

Aus dem Institut für Toxikologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Rolle von Calcium in der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose in Mausfibroblasten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Stefanie Holm
aus Nauen

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 06. Dezember 2022

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis..... | 5 |
| Abbildungsverzeichnis..... | 7 |
| 1 Einleitung..... | 9 |
| 1.1 Allgemeine Einleitung..... | 9 |
| 1.2 Zielsetzung..... | 9 |
| 2 Literaturdiskussion..... | 11 |
| 2.1 Ferroptose..... | 11 |
| 2.1.1 Lipidperoxidation und Eisen..... | 13 |
| 2.1.2 Mitochondriale ROS..... | 14 |
| 2.1.3 <i>t</i> -BuOOH..... | 15 |
| 2.2 Calcium..... | 16 |
| 2.2.1 Zusammenspiel von Calcium, <i>t</i> -BuOOH und Ferroptose..... | 18 |
| 3 Material und Methoden..... | 21 |
| 3.1 Material..... | 21 |
| 3.1.1 Geräte..... | 21 |
| 3.1.2 Verbrauchsmaterialien..... | 22 |
| 3.1.3 Kulturmedien..... | 22 |
| 3.1.4 Chemikalien..... | 23 |
| 3.1.5 Puffer und Lösungen..... | 23 |
| 3.2 Zellbiologische Methoden..... | 26 |
| 3.2.1 Zellkultivierung..... | 26 |
| 3.2.2 Zellpassagierung..... | 26 |
| 3.2.3 Zellzahlbestimmung..... | 27 |
| 3.3 Behandlung der Zellen..... | 29 |
| 3.4 Durchflusszytometrie (FACS)..... | 30 |
| 3.4.1 Messung des Zelltods mittels PI-Färbung/ Annexin V-FITC..... | 30 |
| 3.4.2 Bestimmung des zytosolischen Calcium-Gehalts..... | 31 |
| 3.4.3 Bestimmung der Lipidperoxidation..... | 32 |
| 3.4.4 Messung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP)..... | 33 |
| 3.4.5 Messung der mitochondrialen Superoxide..... | 34 |
| 3.5 Auswertung..... | 35 |
| 4 Ergebnisse..... | 36 |
| 4.1 Morphologische Veränderungen in der Ferroptose..... | 36 |
| 4.2 Einfluss von Calciumkanal-Inhibitoren auf den <i>t</i> -BuOOH-Effekt..... | 38 |
| 4.2.1 Einfluss der Calciumkanal-Inhibitoren 2-APB und CoCl ₂ auf den <i>t</i> -BuOOH-induzierten Zelltod..... | 38 |
| 4.2.2 Einfluss von CoCl ₂ , 2-APB und Thapsigargin (TG) auf den zytosolischen Calciumspiegel..... | 40 |
| 4.2.3 Einfluss von CoCl ₂ und 2-APB auf die Lipidperoxidation..... | 43 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.2.4 | Einfluss von 2-APB auf das mitochondriale Membranpotential (MMP) | 44 |
| 4.3 | Einfluss von Polyethylenglykol (PEG) auf den <i>t</i> -BuOOH-Effekt..... | 45 |
| 4.3.1 | Einfluss von PEG auf den <i>t</i> -BuOOH-induzierten Zelltod..... | 45 |
| 4.3.2 | Einfluss von PEG auf die Staurosporin-induzierte Apoptose..... | 46 |
| 4.3.3 | Einfluss von PEG auf den zytosolischen Ca ²⁺ -Spiegel | 47 |
| 4.3.4 | Einfluss von PEG auf die Lipidperoxidation | 48 |
| 4.4 | Einfluss von BAPTA-AM und Deferoxamin auf den zytosolischen Calciumspiegel und das mitochondriale Membranpotential (MMP)..... | 49 |
| 4.4.1 | Einfluss von BAPTA-AM und Deferoxamin auf den zytosolischen Calciumspiegel | 49 |
| 4.4.2 | Einfluss von BAPTA-AM auf das mitochondriale Membranpotential (MMP)... | 50 |
| 4.4.3 | Einfluss von Deferoxamin auf das mitochondriale Membranpotential (MMP) | 51 |
| 4.5 | Einfluss von Antimycin A auf den <i>t</i> -BuOOH-Effekt | 52 |
| 4.5.1 | Einfluss von Antimycin A auf das mitochondriale Membranpotential..... | 52 |
| 4.5.2 | Einfluss von Antimycin A auf den <i>t</i> -BuOOH(50/ 30µM)-induzierten Zelltod ... | 53 |
| 4.5.3 | Effekt von Antimycin A auf den Erastin-induzierten Zelltod | 55 |
| 4.5.4 | Einfluss von Antimycin A auf die <i>t</i> -BuOOH- und Erastin- induzierte Lipidperoxidation..... | 56 |
| 4.6 | Bildung mitochondrialer Superoxide | 59 |
| 4.6.1 | Einfluss von <i>t</i> -BuOOH auf die Bildung mitochondrialer Superoxide | 59 |
| 4.6.2 | Einfluss von 2-APB, BAPTA-AM und Deferoxamin auf die <i>t</i> -BuOOH-induzierte mitochondriale Superoxidbildung..... | 60 |
| 4.7 | Einfluss von mito-TEMPO auf den <i>t</i> -BuOOH-induzierten Zelltod | 61 |
| 5 | Diskussion | 64 |
| 5.1 | Methodendiskussion | 65 |
| 5.2 | Ergebnisdiskussion | 67 |
| 5.2.1 | <i>t</i> -BuOOH induziert eine partielle Ca ²⁺ -Freisetzung aus dem ER | 67 |
| 5.2.2 | Später Ca ²⁺ -Anstieg von extrazellulär..... | 68 |
| 5.2.3 | Zusammenspiel von Calcium und Eisen..... | 70 |
| 5.2.4 | Einfluss des Mitochondriums | 71 |
| 5.3 | Ausblick..... | 73 |
| 6 | Zusammenfassung | 74 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 76 |
| 8 | Danksagung..... | 88 |
| 9 | Tabellarischer Lebenslauf..... | 89 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|--|
| AMA | Antimycin A |
| 2-APB | 2-Aminoethoxydiphenylborat |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| BAPTA | 1,2-bis(o-aminophenoxyethan-N,N, N', N- tetraessigsäure (Acetoxymethyl verestert) |
| Ca ²⁺ | Calcium (II) |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| C11-BODIPY | C11-BODIPY (581/591) |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CoCl ₂ | Cobaltdichlorid |
| DF | Deferoxamin |
| DiOC ₆ | 3,3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's Medium; Zellkultur-Nährlösung |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | desoxyribonucleic acid |
| DSB | double-strand-break |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| FACS | Fluorescent activated cell sorting |
| FCCP | Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon |
| Fe ²⁺ | Eisen (II) |
| FBS | Fetal bovine serum; fetales Kälberserum |
| FS | Ferrostatin-1 |
| FLUO-4-AM | N-[4-[6-[(Acetyloxy)methoxy]-2,7-difluoro-3-oxo-3H-xanthen-9-yl]-2-[2-[2-[bis[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]amino]-5-methylphenoxy]ethoxy]phenyl]-N-[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]glycine (acetyloxy)methyl ester |
| Gln | Glutamin |
| GSH | Glutathion |
| GPX4 | Glutathionperoxidase |
| H | Wasserstoff |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| IPP | Isopentenylpyrophosphat |
| l | Liter |
| LIP | labile iron pool, labiler Eisenpool |

| | |
|-----------------|---|
| L-ROS | Lipid reactive oxygen species; lipidreaktive Sauerstoffspezies |
| LOX | Lipoxygenase |
| LPO | Lipidperoxidation |
| LX | Liproxstatin-1 |
| MAM | Mitochondrien-assoziierte-Membranen |
| ml | Milliliter |
| MMP | Mitochondriales Membranpotential |
| mM | Millimolar |
| µl | Mikroliter |
| µM | Mikromolar |
| PBS | Phosphate buffered saline; Phosphat-gepufferte Elektrolytlösung |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PI | Propidiumiodid |
| ROS | Reactive oxygen species |
| RSL-3 | RAS-selective Lethal 3 |
| RT | Raumtemperatur |
| SR | Sarkoplasmatisches Retikulum |
| s. Abb. | siehe Abbildung |
| <i>t</i> -BuOOH | tert-Butylhydroperoxid |
| TG | Thapsigargin |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| Vgl | Vergleich |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1 Angriffspunkte verwendeter Inhibitoren/ Entkoppler/ Chelatoren..... | 10 |
| Abbildung 2 Ferroptosemechanismus schematisch und gekürzt dargestellt | 12 |
| Abbildung 3 Überblick über die Eisen-katalysierte LPO und die Bildung von Lipid- Radikalen angelehnt an Abb.1 von Cheng and Li (Cheng and Li, 2007)..... | 14 |
| Abbildung 4 Calciumkonzentrationen ($[Ca^{2+}]$) von extrazellulär und verschiedener Zellkompartimente | 16 |
| Abbildung 5 Intrazelluläre Calciumströme und Calciumkanäle innerhalb der Zelle..... | 18 |
| Abbildung 6 Neubauer-Zählkammer und Auszählen der Zellen mithilfe eines Hämocytometers | 28 |
| Abbildung 7 Lichtmikroskopische Aufnahme von NIH3T3-Zellen: Kontrolle und nach <i>t</i> -BuOOH-Behandlung | 36 |
| Abbildung 8 Lichtmikroskopische Aufnahmen <i>t</i> -BuOOH-behandelter NIH3T3-Zellen mit starker Vergrößerung..... | 37 |
| Abbildung 9 Einfluss von Cobalt(II)-chlorid auf den <i>t</i> -BuOOH-induzierten Zelltod | 38 |
| Abbildung 10 Einfluss von 2-APB auf den <i>t</i> -BuOOH-induzierten Zelltod | 39 |
| Abbildung 11 Einfluss von $CoCl_2$ auf den <i>t</i> -BuOOH-induzierten Calciumanstieg in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer (Kinetik)..... | 40 |
| Abbildung 12 Einfluss von 2-APB auf den <i>t</i> -BuOOH-induzierten Calciumanstieg | 41 |
| Abbildung 13 Einfluss von Thapsigargin auf den zytosolischen Calciumspiegel..... | 42 |
| Abbildung 14 Einfluss von 2-APB und $CoCl_2$ auf die Lipidperoxidation | 43 |
| Abbildung 15 Einfluss von 2-APB auf den <i>t</i> -BuOOH-induzierten MMP-Abfall | 44 |
| Abbildung 16 Einfluss von PEG auf den <i>t</i> -BuOOH-induzierten Zelltod | 45 |
| Abbildung 17 Einfluss von PEG auf die Staurosporin-induzierte Apoptose..... | 46 |
| Abbildung 18 Einfluss von PEG auf den <i>t</i> -BuOOH-induzierten zytosolischen Calciumanstieg..... | 47 |
| Abbildung 19 Einfluss von PEG auf die <i>t</i> -BuOOH-induzierte Lipidperoxidation | 48 |
| Abbildung 20 Einfluss von BAPTA-AM und Deferoxamin auf den zytosolischen Calciumspiegel | 49 |
| Abbildung 21 Einfluss von BAPTA-AM auf den <i>t</i> -BuOOH-induzierten MMP-Abfall..... | 50 |
| Abbildung 22 Einfluss von Deferoxamin auf den <i>t</i> -BuOOH-induzierten MMP-Abfall | 51 |
| Abbildung 23 Einfluss von Antimycin A auf das mitochondriale Membranpotential.... | 52 |
| Abbildung 24 Einfluss von Antimycin A auf den <i>t</i> -BuOOH (50 μ M)-induzierten Zelltod nach 2h, 4h und 6h..... | 53 |
| Abbildung 25 Einfluss von Antimycin A auf den <i>t</i> -BuOOH (30 μ M)-induzierten Zelltod | 54 |
| Abbildung 26 Einfluss von Antimycin A auf den Erastin-induzierten Zelltod | 55 |

| | |
|---|-----------|
| Abbildung 27 Einfluss von Antimycin A auf die <i>t</i>-BuOOH (50 μM)- und Erastin-induzierte Lipidperoxidation | 56 |
| Abbildung 28 Einfluss von Antimycin A auf die <i>t</i>-BuOOH (30μM)-induzierte Lipidperoxidation (Balkendiagramm) | 57 |
| Abbildung 29 Einfluss von Antimycin A auf die <i>t</i>-BuOOH (30μM)-induzierte Lipidperoxidation (Histogramm) | 58 |
| Abbildung 30 Einfluss von <i>t</i>-BuOOH auf mitochondriale Superoxide | 59 |
| Abbildung 31 Einfluss von 2-APB, BAPTA-AM und DF auf die mitochondriale Superoxidbildung | 60 |
| Abbildung 32 Einfluss von mito-TEMPO auf den <i>t</i>-BuOOH (50μM)-induzierten Zelltod | 61 |
| Abbildung 33 Einfluss von mito-TEMPO auf den <i>t</i>-BuOOH (30μM)-induzierten Zelltod | 62 |
| Abbildung 34 Schematische Ergebnisdarstellung | 63 |

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Rolle von Calcium in der Ferroptose, einem speziellen Zelltod, der in dieser Arbeit durch die organische Verbindung *tertiär-Butylhydroperoxid* (*t*-BuOOH) induziert wurde.

Die Ferroptose beschreibt eine besondere Form des regulierten nekrotischen Zelltods, der eisenabhängig ist und nicht apoptotisch abläuft. Kennzeichnend ist dabei eine gesteigerte Bildung von Phospholipidhydroperoxiden, was sich toxisch auf die Zelle auswirkt. Diese schädlichen Prozesse auf die Zelle spiegeln sich in diversen Pathologien wider, wie z.B. neurodegenerativen Erkrankungen oder Ischämien. Auch die Rolle der Ferroptose in der Krebstherapie bei apoptoseresistenten Tumoren gewinnt aktuell immer mehr an Bedeutung in der Forschung.

In vorausgegangenen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass *t*-BuOOH-Behandlung in verschiedenen Zelllinien zu einem intrazellulären Anstieg von Ca^{2+} führt. Die Beobachtung, dass der Calcium-Chelator BAPTA-AM die *t*-BuOOH-induzierte Ferroptose hemmt, spricht für eine zentrale Rolle von Ca^{2+} . Bislang wurde noch nicht untersucht, aus welchem(n) Kompartiment(en) Ca^{2+} freigesetzt wird und welche Funktion Ca^{2+} in der Ferroptose ausübt.

1.2 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll die Freisetzung und Funktion des zytosolischen Calciumanstiegs während der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose in der murinen Fibroblastenlinie NIH3T3 untersucht werden.

Mit diversen Calciumkanalinhibitoren soll die Herkunft des Calciums analysiert werden, u.a. ob und wie der Weg des Calciums von extra- nach intrazellulär erfolgt und/ oder von intrazellulären Strukturen ins Zytosol freigesetzt wird (s. Abb. 1). So kann 2-Aminoethyl-diphenylborinat (2-APB) die IP_3 -Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum hemmen. Zusätzlich wurde bereits in diverser Literatur nachgewiesen, dass 2-APB auch die SOCE-Kanäle („store-operated-channels-entry“) hemmt und somit den extrazellulären Calciumeinstrom verhindert (Dobrydneva and Blackmore, 2001, Parekh and Penner, 1997). Die Aktivierung dieser sog. SOCE-Kanäle an der äußeren Membran erfolgt physiologisch erst, nachdem die Calciumspeicher des endoplasmatischen Retikulums entleert wurden, um diese wieder mit Calcium aufzufüllen. Thapsigargin (TG) kann über die Hemmung der SERCA-ATPase das endoplasmatische Retikulum an Ca^{2+} depletieren.

Cobalt(II)-chlorid (CoCl_2) und Polyethylenglykol (PEG) inhibieren den Calciumeinstrom von extrazellulär über Kanäle bzw. Poren. Zusätzlich sollen der Calciumchelator BAPTA-AM und der Eisenchelator Deferoxamin (DF) in Bezug auf die Ferroptose und die Calciumfreisetzung untersucht werden.

Außerdem soll der Einfluss von Calcium auf die *t*-BuOOH-induzierte Lipidperoxidation, ROS-Produktion und das mitochondriale Membranpotenzial (MMP) in NIH3T3 Zellen analysiert werden. Der spezielle Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette Antimycin A (AMA) soll zusätzlich Informationen über die Aufgabe des Mitochondriums in Zusammenspiel mit der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose liefern. Antimycin A hemmt den Komplex III der Atmungskette. Abschließend sollte der Einfluss von mito-TEMPO, einem mitochondrialen Radikalfänger (mitochondrialer Superoxide), auf den *t*-BuOOH induzierten Zelltod untersucht werden.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, den Mechanismus der Ferroptose besser zu verstehen. Ein besseres Verständnis der Ferroptose könnte dazu beitragen, evtl. neue Zielstrukturen zur Therapie diverser Pathologien zu finden, z.B. neurodegenerative Erkrankungen, ischämisch bedingte Durchblutungsstörungen bzw. -verletzungen, aber auch Krebserkrankungen.

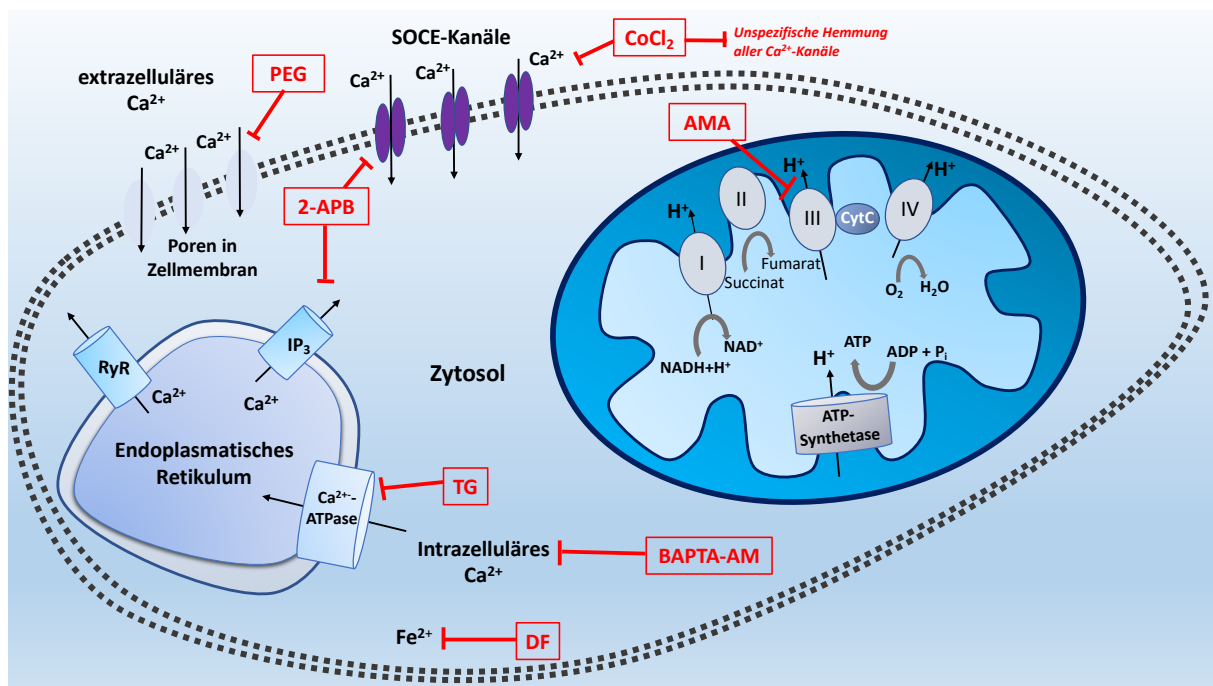


Abbildung 1 Angriffspunkte verwendeter Inhibitoren/ Entkoppler/ Chelatoren

Dargestellt ist eine schematische Graphik zur Veranschaulichung der untersuchten Angriffspunkte an Zielstrukturen innerhalb der NIH3T3 Zellen durch die in rot gekennzeichneten Substanzen. Die Komplexe der Atmungskette sind mit I, II, III und IV beschriftet. AMA- Antimycin A; 2-APB- 2-Aminoethyl-diphenylborinat; CoCl_2 - Cobalt(II)-chlorid; DF- Deferoxamin; PEG- Polyethylenglykol; TG- Thapsigargin

2 Literaturdiskussion

2.1 Ferroptose

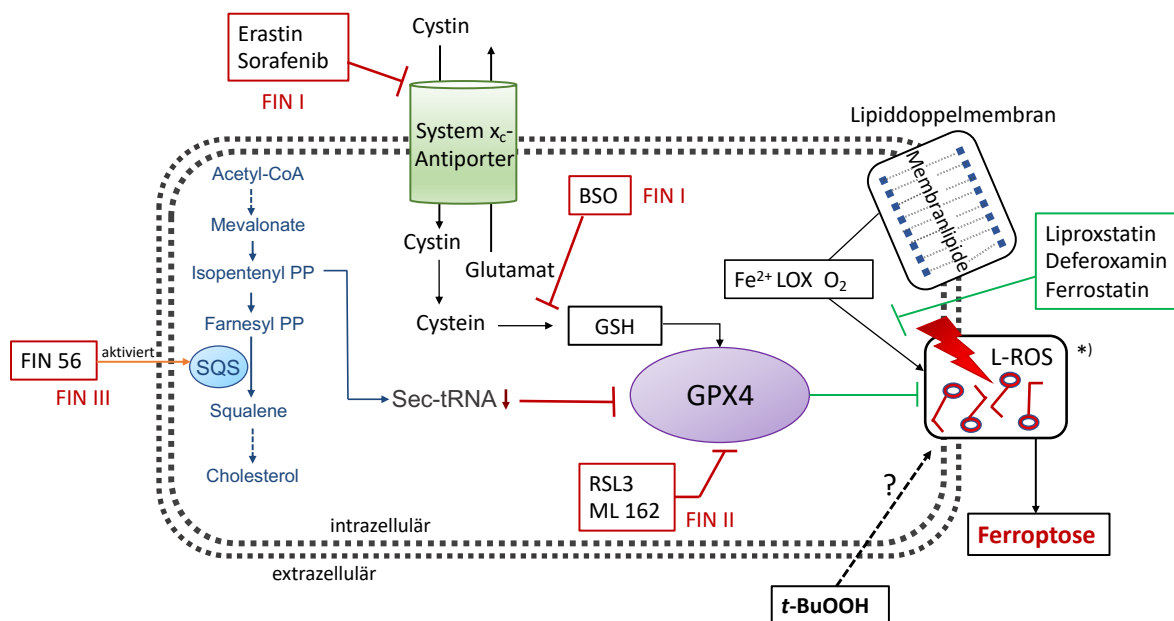
Ferroptose ist eine erst 2012 beschriebene regulierte Form des Nekrosezelltods, der nicht apoptotisch, aber eisenabhängig abläuft und mit einer Akkumulation zelltoxischer Lipidhydroperoxide einhergeht (Dixon et al., 2012, Galluzzi et al., 2018, Stockwell et al., 2017, Conrad et al., 2018). Die Homöostase der Zellfunktionen zwischen Lipidperoxidation und detoxifizierenden Mechanismen ist hierbei gestört und führt zu einer Desintegration der Zellmembran.

Die morphologischen Veränderungen durch Ferroptose ähneln denen der Nekrose in Form von einer zytoplasmatischen Schwellung (Onkose), dem Verlust von Plasmamembranintegrität und einer Schwellung der zytoplasmatischen Organellen (Berghe et al., 2014). Schließlich kann man bei der Ferroptose eine Abrundung und Ablösung der Zellen beobachten sowie das Auftreten einzelner Schwellungsblasen (Pedrera et al., 2020, Abrams et al., 2016).

Ferroptose kann unterschiedlich ausgelöst werden. Aktuell werden zwei Hauptmechanismen beschrieben: 1.) der extrinsische oder Transporter-abhängige Mechanismus und 2.) der intrinsische oder Enzym-regulierte Mechanismus (Tang et al., 2021). So zählt eine Hemmung der Cyst(e)inaufnahme über das System xc- (einem Cystin-Glutamat-Antiporter) in die Zelle zum extrinsischen Mechanismus. Hier führt eine verringerte Aufnahme von Cyst(e)in zu einer verringerten Synthese des Cofaktors GSH und damit zu einer reduzierten Aktivität des besonders wichtigen Enzyms, der Glutathionperoxidase 4 (GPX4). Die GPX4 hat in der Zelle eine zentrale entgiftende Funktion, indem sie zelltoxische Lipidhydroperoxide in nicht toxische Lipidalkohole reduziert. Zum intrinsischen Mechanismus gehört eine direkte Hemmung der GPX4.

Ferroptose-Induktoren werden in vier Klassen eingeteilt (s. Abb. 2). Zu den FIN I zählen Substanzen, die die GSH-Synthese inhibieren. Dazu gehören z.B. Erastin und Sorafenib, Hemmstoffe des Cystin-Glutamat-Austauschers System xc-. Die direkten GPX4-Hemmer RSL 3 oder ML162 gehören zur Gruppe FIN II. Die Untersuchung des Mechanismus der FIN56-induzierten Ferroptose konnte eine weitere Klasse, FIN III, aufdecken (Shimada et al., 2016). FIN 56 aktiviert die Squalensynthese. Dadurch kommt es zum vermehrten Verbrauch von Farnesylpyrophosphat (FPP), aus welchem über Squalen Cholesterin gebildet wird. Mit dem Verbrauch von FPP steht auch weniger seiner Vorstufe Isopentenylpyrophosphat (IPP) für die Produktion von Sec-tRNA zur Verfügung. Sec-tRNA ist notwendig für den Einbau von Sec (Selenocystein) in die GPX4. Außerdem ist FPP für die Synthese des antioxidativ wirkenden CoQ₁₀ wichtig, sodass es zusätzlich zu einer Depletion von CoQ₁₀ kommt. Shimada et al.

(2016) konnten zeigen, dass CoQ₁₀ vor Ferroptose schützt. FIN IV führen zu einem Anstieg des freien Eisens (Hassannia et al., 2019).



*) hier exemplarische Darstellung der LPO in der Plasmamembran, da genaue Kompartimente der stattfindenden LPO noch unbekannt sind

Abbildung 2 Ferroptosemechanismus schematisch und gekürzt dargestellt

GPX4- Glutathionperoxidase 4; RSL3- Ras-selective-lethal small molecule 3; GSH- Glutathion; L-ROS- Lipid-reaktive-oxidative-Phospholipide; BSO-Buthioninsulfoximin, LOX- Lipoxygenase; O₂-Sauerstoff; Fe²⁺- Eisen (II), FIN-Ferroptoseinduktoren (Klasse I,II,III), PP- Pyrophosphat, SQS- Squalensynthase

Radikalfänger wie Liproxstatin und Ferrostatin (Zilka et al., 2017, Miotto et al., 2020), aber auch der Eisenchelator Deferoxamin (Xie et al., 2016) können die Ferroptose aufheben. Trolox, ein Vitamin E-Derivat (α -Tocopherol), wird als schwächerer Radikalfänger zur Hemmung der Ferroptose dargestellt (Skouta et al., 2014, Valgimigli and Pratt, 2015). Zusätzlich konnte erst kürzlich von der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Zell-Zell-Kontakte vor dem *t*-BuOOH-induzierten Zellschaden und der Ferroptose *in vitro* schützen können (Wenz et al., 2019).

Ferroptose spielt in Zusammenhang mit verschiedenen Pathologien eine wichtige Rolle, z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, aber auch bei der Ischämie (Angelova et al., 2020, Dobrydneva and Blackmore, 2001, Friedmann Angeli et al., 2014, Ashraf and So, 2020). Zusätzlich stellt Ferroptose einen neuen Angriffspunkt in der Krebstherapie bei apoptoseresistenten Tumoren dar. So konnten Badgley et al. (2020) zeigen, dass Ferroptose in Pankreastumoren in Mäusen durch Cysteinmangel ausgelöst werden kann (Badgley et al., 2020).

2.1.1 Lipidperoxidation und Eisen

Für die Peroxidation stellen die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) in Phospholipiden der Zellmembranen besonders günstige Ziele für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) dar. LPO steht in Zusammenhang mit diversen Pathologien, wie Entzündungen, Krebs oder Arteriosklerose, durch Veränderungen der Membranfluidität, Verlust der Kompartimentierung und der Plasmamembranintegrität sowie der Störung der Ionenverteilung und Beeinträchtigung von Lipid-Protein-Interaktionen (Nicholls and Hazen, 2009). Lipidhydroperoxide sind außerdem potente Inhibitoren der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung (Rice-Evans and Burdon, 1993, Watanabe and Nakamura, 1979).

Man unterscheidet die radikalische und enzymatische (nicht-radikalische) Reaktion der LPO.

Die radikalisch initiierte Kettenreaktion der LPO (s. Abb. 3) wird in drei Teile gegliedert: Initiation, Propagation und Terminierung (Yin et al., 2011). Den Beginn der Kettenreaktion stellt die Entfernung eines Wasserstoffatoms (H) von der reaktiven Methylengruppe der Lipide dar. Dieser Schritt der H-Abstraktion hinterlässt ein ungepaartes Elektron am Kohlenstoffatom der Methylengruppe, was die Umlagerung der an die Methylengruppe angrenzenden Doppelbindungen fördert und Alkylradikale erzeugt (Gaschler and Stockwell, 2017, Cheng and Li, 2007).

Innerhalb der Kettenreaktion kommt es in Gegenwart von Sauerstoff zu einer Reaktion der Alkylradikale zu Peroxylradikalen ($\text{LOO}\cdot$), die wiederum ein Wasserstoffatom entfernen können, um Lipidperoxide (LOOH) zu erzeugen und dabei die Reaktionen fortzusetzen. Das entstandene LOOH kann anschließend in Anwesenheit von aktiven Eisenionen gespalten werden und bildet reaktivere Spezies wie $\text{LOO}\cdot$, Alkoxy- ($\text{LO}\cdot$) oder Epoxyperoxylradikal ($\text{OLOO}\cdot$). Diese Spezies können wiederum H-Atome aus dem Lipid abspalten, um die LPO zu propagieren oder die Kettenreaktion durch Dimerisierung zu beenden. Daneben entstehen reaktive Produkte, die auch Proteine und DNA angreifen und so oxidative Schäden und Protein/DNA-Querverbindungen verursachen (Łuczaj and Skrzydlewska, 2003).

Eisen ist aufgrund seines hohen Redoxpotentials ein wichtiger Katalysator der LPO. Neben der oben beschriebenen Rolle während der Propagationsphase kann Eisen jedoch auch als Initiator fungieren, wobei der zugrundeliegende Mechanismus nicht völlig geklärt ist (Vanden Berghe et al., 2014, Hershko et al., 1998). Möglicherweise kann Eisen in Form von hypervalenten Eisenkomplexen als Initiator der LPO bei der Entfernung des Wasserstoff-Atoms fungieren (Cheng and Li, 2007).

Eisen kann als Fe^{2+} oder Fe^{3+} vorliegen und ist in Form eines zellulären labilen Eisenpools (LIP) an Stoffwechselprozessen der Zelle beteiligt. Ein erhöhter LIP kann zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen (s.u.), was schließlich zur Membranruptur führen kann (Kakhlon and

Cabantchik, 2002, Petrat et al., 2002). Ein übermäßiger Anstieg des LIP kann mittels Ferritin durch Speicherung von Eisen verhindert werden (Harrison and Arosio, 1996). Während der Ferroptose wurde beschrieben, dass Ferritinophagie als lysosomaler Abbau des Ferritins stattfindet und so die Cysteinmangel-induzierte Ferroptose zu verstärken scheint (Gao et al., 2016, Hou et al., 2016). Außerdem enthalten Lipoxygenasen in ihrem katalytischen Zentrum Eisen, das für deren Aktivität essentiell ist. Lipoxygenasen sind zumindest unter bestimmten Umständen neben anderen Enzymen, wie Cytochrom P450 Oxidoreduktase POR (Zou et al., 2020, Yan et al., 2021) für die enzymatische LPO innerhalb der Ferroptose verantwortlich (Bayir et al., 2020).

Beide Arten der LPO können nebeneinander ablaufen und vermögen sich gegenseitig zu verstärken (Nigam and Schewe, 2000).

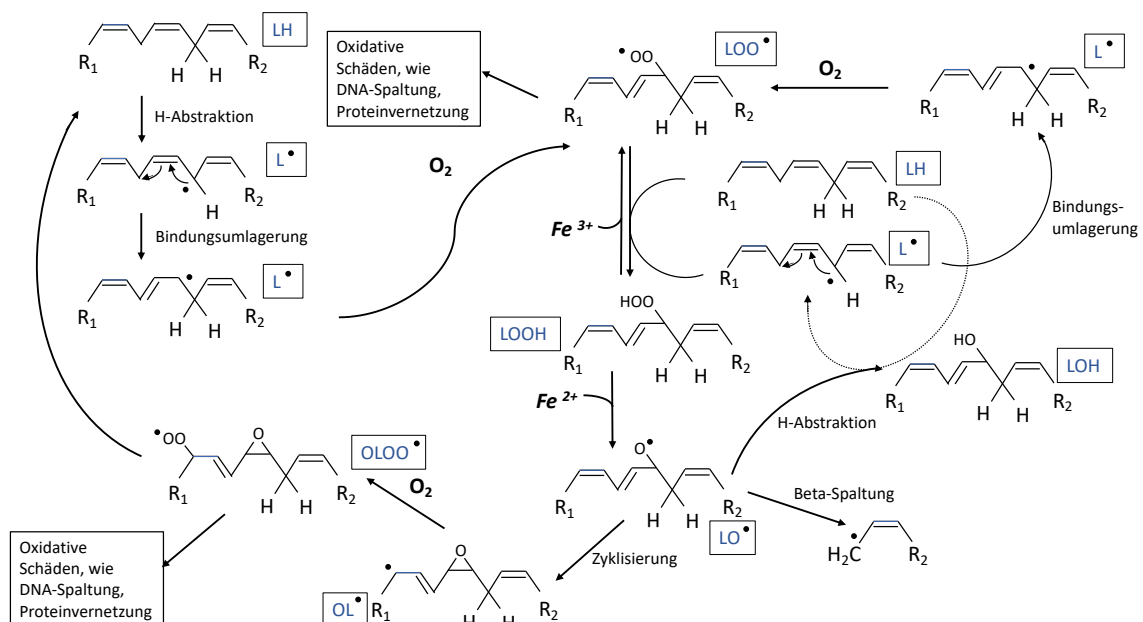


Abbildung 3 Überblick über die Eisen-katalysierte LPO und die Bildung von Lipid-Radikalen angelehnt an Abb.1 von Cheng and Li (Cheng and Li, 2007)

2.1.2 Mitochondriale ROS

Reaktive Sauerstoffspezies, sog. ROS, stellen ein Nebenprodukt des aeroben Stoffwechsels dar und umfassen Superoxidanionen ($O_2^{\bullet -}$), Hydroxylradikale (OH^\bullet), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und singulären Sauerstoff (1O_2). Die wichtigste Quelle für ROS stellen der mitochondriale Stoffwechsel und die NADPH-Oxidase (NOX) an der Zellmembran dar. Die Superoxidanionen werden durch die Elektronentransportkette an der inneren Mitochondrienmembran erzeugt. Die Produktion der Superoxidanionen ist von dem inneren Transmembranpotential der Mitochondrien abhängig (Tang et al., 2021). Die

Superoxiddismutase wandelt die Superoxidanionen in H_2O_2 um, welches dann ins Zytosol diffundieren kann. Vermehrt anfallendes Eisen begünstigt die Reaktion von H_2O_2 in hochreaktive Sauerstoff-Radikale (Gao et al., 2019). Eisen kann dann als Katalysator die sog. Fenton-Reaktion befeuern, die eine Bildung von Hydroxylradikalen durch die Reduktion von Wasserstoffperoxid beschreibt und als Quelle für die Produktion zellulärer ROS gilt.

2.1.3 *t*-BuOOH

Tertiär-Butylhydroperoxid (*t*-BuOOH) zählt zu den organisch-chemischen Verbindungen, die der Gruppe der Hydroperoxide angehört und in Form einer farblosen, stechenden Flüssigkeit vorkommt. Es ist als starkes Oxidationsmittel bekannt, das oxidativen Stress verursachen und auch zur Entstehung von Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal, Endprodukte der LPO, führen kann (Ayala et al., 2014, Garcla-Cohen et al., 2000). Schon früh wurde erkannt, dass *t*-BuOOH die Lipidperoxidation und den Zelltod in Hepatozyten von Ratten auslöst (Rush et al., 1985, Bellomo et al., 1982).

Erst 2018 wurde in der Arbeitsgruppe gezeigt, dass diese organische Verbindung Ferroptose in murinen (NIH3T3) und humanen Zellen (HaCaT und Caco-2) auslösen kann (Wenz et al., 2018, Wenz et al., 2019, Dissertation Wenz, 2019). Dieser Auslösemechanismus scheint jedoch nicht dem kanonischen Weg der Ferroptose zu folgen und ist noch nicht komplett entschlüsselt. Einerseits kann die GPX4 *t*-BuOOH zu einem Alkohol reduzieren, was zu einem Abfall des intrazellulären GSH und zu oxidativen Stress führen kann. Andererseits kann eine Umwandlung von *t*-BuOOH analog zur Fenton-Reaktion stattfinden, die eine Reaktionskette weiterer Radikale nach sich zieht (Bartoli et al., 1994, Davies, 1989, Kennedy et al., 1992). Auch eine enzymatische Bildung von Radikalen zu Alkyl-, Alkoxy- und Peroxy-Radikalen ist beschrieben (Barr and Mason, 1995, Davies, 1989, Kennedy et al., 1992, Belikova et al., 2009), wobei die beteiligten Enzyme bzw. zugrundeliegenden Mechanismen nur teilweise bekannt sind.

Die bisherigen Daten (unveröffentlicht) konnten zeigen, dass die *t*-BuOOH-induzierte Ferroptose calciumabhängig abläuft. So wurde in der Dissertationsarbeit von Christine Wenz (2019) bereits ein signifikanter zytosolischer Calciumanstieg während der Ferroptose beobachtet. Umgekehrt kann die Ferroptose durch den Calciumchelator BAPTA-AM nahezu vollständig aufgehoben werden. Welche Rolle Calcium in der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose spielt, ist bisher noch nicht geklärt.

2.2 Calcium

Calcium stellt ein vielseitiges Molekül dar, das ubiquitär im menschlichen Organismus vorkommt und in vielen physiologischen Prozessen einer Zelle elementare Funktionen übernimmt, wie z.B. die Muskelkontraktion, das Zellwachstum, Regulation von Enzymen, die neuronale Erregbarkeit und die Expression von Genen (Marchi et al., 2018, Zahiragic´S., 2010, Lang, 2019, Berridge et al., 2000).

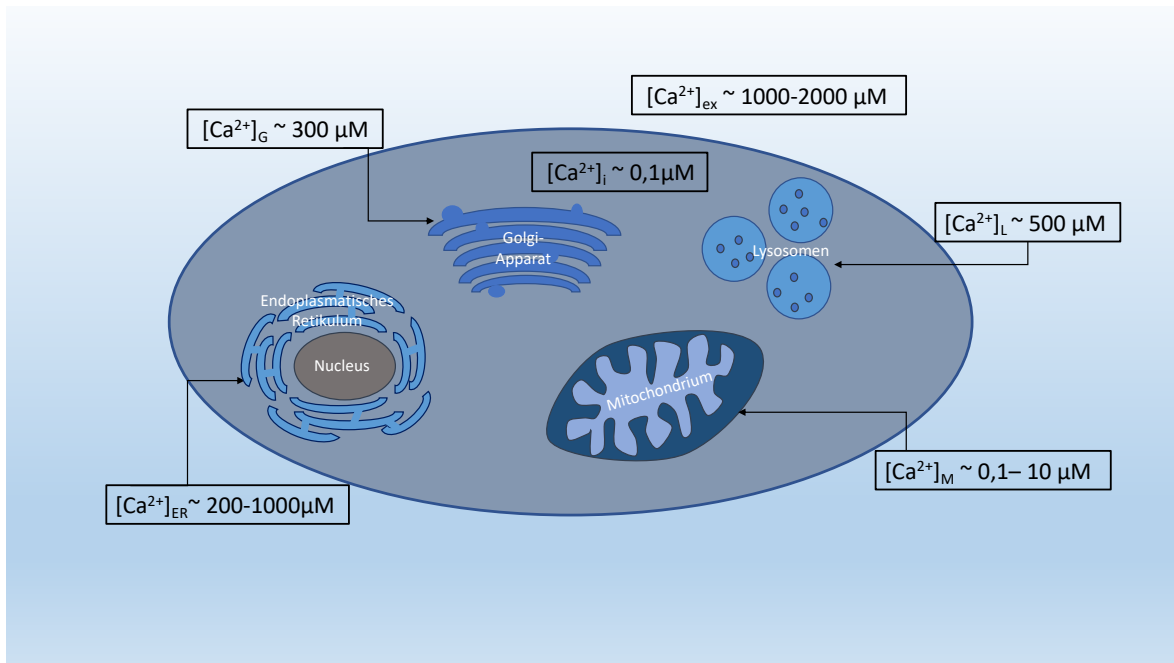


Abbildung 4 Calciumkonzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]$) von extrazellulär und verschiedener Zellkompartimente

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ - intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ - extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{G}}$ - Ca^{2+} -Konzentration im Golgi-Apparat, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$ - mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ - Ca^{2+} -Konzentration im endoplasmatischen Retikulum; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{L}}$ - Ca^{2+} -Konzentration in den Lysosomen

Hierbei halten Calciumströme von extra- nach intrazellulär und umgekehrt je nach Gegebenheit die physiologische Calciumhomöostase der Zelle aufrecht. Calciumsignale unterliegen gewissen Schwankungen (Verkhratsky, 2007). Dabei spielt die zeitliche Abfolge der sogenannten Calcium-Oszillationen eine wichtige Rolle. Eine intermittierend kurzfristige Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration kann die Expression von Genen und die Zellproliferation antreiben (Bellomo et al., 1982, Bente et al., 2006). Eine dauerhafte intrazelluläre Akkumulation dagegen kann die Zellmembran schädigen und letztlich auch zum programmierten Zelltod führen. Die intrazelluläre Speicherung des Calciums übernehmen unterschiedliche Zellorganellen, wie z.B. das endoplasmatische Retikulum, das sarkoplasmatische Retikulum und während pathologischer Prozesse vermehrt auch das Mitochondrium (s. Abb. 4). Die verschiedenen Calciumkonzentrationen der verschiedenen

Zellkompartimente und auch von extra- und intrazellulär ermöglichen schnelle Ca^{2+} -Flüsse (Christensen et al., 2002).

Das mitochondriale Calcium hat eine besonders wichtige Rolle, da es zur Energiegewinnung in Form von ATP und auch innerhalb des Citratzyklus, nämlich zur Bildung von NADH, unabdingbar ist. Im Mitochondrium befinden sich diverse Calciumkanäle (s. Abb.5). Der Hauptmechanismus für die mitochondriale Calciumaufnahme erfolgt durch den Calcium-Uniporter, welcher sensitiv gegenüber Rutheniumrot ist (Ying et al., 1991, Gunter and Pfeiffer, 1990, Peng and Jou, 2010, Korkotian and Segal, 1996). Darüber hinaus ist mitochondriales Calcium aber auch an pathophysiologischen Prozessen beteiligt. So kommt es z.B. während der Apoptose durch einen intramitochondrial vermittelten Calciumanstieg zum Anschwellen des Mitochondriums, was zum Öffnen der mPTP (mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore), zur Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren wie Cytochrom C und schließlich zum Untergang der Zelle führt (Brookes et al., 2004). Bereits 2004 beschrieben Brookes, P. et al. die sog. „two-hit“-Hypothese, die besagt, das Ca^{2+} zusammen mit einem pathogenen Stimulus zu einer Dysfunktion des Mitochondriums führt, welche mit erhöhter ROS-Produktion und dem anschließenden Zelltod einhergeht.

Desweiteren sind zwei weitere Mechanismen der Calcium-Aufnahme aus dem Zytosol in das Mitochondrium bekannt:

- 1) Der schnelle Calciumaufnahmemodus („rapid-mode uptake“) findet im Gegensatz zur Calciumaufnahme über den Calciumuniporter innerhalb von Millisekunden statt und bedingt schnelle, selbstlimitierende Veränderungen der intramitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration (Buntinas et al., 2001)
- 2) Die Calciumaufnahme über Ryanodinrezeptoren (mRyR), die sich an der inneren Mitochondrienmembran erregbarer Zellen befinden.

Zusammen scheinen diese zwei Mechanismen an die Veränderungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration gekoppelt zu sein und die oxidative Phosphorylierung so zu stimulieren. Umgekehrt findet der hauptsächlichliche Ca^{2+} -Ausstrom über den Austausch mit Na^+ statt, welches wiederum im Austausch gegen Protonen aus der Matrix gepumpt wird. Der zusätzliche Ausstrom über die mPTP (mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore) setzt Ca^{2+} aus der Matrix frei. Bereits 1976 beschrieben Haworth & Hunter den calciumabhängigen Mechanismus der mPTP. Die mPTP setzt sich aus Proteinen zusammen, die sich in der inneren und äußeren Mitochondrienmembran befinden und beherbergt diverse Ca^{2+} -Bindungsstellen, die die Porenaktivität regulieren sollen (Brookes et al., 2004). Die verlängerte Öffnung der mPTP findet aufgrund einer mitochondrialen Ca^{2+} -Überladung statt und hat eine pathologische Konsequenz der Zelle zur Folge (Peng and Jou, 2010).

Neben dem Mitochondrium speichert das endo/ sarkoplasmatische Retikulum das meiste intrazelluläre Calcium. Ermöglicht durch die enge Lagebeziehung zwischen Mitochondrium und endoplasmatischem Retikulum gewährleisten spezielle Areale, sog. Mitochondrien-assoziierte Membranen (MAM`s) eine schnelle Calciumkommunikation zwischen beiden Zellkompartimenten (Missirolì et al., 2018, Morciano et al., 2018, Yang et al., 2020). Diese unmittelbare Kommunikationsebene ermöglicht einen schnellen Anstieg des Calciums im Mitochondrium, was auch eine gesteigerte ROS-Produktion zur Folge hat (Marchi et al., 2018, Ivanova et al., 2017).

Weiterhin setzt das ER Calcium ins Zytosol über IP₃-Rezeptoren und Ryanodinrezeptoren frei, wo das Calcium dann u.a. als „second messenger“ funktionieren kann. Über die Ryanodinrezeptoren findet die Calcium-induzierte Freisetzung statt, die durch eine zytosolische Ca²⁺-Überladung ausgelöst wird (Zalk et al., 2007). IP₃-Rezeptoren werden über den second messenger Inositoltriphosphat aktiviert. Dieses wird durch das Enzym Phospholipase C gespalten, welches selbst durch G_q-Proteine in der Plasmamembran stimuliert wird (Foskett et al., 2007). Die Ca²⁺-Aufnahme zur Speicherung im ER findet über die Ca²⁺-ATPasen (SERCA-Typ) entgegen des Konzentrationsgradienten und unter Energieverbrauch von ATP statt (Koch, 1990).

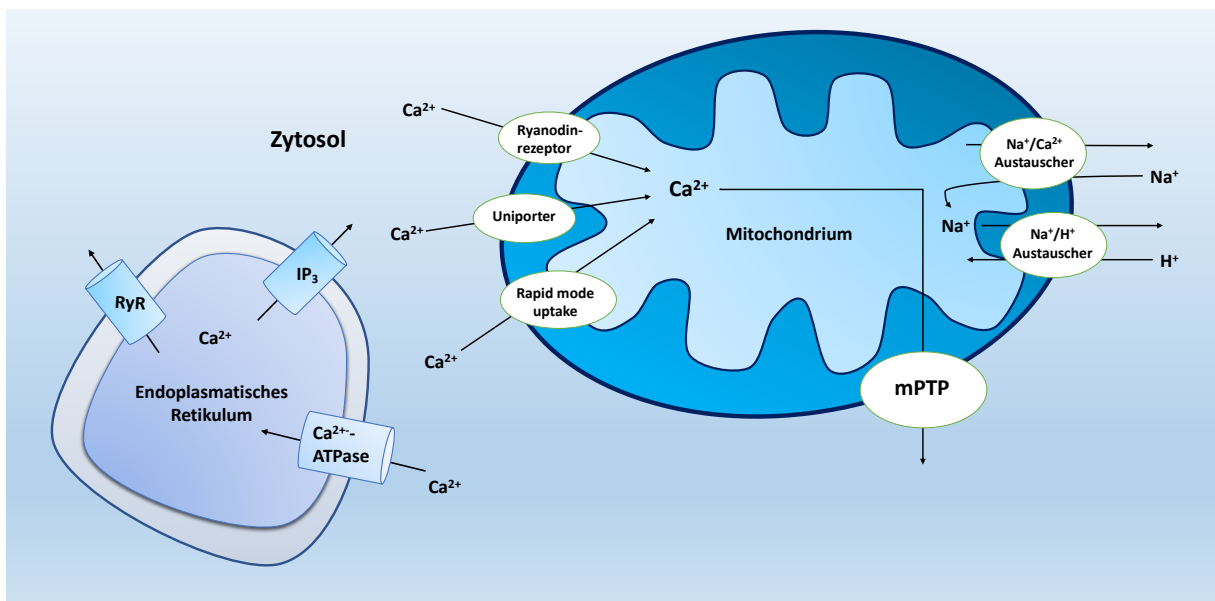


Abbildung 5 Intrazelluläre Calciumströme und Calciumkanäle innerhalb der Zelle

IP₃- Inositol-1,4,5-trisphosphat- Rezeptor, mPTP- mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore, RyR- Ryanodinrezeptor

2.2.1 Zusammenspiel von Calcium, *t*-BuOOH und Ferroptose

In den Untersuchungen von Dixon et al. 2012 zeigten BAPTA-AM, Fura-2 und EGTA keinen Effekt auf die Erastin-induzierte Ferroptose, was für die Autoren gegen eine Funktion des

Calciums innerhalb der Ferroptose sprach (Dixon et al., 2012). Dagegen vergleichen Maher et al. (2018) die oxidative Glutamat-Toxizität in der Hippocampus-Zelllinie HT22 mit dem Ferroptosemechanismus, wo es ebenfalls zu einem späten Ca^{2+} -Einstrom kommt und in diesem Fall als essenziell für das Zelltodprogramm erscheint. Glutamat bewirkt hier eine Hemmung des Systems xc-, welche nach 6-8 h zum Absinken der GSH-Konzentration führt und die Sauerstoffspezies (ROS) exponentiell ansteigen lässt (Maher et al., 2018b). CoCl_2 - ein unspezifischer Ca^{2+} -Kanalinhibitor, der den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} nach intrazellulär verhindert - konnte den durch Glutamat induzierten Zelltod aufheben (Davis and Maher, 1994). In neueren Studien in NIH3T3 Zellen konnte ein Calciumanstieg durch Erastin und RSL-3 nach 4 h nachgewiesen werden (Pedrera et al., 2020). Die Autoren zeigten, dass Osmoprotektiva die Ferroptose (ausgelöst durch RSL-3), aber nicht die Lipidperoxidation verzögern können (Pedrera et al., 2020). Offensichtlich führt Lipidperoxidation in der Zellmembran zur Porenbildung und Einstrom von Calcium. Auch Riegmann und Mitarbeiter konnten während der Ferroptose eine Porenformation von wenigen Nanometern Radius beobachten (Riegman et al., 2020). Darüber hinaus aktiviert Calcium den ESCRT-III-Komplex („endosomal sorting complex required for transport“- endosomaler Sortierkomplex) (Dai et al., 2020). Der ESCRT-III-Komplex aktiviert einen Reparaturmechanismus der Zellmembran und stellt somit ein negatives Feedback für die Auslösung der Ferroptose dar (Dai et al., 2020, Pedrera et al., 2020).

Auch in anderen Zellarten wie z.B. in Makrophagen wurde ein Ca^{2+} -Anstieg bei Behandlung mit *t*-BuOOH im Zytosol beobachtet (Kanupriya et al., 2007, Farghali et al., 2000, Bartoli et al., 1994). Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit dem zeitlichen Zusammenhang des intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegs nach *t*-BuOOH-Behandlung und zeigen die mögliche Herkunft des Calciums. Martinez-Burgos et al. (2006) zeigten nach *t*-BuOOH-Behandlung eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Mitochondrium und nicht-mitochondrialen intrazellulären Calciumspeichern pankreatischer Azinuszellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren einen biphasischen Anstieg: zuerst ein langsamer, initialer Anstieg innerhalb der ersten Minuten und einen zweiten, nachhaltigen Anstieg zu einem späteren Zeitpunkt. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass *t*-BuOOH keinen Calciumanstieg mehr auslösen konnte, wenn sowohl mitochondriale (mittels FCCP) als auch nicht-mitochondriale intrazelluläre Speicher (mittels Thapsigargin) entleert wurden. Dies spricht für eine Freisetzung von Calcium aus den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum. Auch weisen Arbeiten an isolierten Mitochondrien darauf hin, dass *t*-BuOOH durch mitochondriale GPX zu *t*-BOH reduziert wird. Das entstehende GSSG wird durch Glutathionreduktasen reduziert, wobei NAD(P)H zu NAD(P) oxidiert wird, dessen Hydrolyse zur Freisetzung von Calcium aus den Mitochondrien führt (Bellomo et al. 1984).

Auch Farghali et al. (2000) zeigten einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg nach der Behandlung mit *t*-BuOOH in Hepatozyten. Dass dieser *t*-BuOOH induzierte Ca^{2+} -Anstieg aus intrazellulären Speichern stammen könnte, wurde in einer weiteren Arbeit von Rooney et al. (1991) bestätigt, wo speziell das endoplasmatische Retikulum in Hepatozyten untersucht wurde und auch die Entfernung des extrazellulären Calciums den zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg nicht verhindern konnte (Rooney et al., 1991).

Die Beobachtung des Calciumanstiegs nach *t*-BuOOH-Behandlung und dessen Funktion beschäftigt die Forschung schon länger, und die Herkunft des Calciums während des Calciumanstiegs ist noch nicht aufgeschlüsselt. Diese Arbeit versucht den Zusammenhang der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose und dem *t*-BuOOH-induzierten Calciumanstieg in NIH3T3 Zellen zu erörtern und die mögliche Herkunft des Calciums zu überprüfen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

| Geräte | Hersteller |
|--|---|
| Durchflusszytometrie-Geräte: BD FACSCalibur BD FACSCantoll | BD Biosciences, Heidelberg, Germany |
| Inkubator (CO ₂): Heracell 150 | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Gefrierschrank (-20°) | Siemens AG München |
| Kühlschrank (4°) | Liebherr- International, Biberach an der Riß |
| Lichtmikroskop | VWR International, Radnort (PA, USA) |
| MIKROSKOP für Fotos: Rebel | ECHO, San Diego, USA |
| Glas-Zählkammer: Neubauer | Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen |
| Pipetten | Eppendorf Hamburg |
| Pipettierhilfe: Pipetboy acu | Integra Biosciences, Zizers (Schweiz) |
| Sterilwerkbank: NuAire, Typ A2 | Integra Biosciences, Zizers (Schweiz) |
| Stoppuhr | Junghans, Schramberg, Germany |
| Vakuumpumpe | Leybold GmbH, Köln |
| Vortex mixer: Vortex Genie 2 | Bender & Hobein AG, Zürich (Schweiz) |
| Wasserbad | Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel |
| Zentrifuge: Rotana RPC | Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen |

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

| Material | Hersteller |
|--|--|
| Aluminiumfolie Rotilabo® | Carl Roth, Karlsruhe, Germany |
| FACS Röhren | Sarstedt AG & Co.KG, Mümbrecht |
| Gewebekulturschalen: 10 cm/6cm, Cellstar® | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Glaspipetten: 10ml, steril | Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe |
| Kunststoffpipetten: 10ml, steril | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Zellkulturplatten: Multiwell-6-Well-Platten, Cellstar® | Greiner Bio-One GmbH,Frickenhausen |
| Pipettenspitzen steril | Greiner Bio-One GmbH,Frickenhausen |
| Reaktionsgefäße 0,5 / 1,5ml, steril | Eppendorf AG, Hamburg |
| Zentrifugenröhrchen 15 / 15ml, steril | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |

3.1.3 Kulturmedien

| Medium | Hersteller | Modifikation |
|---|------------------------------|---|
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (Kat.-Nr.: 11960044) | Thermo Fischer Scientific | 1% (v/v) PEST 2% (v/v) L-Glutamin 10% (v/v) FBS |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium ohne Phenolrot (Kat.-Nr.: 21063-029) | Thermo Fisher Scientific | |

3.1.4 Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller |
|---|---|
| Annexin V-FITC | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| Antimycin A | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 2-APB | Santa Cruz Biotechnology |
| BAPTA-AM | AAT Bioquest, Sunnyvale (CA USA) |
| C11-BODIPY | Life Technologies, Carlsbad (CA, USA) |
| CoCl ₂ | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Deferoxamin | Tocris Bioscience |
| DiOC ₆ | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| DMSO | AppliChem, Darmstad |
| EDTA | PanReac AppliChem, Darmstadt |
| Erastin | Cayman Chemical, Michigan (USA) |
| Ethanol | Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe |
| FBS | Gibco Life Technologies, Karlsruhe |
| FLUO-4-AM | Life Technologies, Carlsbad (CA, USA) |
| L-Glutamin (200mM) | PAA Laboratories, Pasching (Österreich) |
| Liproxstatin-1 | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| MitoTEMPO | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| MitoSOX™ Red | Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA) |
| PEST: Penicillin (10.000U/ml) / Streptomycin (10mg/ml) - Lösung | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Pluronic F-127 | Life Technologies, Carlsbad (CA, USA) |
| Polyethylenglykol 8000 | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Propidiumiodid | Serva Electrophoresis, Heidelberg |
| <i>t</i> -BuOOH (70%) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Thapsigargin | Cayman Chemical, USA |
| Trypanblau | Serva Electrophoresis, Heidelberg |
| Trypsin (2,5%) | Sigma-Aldrich, Steinheim |

3.1.5 Puffer und Lösungen

| Lösung | Zusammensetzung | Lagerung |
|---------------------|---|-------------------------|
| Annexin-Färbelösung | 2,5 µl Annexin V-FITC ad 50 µl Binding buffer (1x) 5% (v/v) | Dunkel gelagert bei 4°C |

| | | |
|--------------------------------|---|--|
| Antimycin A-Stammlösung | 50 mM und 5 mM in DMSO Arbeitskonzentration: 10/ 30 μ M | Lagerung bei - 20° |
| 2-APB-Stammlösung | 50 mM in DMSO Arbeitskonzentration: 50/ 100 μ M | Lagerung bei - 20°C |
| BAPTA AM-Stammlösung | 5 mM in DMSO Arbeitskonzentration: 5 μ M | Lagerung bei - 20° C |
| Binding-Buffer-Lösung (10x) | 4,09 g NaCl 1,4 M 1,19 g HEPES 100 mM 0,5 g BSA 1% (w/v) 0,18 g CaCl ₂ 25 mM ad 50 ml H ₂ O _{dest} Für die Arbeitskonzentration (1x Binding Buffer) wurde die Stammlösung 1:10 mit H ₂ O _{dest} verdünnt. | Lagerung bei - 20°C Arbeitslösung gelagert bei 4°C bis zu einer Woche |
| C11-BODIPY-Stammlösung | 10 mM in DMSO Arbeitskonzentration: 2 μ M in DMEM ohne Phenolrot | Dunkel gelagert bei - 20 °C |
| CoCl ₂ -Stammlösung | 100 mM in H ₂ O Arbeitskonzentration: 10 mM | Lagerung bei - 20°C |
| DF-Stammlösung | 100 mM in DMSO Arbeitskonzentration: 100 μ M | Lagerung bei - 20°C |
| DiOC ₆ -Stammlösung | 100 μ M in Ethanol Arbeitskonzentration: 20 nM in DMEM ohne Phenolrot | Dunkel gelagert bei - 20°C |
| Erastin-Stammlösung | 10 mM in DMSO Arbeitskonzentration: 1/ 10 μ M | Lagerung bei - 20°C |

| | | |
|--------------------------------|--|--|
| Ethanol | (70%) 700 ml Ethanol ad 1 L H ₂ O _{dest} | Lagerung bei Raumtemperatur |
| FLUO-4-AM- Stammlösung | 2 mM in DMSO (50µg gelöst in 25µl DMSO) Arbeitskonzentration: 2 µM in DMEM ohne Phenolrot | Dunkel gelagert bei - 20°C |
| Liproxstatin-1- Stammlösung | 1 mM in DMSO Arbeitskonzentration: 1 µM | Lagerung bei - 20°C |
| PEG-Stammlösung | 20 mM in DMEM (4mM Glutamin, PEST, kein FBS) Arbeitskonzentration: 10 mM mittels Mediumwechsel | Lagerung bei 4° |
| MitoSOX Red- Stammlösung | 5 mM in DMSO Arbeitskonzentration: 5 µM in DMEM ohne Phenolrot | Dunkel gelagert bei -20°C |
| MitoTempo- Stammlösung | 20 mM in H ₂ O _{dest} Arbeitskonzentration: 2 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM | Lagerung bei -20° C |
| PBS (10x) | 80 g NaCl 1,368 M 4,5 g Na ₂ HPO ₄ 32 mM 2 g KCL 26,8 mM 2 g KH ₂ PO ₄ 14,7 mM ad 1 L H ₂ O _{dest} Für die Arbeitskonzentration (1x PBS) wurde die Stammlösung 1:10 mit H ₂ O _{dest} verdünnt, aliquotiert und durch Autoklavieren sterilisiert. | Der pH wurde auf 7,4 eingestellt. Lagerung bei 4°C |

| | | |
|--|--|-------------------------------------|
| FBS-Lösung zum Abstoppen der Trypsinreaktion | 5 ml FBS ad 50 ml PBS (steril) (10%) | Lagerung bei 4° C mehrere Wochen |
| Propidiumiodid (PI) - Stammlösung | 1 mg/ ml H ₂ O _{dest} Arbeitskonzentration: 1,25 µl PI-Stammlösung /ml PBS | Dunkel gelagert bei 4° C |
| <i>t</i> -BuOOH- Stammlösung | 10 mM in PBS Arbeitskonzentration: 50 µM, 30 µM | Lagerung bei 4°C bis zu einer Woche |
| Trypanblau-Färbelösung | 0,1% in PBS | Lagerung bei Raumtemperatur |
| Trypsin | 0,1 % in PBS | Lagerung bei -20°C |

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

Vor der Verwendung jeglicher Lösungen, werden diese im Wasserbad bei 37°C erwärmt.

Gearbeitet wird mit den Zellkulturen unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank mit laminarem Luftstrom. Die Oberfläche wird stets vor und abschließend nach der Arbeit mit Ethanol (70%) desinfiziert. Die Zellvermehrung, das Zellwachstum sowie die Zellen selbst werden regelmäßig unter dem Mikroskop überprüft.

In einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ werden die NIH3T3 Zellen (embryonale Mausfibroblasten) in 10 ml DMEM (10% FBS) in Gewebekulturschalen (Ø 10 cm) kultiviert. Dabei ist das Medium DMEM zusätzlich zu den 10% FBS mit Penicillin, Streptomycin und Glutamin (4mM) versetzt (s. 3.1.3).

3.2.2 Zellpassagierung

Das Ziel der regelmäßig durchgeführten Zellpassagierung ist, einer Wachstumshemmung durch Kontaktinhibition konfluenten Zellen entgegenzuwirken und somit der Erhalt einer Stammkultur. Von dieser Stammkultur ausgehend werden dann die Zellen für die jeweiligen Versuche ausgesät. NIH3T3 Zellen zählen zu den adhären wachsenden Zellen, die nach 3 Tagen gesplittet werden sollten (Schmitz, 2011). Unter dem Lichtmikroskop wird das

Zellwachstum regelmäßig kontrolliert und vor dem Erreichen einer Konfluenz von > 90 % in die gewünschten Konzentrationen verdünnt (häufig 1:30, 1:20, 1:10).

| Geräte | Materialien | Lösungen |
|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Inkubator • Mikroskop • Pipettierhilfe • Vakuumpumpe • Sterilwerkbank • Wasserbad | <ul style="list-style-type: none"> • Gewebekulturschalen (Ø 10cm) • Kunststoffpipetten, steril (10ml) • Glaspipetten, steril (10ml) • Pasteurpipetten, steril | <ul style="list-style-type: none"> • 0,1% Trypsin • DMEM (10% FBS, 4mM Gln, PEST) • PBS |

Zuerst wird das alte Medium der Zellkultur mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Anschließend wird der Zellrasen mit PBS 1x gewaschen, mit 0,5ml der 0,1%igen Trypsinlösung versehen und für 2-3min bei 37° C inkubiert. Mittels mikroskopischer Kontrolle wird das Ablösen der Zellen sichergestellt. Falls noch Zellen angehaftet sind, können diese durch vorsichtiges Beklopfen der Kulturschale vom Boden abgelöst werden. Die Trypsinaktivität wird durch die Zugabe von 10ml Medium abgestoppt. Schließlich werden die Zellen nun mehrfach gut resuspendiert und in den gewünschten Konzentrationen (z.B. 1:10; dies entspricht 1ml Zellsuspension in 10ml DMEM) auf die bereits mit 10 ml Kulturmedium beschickten Gewebekulturschalen aufgebracht.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mittels Neubauer Zählkammer und dient der Aussaat einer definierten Anzahl an Zellen in 6-Well-Multiwell-Platten bzw. in 6cm Ø Gewebekulturschalen. Dabei wird ein Aliquot der Zellsuspension mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau versetzt. Nur die toten Zellen mit nicht mehr intakter Plasmamembran können diesen sauren Farbstoff aufnehmen und dieser als Anion selektiv an Zellproteine binden. Die intakte Plasmamembran vitaler Zellen kann der Farbstoff wegen seiner molekularen Masse (M=960,8g/mol) hingegen nicht passieren. Daher können bei der Zählung die ungefärbten, lebenden Zellen identifiziert und ausschließlich erfasst werden (Schmitz et al., 2011).

| Geräte | Materialien | Lösungen |
|---|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Mikroskop • Neubauer-Zählkammer • Pipette • Zentrifuge | <ul style="list-style-type: none"> • 6- Well-Multiwell-Platten • 6 cm \emptyset • Gewebekulturschalen • Pipettenspitzen, steril • Zentrifugenröhrchen (10/ 50ml), steril • unsteriles Reaktionsgefäß | <ul style="list-style-type: none"> • 0,1% Trypsin-lösung • 0,1% Trypanblau-Färbelösung • DMEM (10% FBS, 4mM Gln, PEST) • PBS |

Nachdem die mit Trypsin abgelösten Zellen in 10ml DMEM aufgenommen wurden, wird ein Aliquot der Zellsuspension zur Zellzählung in ein Reaktionsgefäß getropft und der Rest der Zellsuspension bei 800 Upm für 10min zentrifugiert.

Währenddessen werden 50 μ l der abgezweigten Zellsuspension mit 50 μ l Trypanblau versetzt, resuspendiert und auf die Zählkammer aufgebracht. Ungefärbte Zellen werden nun unter dem Mikroskop ausgezählt. Zur Ermittlung der Zellzahl: Die Fläche des Eckquadrates, bestehend aus 4 x 4 kleinen Quadraten, beträgt 1 mm². Bei der Auszählung aller 4 Eckquadrate errechnet sich die Zellzahl mittels nachfolgender Formel:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Zellen in allen 4 Eckquadraten} \times F_v \times F_k$$

F_v : Verdünnungsfaktor 2

F_k : Kammerfaktor 2500 (durch den Kammerfaktor wird das Volumen aller 4 Eckquadrate auf 1 ml hochgerechnet)

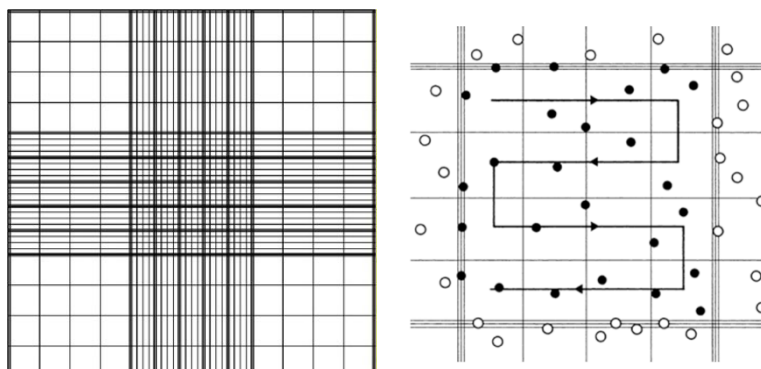


Abbildung 6 Neubauer-Zählkammer und Auszählen der Zellen mithilfe eines Hämocytometers

Quelle: <http://zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>, (Schmitz, 2008) Abb.2.14

Nach der Zentrifugation der Zellsuspension wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10ml DMEM (10% FBS, 4mM Gln, PEST) resuspendiert. Für die Versuche werden die Zellen auf einer 6-Well- Multiwell-Platte in einer Konzentration von 1×10^5 pro Well ($1,04 \times 10^4 / \text{cm}^2$) in 2ml Volumen DMEM (10% FBS, 4mM Gln, PEST) ausgesät. Für die Versuche in den 6cm \emptyset Gewebekulturschalen (für die lichtmikroskopischen Aufnahmen) wurden die Zellen zu $2,2 \times 10^5$ pro Schale in 4ml Volumen DMEM (10% FBS, 4mM Gln, PEST) ausgesät. Im Anschluss werden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Aussaat für die jeweiligen Versuche erfolgte mindestens 20h im Voraus.

3.3 Behandlung der Zellen

Die Behandlung der Zellen richtet sich je nach Versuch nach einem bestimmten Protokoll (s.u.). Für die Auswertung der Versuche am FACSCanto II zur Calciumfreisetzung, zur Lipidperoxidation, zum mitochondrialen Membranpotential und zu mitochondrialen Superoxiden werden die Zellen nach entsprechender Behandlung /Färbung mittels Trypsin 0,1% abgelöst, in 1ml PBS/ 10% FBS aufgenommen, resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die FACS-Röhrchen selbst werden vorab mit 1ml PBS/ 10% FBS versetzt.

Bei der Zelltodmessung (PI-Färbung, Annexin V-FITC – Färbung) wird vor dem Trypsinieren der Zellen der Zellüberstand der Wells in die entsprechenden FACS-Röhrchen überführt, um bereits tote, abgelöste Zellen bei der Messung mit zu berücksichtigen.

Mittels Hettich Zentrifuge werden die Zellen bei 1000upm für 5min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand anschließend vorsichtig dekantiert.

Dem Zellpellet werden anschließend 200 μ l von der 1,25 μ g/ml Propidiumiodidlösung hinzugefügt und mittels Vortex resuspendiert.

Zur Bestimmung der Viabilität eignet sich die PI-Färbung, da hier nur tote Zellen mit beschädigter und somit für den Farbstoff durchlässiger Membran angefärbt werden. Die Proben werden auf Eis gekühlt und abgedunkelt bis zur Messung aufbewahrt.

Die Zellanalyse am FACS Gerät (FACS Calibur, FACS Canto II) „sortiert“ nicht nur Zellen, wie die ursprüngliche Übersetzung von FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) lautet, sondern analysiert weitere diverse Zelleigenschaften. Die Zellen werden, je nach Fragestellung, mit spezifischen, fluoreszierenden Farbstoffen behandelt. Die Darstellung der Zu- bzw. Abnahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit einer bestimmten Behandlung, erfolgt durch die Anregung des Farbstoffes mit der seines Absorptionsspektrums entsprechenden Laserfrequenz. Die Emission/Fluoreszenz wird mit entsprechenden Filtern gemessen. Die Anregung der hier verwendeten Farbstoffe erfolgt bei 488nm (Laser grün/blau).

Zu Beginn jeder Messung werden die Laser auf eine definierte Intensität für die Kontrollen (unbehandelte Zellen) eingestellt. Bei der C11-BODIPY-Messung wird zusätzlich die Fluoreszenz behandelter Zellen **ohne** Farbstoffbeladung als sog. „Leerwerte“ ermittelt und in der Auswertung berücksichtigt und verrechnet.

Für die Messung wird eine Zellzahl (Events) von 10 000 berücksichtigt und mittels der Software CellQuest Pro für FACSCalibur oder mit der BD Diva Software für das FACSCanto II anschließend analysiert.

Die abschließende Auswertung erfolgt mittels Flowing Software 2.5.1.

| Geräte | Materialien | Lösungen und Chemikalien |
|---|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • FACSCalibur • FACSCanto II • Pipette • Pipettierhilfe • Vakuumpumpe • Vortexer • Zentrifuge | <ul style="list-style-type: none"> • FACS-Röhrchen • Pasteurpipetten • Pipettenspitzen, steril • Zentrifugenröhrchen (10/ 50 ml) • Kunststoffpipetten, steril (10ml) • Glaspipetten, steril | <ul style="list-style-type: none"> • C11-BODIPY-Stammlösung • DiOC₆-Stammlösung • DMEM (10% FBS, 4mM Gln, PEST) • DMEM ohne Phenolrot • DMSO • FLUO-4 AM-Stammlösung • Inhibitoren-Stammlösungen (3.1.5) • MitoSox Red-Stammlösung • PBS • PBS/10% FBS • PI-Stammlösung • <i>t</i>-BuOOH-Stammlösung • 0,1% Trypsinlösung • H₂O_{dest} |

3.4 Durchflusszytometrie (FACS)

3.4.1 Messung des Zelltods mittels PI-Färbung/ Annexin V-FITC

Propidiumiodid (PI) bindet an nekrotische Zellen, während Annexin V-FITC Zellen in der frühen bis späten Apoptose anfärbt, was anschließend im FACSCalibur detektiert werden kann.

PI gilt als DNA-Farbstoff, der nur die geschädigte Membran passieren kann, sodass vitale Zellen ungefärbt bleiben und zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen differenziert

werden kann. Annexin V-FITC dagegen lagert sich an den Membranbestandteil Phosphatidylserin an. Dieser transloziert während der frühen Apoptose von der Innenseite der Membran einer Zelle auf die Außenseite und kann so bei der Messung erfasst werden (Wallberg et al., 2016).

Bevor die Zellen für die Messung geerntet werden, wird das Medium abgenommen und in die FACS-Röhrchen überführt (siehe 3.3), damit bereits abgelöste tote Zellen ebenfalls bei der Messung berücksichtigt werden können. Danach werden die Zellen 1x mit 1ml PBS gewaschen und anschließend mit 2-3 Tropfen 0,1% Trypsin versehen. Nach 2-3-minütiger Inkubation bei 37°C wird das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert und diese anschließend in 1ml DMEM 10% FBS aufgenommen, resuspendiert und in die entsprechenden, beschrifteten FACS-Röhrchen überführt. Anschließend folgt die Zentrifugation bei 1000upm für 5min. Der Überstand wird dann vorsichtig dekantiert, das Zellpellet für die PI-Zelltodmessung mit 200µl Propidiumiodidlösung (1,25µg/ml) versetzt und mittels Vortexer resuspendiert.

Für die Identifizierung apoptotischer/ nekrotischer Zellen, werden die Zellpellets nach Zentrifugation zunächst in 50µl der Annexin V-FITC-Färbelösung resuspendiert, anschließend auf Eis für etwa 15min inkubiert und letztlich mit PI (s.o.) angefärbt. Die Proben werden bis zur Messung dunkel auf Eis gelagert. Nach Anregung über Laser 488nm wird die Emission am FACS Gerät über die Detektoren FL-1 (FITC 530/30nm) und FL-3 (670 LP) bestimmt. Zusätzlich wird der FSC (Forward scatter) und der SSC (sidewards scatter) bei der Messung berücksichtigt. FSC bezeichnet vorwärts gestreutes Licht, das durch eine Zelle in der Richtung des Laserstrahls gebrochen wird und dient zur Identifizierung der Partikelgröße. Die Menge des gestreuten Lichts steht in direktem Zusammenhang mit der Größe und Komplexität der Zelle. Das SSC bezeichnet das Seitwärtsstreulicht, das rechtwinklig gebrochen wird und spezifiziert die Granularität, Membranfaltung und äußere Form der Zelle (Sack U., 2007).

Um zu bestätigen, dass der durch eine PI-Färbung detektierte Zelltod nach *t*-BuOOH-Behandlung tatsächlich durch den Ferroptosemechanismus ausgelöst wurde, erfolgt eine zusätzliche Kontrolle durch Behandlung mit Liproxstatin (1µM), einem Radikalfänger innerhalb der Lipidperoxidation, der Ferroptose aufheben kann (Zilka et al., 2017, Miotto et al., 2020).

3.4.2 Bestimmung des zytosolischen Calcium-Gehalts

Die Zellmembran ist für die meisten chemischen Fluoreszenzindikatoren undurchlässig, daher werden viele der fluoreszierenden Ca²⁺-Indikatoren mit Acetoxymehtyl (AM)-Estergruppen modifiziert. Die AM-Form des Indikators kann durch Zellmembranen diffundieren. Da das AM-Derivat eine geringe Wasserlöslichkeit aufweist, werden häufig Dispergiermittel wie Pluronic

F-127 verwendet, um die Löslichkeit großer Farbstoffmoleküle in physiologischen Medien zu unterstützen und die Zellbeladung zu erleichtern (Takahashi et al., 1999). Sobald diese in der Zelle sind, spalten Esterasen die AM-Gruppe wieder ab, was zu einem Zellmembran-impermeablen, Calcium-bindenden Indikator führt (Guatimosim et al., 2011). FLUO-4 ist ein Analogon von FLUO-3 mit höherer Quantenausbeute bei Anregung bei 488nm und liefert im Vergleich zu FLUO-3 hellere Emissionssignale als Reaktion auf Ca^{2+} -Bindung (Guatimosim et al., 2011, Blenn et al., 2010).

Die Behandlung der Zellen mit den jeweiligen Inhibitoren erfolgt 30min vor der *t*-BuOOH-Behandlung (50 μM). Der Zeitraum der *t*-BuOOH-Behandlung beträgt 3,5h, in den letzten 30min dieser Inkubationszeit findet die Farbstoff-Inkubation statt: Nach 3h wird der Zellrasen 3x mit PBS gewaschen und mit 500 μl der Calcium-Farbstofflösung beladen: Hierfür wird die benötigte Menge an FLUO-4-AM Stammlösung (2mM) 1:1 mit Pluronic F-127 gemischt und anschließend in DMEM ohne Phenolrot entsprechend verdünnt (2 μM Endkonzentration).

Die Zellen werden geerntet, indem sie 3x mit PBS gewaschen, trypsiniert, in PBS /10% FBS resuspendiert und abzentrifugiert werden. Nach dem Dekantieren des Überstandes werden die Zellpellets wie oben beschrieben in 200 μl Propidiumiodidlösung resuspendiert. Die Proben werden bis zur Messung am FACSCantoll dunkel auf Eis gelagert.

Gemessen wird die FLUO-4-AM-Fluoreszenz im FL-1 Kanal (FITC 530/30) und parallel die PI-Fluoreszenz im FL-3 Kanal (670LP). Die Medianwerte werden in Bezug zur unbehandelten Kontrolle gesetzt und als x-Faches ausgewertet und dargestellt.

3.4.3 Bestimmung der Lipidperoxidation

C11-BODIPY 581/591 ist ein fluoreszierender Farbstoff zum Nachweis von Lipidperoxidation in lebenden Zellen. Er beherbergt folgende Eigenschaften: (i) Emission im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums, mit guter spektraler Trennung der nicht oxidierten (595 nm) und oxidierten (520 nm) Formen; (ii) hat eine hohe Quantenausbeute und kann daher mit niedrigen Markierungskonzentrationen verwendet werden, was eine minimale Störung der Membran gewährleistet (iii) ist praktisch unempfindlich gegenüber Umgebungsänderungen (iv) ist lipophil und dringt als solches leicht in Membranen ein; (v) einmal oxidiert, bleibt C11-BODIPY 581/591 lipophil (vi) ist nicht zytotoxisch für Ratten-1-Fibroblasten bis zu 50 μM ; (vii) ist empfindlich gegenüber einer Vielzahl von Oxy-Radikalen und Peroxynitrit, aber nicht gegenüber Superoxid (Drummen et al., 2002). Nach Integration und somit als Bestandteil der Membranen dient der Farbstoff als „künstliches Substrat“ zum Nachweis von Lipidperoxidation in der Zelle. Bei der Auswertung am FACS Gerät wird die Zunahme der oxidierten Form

dargestellt, die Abnahme der reduzierten Form ist nicht möglich, da der entsprechende Laser nicht zur Verfügung steht.

Bei der Bestimmung der *t*-BuOOH-induzierten Lipidperoxidation in Anwesenheit von Inhibitoren/ Entkoppler geschieht die Farbstoffinkubation **vor** der Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor und *t*-BuOOH. So können alle Ereignisse der Lipidperoxidation kumulativ dargestellt werden. Die Zellrasen werden vor Zugabe des Farbstoffs 3x mit PBS gewaschen und dann mit dem Farbstoff C11-BODIPY (2 μ M) in 500 μ l DMEM ohne Phenolrot für 30 min bei 37°C beladen. Zusätzlich werden doppelte Ansätze für die Leerwerte ohne Farbstoff angelegt, d.h. anstelle der Farbstoffbehandlung werden die Zellen mit 500 μ l DMEM ohne Phenolrot versehen und parallel für 30min inkubiert. Anschließend werden die Zellrasen erneut 3x mit PBS gewaschen und mit entsprechenden Inhibitoren/ Entkoppler in DMEM (10% FBS, 4mM Glu, PEST) für weitere 30min bei 37°C inkubiert. Darauf folgt die Behandlung mit der Substanz *t*-BuOOH und die weitere Inkubation bei 37°C für 2,5h. Die Zellen werden wie in 3.3 beschrieben geerntet und am FACSCantoll gemessen.

Bei der Bestimmung der Kinetik der Lipidperoxidation in Anwesenheit von Erastin erfolgt die Farbstoff-Inkubation innerhalb der letzten halben Stunde der jeweiligen Behandlungszeit. Hier werden längerer Inkubationszeiträume von bis zu 5,5h berücksichtigt. Bei einer **Prä**-Inkubation des Farbstoffes wäre dieser bis zum Zeitpunkt der Messung zum größten Teil wieder aus der Zelle diffundiert. In diesem Falle werden allerdings nur die Lipidperoxidationsereignisse der letzten halben Stunde erfasst.

Gemessen wird die Zunahme der oxidierten Form des BODIPY-Farbstoffes im FL-1 Kanal (FITC 530/30). Die Medianwerte werden abzüglich der Leerwerte in Bezug zur unbehandelten Kontrolle gesetzt und als x-Faches ausgewertet und dargestellt.

3.4.4 Messung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP)

Der Abfall des MMPs kann mittels Durchflusszytometrie als Verlust der Fluoreszenzintensität von mitochondrienspezifischen lipophilen Farbstoffen, wie z.B. 3,3'-dihexyloxycarbocyaniniodid (DiOC₆), gemessen werden. DiOC₆ ist ein Carbocyaninderivat mit kurzen Alkylendungen (< 7 Kohlenstoffatome) (Perry et al., 2011). Als grün fluoreszierender Membranfarbstoff kann er in hoher Konzentration das ER in lebenden und fixierten Zellen anfärben. In geringerer Konzentration gilt der Farbstoff selektiv für die Mitochondrien. DiOC₆ zielt auf die negative Umgebung stoffwechselaktiver Mitochondrien, wo es im FL-1 Kanal intensiv emittiert. Nach dem Abfall des MMPs entweicht der Farbstoff und es kommt zu einer Abnahme der Fluoreszenz

Für die Bestimmung des MMPs werden die Zellen vor *t*-BuOOH-Behandlung mit den entsprechenden Inhibitoren für 30min bei 37 °C prä-inkubiert. Die anschließende *t*-BuOOH-Inkubation erfolgt für die Dauer von 4/ 2/ 1h. Der Farbstoff DiOC₆ (20nM) wird in 500µl / Well DMEM ohne Phenolrot 20min vor dem Ernten den Zellen hinzugegeben und bei 37°C inkubiert. Das Ernten erfolgt wie in 3.3 beschrieben. Unmittelbar nach dem Ernten werden die Zellen mit 200µl Propidiumiodidlösung angefärbt und mit entsprechenden Lasern gemessen.

Gemessen wird die DiOC₆-Fluoreszenz im FL-1 Kanal (FITC 530/30), die parallele PI-Messung findet im FL-3 Kanal (670LP) statt. Die Medianwerte werden in Bezug zur unbehandelten Kontrolle gesetzt, prozentual ausgewertet und entsprechend dargestellt.

3.4.5 Messung der mitochondrialen Superoxide

MitoSOXTM Red gilt als zellgängiges Reagenz zur selektiven Färbung von Mitochondrien. Es wird schnell durch Superoxide oxidiert, jedoch nicht durch andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS). Das oxidierte Produkt ist nach der Bindung an Nukleinsäuren stark fluoreszierend (Robinson et al., 2006). Die Methode wurde kürzlich modifiziert, um parallel die Apoptose mittels Annexin V-FITC und Sytox Green zu beurteilen (Mukhopadhyay et al., 2007).

Für die Bestimmung der mitochondrialen Superoxide werden die Zellen zunächst in Form einer Zeitkinetik für 30min, 60min und 120min mit *t*-BuOOH behandelt. Für die kombinatorische Behandlungen mit dem Calciumkanal-Inhibitor 2-APB, dem Calciumchelator BAPTA-AM bzw. dem Eisenchelator Deferoxamin wurden die Zellen vor Zugabe von *t*-BuOOH mit den genannten Substanzen für 30min bei 37°C prä-inkubiert. Nach Zugabe von *t*-BuOOH wurden die Zellen für weitere 2h bei 37°C inkubiert. Der Farbstoff MitoSOXTM Red wird in 500µl/ Well DMEM ohne Phenolrot für die letzten 20min der jeweiligen Inkubationszeit hinzugegeben. Zusätzlich werden doppelte Ansätze für die Leerwerte ohne Farbstoff angelegt, d.h. anstelle der Farbstoffbehandlung werden die Zellen mit 500µl DMEM ohne Phenolrot versehen und parallel für 30min inkubiert. Das Ernten erfolgt wie in 3.3 beschrieben. Das Zellpellet wird in 200µl PBS resuspendiert, auf Eis gelagert und anschließend fluorimetrisch gemessen.

Gemessen wird die MitoSOX Red-Fluoreszenz im FL-2 Kanal (PE575/26). Die Medianwerte werden abzüglich der entsprechenden Leerwerte in Bezug zur unbehandelten Kontrolle gesetzt und als x-Faches ausgewertet und dargestellt.

3.5 Auswertung

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgt abschließend über die *Flowing Software 7.0*, wird in Excel übertragen und mittels *GraphPad Prism 9* werden die statistischen Unterschiede erhoben. Hierbei wurden ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen durchgeführt. Für die Mittelwertanalyse dient der Tukey-Test. Ein p-Wert $< 0,05$ wird als signifikant gewertet. Die Signifikanz ist mit * markiert: $p > 0,05$ (n.s.), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Bei den Messungen werden jeweils die Einzelwerte der Doppelbestimmung berücksichtigt.

Software

| | |
|-----------------------|--|
| Cellquest Pro | BD Pharmingen, Heidelberg, Germany |
| EndNote | Thomson Reuters, New York City, NY, USA |
| FACSDiva Software 7.0 | BD Pharmingen, Heidelberg, Germany |
| Flowing software | Turku Centre for Biotechnology, Finland |
| MS Office 365 | Microsoft, Unterschleißheim, Germany |
| GraphPad Prism 9 | GraphPad Software, University of California San Diego, USA |
| Mikroskopierapp | ECHO, San Diego, USA |

4 Ergebnisse

4.1 Morphologische Veränderungen in der Ferroptose

In der Literatur werden diverse morphologische Veränderungen in der Ferroptose beschrieben, die denen der Nekrose ähnlich sind (Yagoda et al., 2007). Dabei wird die sog. Onkose als eine zytoplasmatische Schwellung aufgeführt, die einhergeht mit einer Schwellung der zytoplasmatischen Organellen und schließlich der Ruptur der Plasmamembran (Berghe et al., 2014).

Nach *t*-BuOOH-Behandlung der NIH3T3-Zellen konnte man unter dem Mikroskop zusätzlich eine Abrundung der Zellen, sowie einzelne Schwellungsblasen und auch die Ablösung der Zellen nach 5-6h beobachten.

Die **Abbildung 7** zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von unbehandelten und mit *t*-BuOOH-behandelten NIH3T3-Zellen nach 4h.

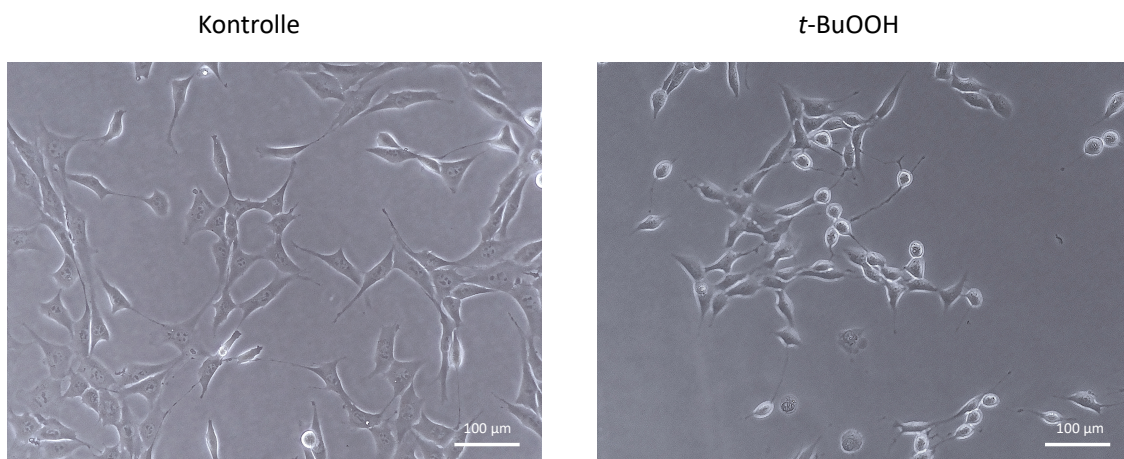


Abbildung 7 Lichtmikroskopische Aufnahme von NIH3T3-Zellen: Kontrolle und nach *t*-BuOOH-Behandlung

Abgebildet sind proliferierende NIH3T3-Zellen ohne (links) und nach *t*-BuOOH-Behandlung (4h, 50µM, rechts). In den *t*-BuOOH-behandelten Kulturen erkennt man bereits nach 4h zusammengezogene, zunehmend geringer gespreitete Zellen mit – aufgrund osmotischer Veränderungen – „ballonförmig aufgeblasenen“ Zellkörpern.

Die **Abbildung 8** zeigt die morphologischen Veränderungen der Zellen 4h nach Behandlung mit 50 μ M *t*-BuOOH von einer spindelförmigen zu einer abgerundeten, „kugeligen“ Form mit vergrößertem „balloniertem“ Zytoplasma um den Nukleus herum. Die Adhäsion der Zellen an die Kulturschale geht im Laufe der Behandlung zunehmend verloren. Nach 5 - 6h kann man eine Abrundung und eine vollständige Ablösung der Zellen von der Platte beobachten.

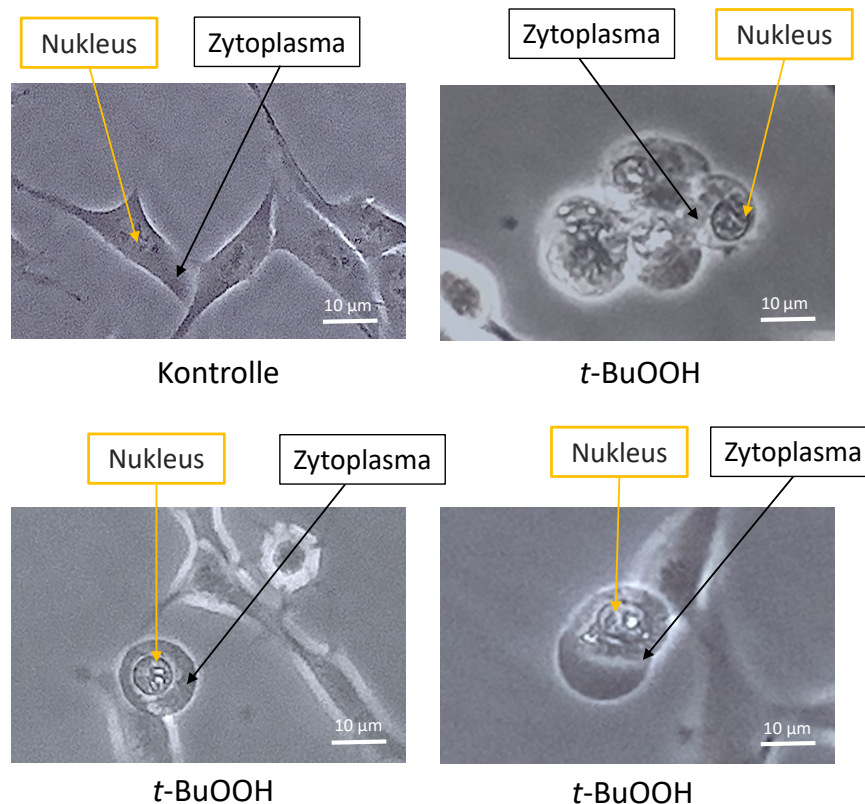


Abbildung 8 Lichtmikroskopische Aufnahmen *t*-BuOOH-behandelter NIH3T3-Zellen mit starker Vergrößerung

Abgebildet sind Bildausschnitte stark vergrößerter Aufnahmen (x 2000) von NIH3T3-Zellen nach einer 4-stündigen, 50 μ M *t*-BuOOH-Behandlung.

Die Bildausschnitte vergleichen einzelne Zellveränderungen des Nukleus und des Zytoplasmas un behandelter Kontrollzellen mit den *t*-BuOOH-behandelten Zellen. Die morphologischen Veränderungen der Zellen nach *t*-BuOOH-Behandlung stellen sich in Form „ballonförmig-aufgeblasener“ Zellkörper dar (oben rechts, untere Reihe). Oben links: Unbehandelte Kontrollzellen.

4.2 Einfluss von Calciumkanal-Inhibitoren auf den *t*-BuOOH-Effekt

4.2.1 Einfluss der Calciumkanal-Inhibitoren 2-APB und CoCl₂ auf den *t*-BuOOH-induzierten Zelltod

Zu Beginn der Arbeit wurden die Calciumkanal-Inhibitoren 2-APB und CoCl₂ in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Diese zeigten bereits in anderen Arbeiten einen starken inhibitorischen Effekt auf z.B. den Glutamat-induzierten Zelltod (Tan et al., 1998).

Die Kontrolle mit Liproxstatin bestätigt im Rahmen der PI-Messungen, dass es sich bei dem ausgelösten Zelltodmechanismus um Ferroptose handelt.

Die **Abbildung 9** zeigt den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von CoCl₂ (10/20µM) auf den durch *t*-BuOOH-induzierten Zelltod in NIH3T3-Zellen. Der Anteil PI-positiver Zellen ist durch *t*-BuOOH signifikant auf 61,4% (± 10,2%) angestiegen. Die Präinkubation mit 10µM wie auch 20µM CoCl₂ haben nur einen geringfügig hemmenden Effekt auf den Anteil PI-positiver Zellen, induziert durch *t*-BuOOH. Liproxstatin (LX, 1µM), als interne Kontrolle der Ferroptose, kann den Anteil PI-positiver Zellen komplett auf Kontrollniveau senken.

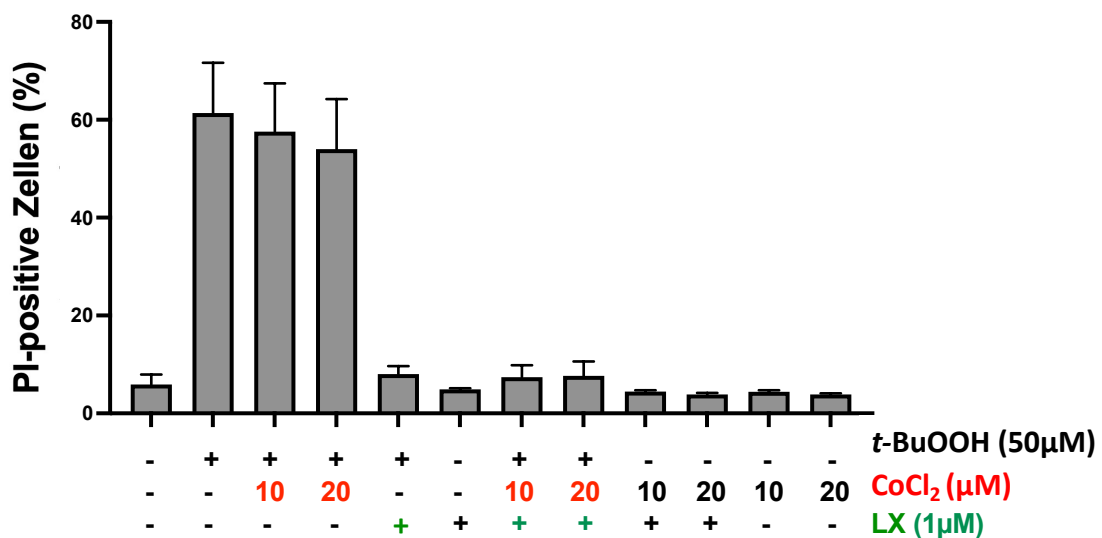


Abbildung 9 Einfluss von Cobalt(II)-chlorid auf den *t*-BuOOH-induzierten Zelltod

Dargestellt ist der Anteil PI-positiver Zellen in Prozent (n=6) mit Standardabweichung. NIH3T3-Zellen wurden 6h mit 50µM *t*-BuOOH in Anwesenheit (10/20) bzw. Abwesenheit (-) von CoCl₂ (10/20µM) behandelt. Liproxstatin (LX, 1µM) kann den Anteil PI-positiver Zellen auf Kontrollniveau senken.

Die **Abbildung 10** zeigt den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von 2-APB (50/100 μ M) auf den durch *t*-BuOOH-induzierten Zelltod in NIH3T3-Zellen. Auch hier sieht man keinen signifikanten Einfluss auf den *t*-BuOOH-induzierten Zelltod. Liproxstatin (LX, 1 μ M) senkt den Anteil PI-positiver Zellen auf Kontrollniveau.

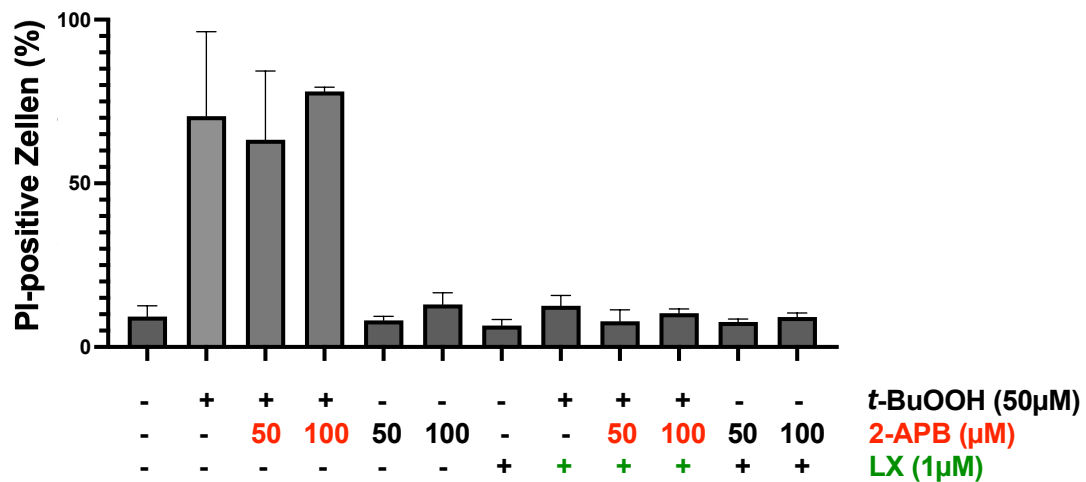


Abbildung 10 Einfluss von 2-APB auf den *t*-BuOOH-induzierten Zelltod

Dargestellt ist der Anteil PI-positiver Zellen in Prozent (n=6) mit Standardabweichung. NIH3T3-Zellen wurden 6h mit 50 μ M *t*-BuOOH in Anwesenheit (50/100) bzw. Abwesenheit (-) von 2-APB (50/100 μ M) behandelt. Liproxstatin (LX, 1 μ M) kann den Anteil PI-positiver Zellen auf Kontrollniveau senken.

4.2.2 Einfluss von CoCl_2 , 2-APB und Thapsigargin (TG) auf den zytosolischen Calciumspiegel

In den nächsten Untersuchungen war es nun das Ziel herauszufinden, ob 2-APB bzw. CoCl_2 die $t\text{-BuOOH}$ -induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration beeinflussen. Weitere Erkenntnisse zur Herkunft des Calciums nach $t\text{-BuOOH}$ -Behandlung sollte Thapsigargin liefern, ein Inhibitor der SERCA-ATPase des ER.

4.2.2.1 Einfluss von CoCl_2 auf den zytosolischen Calciumspiegel (Kinetik)

Die **Abbildung 11** zeigt den Effekt von CoCl_2 ($20\mu\text{M}$) auf die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels in Abhängigkeit von der $t\text{-BuOOH}$ -Behandlungsdauer. Die FLUO-4-AM-Fluoreszenz wurde nach 1h, 2h, 3h und 4h gemessen. Die Behandlung mit CoCl_2 hatte keinen Einfluss auf den Anstieg des intrazellulären Calciums.

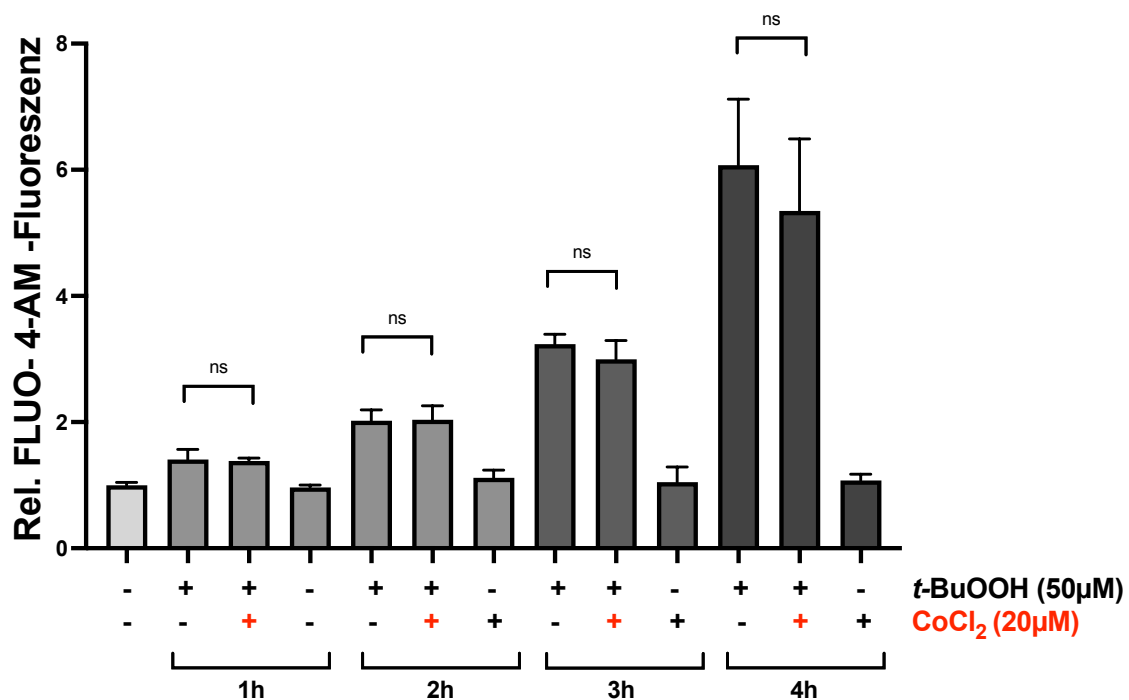


Abbildung 11 Einfluss von CoCl_2 auf den $t\text{-BuOOH}$ -induzierten Calciumanstieg in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer (Kinetik)

Dargestellt ist der Mittelwert der Fluoreszenz-Medianwerte ($n=4$) als x -faches der unbehandelten Kontrolle ($x=1$) mit Standardabweichung. Die FLUO-4-AM-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert. Die NIH3T3-Zellen wurden 1, 2, 3 und 4h mit $50\mu\text{M}$ $t\text{-BuOOH}$ in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von CoCl_2 ($20\mu\text{M}$) behandelt.

4.2.2.2 Einfluss von 2-APB auf den zytosolischen Calciumspiegel

Die **Abbildung 12a** zeigt den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von 2-APB auf die durch eine *t*-BuOOH-Behandlung induzierte Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels nach 3,5 h. Zu sehen ist eine konzentrationsabhängige Hemmung der Calciumfreisetzung durch 2-APB. Der Anstieg des intrazellulären Calciums durch *t*-BuOOH-Behandlung wird sowohl durch die Anwendung von 50µM 2-APB als auch 100µM 2-APB signifikant gesenkt ($x 4,6 \pm 0,2$ versus $x 3,2 \pm 0,2$ (50µM) bzw. $x 2,7 \pm 0,2$ (100µM)). Die **Abbildung 12b** zeigt den Effekt von 2-APB (100µM) auf die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels in Abhängigkeit von der *t*-BuOOH-Behandlungsdauer: Die FLUO-4-AM-Fluoreszenz wurde nach 1h, 2h, 3h und 4h gemessen. Der *t*-BuOOH-induzierte Calciumanstieg wird nach 2, 3 und 4h durch die Vorbehandlung mit 100µM 2-APB (+) signifikant gehemmt.

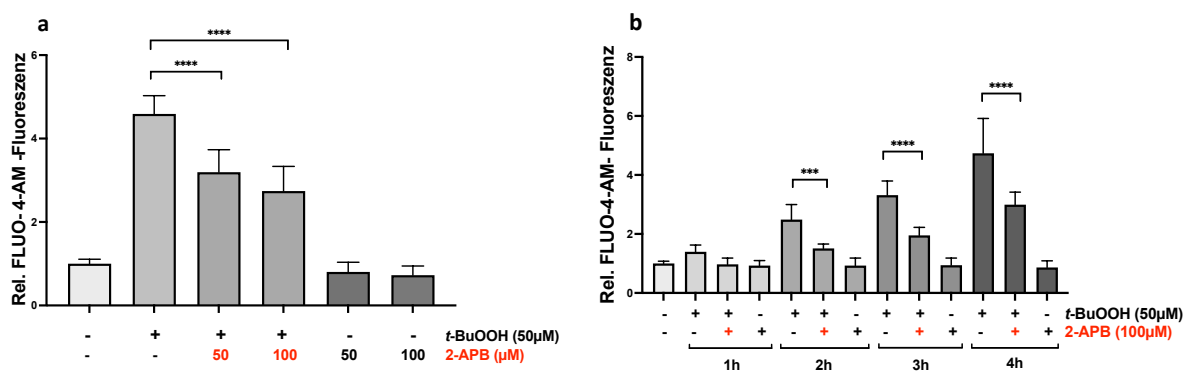


Abbildung 12 Einfluss von 2-APB auf den *t*-BuOOH-induzierten Calciumanstieg

Dargestellt ist der Mittelwert der Fluoreszenz-Medianwerte ($n=6$) als x -faches der unbehandelten Kontrolle ($x=1$) mit Standardabweichung. Die FLUO-4-AM-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert. Die NIH3T3-Zellen wurden **3,5h** mit 50µM *t*-BuOOH in Anwesenheit (50/100) bzw. Abwesenheit (-) von 2-APB (50/100µM) behandelt (**a**). Für die **Zeitkinetik (b)** wurden die NIH3T3-Zellen 1, 2, 3 und 4h mit 50µM *t*-BuOOH in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von 2-APB (100µM) behandelt.

4.2.2.3 Einfluss von Thapsigargin (TG) auf den zytosolischen Calciumspiegel

Die Vorbehandlung mit TG bewirkt eine Calciumdepletion des ER (Denmeade and Isaacs, 2005). Sollte durch eine TG-Vorbehandlung der *t*-BuOOH-induzierte Calciumanstieg gehemmt werden, spräche dies für eine Calciumfreisetzung aus dem ER.

Die **Abbildung 13** zeigt den Effekt von Thapsigargin (2 μ M) auf die *t*-BuOOH-induzierte FLUO-4-AM-Fluoreszenz. Die NIH3T3-Zellen wurden mit *t*-BuOOH (50 μ M) behandelt mit vorausgegangener 15-minütiger Präinkubation von 2 μ M TG. Als Positivkontrolle wurde TG direkt vor der Messung am Cantoll hinzugegeben, was einen leichten, nicht signifikanten und transienten Anstieg des intrazellulären Calciums verursachte (nicht gezeigt). Zu sehen ist in **a** ein Abfall der FLUO-4-AM-Fluoreszenz in der kombinatorischen Behandlung TG und *t*-BuOOH. In **b** erkennt man eine Tendenz der abfallenden FLUO-4-AM-Fluoreszenz durch TG auf die *t*-BuOOH-behandelten Zellen, doch wurde keine Signifikanz erzielt. Eine Depletierung des ER könnte somit zu einer weniger starken zytosolischen Ca²⁺-Freisetzung durch *t*-BuOOH führen. Um diese Aussage zu unterstützen, benötigt es noch weitere Versuche.

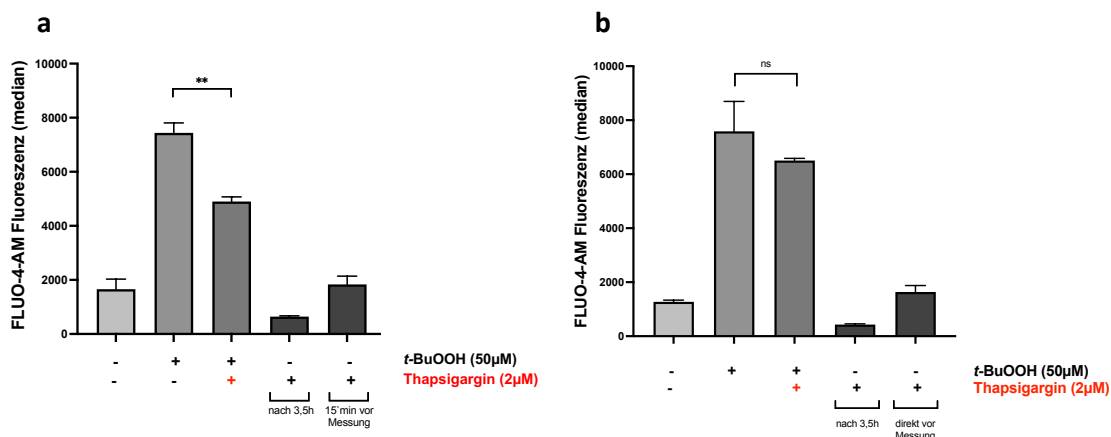


Abbildung 13 Einfluss von Thapsigargin auf den zytosolischen Calciumspiegel

Dargestellt sind die Fluoreszenz-Medianwerte (n=2) mit Standardabweichung. Die FLUO-4-AM-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert. Die NIH3T3 Zellen wurden mit TG (2 μ M) 15 Minuten präinkubiert und anschließend mit (+) und ohne (-) 50 μ M *t*-BuOOH für weitere 3h inkubiert. Die Kontrollen für TG erfolgten für 3,5h, direkt vor der Messung.

4.2.3 Einfluss von CoCl_2 und 2-APB auf die Lipidperoxidation

Um anschließend den Zusammenhang zwischen der partiellen Hemmung der $t\text{-BuOOH}$ -induzierten Calciumerhöhung durch die Calciumkanal-Inhibitoren und der früh stattfindenden Lipidperoxidation zu analysieren, erfolgte die C11-BODIPY-Messung. Da die PI-Messung und damit der Zelltod unbeeinflusst von den Calciumkanalinhibitoren blieb (s. Abb. 9/10), war auch dies von der LPO zu erwarten.

Die **Abbildung 14** stellt die Ergebnisse der C11-BODIPY-Messung $t\text{-BuOOH}$ -behandelter NIH3T3-Zellen in An- und Abwesenheit von 2-APB (**a**) bzw. CoCl_2 (**b**) dar. Weder CoCl_2 noch 2-APB (50/100 μM) haben einen signifikanten Effekt auf die $t\text{-BuOOH}$ -induzierte Lipidperoxidation (**a**, **b**).

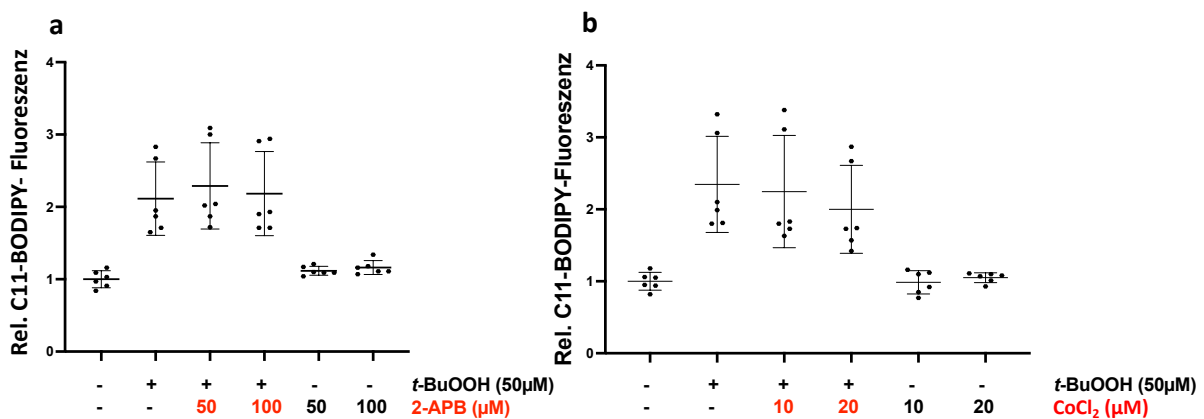


Abbildung 14 Einfluss von 2-APB und CoCl_2 auf die Lipidperoxidation

Dargestellt ist der Mittelwert der Fluoreszenz-Medianwerte ($n=4$) als x -Faches der unbehandelten Kontrolle ($x=1$) mit Standardabweichung in Form eines Punkte-Diagrammes. Die C11-BODIPY-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert. Die NIH3T3-Zellen wurden 2,5h mit 50 μM $t\text{-BuOOH}$ in Anwesenheit (50/100) bzw. Abwesenheit von 2-APB (50/100 μM) (**a**) und in Anwesenheit (10/20) bzw. Abwesenheit von CoCl_2 (10/20 μM) behandelt (**b**).

4.2.4 Einfluss von 2-APB auf das mitochondriale Membranpotential (MMP)

Aus vorausgegangenen Arbeiten war bekannt, dass der durch *t*-BuOOH-induzierte Abfall des MMPs weder durch Liproxstatin noch durch Ferrostatin aufgehoben werden kann (Wenz et al., 2018).

Die **Abbildung 15** zeigt den Einfluss von 2-APB auf eine 1-, 2-, bzw. 4-stündige *t*-BuOOH-Behandlung von NIH3T3-Zellen. Nach 1- und 2-stündiger *t*-BuOOH-Behandlung ist noch kein Effekt auf das MMP zu erkennen. Nach 4h fällt das MMP durch *t*-BuOOH-Behandlung auf 49,5% ($\pm 0,1\%$) und kann durch eine Vorbehandlung mit 2-APB auf 80,6% ($\pm 0,2\%$) angehoben werden.

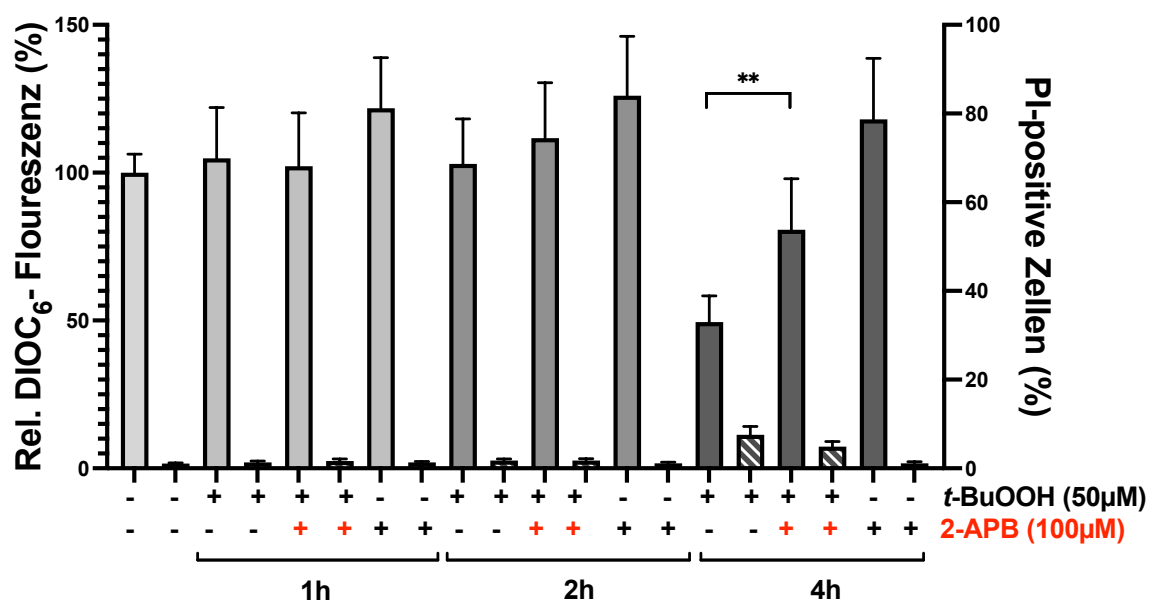


Abbildung 15 Einfluss von 2-APB auf den *t*-BuOOH-induzierten MMP-Abfall

Dargestellt ist der Mittelwert der Fluoreszenz-Medianwerte (n=6) in Prozent mit Standardabweichung. Die DiOC₆-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert und in Relation zur unbehandelten Kontrolle (100%) dargestellt. NIH3T3-Zellen wurden 1, 2 bzw. 4h mit 50 μM *t*-BuOOH in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von 2-APB (100 μM) behandelt.

4.3 Einfluss von Polyethylenglykol (PEG) auf den *t*-BuOOH-Effekt

Die Arbeitsgruppen von Pedrera et al. (2020) und Riegmann et al. (2020) zeigten die Fähigkeit von Osmoprotektiva - speziell Polyethylenglykol - die Ferroptose, induziert durch Erastin, RSL3 oder ML162, zu hemmen.

4.3.1 Einfluss von PEG auf den *t*-BuOOH-induzierten Zelltod

Die **Abbildung 16** zeigt die Ergebnisse einer Behandlung von NIH3T3-Zellen mit 50 μ M *t*-BuOOH und vorausgegangener Prä-inkubation mit 10mM PEG (MG= 8000). Zu sehen ist eine signifikante Hemmung des durch *t*-BuOOH-verursachten Anteils PI-positiver Zellen von 42,3% (\pm 7,7%) auf 11,5% (\pm 3,9%) durch PEG.

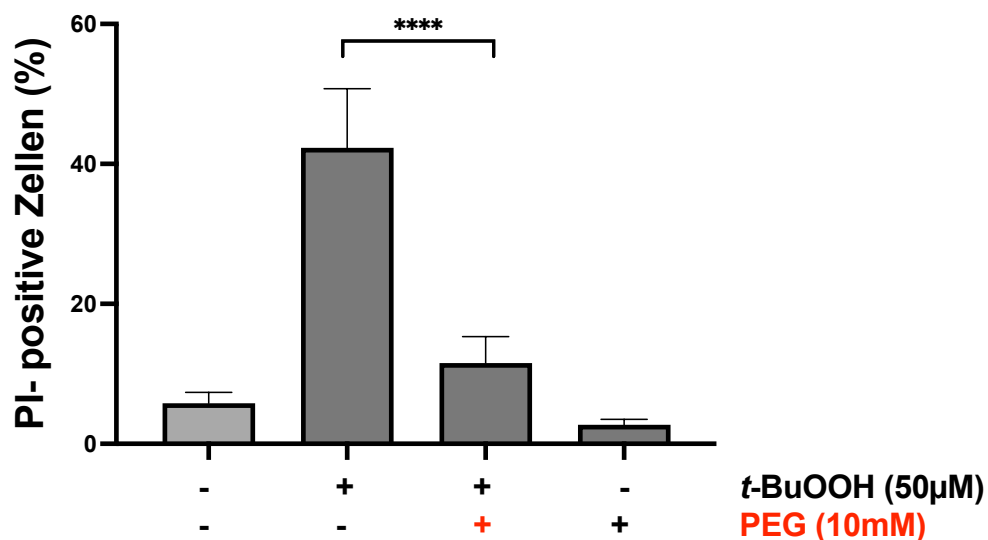


Abbildung 16 Einfluss von PEG auf den *t*-BuOOH-induzierten Zelltod

Dargestellt ist der Anteil PI-positiver Zellen in Prozent (n=6) mit Standardabweichung. Die NIH3T3-Zellen wurden 6h mit 50 μ M *t*-BuOOH in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von PEG (10mM) behandelt.

4.3.2 Einfluss von PEG auf die Staurosporin-induzierte Apoptose

Die Tatsache, dass die *t*-BuOOH-induzierte Ferroptose durch PEG gehemmt werden konnte, sprach für die Bildung von Poren, Einstrom von Ionen und Wasser (siehe auch Abb. 8), Zellschwellung und Lyse und ist somit dem Mechanismus der kanonischen Ferroptose vergleichbar (Pedrera et al., 2020, Riegmann et al 2020). Um einen unspezifischen Effekt auszuschließen, wurde der Effekt von PEG auf die Staurosporin-induzierte Apoptose untersucht. Hier löste PEG eine Verstärkung der Apoptose aus.

Die **Abbildung 17** zeigt die Ergebnisse einer 24-stündigen Staurosporin-Behandlung von NIH3T3-Zellen in Anwesenheit von 10mM PEG. Die Auswertung der PI / Annexin V-FITC-Messung zeigt eine deutliche Verstärkung des durch Staurosporin-induzierten Zelltods durch PEG. Man erkennt sowohl einen Anstieg PI-positiver Zellen 8,9 % ($\pm 1,4\%$) auf 29,1% ($\pm 12,8\%$) als auch einen Anstieg Annexin V-FITC -positiver Zellen von 19,6% ($\pm 6,8\%$) auf 46,5% ($\pm 5,2\%$).

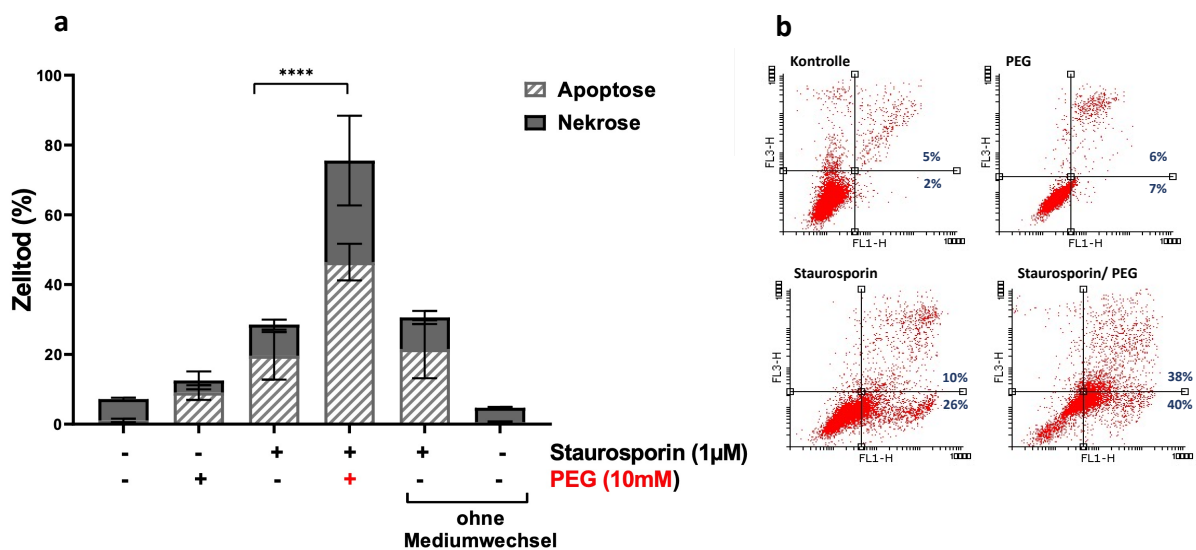


Abbildung 17 Einfluss von PEG auf die Staurosporin-induzierte Apoptose

Das Balkendiagramm (a) zeigt den Anteil PI-positiver Zellen in Prozent (n=4) mit Standardabweichung. NIH3T3-Zellen wurden 24h mit Staurosporin (1µM) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von PEG (10mM) behandelt. PEG konnte infolge der geringen Löslichkeit nur in Form eines Mediumwechsels zu den Zellen gegeben werden. Der Mediumwechsel hat keinen Einfluss auf die Wirkung von Staurosporin (siehe beide rechten Balken „ohne Mediumwechsel“).

Die Punktwolkendiagramme (b) der FACS –Analyse zeigen links oben: Kontrolle ohne Behandlung, rechts oben: Kontrolle 10mM PEG, links unten: Staurosporin 1µM/24h und rechts unten: Staurosporin 1µM/24 h in Kombination mit PEG 10mM. Die PI-Fluoreszenz und die Annexin V-FITC-Fluoreszenz wurden im FL-3- Kanal bzw. FL-1 Kanal detektiert.

4.3.3 Einfluss von PEG auf den zytosolischen Ca²⁺-Spiegel

Die Daten von Riegmann et al. (2020) und Pedrera et al. (2020) zeigen, dass Osmoprotektiva in der Lage sind, den Einstrom von Wasser und Calcium zu blockieren, sodass der Lyse-Prozess verhindert wird. Die Exekution der kanonischen Ferroptose wird also durch osmotische Prozesse vermittelt.

Die **Abbildung 18** zeigt den Einfluss von PEG auf intrazelluläres Calcium nach einer 1-, 2-, 3- und 4-stündigen *t*-BuOOH –Behandlung von NIH3T3-Zellen. Nach 3h und nach 4h ist eine signifikante Reduktion des *t*-BuOOH-induzierten Anstiegs des intrazellulären Calciums durch PEG zu erkennen (3h: $3,7 \pm 0,4$ versus $2,6 \pm 0,1$; 4h: $5,4 \pm 0,9$ versus $3,5 \pm 0,3$).

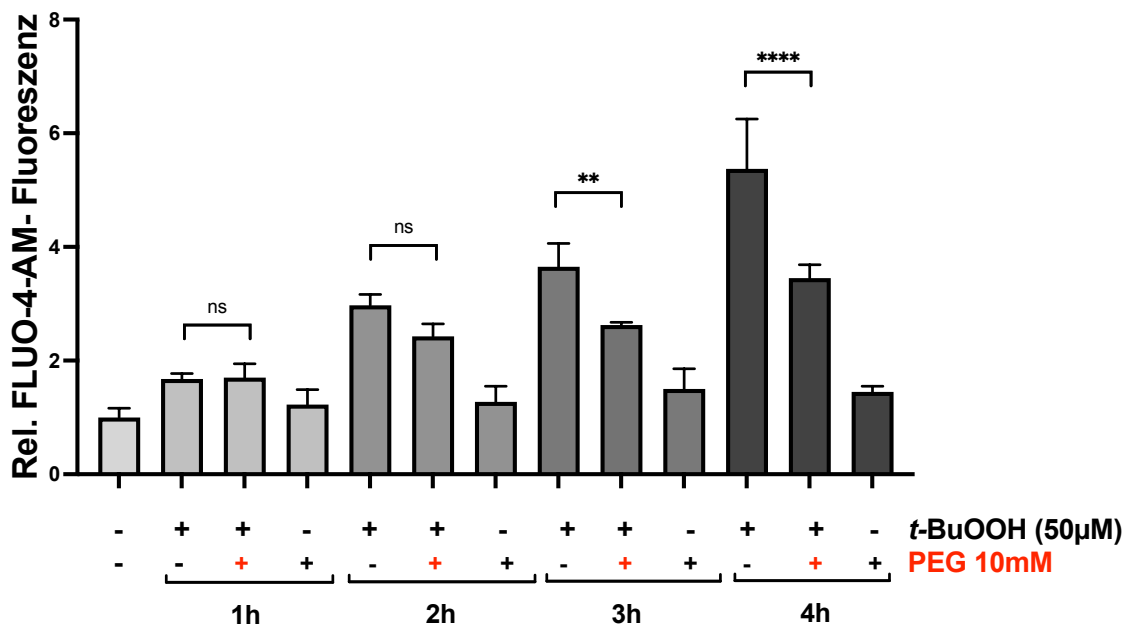


Abbildung 18 Einfluss von PEG auf den *t*-BuOOH-induzierten zytosolischen Calciumanstieg

Dargestellt ist der Mittelwert der Fluoreszenz- Medianwerte aus n=4 als x-Faches der unbehandelten Kontrolle mit Standardabweichung. Die FLUO-4-AM-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert. Die NIH3T3-Zellen wurden 1, 2, 3 und 4h mit *t*-BuOOH (50 μM) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von PEG (10mM) behandelt.

4.3.4 Einfluss von PEG auf die Lipidperoxidation

Die Arbeitsgruppe Pedrera et al. (2020) zeigte für NIH3T3-Zellen, dass nach Auslösen der Ferroptose durch RSL-3 die Anwendung von PEG 8000 zwar den Zelltod und die Calciumfreisetzung hemmt, die LPO aber nicht verhindert werden konnte.

Die **Abbildung 19** zeigt die Ergebnisse einer 3-stündigen Behandlung der NIH3T3-Zellen mit 50µM *t*-BuOOH mit einer 10mM PEG-Prä-inkubation von 30min. Die Auswertung der C11-BODIPY-Fluoreszenzen zeigt hier eine signifikante Verminderung der *t*-BuOOH-induzierten Lipidperoxidation ($2,6 \pm 0,04$ versus $1,7 \pm 0,1$).

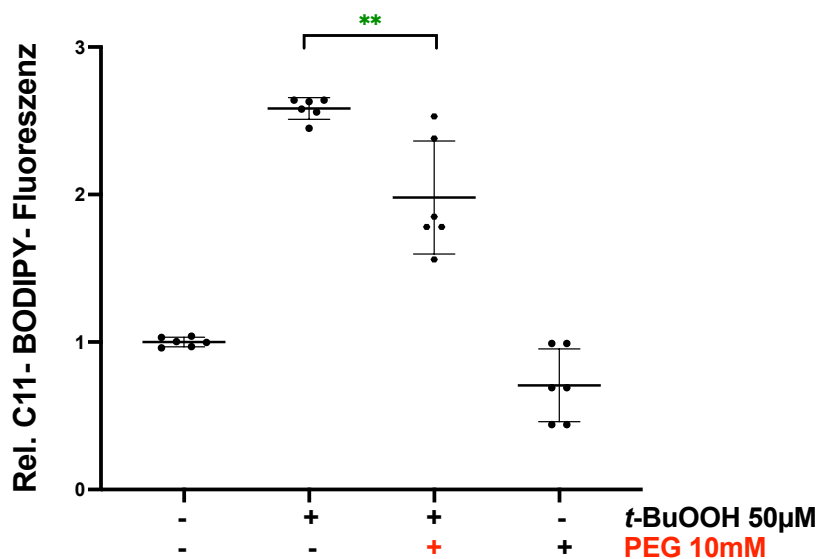


Abbildung 19 Einfluss von PEG auf die *t*-BuOOH-induzierte Lipidperoxidation

Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz-Medianwerte aus $n=6$ als x -Faches der unbehandelten Kontrollen ($x=1$) mit Standardabweichung in Form eines Punkte-Diagrammes. Die C11-BODIPY-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert. Die NIH3T3-Zellen wurden für 3h mit 50µM *t*-BuOOH in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von PEG (10mM) behandelt.

4.4 Einfluss von BAPTA-AM und Deferoxamin auf den zytosolischen Calciumspiegel und das mitochondriale Membranpotential (MMP)

BAPTA-AM kann, wie bereits in der Dissertation von Wenz (2019) gezeigt, die *t*-BuOOH-induzierte Lipidperoxidation, die späte NADH-Oxidation, den Abfall des MMPs und auch den Zelltod hemmen (Dissertation Wenz, 2019). Deferoxamin ist als Eisenchelator bekannt für die Hemmung der Ferroptose, so auch der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose (Wenz et al., 2018). In dieser Arbeit wurden beide Substanzen auf ihren Einfluss auf das zytosolische Calcium und das MMP untersucht.

4.4.1 Einfluss von BAPTA-AM und Deferoxamin auf den zytosolischen Calciumspiegel

Die **Abbildung 20** zeigt die Ergebnisse der zytosolischen Calciumbestimmung nach 3,5-stündiger *t*-BuOOH (50µM)-Behandlung der NIH3T3-Zellen mit 30-minütiger Prä-Inkubation von BAPTA-AM (5µM) **(a)** bzw. Deferoxamin (100µM) **(b)**.

Im Falle von BAPTA-AM erkennt man eine signifikante Hemmung des *t*-BuOOH-induzierten Calciumanstiegs ($5,9 \pm 0,6$ versus $1,8 \pm 0,1$). Auch Deferoxamin verursacht eine signifikante, wenn hier auch nur eine partielle Hemmung des Calciumanstiegs ($5,6 \pm 0,7$ versus $2,7 \pm 1,1$).

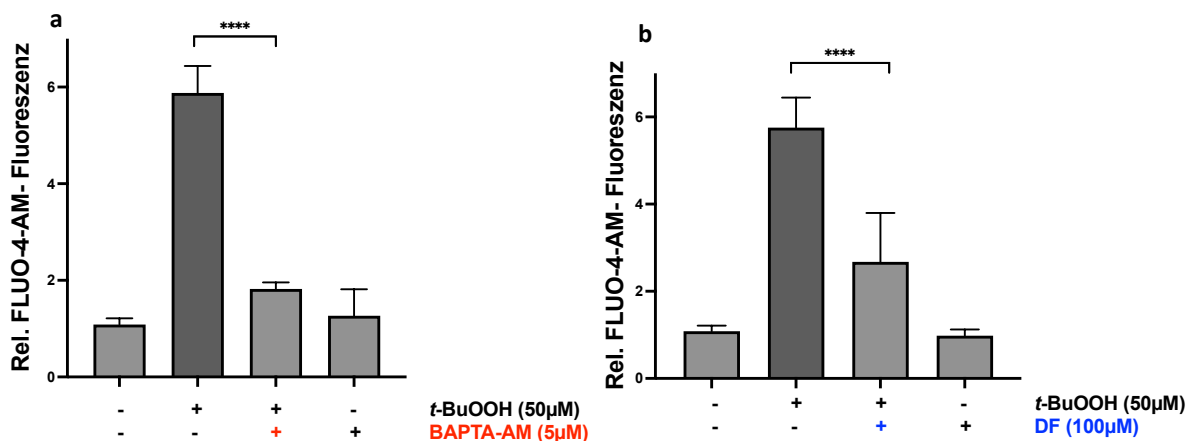


Abbildung 20 Einfluss von BAPTA-AM und Deferoxamin auf den zytosolischen Calciumspiegel

Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz-Medianwerte aus $n=4$ (a) und $n=6$ (b) als x-Faches der unbehandelten Kontrolle mit Standardabweichung. Die FLUO-4-AM-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert. Die NIH3T3-Zellen wurden 3,5h mit 50µM *t*-BuOOH **(a)** in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit

(-) von BAPTA-AM (5 μ M) oder **(b)** in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von Deferoxamin (100 μ M) behandelt.

4.4.2 Einfluss von BAPTA-AM auf das mitochondriale Membranpotential (MMP)

Die **Abbildung 21** zeigt den Effekt von BAPTA-AM (5 μ M) auf den *t*-BuOOH-induzierten MMP-Abfall. Die 2- und 4-stündige *t*-BuOOH(50 μ M)-Behandlung der NIH3T3-Zellen erfolgt in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von BAPTA-AM (5 μ M).

Nach 4h ist ein *t*-BuOOH-induzierter MMP-Abfall zu erkennen, die Anwendung von BAPTA-AM hebt den Abfall des MMP signifikant auf (43,3% \pm 5,1 versus 87,3% \pm 8,5). Die parallel durchgeführte PI-Messung nach 4-stündiger *t*-BuOOH-Behandlung zeigt die Reduktion des Anteils PI-positiver Zellen auf Kontrollniveau durch BAPTA-AM.

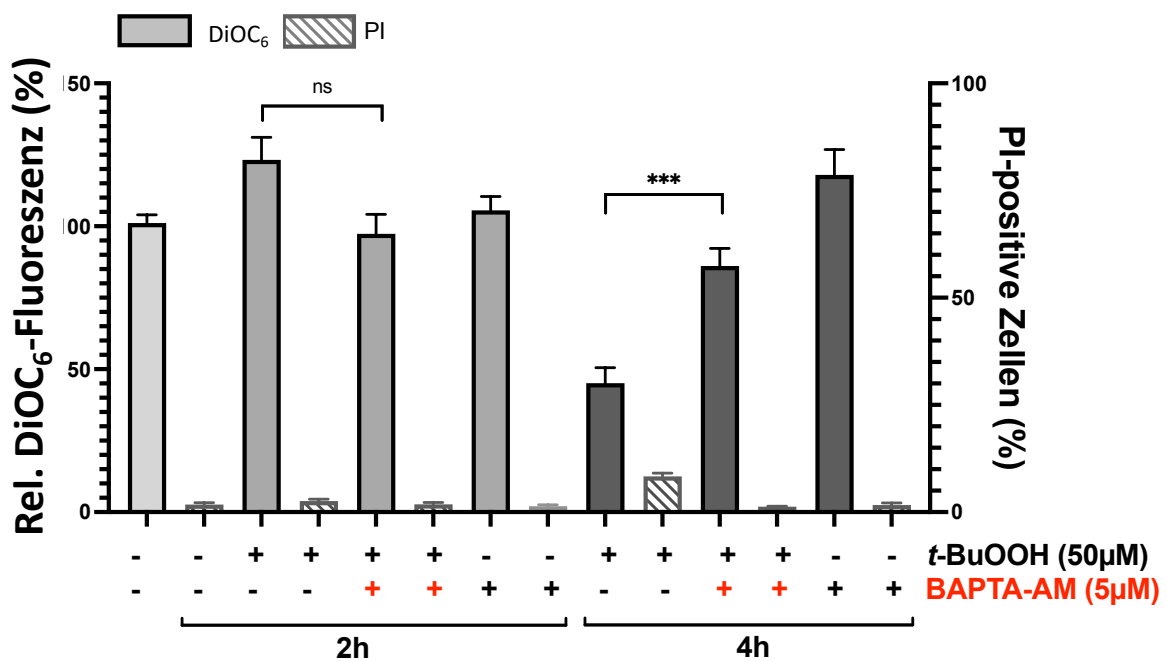


Abbildung 21 Einfluss von BAPTA-AM auf den *t*-BuOOH-induzierten MMP-Abfall

Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz-Medianwerte aus n=6 in Prozent in Relation zur unbehandelten Kontrolle (100%) mit Standardabweichung. Die DiOC₆-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert. NIH3T3-Zellen wurden 2h und 4h mit 50 μ M *t*-BuOOH in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von BAPTA-AM (5 μ M) behandelt.

4.4.3 Einfluss von Deferoxamin auf das mitochondriale Membranpotential (MMP)

Die **Abbildung 22** zeigt den Effekt von Deferoxamin (100 μ M) auf den *t*-BuOOH-induzierten MMP-Abfall. Die NIH3T3-Zellen wurden 4h mit 50 μ M *t*-BuOOH in Anwesenheit (+) bzw. in Abwesenheit (-) von Deferoxamin (100 μ M) behandelt.

Deferoxamin konnte den durch *t*-BuOOH-induzierten MMP-Abfall signifikant hemmen (43,3% \pm 5,1% versus 82,3% \pm 5,5%). Die parallel durchgeföhrte PI-Messung zeigt die Reduktion des Anteils PI-positiver Zellen auf Kontrollniveau durch Deferoxamin.

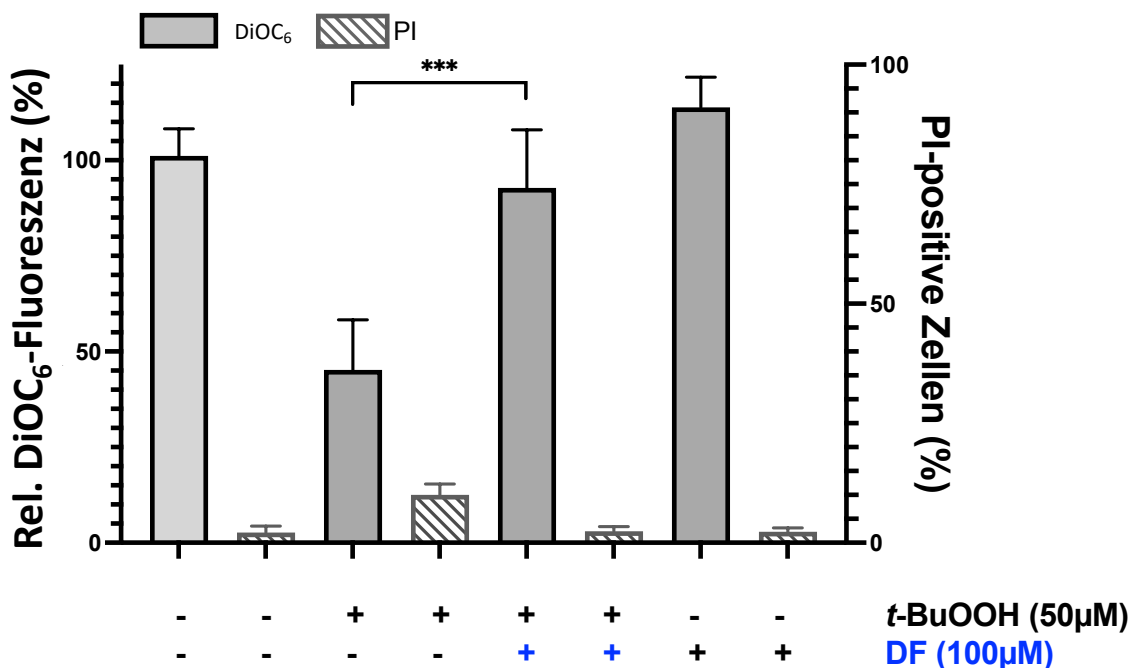


Abbildung 22 Einfluss von Deferoxamin auf den *t*-BuOOH-induzierten MMP-Abfall

Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz-Medianwerte aus n=6 in Prozent in Relation zur unbehandelten Kontrolle (100%) mit Standardabweichung. Die DiOC₆-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert. NIH3T3-Zellen wurden 4h mit 50 μ M *t*-BuOOH in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von DF (100 μ M) behandelt.

4.5 Einfluss von Antimycin A auf den *t*-BuOOH-Effekt

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Gao et al. (2019) zeigten in MEF (embryonale Mausfibroblasten) und HT1080 (Fibrosarkom-Zelllinie) eine durch Inhibitoren der Atmungskette ausgelöste Hemmung des Ferroptose-Zelltods sowie eine Hemmung der Lipidperoxidation. Induziert wurde in der oben genannten Arbeit die Ferroptose durch Cysteinmangel oder durch Erastin. Hier sollte untersucht werden, ob Antimycin A, ein Hemmstoff des Komplex III der Atmungskette, einen Effekt auf die *t*-BuOOH-induzierte Ferroptose ausübt.

4.5.1 Einfluss von Antimycin A auf das mitochondriale Membranpotential

Als Positivkontrolle für die Wirkung von Antimycin A (AMA) wurde der Abfall des mitochondrialen Membranpotentials mittels DiOC₆-Färbung gemessen (Abbildung 23).

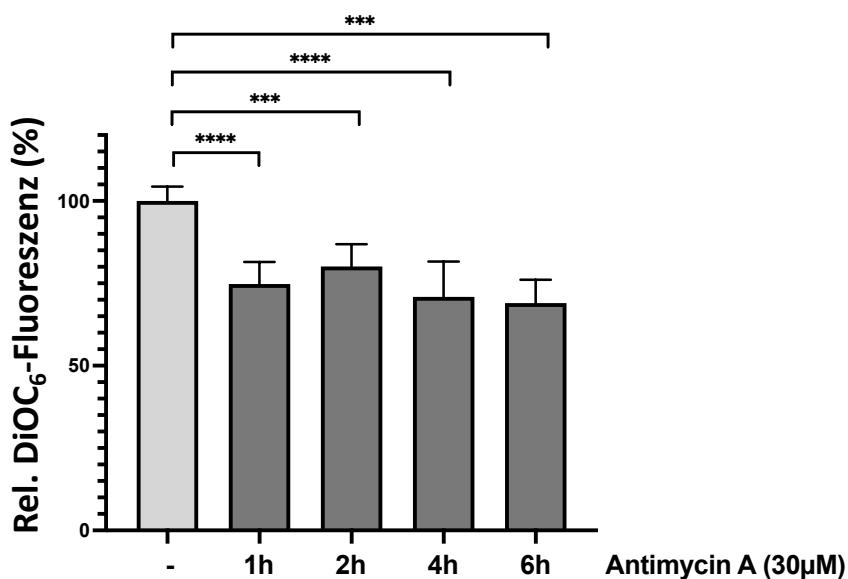


Abbildung 23 Einfluss von Antimycin A auf das mitochondriale Membranpotential

Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz-Medianwerte aus $n=12$ in Prozent in Relation zur unbehandelten Kontrolle (100%) mit Standardabweichung dargestellt. Die DiOC₆-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert. Die Messung der Fluoreszenz wurde nach 1-, 2-, 4- und 6-stündiger Behandlung der NIH3T3-Zellen mit Antimycin A (30 μM) durchgeführt. Der gemessene Abfall des MMPs gilt für die weiteren PI-Messungen mit Antimycin A als Positivkontrolle.

4.5.2 Einfluss von Antimycin A auf den *t*-BuOOH(50/ 30 μ M)-induzierten Zelltod

Die **Abbildung 24** zeigt den Effekt von Antimycin A (30 μ M) auf den *t*-BuOOH-induzierten Zelltod. Die 2-, 4- und 6-stündige *t*-BuOOH(50 μ M)-Behandlung der NIH3T3-Zellen erfolgte in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von AMA (30 μ M).

Nach 4h und 6h ist ein signifikanter Anstieg des *t*-BuOOH-induzierten Zelltods durch AMA (30 μ M) zu erkennen (4h: 12,5% \pm 3,9% versus 37,6% \pm 5,2%; 6h: 55,8% \pm 6,4% versus 74,6% \pm 6,2%). Der verstärkende Effekt auf den Zelltod konnte durch die zusätzliche Anwendung von Liproxstatin (1 μ M) komplett auf Kontrollniveau gesenkt werden. Das lässt den Schluss zu, dass AMA die *t*-BuOOH-induzierte Ferroptose verstärkt.

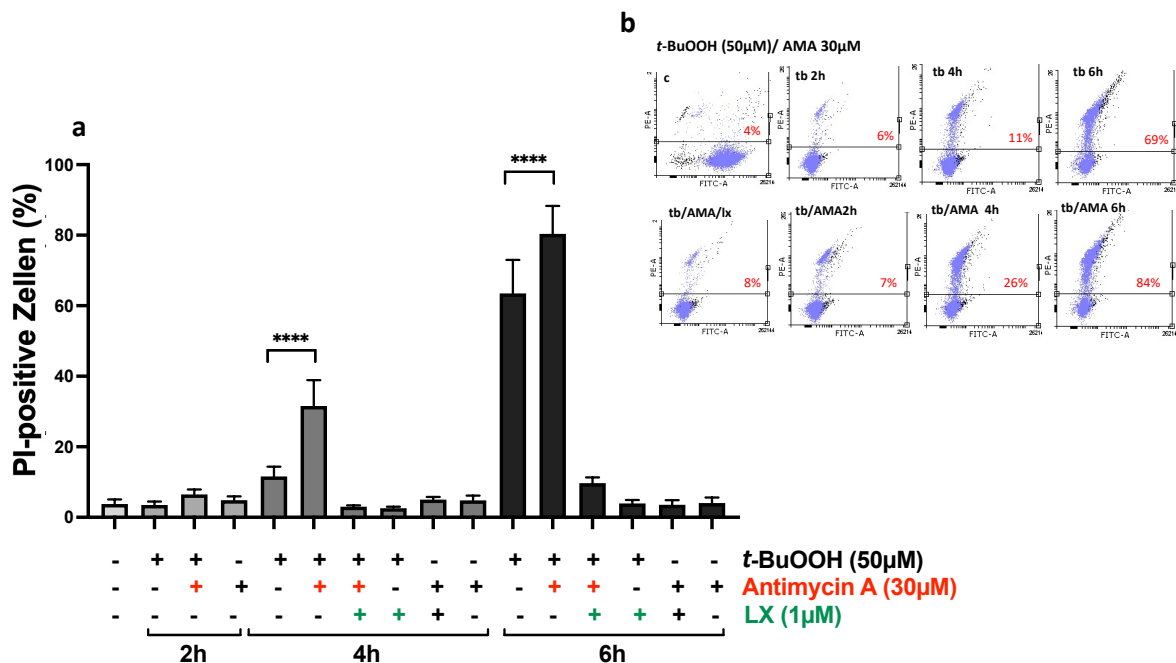


Abbildung 24 Einfluss von Antimycin A auf den *t*-BuOOH (50 μ M)-induzierten Zelltod nach 2h, 4h und 6h

Das Balkendiagramm (a) zeigt den Anteil PI-positiver Zellen in Prozent (n=8) mit Standardabweichung. Die NIH3T3-Zellen wurden 2, 4 und 6h mit *t*-BuOOH (50 μ M) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von AMA (30 μ M) behandelt. Liproxstatin (LX, 1 μ M) kann den Anteil PI-positiver Zellen auf Kontrollniveau senken.

Die Punktplotte (b) der FACS-Analyse zeigen in der oberen Reihe von links nach rechts: Kontrolle ohne Behandlung, *t*-BuOOH 50 μ M/2h, *t*-BuOOH 50 μ M/4h, *t*-BuOOH 50 μ M/6h; in der unteren Reihe von links nach rechts: *t*-BuOOH 50 μ M/ AMA 30 μ M / LX 1 μ M, *t*-BuOOH 50 μ M/ AMA 30 μ M 2h, *t*-BuOOH 50 μ M/ AMA 30 μ M 4h, *t*-BuOOH 50 μ M/ AMA 30 μ M 6h.

Die **Abbildung 25** zeigt den Effekt von Antimycin A (30 μ M) auf den Zelltod, hier induziert durch eine niedrigere Konzentration an *t*-BuOOH (30 μ M). Die NIH3T3-Zellen wurden 2, 4 und 6h mit 30 μ M *t*-BuOOH in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von AMA (30 μ M) behandelt.

Auch bei einer niedrigeren Konzentration an *t*-BuOOH führt die zusätzliche Gabe von AMA zu einem signifikanten Anstieg PI-positiver Zellen (4h: 8,7% \pm 3,1% versus 32,8% \pm 8,2 %; 6h: 51,9% \pm 8,6% versus 81,4% \pm 5,9%). Die Verstärkung des Zelltods lässt sich, wie bereits für die 50 μ M *t*-BuOOH-Behandlung in Abb. 24 beschrieben, mit Liproxstatin (1 μ M) auf das Kontrollniveau senken. Im Vergleich zu der Behandlung mit 50 μ M *t*-BuOOH (s.Abb.24) führt die Anwendung von AMA in Kombination mit der niedrigeren *t*-BuOOH Konzentration (30 μ M) zu einem stärkeren Anstieg des durch *t*-BuOOH-ausgelösten Zelltods.

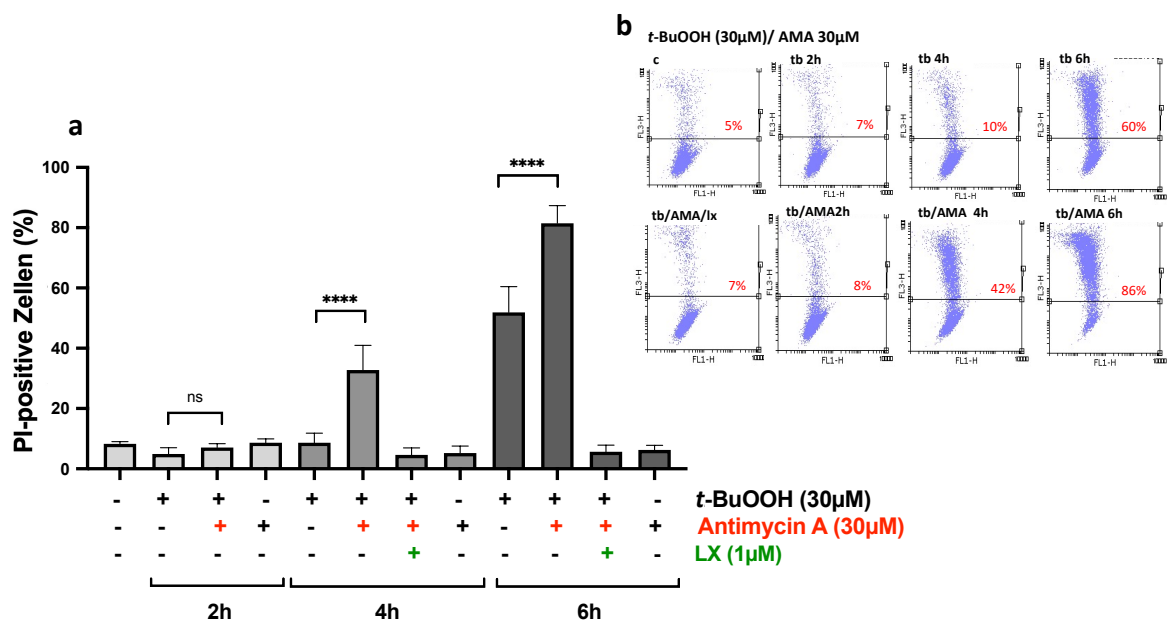


Abbildung 25 Einfluss von Antimycin A auf den *t*-BuOOH (30 μ M)-induzierten Zelltod

Das Balkendiagramm (a) zeigt den Anteil PI-positiver Zellen in Prozent (n=4) mit Standardabweichung. Die NIH3T3-Zellen wurden 2, 4 und 6h mit *t*-BuOOH (30 μ M) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von AMA (30 μ M) behandelt. Liproxstatin (LX, 1 μ M) kann den Anteil PI-positiver Zellen auf Kontrollniveau senken.

Die Punktwolkendiagramme (b) der FACS-Analyse zeigen in der oberen Reihe von links nach rechts: Kontrolle ohne Behandlung, *t*-BuOOH 30 μ M/2h, *t*-BuOOH 30 μ M/4h, *t*-BuOOH 30 μ M/6h; in der unteren Reihe von links nach rechts: *t*-BuOOH 30 μ M/ AMA 30 μ M / LX 1 μ M, *t*-BuOOH 30 μ M/ AMA 30 μ M 2h, *t*-BuOOH 30 μ M/ AMA 30 μ M 4h, *t*-BuOOH 30 μ M/ AMA 30 μ M 6h.

4.5.3 Effekt von Antimycin A auf den Erastin-induzierten Zelltod

Die **Abbildung 26** zeigt den Effekt von Antimycin A (30 μ M) auf den Erastin-induzierten Zelltod. Die NIH3T3-Zellen wurden 11h mit Erastin (1/10 μ M) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von AMA (30 μ M) behandelt.

Bei der niedrigeren Erastin-Konzentration (1 μ M) führt AMA zu einem signifikanten Anstieg PI-positiver Zellen (27,5% \pm 7,3% versus 62% \pm 5,8%).

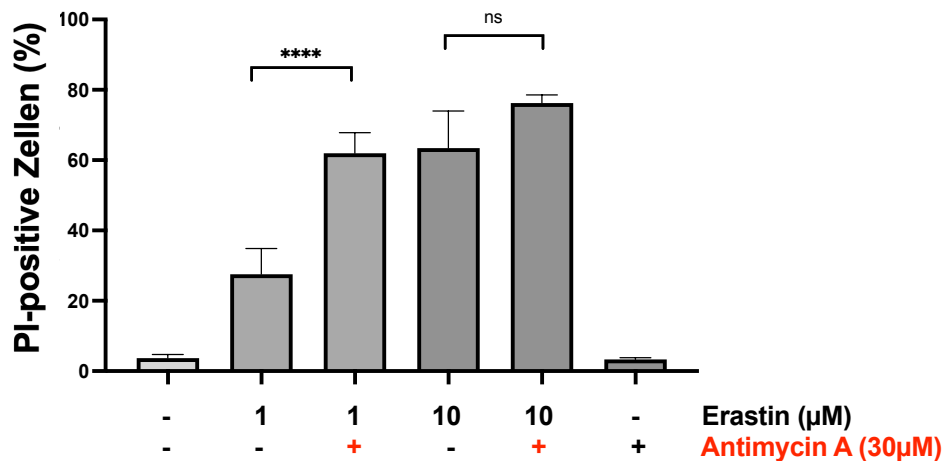


Abbildung 26 Einfluss von Antimycin A auf den Erastin-induzierten Zelltod

Dargestellt ist der Anteil PI-positiver Zellen in Prozent (n=4) mit Standardabweichung. NIH3T3-Zellen wurden 11h mit Erastin (1/10 μ M) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von AMA (30 μ M) behandelt.

4.5.4 Einfluss von Antimycin A auf die *t*-BuOOH- und Erastin- induzierte Lipidperoxidation

Nach Berücksichtigung der neu erworbenen Kenntnisse, dass AMA sowohl die *t*-BuOOH- als auch die Erastin (1 μ M)- induzierte Ferroptose verstärkt, war die Annahme, dass sich dies auch in einer verstärkten LPO widerspiegelt. Dies konnte allerdings mittels C11-BODIPY-Messung nicht bestätigt werden.

Die **Abbildung 27** zeigt den Effekt von Antimycin A (30 μ M) auf die Lipidperoxidation, induziert durch *t*-BuOOH bzw. Erastin. Die NIH3T3-Zellen wurden 1h und 2,5h mit *t*-BuOOH (50 μ M) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von AMA (30 μ M) behandelt (**Abbildung 27a**). Antimycin A zeigt hier keinen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der durch *t*-BuOOH (50 μ M) -induzierten Lipidperoxidation.

Die NIH3T3-Zellen wurden für 5,5h mit Erastin (1/10 μ M) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von AMA (30 μ M) behandelt (**Abbildung 27b**). In beiden Fällen sind die Effekte nicht signifikant.

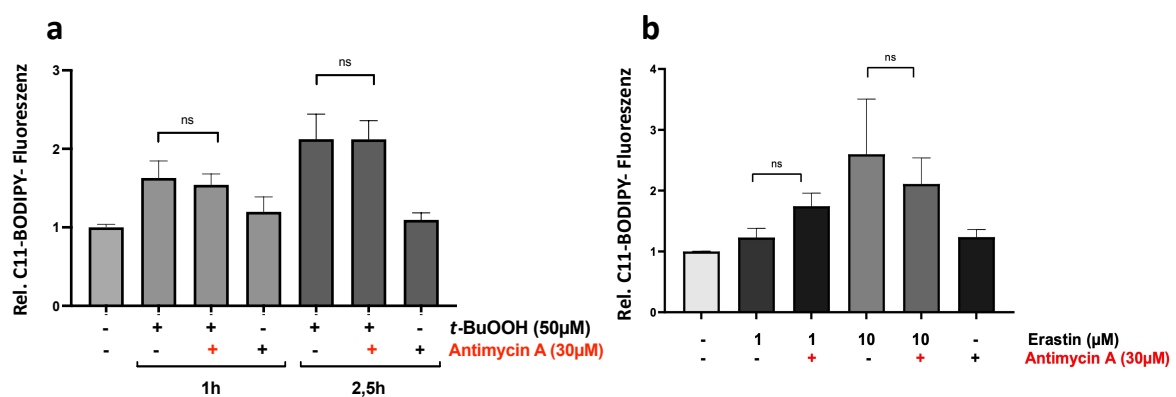


Abbildung 27 Einfluss von Antimycin A auf die *t*-BuOOH (50 μ M)- und Erastin-induzierte Lipidperoxidation

Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz-Medianwerte aus n=4 als x-Faches der unbehandelten Kontrolle (x=1) mit Standardabweichung. Die C11-BODIPY-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert. Die NIH3T3-Zellen wurden für 1h und 2,5h mit *t*-BuOOH (50 μ M) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von AMA (30 μ M) (**a**), oder für 5,5h mit Erastin (1/10 μ M) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von AMA (30 μ M) (**b**) behandelt.

Die **Abbildung 28** zeigt den Effekt von Antimycin A (30 μ M) auf die durch eine Konzentration von 30 μ M *t*-BuOOH-induzierte LPO. Die NIH3T3-Zellen wurden 1,5; 2,5; und 3,5h mit *t*-BuOOH (30 μ M) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von AMA (30 μ M) behandelt.

t-BuOOH führt in Abhängigkeit der Behandlungsdauer zu einem zunehmenden Anstieg der LPO (1,5h: $x1,3 \pm 0,2$; 2,5h: $x1,8 \pm 0,4$; 3,5h: $x2,3 \pm 0,7$). Antimycin A zeigte bei der PI-Messung (s. Abb. 25) einen signifikant verstärkenden Effekt auf den *t*-BuOOH(30 μ M)-induzierten Zelltod, der sich aber hier nicht in einem Anstieg der Lipidperoxidation widerspiegelt. Die gemessene C11-BODIPY-Fluoreszenz der AMA/*t*-BuOOH-behandelten Zellen wurde nach 3,5h sogar leicht, nicht signifikant reduziert. Antimycin A (30 μ M) hat keinen Effekt auf die *t*-BuOOH(30 μ M)-induzierte LPO.

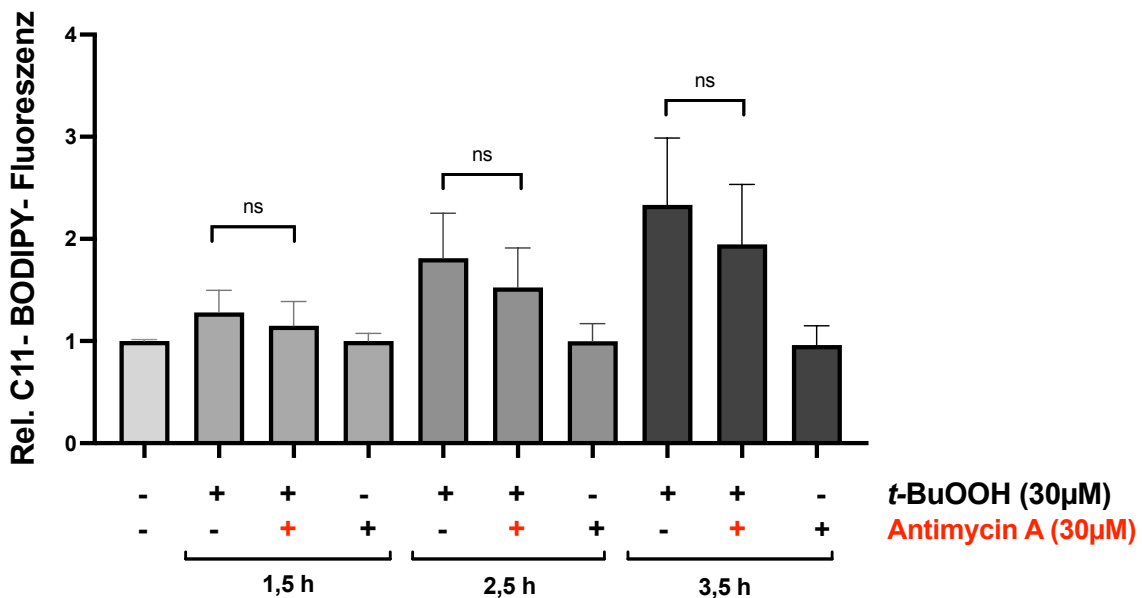


Abbildung 28 Einfluss von Antimycin A auf die *t*-BuOOH (30 μ M)-induzierte Lipidperoxidation (Balkendiagramm)

Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz-Medianwerte aus $n=4$ als x -Faches der unbehandelten Kontrolle ($x=1$) mit Standardabweichung. Die C11-BODIPY-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert. Die NIH3T3 Zellen wurden für 1,5h; 2,5h und 3,5h mit *t*-BuOOH (30 μ M) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von AMA (30 μ M) behandelt.

Die **Abbildung 29** zeigt die C11-BODIPY-Fluoreszenzintensitäten zu den verschiedenen Zeitpunkten in Form von Histogrammen. Die jeweils geringfügig, nicht signifikant reduzierte Fluoreszenzintensität bei der kombinatorischen Behandlung von Antimycin A und *t*-BuOOH ist in Form einer leichten Linksverschiebung der Kurve (blau) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität durch alleinige Behandlung mit *t*-BuOOH (rote Kurve) zu erkennen.

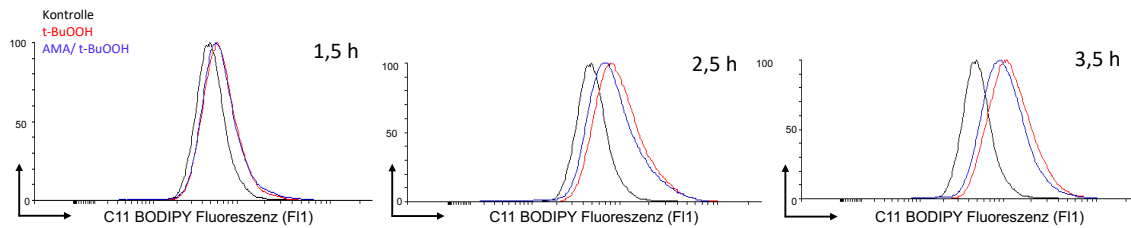


Abbildung 29 Einfluss von Antimycin A auf die *t*-BuOOH (30 μ M)-induzierte Lipidperoxidation (Histogramm)

Dargestellt sind die durch FACS-Analyse zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmten Fluoreszenzintensitäten behandelter NIH3T3-Zellen in Form von Histogrammen. Die Fluoreszenzintensität wurde im FITC-Kanal detektiert. NIH3T3-Zellen wurden 1,5h; 2,5h und 3,5h mit *t*-BuOOH (30 μ M) in Kombination mit AMA (30 μ M) behandelt. (Unbehandelte Kontrolle= schwarz; *t*-BuOOH= rot; AMA+ *t*-BuOOH= blau)

4.6 Bildung mitochondrialer Superoxide

Der verstärkende Effekt durch Antimycin A auf den *t*-BuOOH-induzierten Zelltod führte zu der Annahme, dass es in den Mitochondrien zur Bildung zusätzlicher ROS kommen könnte, die allerdings auf das Ausmaß der induzierten Lipidperoxidation keinen Einfluss haben. Mitochondriale Superoxide wurden über den Farbstoff MitoSOX Red detektiert.

4.6.1 Einfluss von *t*-BuOOH auf die Bildung mitochondrialer Superoxide

Die **Abbildung 30** zeigt den Effekt von *t*-BuOOH auf die Superoxidbildung in den Mitochondrien. NIH3T3-Zellen wurden 30, 60 und 120 min mit *t*-BuOOH (50 μ M) behandelt. Eine 2-stündige *t*-BuOOH-Behandlung der Zellen führt zu einer Verdopplung der MitoSOX Red-Fluoreszenz. Dieses Ergebnis zeigt, dass *t*-BuOOH nach 2h zu einer signifikanten mitochondrialen Superoxidbildung führt. Folglich scheint infolge einer *t*-BuOOH-Behandlung zusätzlich zur Lipidperoxidation eine Superoxidbildung innerhalb der Mitochondrien stattzufinden.

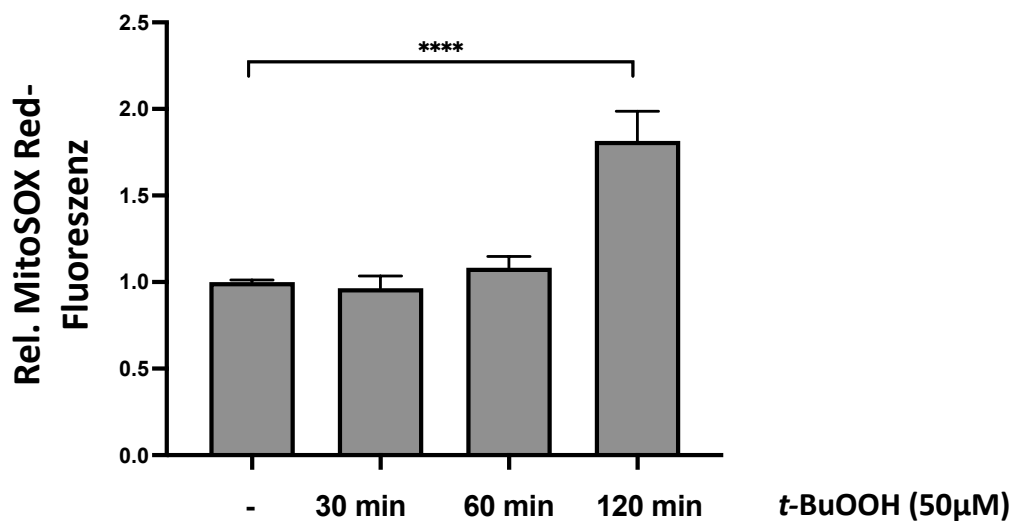


Abbildung 30 Einfluss von *t*-BuOOH auf mitochondriale Superoxide

Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz-Medianwerte aus $n=4$ als x -Faches der unbehandelten Kontrolle ($x=1$) mit Standardabweichung. Die MitoSOX Red-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert. Die NIH3T3-Zellen wurden für 30, 60 und 120min mit *t*-BuOOH (50 μ M) behandelt.

4.6.2 Einfluss von 2-APB, BAPTA-AM und Deferoxamin auf die *t*-BuOOH-induzierte mitochondriale Superoxidbildung

Nach den Ergebnissen, dass *t*-BuOOH zusätzlich eine Superoxid-Produktion in den Mitochondrien anregt (s. Abb. 30), war nun von Interesse, den Einfluss der bisher relevanten, getesteten Substanzen auf die Bildung mitochondrialer Superoxide zu testen.

Die **Abbildung 31** zeigt den Effekt von 2-APB, BAPTA-AM bzw. DF auf die *t*-BuOOH-induzierte Superoxidbildung. Die NIH3T3-Zellen wurden 2h mit *t*-BuOOH (50µM) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von 2-APB (100µM), BAPTA-AM (5µM) bzw. DF (100µM) behandelt. Die *t*-BuOOH-induzierte Superoxidbildung konnte vollständig durch BAPTA-AM gehemmt werden. Die Vorbehandlung mit 2-APB oder DF hatte dagegen keinen Einfluss auf die *t*-BuOOH-induzierte Superoxidbildung.

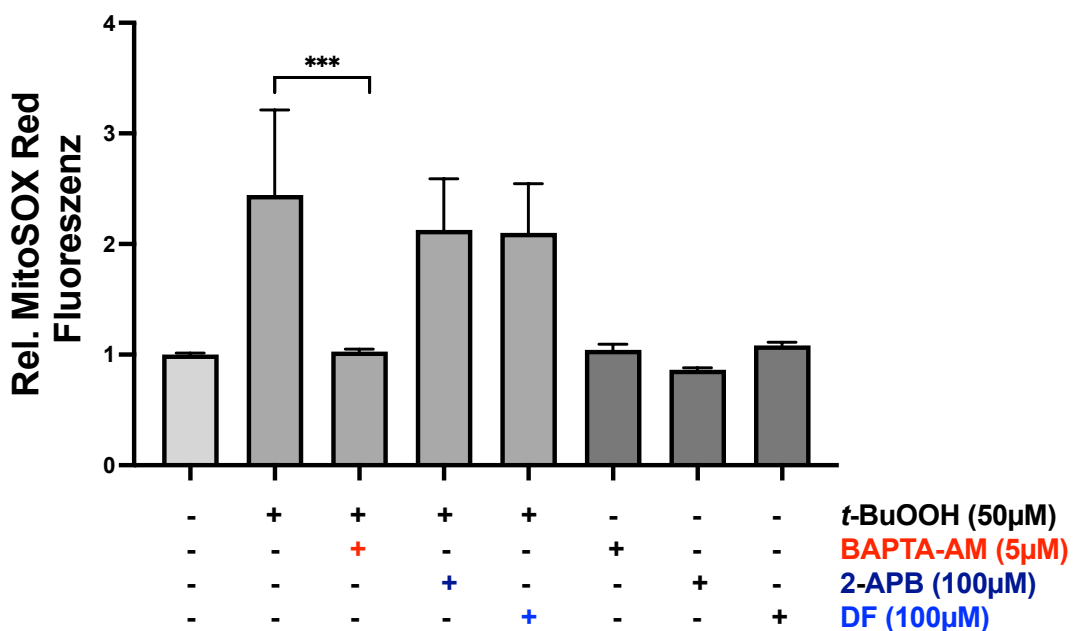


Abbildung 31 Einfluss von 2-APB, BAPTA-AM und DF auf die mitochondriale Superoxidbildung

Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz-Medianwerte aus n=4 als x-Faches der unbehandelten Kontrolle (x=1) mit Standardabweichung. Die MitoSOX-Red-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert. Die NIH3T3-Zellen wurden für 2h mit *t*-BuOOH (50µM) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von BAPTA-AM (5µM), in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von 2-APB (100µM) und in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von DF (100µM) behandelt.

4.7 Einfluss von mito-TEMPO auf den *t*-BuOOH-induzierten Zelltod

Da *t*-BuOOH die Produktion von mitochondrialen Superoxiden induziert, war nun die Überlegung, ob der mitochondriale Radikalfänger mito-TEMPO eine abschwächende Wirkung auf den *t*-BuOOH-induzierten Zelltod haben könnte.

4.7.1 Einfluss von mito-TEMPO auf den *t*-BuOOH (30/50 μ M)-induzierten Zelltod

Allerdings konnte dies nicht bestätigt werden. Dies gilt für die Anwendung von 50 μ M *t*-BuOOH (Abb. 32) wie auch für die Anwendung einer niedrigeren Konzentration von 30 μ M *t*-BuOOH (Abb. 33). Mito-TEMPO scheint gegenüber *t*-BuOOH zu schwach. Dabei kamen mito-TEMPO -Konzentrationen von 2 – 20 μ M zum Einsatz.

Die **Abbildung 32** zeigt den Einfluss von mito-TEMPO auf den durch 50 μ M *t*-BuOOH-induzierten Zelltod. NIH3T3-Zellen wurden mit *t*-BuOOH (50 μ M) in Kombination mit 2/ 5/ 10/ 20 μ M mito-TEMPO behandelt. Bei der Anwendung von 2 μ M mito-TEMPO ist ein schwach reduzierender, nicht signifikanten Effekt auf den Anteil PI-positiver Zellen zu erkennen (64,8% \pm 3,9% versus 57,8% \pm 6,2%).

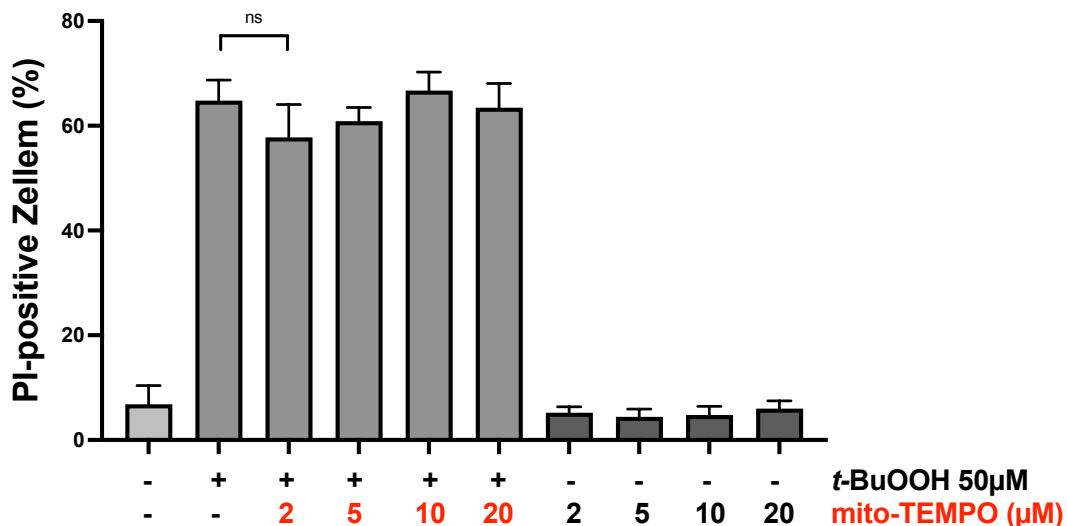


Abbildung 32 Einfluss von mito-TEMPO auf den *t*-BuOOH (50 μ M)-induzierten Zelltod

Dargestellt ist der Anteil PI-positiver Zellen in Prozent (n=4) mit Standardabweichung. Die NIH3T3-Zellen wurden 6h mit *t*-BuOOH (50 μ M) in Kombination mit mito-TEMPO 2/5/10/20 μ M) behandelt.

Die **Abbildung 33** zeigt den Effekt von mito-TEMPO auf den durch eine niedrigere 30µM *t*-BuOOH-Konzentration induzierten Zelltod. NIH3T3-Zellen wurden mit *t*-BuOOH 30µM in Kombination mit mito-TEMPO (2/ 5/ 10/ 20 µM) behandelt. Auch hier konnte keine signifikante Hemmung des *t*-BuOOH-induzierten Zelltods durch mito-TEMPO gezeigt werden.

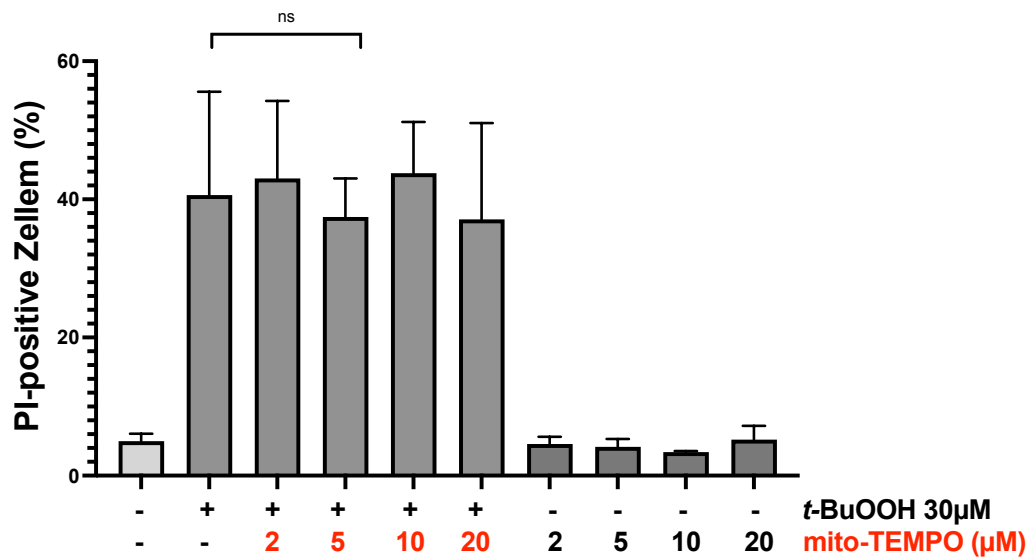


Abbildung 33 Einfluss von mito-TEMPO auf den *t*-BuOOH (30µM)-induzierten Zelltod

Dargestellt ist der Anteil PI-positiver Zellen in Prozent (n=4) mit Standardabweichung. Die NIH3T3-Zellen wurden 6h mit *t*-BuOOH (30µM) in Kombination mit mito-TEMPO (2/5/10/20 µM) behandelt.

Die **Abbildung 34** zeigt die erarbeiteten Ergebnisse in einem Schema: *t*-BuOOH wird intrazellulär als Radikal ($\text{OH}\cdot$, *t*-BuO \cdot , *t*-BuOO \cdot) umgesetzt (genaue Reaktion wird noch erforscht) und führt nachfolgend über das endoplasmatische Retikulum (ER) und zusätzliche Ca^{2+} -Speicher zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} und des Eisens im labilen Eisenpool (LIP). Ca^{2+} und Eisen haben Einfluss auf die gesteigerte Lipidperoxidation, welche anschließend zu einer Porenformation führt, die den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} ermöglicht. Der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} hat außerdem Auswirkung auf die Superoxidbildung in den Mitochondrien. Aufgrund der nahen Lagebeziehung zwischen ER und Mitochondrium beeinflusst das Ca^{2+} aus dem IP_3 -Rezeptor des ER das mitochondriale Membranpotenzial (MMP). Inwiefern Ca^{2+} und Eisen sich gegenseitig beeinflussen, ist noch ungeklärt. Auch die Wirkung von Eisen auf das MMP sowie die Rolle von Calcium bei der Umwandlung von *t*-BuOOH in Radikale, ist noch nicht aufgeschlüsselt.

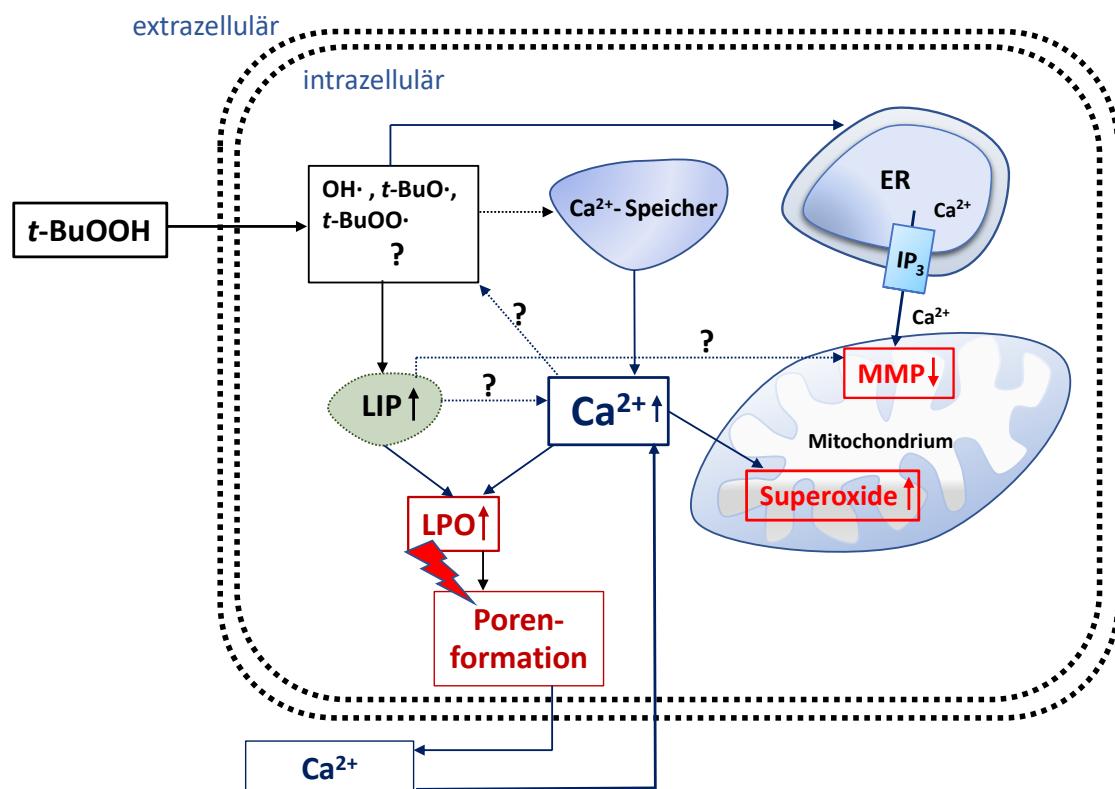


Abbildung 34 Schematische Ergebnisdarstellung

Ca^{2+} - Calcium, ER – endoplasmatisches Retikulum, IP_3 – Inositoltriphosphat-aktivierter Ca^{2+} -Kanal (des ER) - labiler Eisenpool, MMP – mitochondriales Membranpotenzial $\text{OH}\cdot$, *t*-BuO \cdot , *t*-BuOO \cdot - Radikale

5 Diskussion

Schon früh ist die gesteigerte Ca^{2+} -Freisetzung ins Zytosol während diverser Zelltodarten beobachtet worden, aber deren Funktion ist noch nicht vollends geklärt (Tan et al., 1998, McConkey and Orrenius, 1997). Die Rolle von Calcium innerhalb der Ferroptose ist Gegenstand der Forschung und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Arbeitsgruppe Pedrera et al. (2020) zeigte einen Calcium-Anstieg in NIH3T3 nach der Behandlung der Zellen mit Erastin und RSL-3. Erastin zeigte hier zwei unterschiedliche Ca^{2+} -Anstiege mittels FLUO-4-AM-Floureszenz, wobei der frühe Ca^{2+} -Anstieg unspezifisch für die Ferroptose erscheint, da er nicht mit Ferrostatin aufgehoben werden konnte. Ein späterer Ca^{2+} -Anstieg dagegen konnte als Kennzeichen der Ferroptose berücksichtigt werden, weil dieser mit Ferrostatin hemmbar war. Andere Autoren beschreiben einen Ca^{2+} -Anstieg in der Glutamat-induzierten Oxytose und vergleichen diese Zelltodart mit der Ferroptose (Murphy et al., 1989, Maher et al., 2018b). Die oxidative Glutamat-Toxizität in Nervenzellen ähnelt dem klassischen Ferroptose-mechanismus, da Glutamat zu einer Hemmung der Cystin-Aufnahme führt und somit den gemeinsamen initialen Schritt durchläuft, welcher dann zu GSH-Mangel führt; dies geht folglich mit einer Aktivierung von Lipoxygenasen, einer erhöhten Produktion von ROS und einem Ca^{2+} -Anstieg einher (Tan et al., 2001). Interessanterweise konnte diese Zelltodart durch CoCl_2 gehemmt werden (Tan et al., 1998). Auch 2-APB war in der Lage, den vor allem in der späten Phase dieses Zelltodprogramms ausgelösten Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär aufzuheben und den Zelltod damit zu verhindern (Henke et al., 2013). Andere Autoren berichten dagegen, Calcium habe keinen Einfluss auf die Ferroptose (Wolpaw et al., 2011, Dixon et al., 2012).

Eine Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch *t*-BuOOH wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen beschrieben (Guidarelli et al., 1997, Nicotera et al., 1988, Castilho et al., 1995). Auch in der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *t*-BuOOH zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums führt. Dies konnte in NIH3T3-Mausfibroblasten und der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco2 beobachtet werden (Dissertation Wenz, 2019). Sowohl der *t*-BuOOH-induzierte Zelltod als auch die LPO können in NIH3T3- und in Caco2-Zellen durch den Calcium-Chelator BAPTA-AM nahezu vollständig aufgehoben werden. Diese Beobachtungen sprechen für eine zentrale Rolle von Calcium in der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose. In NIH3T3-Zellen führt die Behandlung mit BAPTA-AM dagegen nur zu einer verlangsamten Ferroptose nach Erastin-Gabe, wobei nach 24h kein Unterschied zwischen BAPTA-AM-behandelten und unbehandelten Zellen besteht, und nur zu einer partiellen Hemmung der LPO führt (unveröffentlichte Ergebnisse). Calcium wird also für die Erastin-getriggerte Ferroptose nicht benötigt. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die *t*-BuOOH-induzierte Ferroptose andere Wege beinhaltet als die Erastin-induzierte Ferroptose.

5.1 Methodendiskussion

Die Durchflusszytometrie ermöglicht präzise und zuverlässige Angaben zu den intrazellulär ablaufenden Prozessen. Die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe geben spezifische Informationen über einzelne Zellfunktionen in lebenden Zellen. Eine Fehleranfälligkeit dieser Methodik besteht vor allem in der Handhabung: z.B. bei der Färbung der Zellrasen, beim Waschen der Zellen, beim Ernten der Zellen, damit die lebenden Zellen keinen zusätzlichen Schaden nehmen.

Die Messung des Zelltods mittels PI-Färbung gelingt, weil PI die geschädigte Zellmembran passieren kann und vitale Zellen ungefärbt bleiben. Somit gilt die PI-Färbung als unspezifisches Maß für die Permeabilität der Zellmembran. Die Diskriminierung zwischen Apoptose oder Nekrose, darunter auch die Ferroptose, kann nicht erfolgen. Allerdings konnte in vorausgegangenen Versuchen vielfach nachgewiesen werden, dass der ausgelöste Zelltod durch Ferrostatin-1 und Liproxstatin-1 gehemmt wird, was ein Charakteristikum der Ferroptose darstellt (Zilka et al., 2017, Miotto et al., 2020).

Das zytosolische Calcium wurde mit dem modifizierten FLUO-4-AM-Farbstoff angefärbt. Wie im Methodenteil beschrieben, dient die AM-Gruppe der besseren Retention in die Zelle. Zusätzlich erzielt das neuere Analogon zu FLUO-3 eine bessere Quantenausbeute, ist aber im Gegensatz zu Fura-2 nicht ratiometrisch. Da Calcium eine schnelle Zellantwort darstellt, sind genaue Oszillationen mit dieser Methode nur schwer greifbar. Die Akkumulation des Calciums im Zytosol kann durch das Anfärben mit FLUO-4-AM zwar erfasst werden, doch kann der Farbstoff auch intrazelluläre Membranen passieren und das dort befindliche Calcium anfärben. Die alleinige Calciummessung im Zytosol wäre z.B. mit Cal520 oder Calbryte 520-AM möglich (Young et al., 2022). Die Ca^{2+} -Indikatoren werden unter anderem durch Faktoren wie Osmolarität oder pH beeinflusst und variieren in den problematischen Eigenschaften des „Lecks“ („leakage“) und der Photostabilität (Thomas et al., 2000). Beim „leakage“ kann der Fluoreszenzfarbstoff nach einer gewissen Zeit wieder aus den Zellen diffundieren, sodass nicht alle Ereignisse erfasst werden können. Die Kinetik des intrazellulären Calciums findet ununterbrochen in vielen verschiedenen Zellkompartimenten statt, sodass es unmöglich ist einen intrazellulären Calciumfluss zu bestimmen. Die Durchflusszytometrie gewährt uns nur eine Momentaufnahme des angefärbten Calciums. Für weitere Untersuchungen kann der Farbstoff Rhod-2-AM das Calcium in den Mitochondrien anfärben (Davidson, 2018) und genetisch kodierbare Calcium-Indikatoren (GECIs) können in-vivo zelluläre und physiologische Prozesse des Calcium abbilden (Pérez Koldenkova and Nagai, 2013). Auch Lumineszenz-basierte Methoden können Echtzeit-Veränderungen als Reaktion auf einen Stimuli überwachen (Oh et al., 2019).

Die Lipidperoxidation wurde mit C11-BODIPY gemessen. Dies geschieht durch Oxidation einer Vielzahl von Radikalen (außer Superoxid), sodass folglich das Fluoreszenz-Emissionsspektrum von ~590nm auf ~510nm verschoben wird. Die genaue Lokalisation der stattfindenden LPO kann während der Durchflusszytometrie nicht detektiert werden. Man weiß, dass die LPO vermutlich an Biomembranen umgesetzt wird (Drummen et al., 2002). Mit der Live-Cell-Imaging Methode könnte man zukünftig unter dem Lichtmikroskop beobachten, wo genau C11-BODIPY in den NIH3T3 Zellen oxidiert wird (Prime et al., 2012). Da C11-BODIPY nicht die Abbauprodukte der Lipidperoxidation erfasst, könnte man weitere Methoden anwenden, z.B. über die Messung der Endprodukte der LPO wie das 4-Hydroxynonenal oder Malondialdehyd (Esterbauer et al., 1991, Ayala et al., 2014). Malondialdehyd kann mittels TBARS-Assay nachgewiesen werden, indem Thiobarbitursäure mit Malondialdehyd reagiert und ein rotes Produkt bildet, das fluorimetrisch nachgewiesen werden kann. 4-Hydroxynonenal kann über einen Antikörper mittels ELISA und Western Blot detektiert werden. Eine andere Möglichkeit würde die Messung der Lipidhydroperoxide mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Liperfluor bieten (Yamanaka et al., 2012).

Der Farbstoff DiOC₆ bindet an stoffwechselaktive mitochondriale negative Strukturen und entweicht beim Abfall des MMPs (Perry et al., 2011). Dies spiegelt sich in einem Verlust der Fluoreszenzintensität wider. Es gibt auch andere Fluoreszenzfarbstoffe, die den Abfall des MMPs erfassen können, wie z.B. TMRM, Rhodamin 123, JC-1 (Scaduto and Grotyohann, 1999, Sivandzade et al., 2019). Um die Rolle der Mitochondrien in der *t*-BuOOH-getriggerten Ferroptose besser zu verstehen, wäre eine Möglichkeit, Zellen ohne Mitochondrien (mittels Mitophagie) mit den bisherigen Messungen zu vergleichen (Gao et al., 2019).

Der Indikator MitoSOX wird durch das mitochondriale Superoxid oxidiert, was für eine Superoxidbildung nach *t*-BuOOH-Behandlung spricht.

Ergänzende Untersuchungen können zur zytosolischen ROS-Produkten durchgeführt werden z.B. mit H₂DCFDA, um die enge Beziehung und Interaktion von Calcium und ROS in der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose zu verstehen (Rastogi et al., 2010). Auch die Abfolge der ROS-Entstehung in zeitlichen und auch kausalen Bezug zur intrazellulären Calciumakkumulation könnte so untersucht werden.

Der Versuch, die Rolle der Superoxide in der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose mittels MitoTempo zu untersuchen, scheiterte möglicherweise an der überlegenen Superoxidbildung der Substanz *t*-BuOOH gegenüber dem Superoxid-Fänger mito-TEMPO, zumindest in den benutzten Konzentrationen von 2-20µM. In der Literatur konnte mito-TEMPO bereits einen inhibitorischen Effekt zeigen, wurde aber in höheren Konzentrationen verabreicht (100µM oder 10/20mg/Kg) (García-Navas A, 2021, Du et al., 2017). Ein weiterer möglicher Superoxid-Fänger ist das Tiron (Taiwo, 2008). Ein anderer Ansatz ist, das Superoxid über ein membran-

gebundenes Enzym aus der Enzymfamilie Superoxid-Oxidasen (SOO) zu oxidieren (Lundgren et al., 2018).

5.2 Ergebnisdiskussion

5.2.1 *t*-BuOOH induziert eine partielle Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER

Vorausgegangene Untersuchungen weisen darauf hin, dass der intrazelluläre Anstieg von Calcium innerhalb der ersten 2-3 Stunden nach *t*-BuOOH-Gabe aus der Freisetzung aus intrazellulären Organellen resultiert. Es ist bislang nicht bekannt, welche Organellen hier eine Rolle spielen. Vorbehandlung mit Dantrolen, einem Ryanodin-Rezeptor-Inhibitor des ER (Fruen et al., 1997), hatte weder einen Einfluss auf den *t*-BuOOH-induzierten Anstieg von Calcium, noch auf die Ferroptose (unveröffentlichte Beobachtung). Die Tatsache, dass der *t*-BuOOH-induzierte Calciumanstieg in Gegenwart von 2-APB zumindest teilweise gehemmt werden konnte, deutet darauf hin, dass Calcium aus dem ER über den IP₃-Rezeptor freigesetzt wird. Dafür spräche weiter, dass eine Vorbehandlung mit Thapsigargin, das über Hemmung von SERCA (Lytton et al., 1991) schnell die endoplasmatischen Calcium-Speicher entleert, zumindest in einem Versuch zu einem verminderten Anstieg des intrazellulären Calciums geführt hat. Diese Aussage müsste zukünftig durch weitere Versuche mit Thapsigargin bekräftigt werden. Auch wenn meines Wissens der Einfluss von *t*-BuOOH auf den IP₃-Rezeptor bislang nicht untersucht wurde, so weiß man doch, dass Thiolgruppen im IP₃-Rezeptor oxidiert werden können, was zur Sensitivierung des Rezeptors führt (Joseph et al., 2018).

Andere Arbeitsgruppen konnten allerdings keine Inhibition des *t*-BuOOH-induzierten Calciumanstieges durch 2-APB feststellen. So konnte die Arbeitsgruppe von Martinez et al. (2009) keine Hemmung durch 2-APB auf den *t*-BuOOH induzierten Ca²⁺-Anstieg in Pankreas-Azinuszellen von Ratten beobachten, allerdings verwendeten sie den Inhibitor in einer niedrigeren Konzentration von 30µM. So wird eine dosisabhängige Hemmung durch 2-APB auf die IP₃-Rezeptoren diverser Zelllinien beschrieben (Peppiatt et al., 2003, Maruyama et al., 1997). Auch in Rattenhepatozyten wurde gezeigt, dass 2-APB eine schwächere bis keine Wirkung auf die intrazelluläre Freisetzung von Calcium durch IP₃-Rezeptoren hat (Gregory et al., 2001). Diese Arbeitsgruppe berichtete von unterschiedlichen Subtypen von IP₃-Rezeptoren, die wahrscheinlich differenziert in diversen Zelllinien vorkommen und berücksichtigt werden müssten. Eine weitere mögliche Erklärung der abweichenden Ergebnisse können die unterschiedlich untersuchten Zelllinien sein, die möglicherweise verschiedene Konzentrationen von IP₃-Rezeptoren aufweisen (Bootman et al., 2002). Allerdings konnten Tan et al. (1998) zeigen, dass die Glutamat-induzierte Toxizität in HT-22-

Zellen durch 2-APB fast komplett aufgehoben werden konnte. Interessanterweise zeigen Glutamat-induzierte Toxizität und Ferroptose überlappendes intrazelluläres Signalling (Maher et al., 2018a).

Allerdings ist 2-APB kein spezifischer Inhibitor, sondern er blockiert auch store-operated calcium (SOC)-Kanäle (Leon-Aparicio et al., 2017, Putney and Bird, 1993). Ein Effekt auf die SOC-Kanäle kann nicht ausgeschlossen werden, ist aber unwahrscheinlich: eine Öffnung der SOC-Kanäle würde einen Calciumeinstrom von extrazellulär induzieren. Der intrazelluläre Anstieg von Calcium ist zumindest innerhalb der ersten 2,5h nach *t*-BuOOH-Gabe, aber in calciumfreien Medium nahezu unbeeinflusst (unveröffentlichte Beobachtung). Auch hatte CoCl_2 (s.u.) keinen Einfluss auf den intrazellulären Calciumanstieg und die Ferroptose. Dennoch sind für eine abschließende Aussage weitere Untersuchungen notwendig. So könnte z.B. durch ER-getargete genetisch kodierbare Calciumindikatoren („genetically encodable calcium indicators“ – GECIs) eine Freisetzung von Calcium aus dem ER näher untersucht werden.

Interessanterweise hatte 2-APB keinen Effekt auf die LPO oder den Zelltod, nur der Abfall des MMPs wurde gehemmt. Dies ist mit der engen Lagebeziehung von ER und Mitochondrium zu erklären (Missiroli et al., 2018, Morciano et al., 2018, Yang et al., 2020). So kann das aus dem ER freigesetzte Ca^{2+} nach der *t*-BuOOH-Behandlung vom Mitochondrium aufgenommen werden und dort das MMP beeinflussen.

Zusammen bestärken diese Versuche, dass Calcium in der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose in NIH3T3 Zellen zunächst partiell aus dem intrazellulären Speicher, dem ER, freigesetzt wird. Hierüber freigesetztes Calcium ist dann aber nicht an der Initiation oder Exekution der Ferroptose beteiligt. Darüber hinaus wird es aus zusätzlichen Kompartimenten bzw. über zusätzliche Mechanismen freigesetzt. Es ist zu untersuchen, aus welchen Organellen und über welche weiteren Mechanismen der Anstieg des intrazellulären Calciums verursacht wird.

5.2.2 Später Ca^{2+} -Anstieg von extrazellulär

Die Versuche mit CoCl_2 sollten bestätigen, dass Calcium nach *t*-BuOOH-Exposition nicht von extrazellulär über Kanäle in die Zellen gelangt. CoCl_2 ist ein unspezifischer Hemmstoff von Calcium-Kanälen, da Co^{2+} mit Ca^{2+} um die Aufnahme konkurriert (Palit S, 1991). In einigen Studien wurde gezeigt, dass CoCl_2 einen protektiven Effekt auf den Glutamat-induzierten Zelltod der neuronalen Zelllinie HT-22 hat (Davis and Maher, 1994, Tan et al., 1998, Li et al., 1997). In höheren Konzentrationen dagegen (ab 20 $\mu\text{g/ml}$) wirkt CoCl_2 zytotoxisch in Form von Ferroptose/ Oxytose in einer Neuroblastomzelllinie (undifferenzierte SH-SY5Y-Zellen) (Gupta et al., 2020).

CoCl₂ zeigte keinen hemmenden Effekt auf den *t*-BuOOH-induzierten Zelltod. In Übereinstimmung konnte CoCl₂ auch nicht den Anstieg des intrazellulären Calciums oder die LPO beeinflussen. Ich schliesse daraus, dass Calcium tatsächlich nicht von extrazellulär durch Calcium-Kanäle der Plasmamembran in die Zelle gelangt.

Als weitere Substanz wurde das Osmoprotektivum PEG getestet. PEG ist ab einem bestimmten Molekulargewicht in der Lage, den osmotischen Druck, der durch größere intrazelluläre Moleküle entsteht, auszugleichen (Marmolejo-Garza and Dolga, 2021). PEG verhindert somit den Einstrom von Wasser und Calcium durch gebildete Poren. So führt die Porenformation schließlich zu einer Ruptur der Zellmembran und zum Platzen der Zellen. Pedrera et al. konnten zeigen, dass die Behandlung von NIH3T3-Zellen mit Erastin oder RSL3 - nachgeschaltet der Lipidperoxidation - zu einem Einstrom von Wasser und Calcium führt, was schließlich die Ruptur der Zellmembran verursacht. PEG blockierte den Calciumeinstrom und verzögerte das Platzen der Zellen (Pedrera et al., 2020). Die Autoren schließen daraus, dass Porenbildung, Calcium- und Wassereinstrom und schließlich Platzen der Zelle ein wesentlicher Prozess innerhalb der Ferroptose darstellt. Ähnliche Beobachtungen wurden von Riegman und Mitarbeitern beschrieben (Riegman et al., 2020, Pedrera et al., 2020).

Die Calcium-Kinetik-Messung mit FLUO-4-AM zeigt, dass PEG nach 3h und vor allem nach 4h den *t*-BuOOH-induzierten Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ reduziert. Dies korreliert mit einer Hemmung des Zelltods. Diese Wirkung scheint spezifisch zu sein, da PEG keinen hemmenden Effekt auf die Staurosporin-induzierte Apoptose ausübte, sondern diese vielmehr verstärkte. Diese Ergebnisse weisen auf einen späten (ab 3h nach *t*-BuOOH-Gabe) Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär innerhalb der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose hin. Der frühe Anstieg des intrazellulären Calciums (bis 3h nach *t*-BuOOH-Gabe) beruht dagegen höchstwahrscheinlich auf einer Freisetzung von intrazellulären Speichern. Die Ergebnisse legen weiterhin den Schluss nahe, dass die Exekution der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose über Porenbildung, Calcium- und Wassereinstrom sowie Ruptur der Zellmembran vermittelt wird und damit in Analogie zur Erastin- bzw. RSL3-induzierten Ferroptose verläuft.

In der Studie von Pedrera et al. (2020) wurde kein Einfluss von PEG auf die RSL-3-induzierte LPO festgestellt. Entgegen der Ergebnisse dieser Studie konnte ich zeigen, dass PEG auch einen abschwächenden Effekt auf die *t*-BuOOH-induzierte LPO (gemessen nach 3h) ausübt, was mit einer Hemmung des intrazellulären Anstiegs von Calcium zu erklären ist. Im Gegensatz zur Erastin-induzierten Ferroptose, die unabhängig von Calcium verläuft (Dixon et al 2012, s.u.), wird Calcium für die *t*-BuOOH-induzierte Lipidperoxidation benötigt (Dissertation Wenz, 2019). Allerdings erkennt man eine Streuung, die zeigt, dass PEG teils hemmend, aber auch teils ohne Wirkung auf die LPO bleibt. Dies kann man damit erklären, dass die Porenbildung nicht immer exakt nach 3h beginnt, sondern von Versuch zu Versuch etwas

variiert. Findet sie etwas später als 3h statt, kann PEG nach 3h den Calciumeinstrom und damit die LPO nicht hemmen.

5.2.3 Zusammenspiel von Calcium und Eisen

Dixon et al. zeigten, dass BAPTA-AM, Fura-2 und EGTA keinen Einfluss auf die Erastin-induzierte Ferroptose in HT-1080 Zellen nach 24h haben (Dixon et al., 2012). Auch die Studie von Wolpaw et al. (2011) spricht gegen eine Funktion von Calcium in der Ferroptose. Die Arbeitsgruppe Maher et al. (2018) zeigte dagegen, dass in HT-22-Zellen u.a. Erastin zu einem intrazellulären Calciumanstieg führt (detektiert durch Fura-2AM), der das MMP und die mitochondriale ROS-Produktion beeinflusst.

In der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose dagegen konnte BAPTA-AM und Fura-2 den Zelltod aufheben (unveröffentlicht). Dies spricht für einen calciumabhängigen Mechanismus in der *t*-BuOOH-getriggerten Ferroptose. Auch die Erastin-induzierte Ferroptose konnte zu früheren Zeitpunkten (nach 10h, 14h und 18h) durch BAPTA-AM den Anteil PI-positiver Zellen senken, (unveröffentlicht). Nach 24h war allerdings kein Effekt von BAPTA-AM auf die Erastin-induzierte Ferroptose nachweisbar. Dies spricht für einen fasilitierenden Effekt von Calcium auf die Erastin-induzierte Ferroptose, jedoch scheint Calcium hier nicht notwendig zu sein.

Ein Charakteristikum der Ferroptose ist deren Abhängigkeit von Eisen (Dixon et al., 2012), dies gilt auch für die *t*-BuOOH-getriggerte Ferroptose (Wenz et al., 2018).

In dieser Arbeit sollte die Rolle von Calcium und Eisen auf die Mitochondrien, d.h. Generierung von Superoxiden (erfolgt nach 2h) und Abfall des MMPs (erfolgt nach 4h), nach *t*-BuOOH-Behandlung sowie deren gegenseitige Beeinflussung untersucht werden. Die Tatsache, dass BAPTA-AM sowohl die Bildung von Superoxiden als auch den Abfall des MMPs vermindern konnte, spricht für eine Beteiligung von Calcium an beiden Prozessen. Allerdings hatte 2-APB keinen Einfluss auf die Superoxidbildung, aber einen partiell hemmenden Effekt auf den Abfall des MMPs. Interessanterweise beginnt der Anstieg des intrazellulären Calciums erst nach 2,5h nach *t*-BuOOH-Behandlung (unveröffentlichte Beobachtung). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Effekte von BAPTA-AM und 2-APB ist, dass für die Generierung der Superoxide basales Calcium oder nur ein leichter Anstieg benötigt wird, was durch BAPTA-AM (nicht aber 2-APB) gehemmt wird, für den Abfall des MMPs jedoch ein stärkerer Anstieg des intrazellulären Calciums (zumindest teilweise aus dem ER freigesetzt) notwendig ist (der Anstieg wird durch 2-APB und BAPTA-AM gehemmt). Der zugrundeliegende Mechanismus der *t*-BuOOH-induzierten Superoxidbildung ist Gegenstand aktueller Untersuchungen der Arbeitsgruppe.

Der Eisenchelator Deferoxamin konnte zwar den Abfall des MMPs reduzieren, hatte aber keinen Einfluss auf die mitochondriale Superoxidproduktion. Dies lässt den Schluss zu, dass Eisen nicht für die Superoxidbildung, aber für den Abfall des MMPs benötigt wird. Darüber hinaus reduzierte die Behandlung mit Deferoxamin den Anstieg des intrazellulären Calciums. Interessanterweise erfolgt der Anstieg des labilen Eisenpools bereits 60min nach *t*-BuOOH-Gabe (unveröffentlicht, Kooperation mit Valentin Schatz, Regensburg), also bevor intrazelluläres Calcium ansteigt. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass BAPTA-AM den Anstieg des labilen Eisenpools nicht zu hemmen vermag (unveröffentlicht, Kooperation mit Valentin Schatz, Regensburg). Deferoxamin gelangt über Endozytose in die Zelle und chelatiert das Eisen innerhalb der Lysosomen/Endosomen (Subburayan et al., 2020). Möglich wäre daher, dass Deferoxamin in der Lage ist, zusätzliches lysosomales/endosomales Calcium zu binden. Dies ist eher unwahrscheinlich, da Deferoxamin spezifisch Eisen bindet (Livertox, 2012). Die Beobachtung legt den Schluss nahe, dass der Anstieg des labilen Eisenpools am Anstieg des intrazellulären Calciums zumindest teilweise beteiligt ist. Dies könnte durch Oxidation von Ca^{2+} -Kanälen geschehen mit einhergehender gesteigerter Ca^{2+} -Freisetzung, da ein Anstieg des LIP zu erhöhten ROS-Level führt und redox-sensitive Ca^{2+} -Kanäle aktiveren kann (Gleitze et al., 2021, Muñoz et al., 2011). Die Arbeitsgruppe Gleitze et al. (2021) regt mit ihren Untersuchungen zu der Interdependenz von Eisen-ROS-Calcium zu Therapiemöglichkeiten bei neurodegenerativen Erkrankungen an, die auf die übermäßige Ca^{2+} -Signalübertragung während der Ferroptose abzielen könnte. Die zugrundeliegenden Mechanismen müssen noch untersucht werden.

5.2.4 Einfluss des Mitochondriums

Die Rolle des Mitochondriums in der „klassischen“ Ferroptose wird in der Literatur widersprüchlich dargestellt. So konnte Dixon et al. keine Beeinflussung der Erastin- oder RSL3-induzierten Ferroptose in einer KRAS-mutierten Osteosarcom-Zelllinie mit DNA-depletierten Mitochondrien beobachten (Dixon et al., 2012). Gao et al. (2019) zeigten dagegen eine Beteiligung der Mitochondrien in der Ferroptose nach Erastinbehandlung oder Cysteindepletion, nicht aber nach RSL3-Behandlung. Sie untersuchten HT1080-Fibrosarkomzellen und MEF (Mäuse-Embryo-Fibroblasten), in denen die Mitochondrien mittels Mitophagie entfernt wurden. Diese zeigten dann eine höhere Resistenz gegenüber Ferroptose induziert durch Erastin oder Cysteinmangel. Zusätzlich konnte in dieser Studie mit diversen Inhibitoren der Atmungskette, u.a. mit Antimycin A, der Zelltod und auch die LPO - induziert durch Erastin oder Cysteinmangel - gehemmt werden.

Die Arbeitsgruppe untersuchte bereits die Rolle des Mitochondriums in der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose und erkannte, dass spezifische mitochondriale Radikalfänger wie die

Inhibitoren XJB-5-131 und JP-4-039 den Zelltod deutlich hemmen konnten (Wenz et al., 2017). In der *t*-BuOOH induzierten Ferroptose zeigte Antimycin A in dieser Arbeit in NIH3T3 Zellen einen verstärkenden Effekt auf den Zelltod. Der verstärkende Effekt von AMA konnte sowohl in der Kombination mit 50µM *t*-BuOOH als auch mit 30µM *t*-BuOOH beobachtet werden. Der Zelltod konnte mit Liproxstatin aufgehoben werden, was für den Weg der Ferroptose spricht. Die Behandlung mit AMA führt also nicht zu einem verminderten Zelltod. Auffällig ist, dass der verstärkende Effekt erst zu späteren Zeitpunkten (4 und 6h nach *t*-BuOOH-Gabe) auftritt. Interessanterweise wurde die LPO (C11-Bodipy-Messung) durch AMA nicht verstärkt. Um dies zu bestätigen, wird in der Arbeitsgruppe zur Zeit ein weiterer Assay zur Detektion der LPO (TBARS-Assay) angewendet. Die Tatsache, dass der verstärkende Effekt durch AMA relativ spät einsetzt und die LPO wahrscheinlich nicht beeinflusst ist, weist auf einen bislang unbekanntem Mechanismus downstream der LPO hin. Ob die AMA-induzierte Superoxidproduktion (Boveris and Cadenas, 1975) oder der Abfall des MMPs eine Rolle spielt, muss noch untersucht werden. (Auch wenn Superoxide nicht direkt Bodipy C11 oxidieren können, wäre es denkbar, dass aus den Superoxiden gebildetes H₂O₂ über die Fenton-Reaktion zu Hydroxylradikalen umgesetzt wird.) Auch die vergleichende Untersuchung mit Erastin in NIH3T3 Zellen konnte einen verstärkenden Effekt, vor allem in der Konzentration von 1µM Erastin, auf den Anteil der PI-positiven Zellen aufzeigen. Die LPO (C11-BODIPY-Messung) nach Erastin scheint von AMA unbeeinflusst. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen in der Studie von Gao et al. (2019), wobei hier allerdings eine andere Zelllinie untersucht wurde. Die Beteiligung der Mitochondrien in der Ferroptose scheint also nicht nur vom Ferroptose-Auslöser, sondern auch von der verwendeten Zelllinie abhängig zu sein.

Um herauszufinden, ob mitochondriale ROS produziert werden, wurde mittels MitoSOXRed untersucht, ob es während des *t*-BuOOH-induzierten Ferroptosemechanismus zu einer Freisetzung von Superoxiden aus den Mitochondrien kommt. Die MitoSOXRed-Messung konnte aufzeigen, dass *t*-BuOOH nach 2h zu einer Verdopplung der MitoSOXRed-Fluoreszenz führt und somit eine Superoxidbildung in den Mitochondrien auslöst. Diese Superoxidproduktion konnte durch BAPTA-AM gehemmt werden. 2-APB und DF konnten diese Superoxidproduktion dagegen nicht hemmen (s.o. 4.6.2). Diese Untersuchung weist auf einen verstärkenden Effekt von Calcium auf die schädigenden Prozesse in der *t*-BuOOH ausgelösten Ferroptose hin.

In weiteren Untersuchungen sollte der mitochondriale Radikalfänger mito-TEMPO Aufschluss über die mitochondriale ROS-Bildung während der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose geben. Bei den verwendeten Konzentrationen an mito-TEMPO in NIH3T3-Zellen habe ich mich an der verfügbaren Literatur orientiert, in der ebenfalls mit NIH3T3-Zellen gearbeitet wurde (De Sanctis et al., 2016). Die Ergebnisse zeigten jedoch keinen signifikanten hemmenden Effekt

auf den *t*-BuOOH-induzierten Zelltod. Diese Daten könnten auf eine zu starke Wirkung des *t*-BuOOH als Radikal hinweisen, dass von dem Radikalfänger mito-TEMPO unbeeindruckt bleibt. Möglicherweise könnten höhere Konzentrationen an mito-TEMPO eingesetzt werden. So konnte ein hemmender Effekt von 100µM mito-TEMPO auf den Erastin induzierten Zelltod in primären Mausfibroblasten gezeigt werden (Park and Chung, 2019).

Insgesamt verdeutlichen die teilweise unterschiedlichen Ergebnisse in der vergangenen Literatur, dass Ferroptose nicht nur den kanonischen Mechanismus beherbergen muss.

5.3 Ausblick

Die Untersuchungen zur *t*-BuOOH induzierten Ferroptose konnten teilweise Aufschluss über die Herkunft des Calciums liefern.

Deutlich herausgearbeitet wurde, dass nach *t*-BuOOH-Behandlung eine frühe partielle Freisetzung aus dem ER und anderer Organellen und ein späterer Einstrom von Calcium durch Poren erfolgt. Es bleibt jedoch offen, welche weiteren Zellorganellen, wie z.B. die Lysosomen, an einem zytosolischen Ca²⁺-Anstieg nach *t*-BuOOH-Behandlung beteiligt sind.

Wie Calcium die mitochondriale Superoxid-Produktion anfeuert und ob die Superoxide eine Rolle in der *t*-BuOOH-getriggerten Ferroptose spielen, bleibt ebenso Gegenstand der Forschung. Auch der Zusammenhang zwischen der Erhöhung des labilen Eisenpools und der Calciumfreisetzung muss noch näher untersucht werden.

Die Rolle von Calcium in der *t*-BuOOH-induzierten LPO ist ebenso noch unklar. *t*-BuOOH muss metabolisiert werden, um zelluläre Schäden zu verursachen. In Analogie zur Fenton-Reaktion kann ein Alkoxyradikal gebildet werden, die Fenton-Reaktion ist aber nur eisenabhängig, jedoch unabhängig von Calcium. *t*-BuOOH kann außerdem nicht-radikalisch über GPX detoxifiziert werden, was zum Abfall des intrazellulären GSHs führt. Allerdings benötigt diese Reaktion - soweit mir bekannt - kein Calcium. Eine mögliche Rolle von Lipoxygenasen, NADPH-Oxidasen und der Xanthin-Oxidase, die ebenfalls ROS produzieren und damit die Lipidperoxidation triggern könnten, ist unwahrscheinlich, da pharmakologische Inhibitoren dieser Enzyme keinen Einfluss auf die *t*-BuOOH-induzierte Lipidperoxidation oder den Zelltod ausüben (unveröffentlichte Beobachtung). Denkbar wäre dagegen eine calciumabhängige Bildung von Radikalen, die dann die LPO initiieren. So arbeiten einige mitochondriale Enzyme (z.B. FAD-Glycerolphosphat-Dehydrogenase, Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase, Oxoglutarat-dehydrogenase-Komplex, NAD-Isocitrat-Dehydrogenase), die die für den *t*-BuOOH-Metabolismus notwendigen Reduktionsäquivalente liefern, calciumabhängig (Denton, 2009). Hier werden die Versuche mit Mitochondrien-depletierten NIH3T3-Zellen (Gao et al.,

2019) weitere Hinweise liefern. Möglich wäre auch eine Radikalbildung unter Beteiligung mikrosomaler Enzyme, wie die NADPH-Cytochrom P450 Oxidoreduktase (Davies, 1989), deren Aktivität durch divalente Kationen wie Calcium stimuliert wird (Yamazaki et al., 1995). Dies könnte z.B. durch den Einsatz von siRNA oder der Crispr/Cas9 -Technik untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Die Behandlung der NIH3T3 Zellen mit *t*-BuOOH führt zu einem deutlichen Anstieg des zytosolischen Calciums. Die Untersuchungen lassen zwei Arten des zytosolischen Ca²⁺-Anstiegs ausgelöst durch *t*-BuOOH erkennen: 1.) die initiale, aus intrazellulären Speichern induzierte Ca²⁺-Freisetzung und 2.) der späte extrazelluläre Ca²⁺-Einstrom ausgelöst durch die Porenformation und Desintegration der Plasmamembran. Diese Veränderungen sind auch morphologisch unter dem Mikroskop als Zytoplasmaschwellungen sichtbar und stellen sich in Form seifenblasenartigen Strukturen dar. Die initiale Freisetzung aus intrazellulären Speichern ist notwendig für die LPO und damit Initiation der Ferroptose. Der späte Einstrom von Calcium durch Poren ist für die Exekution der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose verantwortlich. Darüber hinaus ist Calcium notwendig für die Bildung von Superoxiden und den Abfall des MMPs nach *t*-BuOOH-Behandlung. Hierbei scheint die Freisetzung von Calcium aus verschiedenen Zellorganellen unterschiedliche Effekte zu bewirken.

Die initiale, partielle Freisetzung des Calciums aus dem intrazellulären Speicher (ER) führt zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials. Dieser Mechanismus konnte teilweise durch 2-APB, einem IP₃-Rezeptor- Inhibitor, gehemmt werden. Diese partielle Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER konnte in einem Versuch auch durch die Depletierung des ER mit TG bestätigt werden, bedarf aber noch weiterer Untersuchungen, um eine belegbare Aussage zu treffen. Es ist möglich, dass das freigesetzte Calcium über die IP₃-Rezeptoren des ER aufgrund der engen Lagebeziehung zum Mitochondrium in dieses aufgenommen und das MMP dadurch beeinträchtigt wird. Dieses aus dem ER freigesetzte Calcium zeigte jedoch keinen Einfluss auf die LPO oder die Superoxidbildung (s.o.), was auf eine zusätzliche Herkunft von Calcium aus anderen Organellen (z.B. aus den Lysosomen oder Mitochondrien) hinweist. Dieses Calcium könnte dann verantwortlich sein für die LPO und damit Initiation der Ferroptose. Die LPO wiederum führt zur Porenformation (die zugrundeliegenden Mechanismen müssen noch untersucht werden), sodass zusätzliches Calcium von extrazellulär einströmt. Dieser späte Einstrom von extrazellulär befeuert wiederum die LPO und ist aber vor allem für die Exekution der Ferroptose verantwortlich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weiterhin, dass *t*-BuOOH zu einer mitochondrialen Superoxidfreisetzung führt, die ebenfalls calciumabhängig verläuft. Inwiefern die Bildung von Superoxiden einen Einfluss auf die *t*-BuOOH-induzierte Ferroptose ausübt, muss noch untersucht werden. Antimycin A, ein Inhibitor des Komplex III der Atmungskette, beschleunigte und verstärkte die *t*-BuOOH induzierte Ferroptose, hatte aber keinen Effekt auf die LPO. Dies deutet darauf hin, dass Antimycin A downstream der LPO in den Ferroptoseweg eingreift. Die zugrundeliegenden Mechanismen müssen noch untersucht werden. Insgesamt lassen die Daten den Schluss zu, dass das Mitochondrium in der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose eine wichtige Rolle spielt.

Die Ergebnisse der Arbeit deuten darauf hin, dass der Anstieg des intrazellulären Calciums zumindest partiell durch einen Anstieg des labilen Eisenpools verursacht wird, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen noch unklar sind. Es wurde bereits gezeigt, dass Eisen für die *t*-BuOOH-induzierte Lipidperoxidation und damit Ferroptose essenziell ist. Hier konnte weiterhin gezeigt werden, dass Eisen am Abfall des MMPs beteiligt ist, nicht aber an der Produktion von Superoxiden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Calcium in der *t*-BuOOH-induzierten Ferroptose, aber auch anderen zellulären Effekten wie Superoxidproduktion und Abfall des MMPs eine zentrale Rolle spielt. Damit scheint sich die *t*-BuOOH-getriggerte Ferroptose vom kanonischen Weg der Ferroptose zu unterscheiden.

7 Literaturverzeichnis

- ABRAMS, R. P., CARROLL, W. L. & WOERPEL, K. A. 2016. Five-Membered Ring Peroxide Selectively Initiates Ferroptosis in Cancer Cells. *ACS Chemical Biology*, 11, 1305-1312.
- ANGELOVA, P. R., CHOI, M. L., BEREZHNOV, A. V., HORROCKS, M. H., HUGHES, C. D., DE, S., RODRIGUES, M., YAPOM, R., LITTLE, D., DOLT, K. S., KUNATH, T., DEVINE, M. J., GISSEN, P., SHCHEPINOV, M. S., SYLANTYEV, S., PAVLOV, E. V., KLENERMAN, D., ABRAMOV, A. Y. & GANDHI, S. 2020. Alpha synuclein aggregation drives ferroptosis: an interplay of iron, calcium and lipid peroxidation. *Cell Death Differ*, 27, 2781-2796.
- ASHRAF, A. & SO, P.-W. 2020. Spotlight on Ferroptosis: Iron-Dependent Cell Death in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12.
- AYALA, A., MUÑOZ, M. F. & ARGÜELLES, S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 360438.
- BADGLEY, M. A., KREMER, D. M., MAURER, H. C., DELGIORNO, K. E., LEE, H.-J., PUROHIT, V., SAGALOVSKIY, I. R., MA, A., KAPILIAN, J., FIRL, C. E. M., DECKER, A. R., SASTRA, S. A., PALERMO, C. F., ANDRADE, L. R., SAJJAKULNUKIT, P., ZHANG, L., TOLSTYKA, Z. P., HIRSCHHORN, T., LAMB, C., LIU, T., GU, W., SEELEY, E. S., STONE, E., GEORGIU, G., MANOR, U., IUGA, A., WAHL, G. M., STOCKWELL, B. R., LYSSIOTIS, C. A. & OLIVE, K. P. 2020. Cysteine depletion induces pancreatic tumor ferroptosis in mice. *Science*, 368, 85.
- BARR, D. P. & MASON, R. P. 1995. Mechanism of Radical Production from the Reaction of Cytochrome *c* with Organic Hydroperoxides.: AN ESR SPIN TRAPPING INVESTIGATION *. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 12709-12716.
- BARTOLI, G. M., PICCIONI, E., AGOSTARA, G., CALVIELLO, G. & PALOZZA, P. 1994. Different Mechanisms of tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Lethal Injury in Normal and Tumor Thymocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312, 81-87.
- BAYIR, H., ANTHONYMUTHU, T. S., TYURINA, Y. Y., PATEL, S. J., AMOSCATO, A. A., LAMADE, A. M., YANG, Q., VLADIMIROV, G. K., PHILPOTT, C. C. & KAGAN, V. E. 2020. Achieving Life through Death: Redox Biology of Lipid Peroxidation in Ferroptosis. *Cell Chemical Biology*, 27, 387-408.
- BELIKOVA, N. A., TYURINA, Y. Y., BORISENKO, G., TYURIN, V., SAMHAN ARIAS, A. K., YANAMALA, N., FURTMÜLLER, P. G., KLEIN-SEETHARAMAN, J., OBINGER, C. & KAGAN, V. E. 2009. Heterolytic Reduction of Fatty Acid Hydroperoxides by Cytochrome *c*/Cardiolipin Complexes: Antioxidant Function in Mitochondria. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 11288-11289.

- BELLOMO, G., JEWELL, S. A., THOR, H. & ORRENIUS, S. 1982. Regulation of intracellular calcium compartmentation: studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79, 6842.
- BENTLE, M. S., REINICKE, K. E., BEY, E. A., SPITZ, D. R. & BOOTHMAN, D. A. 2006. Calcium-dependent Modulation of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Alters Cellular Metabolism and DNA Repair ^{*}. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 33684-33696.
- BERGHE, T. V., LINKERMANN, A., JOUAN-LANHOUE, S., WALCZAK, H. & VANDENABEELE, P. 2014. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 135-147.
- BERRIDGE, M. J., LIPP, P. & BOOTMAN, M. D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1, 11-21.
- BLENN, C., WYRSCH, P. & ALTHAUS, F. 2010. Messung von zytosolischem Ca²⁺ als Indikator toxischer Zellschädigung.
- BOOTMAN, M. D., COLLINS, T. J., MACKENZIE, L., RODERICK, H. L., BERRIDGE, M. J. & PEPPIATT, C. M. 2002. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *The FASEB Journal*, 16, 1145-1150.
- BOVERIS, A. & CADENAS, E. 1975. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett*, 54, 311-4.
- BROOKES, P. S., YOON, Y., ROBOTHAM, J. L., ANDERS, M. W. & SHEU, S. S. 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, C817-33.
- BUNTINAS, L., GUNTER, K. K., SPARAGNA, G. C. & GUNTER, T. E. 2001. The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1504, 248-261.
- CASTILHO, R. F., KOWALTOWSKI, A. J., MEINICKE, A., BECHARA, E. J. H. & VERCESI, A. E. 1995. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, 18, 479-486.
- CHENG, Z. & LI, Y. 2007. What Is Responsible for the Initiating Chemistry of Iron-Mediated Lipid Peroxidation: An Update. *Chemical Reviews*, 107, 748-766.
- CHRISTENSEN, K. A., MYERS, J. T. & SWANSON, J. A. 2002. pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *Journal of Cell Science*, 115, 599-607.
- CONRAD, M., KAGAN, V. E., BAYIR, H., PAGNUSSAT, G. C., HEAD, B., TRABER, M. G. & STOCKWELL, B. R. 2018. Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species. *Genes Dev*, 32, 602-619.

- DAI, E., MENG, L., KANG, R., WANG, X. & TANG, D. 2020. ESCRT-III-dependent membrane repair blocks ferroptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 522, 415-421.
- DAVIDSON, S., DUCHEN, M. 2018. *Mitochondrial Bioenergetics*, Springer Protocols.
- DAVIES, M. J. 1989. Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. *The Biochemical journal*, 257, 603-606.
- DAVIS, J. B. & MAHER, P. 1994. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Research*, 652, 169-173.
- DE SANCTIS, G., SPINELLI, M., VANONI, M. & SACCO, E. 2016. K-Ras Activation Induces Differential Sensitivity to Sulfur Amino Acid Limitation and Deprivation and to Oxidative and Anti-Oxidative Stress in Mouse Fibroblasts. *PloS one*, 11, e0163790-e0163790.
- DENMEADE, S. R. & ISAACS, J. T. 2005. The SERCA pump as a therapeutic target: Making a "smart bomb" for prostate cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 4, 21-29.
- DENTON, R. M. 2009. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787, 1309-1316.
- DISSERTATION WENZ, C. 2019. *Cell confluence as crucial regulator of ROS-induced toxicity: Analysis of t-BuOOH-induced cell death in vitro*.
- DIXON, SCOTT J., LEMBERG, KATHRYN M., LAMPRECHT, MICHAEL R., SKOUTA, R., ZAITSEV, ELEINA M., GLEASON, CAROLINE E., PATEL, DARPAN N., BAUER, ANDRAS J., CANTLEY, ALEXANDRA M., YANG, WAN S., MORRISON, B. & STOCKWELL, BRENT R. 2012. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, 149, 1060-1072.
- DOBRYDNEVA, Y. & BLACKMORE, P. 2001. 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly inhibits store-operated calcium entry channels in human platelets. *Mol Pharmacol*, 60, 541-52.
- DRUMMEN, G. P., VAN LIEBERGEN, L. C., OP DEN KAMP, J. A. & POST, J. A. 2002. C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radic Biol Med*, 33, 473-90.
- DU, K., FARHOOD, A. & JAESCHKE, H. 2017. Mitochondria-targeted antioxidant Mito-Tempo protects against acetaminophen hepatotoxicity. *Archives of Toxicology*, 91, 761-773.
- ESTERBAUER, H., SCHAUR, R. J. & ZOLLNER, H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11, 81-128.
- FARGHALI, H., KAMENIKOVÁ, L., HYNIE, S. & KMONICKOVÁ, E. 2000. Silymarin effects on intracellular calcium and cytotoxicity: a study in perfused rat hepatocytes after oxidative stress injury. *Pharmacol Res*, 41, 231-7.

- FOSKETT, J. K., WHITE, C., CHEUNG, K.-H. & MAK, D.-O. D. 2007. Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels. *Physiological reviews*, 87, 593-658.
- FRIEDMANN ANGELI, J. P., SCHNEIDER, M., PRONETH, B., TYURINA, Y. Y., TYURIN, V. A., HAMMOND, V. J., HERBACH, N., AICHLER, M., WALCH, A., EGGENHOFER, E., BASAVARAJAPPA, D., RÅDMARK, O., KOBAYASHI, S., SEIBT, T., BECK, H., NEFF, F., ESPOSITO, I., WANKE, R., FÖRSTER, H., YEFREMOVA, O., HEINRICHMEYER, M., BORNKAMM, G. W., GEISSLER, E. K., THOMAS, S. B., STOCKWELL, B. R., O'DONNELL, V. B., KAGAN, V. E., SCHICK, J. A. & CONRAD, M. 2014. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nature cell biology*, 16, 1180-1191.
- FRUEN, B. R., MICKELSON, J. R. & LOUIS, C. F. 1997. Dantrolene Inhibition of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Release by Direct and Specific Action at Skeletal Muscle Ryanodine Receptors *. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 26965-26971.
- GALLUZZI, L., VITALE, I., AARONSON, S. A., ABRAMS, J. M., ADAM, D., AGOSTINIS, P., ALNEMRI, E. S., ALTUCCI, L., AMELIO, I., ANDREWS, D. W., ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M., ANTONOV, A. V., ARAMA, E., BAEHRECKE, E. H., BARLEV, N. A., BAZAN, N. G., BERNASSOLA, F., BERTRAND, M. J. M., BIANCHI, K., BLAGOSKLONNY, M. V., BLOMGREN, K., BORNER, C., BOYA, P., BRENNER, C., CAMPANELLA, M., CANDI, E., CARMONA-GUTIERREZ, D., CECCONI, F., CHAN, F. K. M., CHANDEL, N. S., CHENG, E. H., CHIPUK, J. E., CIDLOWSKI, J. A., CIECHANOVER, A., COHEN, G. M., CONRAD, M., CUBILLOS-RUIZ, J. R., CZABOTAR, P. E., D'ANGIOLELLA, V., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., DE LAURENZI, V., DE MARIA, R., DEBATIN, K.-M., DEBERARDINIS, R. J., DESHMUKH, M., DI DANIELE, N., DI VIRGILIO, F., DIXIT, V. M., DIXON, S. J., DUCKETT, C. S., DYNLACHT, B. D., EL-DEIRY, W. S., ELROD, J. W., FIMIA, G. M., FULDA, S., GARCÍA-SÁEZ, A. J., GARG, A. D., GARRIDO, C., GAVATHIOTIS, E., GOLSTEIN, P., GOTTLIEB, E., GREEN, D. R., GREENE, L. A., GRONEMEYER, H., GROSS, A., HAJNOCZKY, G., HARDWICK, J. M., HARRIS, I. S., HENGARTNER, M. O., HETZ, C., ICHIJO, H., JÄÄTTELÄ, M., JOSEPH, B., JOST, P. J., JUIN, P. P., KAISER, W. J., KARIN, M., KAUFMANN, T., KEPP, O., KIMCHI, A., KITSIS, R. N., KLIONSKY, D. J., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LEE, S. W., LEMASTERS, J. J., LEVINE, B., LINKERMANN, A., LIPTON, S. A., LOCKSHIN, R. A., LÓPEZ-OTÍN, C., LOWE, S. W., LUEDDE, T., LUGLI, E., MACFARLANE, M., MADEO, F., MALEWICZ, M., MALORNI, W., MANIC, G., et al. 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25, 486-541.

- GAO, M., MONIAN, P., PAN, Q., ZHANG, W., XIANG, J. & JIANG, X. 2016. Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Research*, 26, 1021-1032.
- GAO, M., YI, J., ZHU, J., MINIKES, A. M., MONIAN, P., THOMPSON, C. B. & JIANG, X. 2019. Role of Mitochondria in Ferroptosis. *Molecular Cell*, 73, 354-363.e3.
- GARCÌA-COHEN, E., MARÌN, J., DÌEZ-PICAZO, L. D., BAENA, A. B., SALAICES, M. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, M. Oxidative Stress Induced by tert-Butyl Hydroperoxide Causes Vasoconstriction in the Aorta from Hypertensive and Aged Rats : Role of Cyclooxygenase-2 Isoform 1. 2000.
- GARCÌA-NAVAS A, L.-B. P., GÓMEZ C, BATANÁS F, CALZADA N 2021. Critical requirement of SOS1 RAS-GEF function for mitochondrial dynamics, metabolism, and redox homeostasis. *nature*.
- GASCHLER, M. M. & STOCKWELL, B. R. 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 482, 419-425.
- GLEITZE, S., PAULA-LIMA, A., NÚÑEZ, M. T. & HIDALGO, C. 2021. The calcium–iron connection in ferroptosis-mediated neuronal death. *Free Radical Biology and Medicine*, 175, 28-41.
- GREGORY, R. B., RYCHKOV, G. & BARRITT, G. J. 2001. Evidence that 2-aminoethyl diphenylborate is a novel inhibitor of store-operated Ca²⁺ channels in liver cells, and acts through a mechanism which does not involve inositol trisphosphate receptors. *Biochem J*, 354, 285-90.
- GUATIMOSIM, S., GUATIMOSIM, C. & SONG, L.-S. 2011. Imaging calcium sparks in cardiac myocytes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 689, 205-214.
- GUIDARELLI, A., CLEMENTI, E., SCIORATI, C., CATTABENI, F. & CANTONI, O. 1997. Calcium-Dependent Mitochondrial Formation of Species Mediating DNA Single Strand Breakage in U937 Cells Exposed to Sublethal Concentrations of Tert-Butylhydroperoxide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 283, 66.
- GUNTER, T. E. & PFEIFFER, D. R. 1990. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*, 258, C755-86.
- GUPTA, G., GLIGA, A., HEDBERG, J., SERRA, A., GRECO, D., ODNEVALL WALLINDER, I. & FADEEL, B. 2020. Cobalt nanoparticles trigger ferroptosis-like cell death (oxytosis) in neuronal cells: Potential implications for neurodegenerative disease. *The FASEB Journal*, 34, 5262-5281.
- HARRISON, P. M. & AROSIO, P. 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1275, 161-203.
- HASSANNIA, B., VANDENABEELE, P. & VANDEN BERGHE, T. 2019. Targeting Ferroptosis to Iron Out Cancer. *Cancer Cell*, 35, 830-849.

- HENKE, N., ALBRECHT, P., BOUCHACHIA, I., RYAZANTSEVA, M., KNOLL, K., LEWERENZ, J., KAZNACHEYEVA, E., MAHER, P. & METHNER, A. 2013. The plasma membrane channel ORAI1 mediates detrimental calcium influx caused by endogenous oxidative stress. *Cell Death Dis*, 4, e470.
- HERSHKO, C., LINK, G. & CABANTCHIK, I. 1998. Pathophysiology of iron overload. *Ann N Y Acad Sci*, 850, 191-201.
- HOU, W., XIE, Y., SONG, X., SUN, X., LOTZE, M. T., ZEH, H. J., KANG, R. & TANG, D. 2016. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin. *Autophagy*, 12, 1425-1428.
- IVANOVA, H., KERKHOF, M., LA ROVERE, R. M. & BULTYNCK, G. 2017. Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Ca²⁺ Fluxes Underlying Cancer Cell Survival. *Frontiers in Oncology*, 7.
- JOSEPH, S. K., YOUNG, M. P., ALZAYADY, K., YULE, D. I., ALI, M., BOOTH, D. M. & HAJNÓCZKY, G. 2018. Redox regulation of type-I inositol trisphosphate receptors in intact mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 293, 17464-17476.
- KAKHLON, O. & CABANTCHIK, Z. I. 2002. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes¹ ¹This article is part of a series of reviews on "Iron and Cellular Redox Status." The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 1037-1046.
- KANUPRIYA, PRASAD, D., SAI RAM, M., SAWHNEY, R. C., ILAVAZHAGAN, G. & BANERJEE, P. K. 2007. Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced cytotoxicity in U-937 macrophages by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Toxicol In Vitro*, 21, 846-54.
- KENNEDY, C. H., CHURCH, D. F., WINSTON, G. W. & PRYOR, W. A. 1992. Tert-butyl hydroperoxide-induced radical production in rat liver mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, 12, 381-387.
- KOCH, G. L. 1990. The endoplasmic reticulum and calcium storage. *Bioessays*, 12, 527-31.
- KORKOTIAN, E. & SEGAL, M. 1996. Lasting effects of glutamate on nuclear calcium concentration in cultured rat hippocampal neurons: regulation by calcium stores. *The Journal of physiology*, 496 (Pt 1), 39-48.
- LANG, F. B., R.; SCHMIDT, R 2019. Kalzium-, Magnesium- und Phosphathaushalt. In: BRANDES, R., LANG, F. & SCHMIDT, R. F. (eds.) *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- LI, Y., MAHER, P. & SCHUBERT, D. 1997. A Role for 12-lipoxygenase in Nerve Cell Death Caused by Glutathione Depletion. *Neuron*, 19, 453-463.
- LIVERTOX 2012. Chelating Agents. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.

- ŁUCZAJ, W. & SKRZYDLEWSKA, E. 2003. DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell Mol Biol Lett*, 8, 391-413.
- LUNDGREN, C. A. K., SJÖSTRAND, D., BINER, O., BENNETT, M., RUDLING, A., JOHANSSON, A.-L., BRZEZINSKI, P., CARLSSON, J., VON BALLMOOS, C. & HÖGBOM, M. 2018. Scavenging of superoxide by a membrane-bound superoxide oxidase. *Nature Chemical Biology*, 14, 788-793.
- LYTTON, J., WESTLIN, M. & HANLEY, M. 1991. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *The Journal of biological chemistry*, 266, 17067-71.
- MAHER, P., VAN LEYEN, K., DEY, P. N., HONRATH, B., DOLGA, A. & METHNER, A. 2018a. The role of Ca²⁺ in cell death caused by oxidative glutamate toxicity and ferroptosis. *Cell Calcium*, 70, 47-55.
- MAHER, P., VAN LEYEN, K., DEY, P. N., HONRATH, B., DOLGA, A. & METHNER, A. 2018b. The role of Ca(2+) in cell death caused by oxidative glutamate toxicity and ferroptosis. *Cell calcium*, 70, 47-55.
- MARCHI, S., PATERGNANI, S., MISSIROLI, S., MORCIANO, G., RIMESSI, A., WIECKOWSKI, M. R., GIORGI, C. & PINTON, P. 2018. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium*, 69, 62-72.
- MARMOLEJO-GARZA, A. & DOLGA, A. M. 2021. PEG out through the pores with the help of ESCRTIII. *Cell Calcium*, 97, 102422.
- MARUYAMA, T., KANAJI, T., NAKADE, S., KANNO, T. & MIKOSHIBA, K. 1997. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem*, 122, 498-505.
- MCCONKEY, D. J. & ORRENIUS, S. 1997. The Role of Calcium in the Regulation of Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239, 357-366.
- MIOTTO, G., ROSSETTO, M., DI PAOLO, M. L., ORIAN, L., VENERANDO, R., ROVERI, A., VUČKOVIĆ, A.-M., BOSELLO TRAVAIN, V., ZACCARIN, M., ZENNARO, L., MAIORINO, M., TOPPO, S., URSINI, F. & COZZA, G. 2020. Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1. *Redox biology*, 28, 101328-101328.
- MISSIROLI, S., PATERGNANI, S., CAROCCIA, N., PEDRIALI, G., PERRONE, M., PREVIATI, M., WIECKOWSKI, M. R. & GIORGI, C. 2018. Mitochondria-associated membranes (MAMs) and inflammation. *Cell Death & Disease*, 9, 329.
- MORCIANO, G., MARCHI, S., MORGANTI, C., SBANO, L., BITTREMIEUX, M., KERKHOFS, M., CORRICELLI, M., DANESE, A., KARKUCINSKA-WIECKOWSKA, A., WIECKOWSKI, M. R., BULTYNCK, G., GIORGI, C. & PINTON, P. 2018. Role of Mitochondria-Associated ER Membranes in Calcium Regulation in Cancer-Specific Settings. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 20, 510-523.

- MUKHOPADHYAY, P., RAJESH, M., HASKÓ, G., HAWKINS, B. J., MADESH, M. & PACHER, P. 2007. Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nature protocols*, 2, 2295-2301.
- MUÑOZ, P., HUMERES, A., ELGUETA, C., KIRKWOOD, A., HIDALGO, C. & NÚÑEZ, M. T. 2011. Iron Mediates $\text{N-Methyl-d-aspartate}$ Receptor-dependent Stimulation of Calcium-induced Pathways and Hippocampal Synaptic Plasticity ^{*}. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 13382-13392.
- MURPHY, T. H., MIYAMOTO, M., SASTRE, A., SCHNAAR, R. L. & COYLE, J. T. 1989. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron*, 2, 1547-1558.
- NICHOLLS, S. J. & HAZEN, S. L. 2009. Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. *Journal of lipid research*, 50 Suppl, S346-S351.
- NICOTERA, P., MCCONKEY, D., SVENSSON, S.-Å., BELLOMO, G. & ORRENIUS, S. 1988. Correlation between cytosolic Ca^{2+} concentration and cytotoxicity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicology*, 52, 55-63.
- NIGAM, S. & SCHEWE, T. 2000. Phospholipase A2s and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488, 167-181.
- OH, Y., PARK, Y., CHO, J. H., WU, H., PAULK, N. K., LIU, L. X., KIM, N., KAY, M. A., WU, J. C. & LIN, M. Z. 2019. An orange calcium-modulated bioluminescent indicator for non-invasive activity imaging. *Nature chemical biology*, 15, 433-436.
- PALIT S, G. A., SHARMA A, TALUKDER G 1991. Modification of the Clastogenic Effects of Cobalt by Calcium in Bone Marrow Cells of Mice in vivo. *Cytologia*, 56: 373-377,.
- PAREKH, A. B. & PENNER, R. 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev*, 77, 901-30.
- PARK, E. & CHUNG, S. W. 2019. ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation. *Cell death & disease*, 10, 822-822.
- PEDRERA, L., ESPIRITU, R. A., ROS, U., WEBER, J., SCHMITT, A., STROH, J., HAILFINGER, S., VON KARSTEDT, S. & GARCÍA-SÁEZ, A. J. 2020. Ferroptotic pores induce Ca^{2+} fluxes and ESCRT-III activation to modulate cell death kinetics. *Cell Death & Differentiation*.
- PENG, T.-I. & JOU, M.-J. 2010. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201, 183-188.
- PEPPIATT, C. M., COLLINS, T. J., MACKENZIE, L., CONWAY, S. J., HOLMES, A. B., BOOTMAN, M. D., BERRIDGE, M. J., SEO, J. T. & RODERICK, H. L. 2003. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced

- calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels. *Cell Calcium*, 34, 97-108.
- PÉREZ KOLDENKOVA, V. & NAGAI, T. 2013. Genetically encoded Ca²⁺ indicators: Properties and evaluation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833, 1787-1797.
- PERRY, S. W., NORMAN, J. P., BARBIERI, J., BROWN, E. B. & GELBARD, H. A. 2011. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques*, 50, 98-115.
- PETRAT, F., GROOT, H. D., SUSTMANN, R. & RAUEN, U. 2002. The Chelatable Iron Pool in Living Cells: A Methodically Defined Quantity. 383, 489-502.
- PRIME, T. A., FORKINK, M., LOGAN, A., FINICHIU, P. G., MCLACHLAN, J., LI PUN, P. B., KOOPMAN, W. J. H., LARSEN, L., LATTER, M. J., SMITH, R. A. J. & MURPHY, M. P. 2012. A ratiometric fluorescent probe for assessing mitochondrial phospholipid peroxidation within living cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 53, 544-553.
- RASTOGI, R. P., SINGH, S. P., HÄDER, D.-P. & SINHA, R. P. 2010. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397, 603-607.
- RICE-EVANS, C. & BURDON, R. 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Progress in Lipid Research*, 32, 71-110.
- RIEGMAN, M., SAGIE, L., GALED, C., LEVIN, T., STEINBERG, N., DIXON, S. J., WIESNER, U., BRADBURY, M. S., NIETHAMMER, P., ZARITSKY, A. & OVERHOLTZER, M. 2020. Ferroptosis occurs through an osmotic mechanism and propagates independently of cell rupture. *Nature Cell Biology*, 22, 1042-1048.
- ROBINSON, K. M., JANES, M. S., PEHAR, M., MONETTE, J. S., ROSS, M. F., HAGEN, T. M., MURPHY, M. P. & BECKMAN, J. S. 2006. Selective fluorescent imaging of superoxide *in vivo* using ethidium-based probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 15038.
- ROONEY, T. A., RENARD, D. C., SASS, E. J. & THOMAS, A. P. 1991. Oscillatory cytosolic calcium waves independent of stimulated inositol 1,4,5-trisphosphate formation in hepatocytes. *J Biol Chem*, 266, 12272-82.
- RUSH, G. F., GORSKI, J. R., RIPPLE, M. G., SOWINSKI, J., BUGELSKI, P. & HEWITT, W. R. 1985. Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 78, 473-483.
- SACK U., T. A., ROTHE G. 2007. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.*

- SCADUTO, R. C., JR. & GROTYOHANN, L. W. 1999. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Using Fluorescent Rhodamine Derivatives. *Biophysical Journal*, 76, 469-477.
- SCHMITZ, S., DESEL, C. 2008. Der Experimentator Zellbiologie.
- SHIMADA, K., SKOUTA, R., KAPLAN, A., YANG, W. S., HAYANO, M., DIXON, S. J., BROWN, L. M., VALENZUELA, C. A., WOLPAW, A. J. & STOCKWELL, B. R. 2016. Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis. *Nature chemical biology*, 12, 497-503.
- SIVANDZADE, F., BHALERAO, A. & CUCULLO, L. 2019. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-protocol*, 9, e3128.
- SKOUTA, R., DIXON, S. J., WANG, J., DUNN, D. E., ORMAN, M., SHIMADA, K., ROSENBERG, P. A., LO, D. C., WEINBERG, J. M., LINKERMANN, A. & STOCKWELL, B. R. 2014. Ferrostatins Inhibit Oxidative Lipid Damage and Cell Death in Diverse Disease Models. *Journal of the American Chemical Society*, 136, 4551-4556.
- STOCKWELL, B. R., FRIEDMANN ANGELI, J. P., BAYIR, H., BUSH, A. I., CONRAD, M., DIXON, S. J., FULDA, S., GASCÓN, S., HATZIOS, S. K., KAGAN, V. E., NOEL, K., JIANG, X., LINKERMANN, A., MURPHY, M. E., OVERHOLTZER, M., OYAGI, A., PAGNUSSAT, G. C., PARK, J., RAN, Q., ROSENFELD, C. S., SALNIKOW, K., TANG, D., TORTI, F. M., TORTI, S. V., TOYOKUNI, S., WOERPEL, K. A. & ZHANG, D. D. 2017. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*, 171, 273-285.
- SUBBURAYAN, K., THAYYULLATHIL, F., PALLICHANKANDY, S., CHERATTA, A. R. & GALADARI, S. 2020. Superoxide-mediated ferroptosis in human cancer cells induced by sodium selenite. *Translational Oncology*, 13, 100843.
- TAIWO, F. A. 2008. Mechanism of tiron as scavenger of superoxide ions and free electrons. *Spectroscopy*, 22, 953692.
- TAKAHASHI, A., CAMACHO, P., LECHLEITER, J. D. & HERMAN, B. 1999. Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev*, 79, 1089-125.
- TAN, S., SAGARA, Y., LIU, Y., MAHER, P. & SCHUBERT, D. 1998. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *The Journal of cell biology*, 141, 1423-1432.
- TAN, S., SCHUBERT, D. & MAHER, P. 2001. Oxytosis: A novel form of programmed cell death. *Curr Top Med Chem*, 1, 497-506.
- TANG, D., CHEN, X., KANG, R. & KROEMER, G. 2021. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Research*, 31, 107-125.

- THOMAS, D., TOVEY, S., COLLINS, T., BOOTMAN, M., BERRIDGE, M. & LIPP, P. A. 2000. A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell calcium*, 28, 213-23.
- VALGIMIGLI, L. & PRATT, D. A. 2015. Maximizing the Reactivity of Phenolic and Aminic Radical-Trapping Antioxidants: Just Add Nitrogen! *Accounts of Chemical Research*, 48, 966-975.
- VANDEN BERGHE, T., LINKERMANN, A., JOUAN-LANHOUE, S., WALCZAK, H. & VANDENABEELE, P. 2014. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 135-47.
- VERKHRATSKY, A. 2007. *Calcium Signalling and Disease*, Springer®.
- WALLBERG, F., TENEV, T. & MEIER, P. 2016. Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016, pdb.prot087387.
- WATANABE, T. & NAKAMURA, T. 1979. The Effects of Linoleate Hydroperoxide on Respiration and Oxidative Phosphorylation of Rat Liver Mitochondria. *The Journal of Biochemistry*, 86, 1041-1047.
- WENZ, C., FAUST, D., LINZ, B., TURMANN, C., NIKOLOVA, T., BERTIN, J., GOUGH, P., WIPF, P., SCHRÖDER, A. S., KRAUTWALD, S. & DIETRICH, C. 2018. t-BuOOH induces ferroptosis in human and murine cell lines. *Archives of Toxicology*, 92, 759-775.
- WENZ, C., FAUST, D., LINZ, B., TURMANN, C., NIKOLOVA, T. & DIETRICH, C. 2019. Cell-cell contacts protect against t-BuOOH-induced cellular damage and ferroptosis in vitro. *Archives of Toxicology*, 93, 1265-1279.
- WOLPAW, A. J., SHIMADA, K., SKOUTA, R., WELSCH, M. E., AKAVIA, U. D., PE'ER, D., SHAIK, F., BULINSKI, J. C. & STOCKWELL, B. R. 2011. Modulatory profiling identifies mechanisms of small molecule-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, E771-80.
- XIE, Y., HOU, W., SONG, X., YU, Y., HUANG, J., SUN, X., KANG, R. & TANG, D. 2016. Ferroptosis: process and function. *Cell Death & Differentiation*, 23, 369-379.
- YAGODA, N., VON RECHENBERG, M., ZAGANJOR, E., BAUER, A. J., YANG, W. S., FRIDMAN, D. J., WOLPAW, A. J., SMUKSTE, I., PELTIER, J. M., BONIFACE, J. J., SMITH, R., LESSNICK, S. L., SAHASRABUDHE, S. & STOCKWELL, B. R. 2007. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature*, 447, 865-869.
- YAMANAKA, K., SAITO, Y., SAKIYAMA, J., OHUCHI, Y., OSETO, F. & NOGUCHI, N. 2012. A novel fluorescent probe with high sensitivity and selective detection of lipid hydroperoxides in cells. *RSC Advances*, 2, 7894-7900.

- YAMAZAKI, H., UENG, Y.-F., SHIMADA, T. & GUENGERICH, F. P. 1995. Roles of Divalent Metal Ions in Oxidations Catalyzed by Recombinant Cytochrome P450 3A4 and Replacement of NADPH-Cytochrome P450 Reductase with Other Flavoproteins, Ferredoxin, and Oxygen Surrogates. *Biochemistry*, 34, 8380-8389.
- YAN, B., AI, Y., SUN, Q., MA, Y., CAO, Y., WANG, J., ZHANG, Z. & WANG, X. 2021. Membrane Damage during Ferroptosis Is Caused by Oxidation of Phospholipids Catalyzed by the Oxidoreductases POR and CYB5R1. *Molecular Cell*, 81, 355-369.e10.
- YANG, M., LI, C., YANG, S., XIAO, Y., XIONG, X., CHEN, W., ZHAO, H., ZHANG, Q., HAN, Y. & SUN, L. 2020. Mitochondria-Associated ER Membranes – The Origin Site of Autophagy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8.
- YIN, H., XU, L. & PORTER, N. A. 2011. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*, 111, 5944-5972.
- YING, W. L., EMERSON, J., CLARKE, M. J. & SANADI, D. R. 1991. Inhibition of mitochondrial calcium ion transport by an oxo-bridged dinuclear ruthenium ammine complex. *Biochemistry*, 30, 4949-52.
- YOUNG, M. P., SCHUG, Z. T., BOOTH, D. M., YULE, D. I., MIKOSHIBA, K., HAJNOCZKY, G. & JOSEPH, S. K. 2022. Metabolic adaptation to the chronic loss of Ca²⁺ signaling induced by KO of IP3 receptors or the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Journal of Biological Chemistry*, 298, 101436.
- ZAHIRAGIC´S. 2010. Quantifizierung und Modulation der mitochondrialen Ca²⁺ Aufnahme in Kardiomyozyten der Maus.
- ZALK, R., LEHNART, S. E. & MARKS, A. R. 2007. Modulation of the Ryanodine Receptor and Intracellular Calcium. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 367-385.
- ZILKA, O., SHAH, R., LI, B., FRIEDMANN ANGELI, J. P., GRIESSER, M., CONRAD, M. & PRATT, D. A. 2017. On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin-1 and Liproxstatin-1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death. *ACS Central Science*, 3, 232-243.
- ZOU, Y., LI, H., GRAHAM, E. T., DEIK, A. A., EATON, J. K., WANG, W., SANDOVAL-GOMEZ, G., CLISH, C. B., DOENCH, J. G. & SCHREIBER, S. L. 2020. Cytochrome P450 oxidoreductase contributes to phospholipid peroxidation in ferroptosis. *Nature Chemical Biology*, 16, 302-309.

8 Danksagung

9 Tabellarischer Lebenslauf

