

Aus der Klinik für Innere Medizin III
mit den Schwerpunkten Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin
Direktor: Prof Dr. Norbert Frey
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Charakterisierung der Funktion des Receptor
Interacting Protein 3 (RIP3) im Herzen nach
Myokardischämie

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

Vorgelegt von
Natalie Carter
aus Hamburg

Kiel, 2015

Referent: Prof Dr. N. Frey, Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten
Kardiologie und Angiologie

Korreferent: Prof. Dr. M. Gramatzki, Leiter Sektion Stammzell- und Immuntherapie,
Dr. Mildred-Scheel-Haus

Note: Summa cum laude

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Mai 2017

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Natalie Carter, dass ich die Dissertation mit dem Titel

Charakterisierung der Funktion des Receptor Interacting Protein 3 (RIP3) im Herzen nach Myokardischämie

selbständig verfasst habe.

Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen Dritter in Anspruch genommen:

1. Ich habe die Versuche mit den im Kapitel "Material und Methoden" beschriebenen Hilfsmitteln in der Medizinischen Klinik III des UKSH Campus Kiel, Abteilung Labor für Molekulare Kardiologie, durchgeführt.

2. Die Anfertigung erfolgte unter Leitung von Prof Dr. Norbert Frey, Medizinische Klinik III UKSH Campus Kiel, Labor für Molekulare Kardiologie. Die fachliche Betreuung wurde von PD Dr. med. Mark Lüdde übernommen.

3. Operationen an Herzen von Versuchsmäusen wurden von Dr. med. Matthias Lutz, Medizinische Klinik III des UKSH Kiel, Labor Molekulare Kardiologie, durchgeführt.

4. Ein Teil der histologischen und immunhistochemischen Färbungen und Gewebeschnitte wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor von Herrn Prof Dr. Mathias Heikenwälder, Institut für Virologie, TU München, durchgeführt.

5. Die FACS-basierte Zelltod-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. Justyna Sosna, Institut für Immunologie am UKSH Campus Kiel unter Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dieter Adam, durchgeführt.

6. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kardiomyozyten wurden unter Leitung von Frau Prof. Dr. med. Renate Lüllmann-Rauch, Anatomisches Institut der CAU zu Kiel, erstellt.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche

Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich versichere, dass durch die Veröffentlichung meiner Dissertation keine Urheberrechte verletzt werden.

Ich habe die Dissertation an folgendem Institut angefertigt:

Medizinische Klinik III, Abteilung Labor Molekulare Kardiologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht, noch wurde ein vorheriger Promotionsantrag gestellt.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Kiel, im April 2015

Natalie Carter

MEINER FAMILIE
&
MEINER UNVERGESSENEN FREUNDIN KARLA KIEHNE

I Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	III
Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Herzinfarkt	1
1.2 Definition des kardialen Remodeling	2
1.3 TNF- α und seine intrazellulären Auswirkungen	3
1.4 Programmierte Nekrose	5
1.5 Problemstellung der Arbeit	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Material	10
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	10
2.1.2 Chemikalien	11
2.1.3 Enzyme	13
2.1.4 Antikörper	13
2.1.5 Kits	14
2.1.6 Oligonukleotide	14
2.1.7 Puffer und Lösungen	17
2.1.8 Medien	19
2.1.9 Zelllinien	20
2.1.10 Versuchstiere	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden - Bakterien	21
2.2.2 Kultur von Säugetierzellen	22
2.2.3 Kultur von Säugetier-Zelllinien	25
2.2.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden - DNA	26
2.2.5 Molekularbiologische Arbeitsmethoden - RNA	32
2.2.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden - Protein	35
2.2.7 Molekularbiologische Arbeitsmethoden - Adenovirus	39
2.2.8 Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay	41
2.2.9 Durchflusszytometrie	41
2.2.10 Immunzytochemie	43
2.2.11 Transmissions-Elektronenmikroskopie	43
2.2.12 Tierversuche	44
2.2.13 Statistische Auswertung	46
3 Ergebnisse	47
3.1 Expression von RIP3 in Kardiomyozyten	47
3.2 Auswirkung der RIP3-Überexpression auf RIP1	49
3.2.1 RIP1 als Bindungspartner von RIP3 in NRVCN	49
3.2.2 Abnahme der RIP1-Detektion nach RIP3-Überexpression	50
3.2.3 Zunahme der Polyubiquitin-Verbindungen in NRVCN	51

3.3 Auswirkung der RIP3-Überexpression auf die Zellviabilität	52
3.3.1 Auswirkung auf Troponin T im Medium durch RIP3-Überexpression	52
3.3.2 Messung der Zellviabilität von NRVCN mithilfe des MTT-Assay	53
3.3.3 Einfluss von Nekrose auf NRVCN nach RIP3-Überexpression	54
3.3.4 Einfluss von zVAD und TNF α auf die Zellviabilität von NRVCN	55
3.3.5 Einfluss von RIP1-Knockdown auf RIP3-überexprimierende NRVCN	55
3.4 RIP3-Lokalisation in NRVCN	56
3.4.1 Nachweis von endogenem RIP3 in NRVCN	56
3.4.2 Perinukleäre Häufung von endogenem RIP3 in NRVCN	57
3.4.3 Morphologie von Mitochondrien in NRVCN	59
3.5 Expression von RIP3 im ischämischen Myokard <i>in vivo</i>	60
3.6 Charakterisierung des Phänotyps von RIP3^{-/-}-Mäusen	61
3.7 Bedeutung von Apoptose und Angiogenese im Periinfarktgebiet	62
3.7.1 Auswirkung auf Spaltung der Caspase 3 nach Myokardischämie	62
3.7.2 Auswirkung auf Angiogenese nach Myokardischämie	63
3.8 Einfluss von RIP3 auf Entzündungsparameter im Herzen	64
3.8.1 Proinflammatorische T-Zell-Infiltration bei Myokardischämie	64
3.8.2 Schutz vor Sauerstoff-Radikalen bei Fehlen von RIP3	65
3.8.3 Bestimmung der Troponin-T-Konzentration im Serum	65
3.8.4 Ausmaß des strukturellen Remodeling im Myokard	66
3.8.5 Messung der Genexpression von TNF α , TNFR1 und 2 sowie TACE	67
3.9 Langfristige Auswirkungen auf Herzgröße und Pumpfunktion	68
3.9.1 Beurteilung der Infarktgröße mittels kardialen Maus-MRT	68
3.9.2 Hypertrophes Genprogramm operierter RIP3 ^{-/-} - und Wildtyp-Herzen	69
3.9.3 Bestimmung von Ejektionsfraktion und Linksherzhypertrophie	70
4 Diskussion	73
4.1 RIP1-RIP3-Interaktion in NRVCN	73
4.2 RIP3 aktiviert programmierte Nekrose in NRVCN	75
4.3 Ko-Lokalisierung von RIP3 und Mitochondrien	75
4.4 RIP3 vermittelt kardiales Remodeling	76
4.5 Mögliche Einordnung RIP3-abhängiger Signale in Wildtyp-Herzen	79
5 Zusammenfassung	81
6 Literaturverzeichnis	82
7 Abbildungsverzeichnis	87
8 Tabellenverzeichnis	88
9 Veröffentlichungen	88
10 Lebenslauf	89
11 Danksagungen	91
Kopie der Genehmigung für Tierversuchsvorhaben	93

II Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ADS	Verdaupuffer mit Pankreatin und Kollagenase
AdV	Adenovirus
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
C	Celsius
CMV	Cytomegalievirus
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
Ctrl	Kontrolle
CY3	Cyanin-Farbstoff 3
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylcarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EDV	Enddiastolisches linksventrikuläres Volumen
EKG	Elektrokardiogramm
ESV	Endsystolisches linksventrikuläres Volumen
F	Farad
FBS	fetales Rinderserum
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat-Farbstoff
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Ladekontrolle bei Western Blot)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HRP	Horseradish Peroxidase
ifu	infectious units
IP	Immunopräzipitation
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter

λ	Lambda
LacZ	Gen codierend für das Enzym β -Galaktosidase; Virus-Negativkontrolle
LAD	Left anterior descending artery
LV	Linker Ventrikel
m	Milli
M	Mol
μ	Mikro
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MLKL	Mixed-lineage kinase domain-like
mi-con	Kontroll-Mikro-RNA
min	Minute
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
miRNA	Mikro-RNA
MW	Molekulargewicht
n	Nano
N	Normalität (Wertigkeit x Molarität)
NaCl	Natriumchlorid
NCS	Neugeborenes Kälberserum
NRVCM	neonatale Ratten ventrikuläre Kardiomyozyten
n.s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
OsO ₄	Osmium(VIII)-oxid
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RIP1/3	Receptor Interacting Protein 1/3
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Rounds per minute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TG	Transgen
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	volume/volume
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
w/v	weight/volume
zVAD-FMK	Z-Val-Ala-Asp-FMK (Pan-Caspasen-Inhibitor)

1 Einleitung

1.1 Herzinfarkt

Das akute Koronarsyndrom (engl. Acute Coronary Syndrome, ACS) mit typischen anfallsartigen pektanginösen Schmerzen und Engegefühl in der Brust infolge einer eingeschränkten Durchblutung im Myokard kann klinisch, elektrokardiographisch und laborchemisch genauer klassifiziert werden. Hierzu gehören zum einen die instabile Angina pectoris ohne Anstieg von Troponin T oder I im Blut des Patienten. Das ACS mit Troponin-Anstieg wird je nach EKG-Befund in das ACS ohne Hebung der ST-Strecke (Non-STEMI) sowie das ACS mit Hebung der ST-Strecke (STEMI) - dem „klassischen“ Herzinfarkt - unterteilt. Im Rahmen des akuten Myokardinfarktes führt in der Regel der Verschluss einer Koronararterie bereits nach 20 min zu einem Absterben von Kardiomyozyten in der Subendokardregion mit Ausbreitung in Richtung Epikard (Reimer, Lowe et al. 1977). Laut *Herzbericht 2013* ist die Zahl der Sterbefälle aufgrund eines akuten Myokardinfarkts von 92800 im Jahre 1980 auf 52100 im Jahre 2011 gesunken. Verbesserungen in der Vorbeugung, Diagnostik und Therapie haben zum Rückgang der Infarktsterblichkeit geführt. Hohe Qualitätsziele vor Eintreffen in einem Herzkatheterlabor wie beispielsweise Einhalten der Zeit vom ersten medizinischen Kontakt bis zum Erst-EKG von unter 10 min und bis zum Beginn einer perkutanen Koronarintervention (PCI) von unter 90 min (beim STEMI) verdeutlichen ein sehr gutes Versorgungsniveau in Deutschland. Laut Statistischem Bundesamt sind im Jahre 2013 insgesamt 73 176 Patienten an chronisch ischämischer Herzkrankheit sowie 52 044 Patienten an einem akuten Myokardinfarkt verstorben. Somit ist der Myokardinfarkt sowohl in Deutschland als auch weltweit (mit 7,4 Millionen Verstorbenen im Jahre 2012; WHO, Fact Sheet N° 310, 2014) einer der häufigsten Todesursachen, gefolgt von der Herzinsuffizienz mit 45 815 Verstorbenen in Deutschland im Jahre 2013. Ein insuffizient schlagendes Herz ist größtenteils Spätfolge eines Myokardinfarkts, wobei mehr als ein Drittel der betroffenen Patienten bereits im ersten Jahr erneut über typische kardiale Beschwerden klagt. Rezidivierende Dekompensationen und Hospitalisationen führen zu einer schlechten Prognose und fast alle Patienten werden lebenslang arzneimittelbedürftig. Als Fazit haben die Fortschritte in der Behandlung von Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt zwar zu einer Abnahme der Frühsterblichkeit geführt, bei den

Überlebenden jedoch einhergehend mit einer Zunahme der Inzidenz der Herzinsuffizienz. Auch die derzeitigen medikamentösen Therapien gegen kardiales Remodeling bei Postinfarktpatienten können das zentrale Problem nicht beheben, welches mit einer myokardialen Ischämie einhergeht: den Verlust von Kardiomyozyten.

1.2 Definition des kardialen Remodeling

Nach einem Myokardinfarkt kommt es zu Umbauprozessen einerseits im Infarktgebiet und andererseits im nicht direkt von Ischämie betroffenen Myokard. Die Kontraktilität wird vermindert und die Wandsteifigkeit erhöht, sodass progredient eine systolische und diastolische Pumpfunktionsstörung und eine Dilatation des linken Ventrikels als Basis für eine Herzinsuffizienz sichtbar werden. Seit den frühen 80er Jahren werden die postischämischen Anpassungsvorgänge im Herzen besser verstanden und zusammenfassend als "Remodeling" bezeichnet. Da der Begriff "Remodeling" uneinheitlich verwendet wird, stützt sich diese Doktorarbeit auf die Definition des Remodeling nach Weber *et al.*, die drei Formen unterscheidet (Weber, Janicki et al. 1988):

- **Geometrisches Remodeling:** Durch Verlust von Myokardmasse steigt die Restmyokardbelastung und somit die Wandspannung, da das verbleibende Myokard relativ pro Kardiomyozyt mehr leisten muss, um den Blutdruck aufrecht zu erhalten. Infarziertes Herzgewebe dilatiert und nichtinfarziertes Gewebe hypertrophiert kompensatorisch.
- **Strukturelles Remodeling:** Dies beinhaltet alle Veränderungen auf Gewebeebene, die im Wesentlichen durch Kardiomyozytenuntergang und Bindegewebiszunahme gekennzeichnet sind. Der perivaskuläre und interstitielle Kollagengehalt wird nach einer Woche mindestens verdoppelt (reaktive Fibrose). Weber *et al.* machen vor allem Kollagen Typ I, einen besonders starren Bestandteil der Extrazellulärmatrix, für die zunehmende Wandsteifigkeit verantwortlich.
- **Biochemisches Remodeling:** Unter diesem Begriff haben Weber *et al.* Veränderungen nach Myokardinfarkt auf molekularer Ebene zusammengefasst. Wachstumsfaktoren und Zytokine wie TNF α werden

gebildet und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert, um nur einige Veränderungen zu nennen.

1.3 TNF- α und seine intrazellulären Auswirkungen nach Bindung an den Rezeptor TNFR1

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), ein Mitglied aus der Familie der Tumornekrosefaktoren, zu denen noch TNF- β und Lymphotoxin- β zählen, stellt ein bedeutsames Zytokin für die Einleitung von Inflammation und programmiertem Zelltod dar. TNF- α wird im menschlichen Organismus als 233 Aminosäuren zählende Vorstufe gebildet und durch die Metalloproteinase „TNF- α Converting Enzyme“, kurz TACE, in seine aktive monomere Form gespalten. TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen, aber auch Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und glatten Muskelzellen synthetisiert. TNF- α wurde als Ligand im extrinsischen Signalweg der Apoptose in Kardiomyozyten nachgewiesen und wird im hypoxischen Myokard vermehrt exprimiert. Auch bei der Vermittlung lokaler Entzündungsreaktionen im Infarkt sowie bei chronischer Dysfunktion des linken Ventrikels wird TNF- α eine große Bedeutung beigemessen (Sun, Dawood et al. 2004). In einer Studie von Kubota *et al.* wurde nachgewiesen, dass bereits die herzspezifische TNF- α -Überexpression in transgenen Mäusen zur Herzinsuffizienz führte (Kubota, McTiernan et al. 1997). Nach Ausschüttung von TNF- α aus den oben genannten Zellen bindet dieser Botenstoff an den membranständigen TNF-Rezeptor 1 (TNFR1, **Abb. 1**). Dies führt, abhängig vom Zustand der Zelle, zu einer Konformationsänderung des TNFR1 und dem daran assemblierten intrazellulären Komplex I (Micheau and Tschopp 2003); (Chen and Goeddel 2002); (Hsu, Huang et al. 1996). Auswirkungen auf die Zelle sind entweder die Expression proinflammatorischer Gene über den Transkriptionsfaktor NF- κ B oder die Einleitung des programmierten Zelltods durch Apoptose oder programmierte Nekrose (Nekroptose). **Abb. 1** stellt die komplexe Regulation nach Anlagerung von TNF- α an seinen Rezeptor TNFR-1 dar: Der Komplex I formiert sich aus den Adapterproteinen TNFR1-associated Death Domain (TRADD), Receptor Interacting Protein 1 (RIP1), cIAP1/2 (cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2) und TRAF2. Unter diesen Voraussetzungen kommt es zur TRAF2/cIAP1-abhängigen Ubiquitinierung von RIP1. Dabei werden hier in der Folge zur NF- κ B-Aktivierung posttranslational ein oder

mehrere Moleküle des Proteins Ubiquitin kovalent an das Zielprotein angehängt. Zeitlich versetzt oder bei Abwesenheit von antiapoptotischen Molekülen wie cIAP1 wird diese Ubiquitinkette von RIP1 durch die Deubiquitinase CYLD (Cylindromatosis) entfernt (O'Donnell, Legarda-Addison et al. 2007); (Wang, Du et al. 2008). Dies ermöglicht die Formierung eines sogenannten Komplex IIa, bestehend aus FADD (Fas-associated Protein with Death Domain), Procaspase 8 und RIP1. NF-κB selbst und NF-κB-abhängige Synthese antiapoptotischer Moleküle werden dadurch inhibiert (Kreuz, Siegmund et al. 2001). Der Komplex IIa stellt somit einen essentiellen Schritt in der Einleitung der Caspase-Kaskade und damit Apoptose in der Zelle dar (**Abb. 1**).

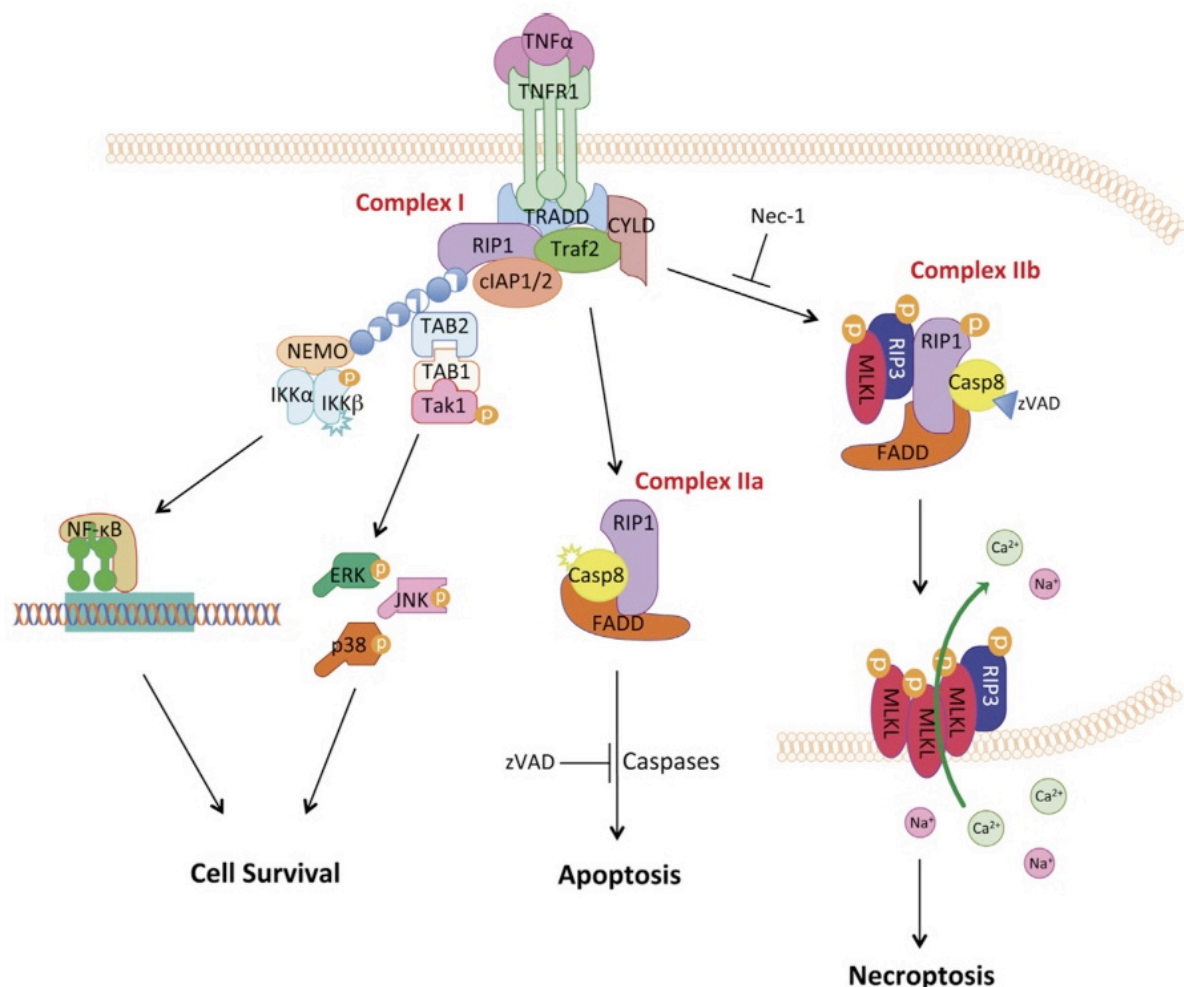


Abbildung 1: TNF-α-abhängiger Zelltod. TNF-Rezeptor-1-vermittelte Signalwege für Proliferation, Apoptose und Nekroptose. In Abwesenheit von cIAP1/2 durch NF-κB-Inhibition induziert Caspase 8 einen proapoptotischen Komplex IIa bestehend aus RIP1, FADD und Caspase 8. Gleichzeitig verhindert Caspase 8 die Formierung eines pronekrotischen Komplexes IIb durch Schneiden von RIP1, RIP3 und CYLD (Lin, Devin et al. 1999); (Feng, Yang et al. 2007) zVAD: Pan-Caspasen-Inhibitor Z-Val-Ala-Asp-FMK; Nec-1: Necrostatin-1. (Abbildung: Wen Zhou et al. (2014): "Necroptosis in Health and Diseases". J.SEMCDB 35:14-23)

1.4 Programmierte Nekrose

Bisher wurde programmierter Zelltod mit Apoptose gleichgesetzt. Die Apoptose ist ein lebensnotwendiger Mechanismus beschädigter, überschüssiger oder infizierter Zellen, um die zelluläre Homöostase aufrecht zu erhalten (Ellis, Yuan et al. 1991). Kerr *et al.* prägten den Begriff "Apoptose" bereits 1972, abgeleitet von der griechischen Bedeutung für "abfallen", ähnlich eines vom Baum abgefallenen Blattes und als Anspielung auf typische morphologische Merkmale. Apoptotische Zellen initiieren ihren eigenen Zelltod durch Kondensierung, Chromatin-Degradierung, Schrumpfung und Fragmentierung in apoptotische Körper. Hierbei wird der extrinsische Signalweg, ausgelöst durch extrazelluläre Liganden wie TNF- α , vom intrinsischen, mitochondrial vermittelten Signalweg der Apoptose unterschieden. Die gemeinsame Folgereaktion ist die Aktivierung von beispielsweise Procaspase-3 oder -7, welche weitere Proteine spalten, um einen das umgebende Gewebe wenig beeinflussenden Zelltod zu induzieren.

Die Beeinflussung der Zelltod-Mechanismen, welche im Herzen initial zum ischämie-induzierten Zelltod führen, stellt ein vielversprechendes therapeutisches Konzept dar. Der Signalweg der Apoptose ist intrazellulär streng reguliert und daher potentiell inhibierbar. Die funktionelle Bedeutung der Apoptose in der Pathogenese des postischämischen Remodeling ist jedoch ungenügend geklärt (Kung, Konstantinidis et al. 2011); (Dorn 2009). Neben der Apoptose werden heutzutage andere Mechanismen des programmierten Zelltods als mögliche Angriffspunkte für protektive Therapien diskutiert. In diesem Zusammenhang erweist sich die neu erforschte sogenannte programmierte Nekrose oder Nekroptose als bedeutsam. Morphologisch sind Charakteristika der Nekrose wie Membranruptur und Entzündungsreaktion zu beobachten (Vanden Berghe, Vanlangenakker et al. 2010). Nekrose wurde lange Zeit als unwillkürlicher Prozess definiert, welcher durch passives Anschwellen von Zellorganellen und Ruptur der Plasmamembran mit Austritt von Substanzen ins umgebende Gewebe gekennzeichnet wurde. Ähnlich der Apoptose wird die Nekroptose jedoch durch teils noch unbekannte Moleküle streng reguliert. Zwei Schlüsselproteine dieser "regulierten Nekrose" sind die Enzyme Receptor Interacting Protein 1 und Receptor Interacting Protein 3, RIP1 und RIP3 (Newton, Sun et al. 2004). Der Nekroptose-induzierende Komplex bestehend aus RIP1, RIP3, MLKL und PGAM5_{L/S} wird oftmals als Nekrosom bezeichnet (Declercq,

Vanden Berghe et al. 2009) (**Abb. 2**). Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die bisher nicht untersuchte Rolle der programmierten Nekrose im Herzen.

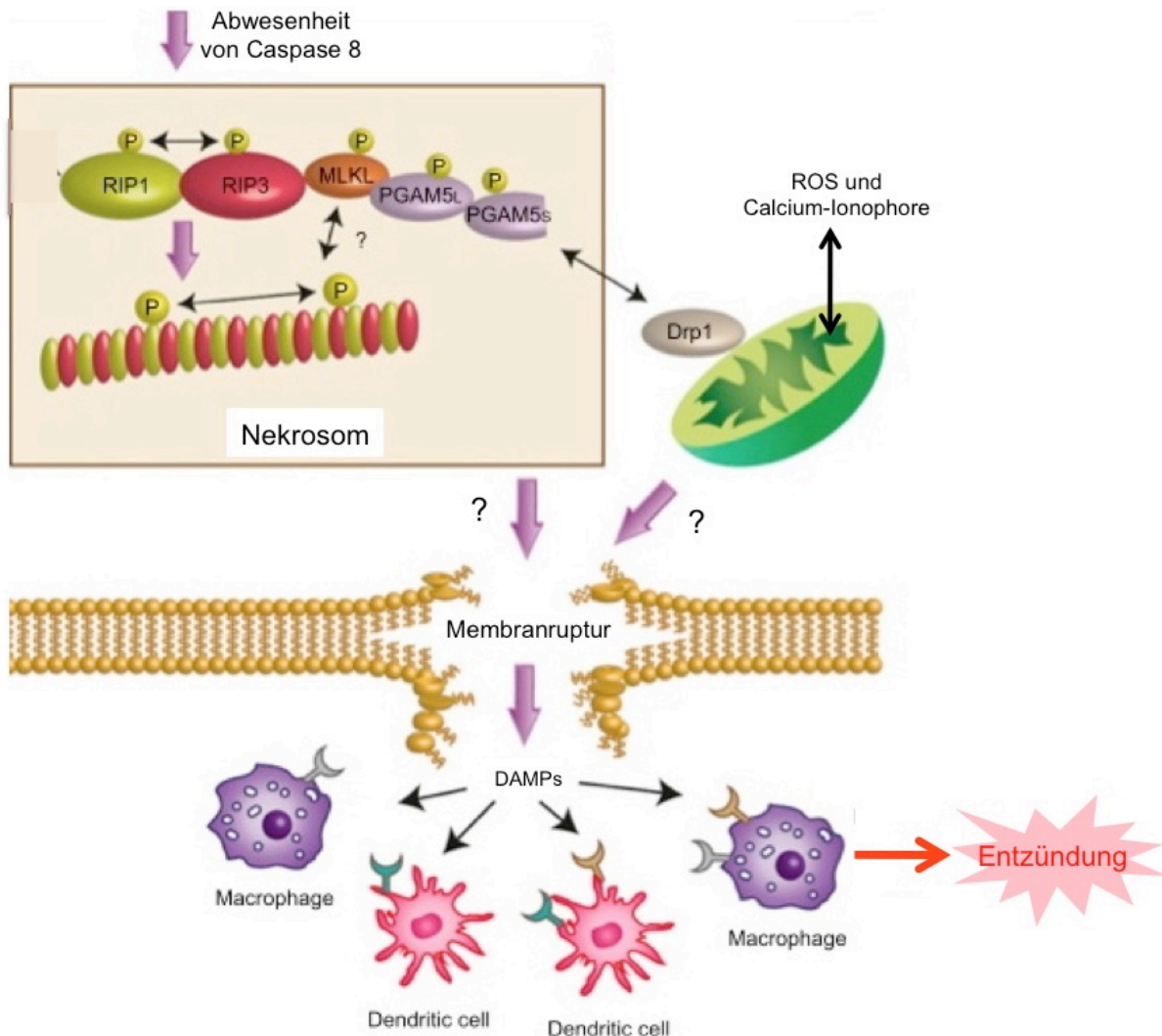


Abbildung 2: Nekrosom-Komplex. Überblick über RIP3-abhängige Entzündungsreaktion und programmierte Nekrose in Abwesenheit von Caspase 8 durch bspw. zVAD-Caspasen-Inhibierung. Mixed-lineage kinase domain-like (MLKL) ist ein wichtiges, RIP3 nachgeschaltetes Molekül im Nekroptose-Signalweg (Chen, Zhou et al. 2013); (Sun, Wang et al. 2012). MLKL rekrutiert PGAM5_{LS} und Drp1, welches wiederum die Freisetzung von Sauerstoffradikalen (ROS) aus Mitochondrien ins Zytosol mithilfe von Calcium-Ionophoren aktiviert. Nachfolgende Reaktionen bis hin zur Membranruptur sind noch ungeklärt, sie führen zur charakteristischen Nekrose und Freisetzung von DAMPs (damage-associated molecular pattern molecules), welche von Immunzellen als Entzündungsreiz erkannt werden. (Abbildung: Moriwaki, Chan (2013): "RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation". Genes&Development **27**: 1640-1649)

1.4.1 Receptor Interacting Protein 3 (RIP3)

Der in diesem Zusammenhang erforschten Serin-Threonin-Kinase RIP3 wird als Schlüsselmolekül der Nekroptose in einigen Organen wie beispielsweise der Leber eine größere Bedeutung beigemessen. So konnte in der Leber und im Fettgewebe

von konstitutiven RIP3^{-/-}-Knockout-Mäusen, die mit dem Pockenvirus infiziert worden waren, deutlich weniger Nekrose-induzierte Entzündung nachgewiesen werden als in Wildtyp-Mäusen. Gleichzeitig zeigten RIP3^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Mortalität durch fehlende Virus-Elimination als die Wildtyp-Kontrolltiere (Cho, Challa et al. 2009). Es ist zudem bekannt, dass RIP3 mit der verwandten Serin-Threonin-Kinase RIP1 TNF- α -abhängig einen Nekrosom-Komplex zur Initiierung der programmierten Nekrose bildet. Dabei fungiert RIP3 als zentrales Regulatorprotein der Nekroptose, indem es die Phosphorylierung von RIP1 induziert und die Nekroptose aktiviert (Cho, Challa et al. 2009); (He, Wang et al. 2009). RIP3 wurde auch im Zusammenhang mit Ischämie im Gehirn untersucht (Degterev, Huang et al. 2005); (Vieira, Fernandes et al. 2014). So wurde eine RIP3-Hochregulierung auf mRNA- und Proteinebene in Neuronen des Hippocampus nach Ischämie durch Sauerstoff- und Glukosedepprivation (OGD) *in vitro* nachgewiesen. Darüber hinaus wurde im Verlauf des OGD-Versuchs eine Herabsetzung von Caspase-8, einem bekannten Gegenspieler der Nekroptose (Cho, Challa et al. 2009), auf mRNA-Ebene festgestellt. Die Bedeutung der Nekroptose im ischämischen Myokard steht in unserer Arbeit im Mittelpunkt und wurde bereits als potentieller Antrieb ischämischer Reperfusionsschäden verschiedener Organe diskutiert (Linkermann, Hackl et al. 2013).

1.4.2 Mixed-lineage kinase domain-like (MLKL)

Mixed-lineage kinase domain-like (MLKL) ist ein wichtiges, RIP3 nachgeschaltetes Molekül im Nekroptose-Signalweg (Chen, Zhou et al. 2013); (Sun, Wang et al. 2012). Die Autophosphorylierung von RIP3 innerhalb eines RIP3-RIP3-Dimers und die anschließende Rekrutierung von MLKL sind für Nekroptose essentiell (Wu, Yang et al. 2014). Erst kürzlich wurde eine Interaktion von RIP3 mit MLKL sowie eine daran geknüpfte Aktivierung von Sauerstoffradikalen (engl. reactive oxygen species, ROS) aus Mitochondrien nachgewiesen (Sun, Wang et al. 2012) (Vanlangenakker, Vanden Berghe et al. 2011). MLKL rekrutiert zudem PGAM5_{L/S} (engl. Phosphoglycerate mutase family member 5 *long* and *short*) und Drp1 (engl. Dynamin related protein 1), die eine Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus Mitochondrien ins Zytosol mithilfe von Kalzium-Ionophoren induzieren (**Abb. 2**). Chen *et al.* fanden heraus, dass ein essentieller Schritt in der Ausführung der Nekroptose die Interaktion des Nekrosoms mit sogenannten Mitochondrien-assoziierten Endoplasmatisches Retikulum-

Membranen (MAM) darstellt. MAM sind spezialisierte Domänen in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER), welche direkt mit Mitochondrien in Verbindung stehen und unterschiedliche Funktionen wie Kalziumströme oder Proteinfaltung katalysieren (Chen, Zhou et al. 2013). **Abb. 1** illustriert eine Oligomerisierung von MLKL zu einem Trimer (Cai, Jitkaew et al. 2014) und Translokation zur Zellmembran mit anschließendem Kalziumeinstrom und nekrotischer Zellyse als weiteres mögliches Charakteristikum der Nekroptose (Chen, Zhou et al. 2013).

1.4.3 Caspase-8

Caspase-8 ist eine Protease und stellt ebenso wie Caspase-9 einen Initiator der Apoptose dar, indem sie Effektor-Caspasen wie Caspase-3 spalten. Caspase-8 spielt eine tragende Rolle in der Nekroptose-Inhibierung durch RIP1- und RIP3-Spaltung (Cho, Challa et al. 2009). Studien zu Caspase-8 *in vivo* haben den Grundstein für die physiologische Relevanz der Nekroptose gelegt. Konstitutive Caspase 8-Knockout-Mäuse sterben gewöhnlich *in utero* an Tag 10,5 bis 11,5 der Embryonalentwicklung (Kaiser, Upton et al. 2011). Bei zusätzlicher RIP3-Deletion in einer Casp8^{-/-}-RIP3^{-/-}-Doppel-Knockout-Maus wurden diese Mäuse lebensfähig und fertil. Eine Schlussfolgerung war, dass RIP3 *in utero* einen alternativen programmierten Zelltod (im Verlauf programmierte Nekrose oder Nekroptose genannt) in der Embryonalentwicklung auslöst und Caspase 8 während dieser Phase nicht Apoptose initiiert, sondern vielmehr RIP3 inhibiert (Oberst, Dillon et al. 2011). Cho *et al.* haben einen essentiellen Zusammenhang von Nekroptose und Virus-Infektionen erforscht (Cho, Challa et al. 2009). Viele Viren, darunter vor allem doppelsträngige DNA-Viren wie das Pockenvirus können Apoptose-Inhibitoren in ihrem Erbgut kodieren. Ein viraler Inhibitor der Caspase-8 ist das vFLIP-Protein in Herpesviren (Thome, Schneider et al. 1997). Nekroptose wird somit in Virus-infizierten Zellen als alternativer Virusschutz bei Ausfall der Apoptose aktiviert.

1.5 Problemstellung der Arbeit

Zahlreiche Publikationen charakterisieren die Serin-Threonin-Kinase RIP3 als einen übergeordneten Aktivator des neu definierten proinflammatorischen Zelltod-Signalwegs Programmierte Nekrose oder Nekroptose (Newton, Dugger et al. 2014).

Die Rolle von RIP3 im Herzen und speziell im ischämischen Myokard ist weitgehend unklar. Ziel unserer Arbeit war die Charakterisierung von RIP3 in Hinblick auf:

- Einordnung von RIP3 und seines Bindungspartners RIP1 in Zelltod-Mechanismen von Kardiomyozyten
- die funktionelle Bedeutung von RIP3 in Kardiomyozyten und im Herzen
- Einfluss der Nekroptose auf die Pathogenese des kardialen Remodeling

Für unsere *in vitro* Experimente wurde die Technik eines adenoviralen RIP3-Gentransfers an isolierten Kardiomyozyten angewandt, um die Wirkung einer RIP3-Überexpression bzw. -Hemmung zu untersuchen.

Die Untersuchung von RIP3 *in vivo* nach Myokardischämie erfolgte mithilfe eines Infarktmodells der Maus. Durch operativen Verschluss des wichtigsten Astes der linken Koronararterie, der LAD (engl. left anterior descending), wurde ein Myokardinfarkt induziert. Neben Wildtyp-Mäusen stand uns dafür eine konstitutive RIP3^{-/-}-Knockout-Mauslinie zur Verfügung (mit freundlicher Genehmigung von Prof. V.M. Dixit, Genentech Inc.).

Arbeitshypothese:

Nekroptose vermittelt negatives Remodeling nach Myokardinfarkt

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Amersham Hybond-P PVDF Membran	GE Healthcare
Axiovert 40 C Mikroskop	Zeiss
Bruker DRX 9.4 Tesla NMR Spektrometer	Bruker Corporation
Cell Scraper 16cm 2-position blade	Sarstedt
Cellstar Zellkulturplatten 6-, 12-, 24-well	Greiner Bio one
Centrifuge 5810	Eppendorf
CFX96 Real-Time PCR Detection Sys	BioRad
Chromatographie-Papier	Whatman
Deckgläser 18mm Durchmesser	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG
Duomax 1030 Plattformschüttler	Heidolph
DynaMag-2 Magnetic Particle Conc.	Invitrogen Dynal AS
ECX-F26.M UV-Transilluminator	Peqlab
Elektroporationsküvette	Peqlab
FACSCalibur Flow Cytometer	BD Biosciences
Faltenfilter 110mm Durchmesser	Schleicher & Schuell
FluorChem Q Kamera (Western Blot)	Alpha Innotech
Galaxy Ministar Mikrozentrifuge	VWR
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Scientific
Heraeus Pico 21 Centrifuge	Thermo Scientific
Horizon 11-14 Gel-Elektrophorese	Life Technologies
Infinite M200Pro Mikroplattenleser	Tecan
Leica Bond-Max Immunhistochemie	Leica Microsystems GmbH
Mini PROTEAN Tetra System	Bio Rad
Multiply- μ Strip 8er Kette Gefäße	Sarstedt
MyCycler Thermal Cycler	Bio Rad
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Scientific
Neubauer-Kammer	Assistent
Objektträger 76x26x1mm	MARIENFELD
Olympus BX53 Mikroskop	Olympus
Olympus DP72 Kamera	Olympus

Parafilm	BEMIS
Pasteurpipetten ohne Stopfen	ROTH
Petrischale 35x10 mm	Sarstedt
Pipette Eppendorf-Reference	Eppendorf Research
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tip	Sarstedt
Pipettenspitzen, gestopft	Sarstedt
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Power Pac HC	Bio Rad
Power Pac P25 Stromversorgung	Biometra
PP-Mikroplatte 96-well	Greiner-Bio One
RCT Basic Magnetrührer	IKA
Reagiergefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Sarstedt
Röhrchen, luftdurchlässig, 14ml	Sarstedt
Röhrchen 15ml, 50ml	Sarstedt
Serologische Pipetten	Sarstedt
Seven Easy pH-Messgerät	Mettler-Toledo
Stemi 2000-C Stereomikroskop	Zeiss
Steril-Cult 200 Inkubator	Labotect
Sterilfilter 0,2µm Porengröße	Nalgene Labware
SterilGARD Hood	The Baker Company
TE1502S Präzisionswaage	Sartorius
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Titan PCR-Arbeitsstation	Scanlaf
Titramax 100 Plattformschüttler	Heidolph
Ultra-Turrax T25 Dispergiergerät	Janke & Kunkel
Vacunsafe Absaugsystem	Integra Biosciences
Variomag Poly Magnetrührer	Thermo Scientific
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zellkulturflaschen 75cm ² , 175cm ²	Sarstedt

2.1.2 Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific GmbH
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	BD Biosciences

Albumin Fraktion V aus Rinderserum	Merck KGaA
Ampicillin	Sigma-Aldrich
CM-H ₂ DCFDA für ROS-Messung	Invitrogen
DAPI	Sigma-Aldrich
DEPC	Sigma-Aldrich
DMEM	PAA Laboratories
DMSO	Sigma-Aldrich
DNA Loading Dye 6x	Fermentas
DreamTaq 10x Puffer grün	Thermo Scientific
DynaBeads Protein G	Novex by Life Technologies
EDTA	Serva Electrophoresis
Elution Buffer	Qiagen
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
FCS Gold	PAA Laboratories
Fluor Preserve Reagent	Calbiochem
Formamid	Sigma-Aldrich
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas
Glukose	Sigma-Aldrich
Glutaraldehyd	Carl Roth
HEPES	Carl Roth
iQ Multiplex 2000 Reagent	Bio-Rad
Kollagen I - Lösung aus Rinderhaut	BD Biosciences
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen
Methanol	Carl Roth
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumhydroxid	AppliChem
NCS (Newborn Calf Serum)	PAA Laboratories
PageRuler Plus Protein Ladder	Thermo Scientific
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen/GIBCO
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth
Propidiumiodid (PI)	Carl Roth
Protein-Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad
QIAzol Lysis Reagenz	Qiagen

SDS	Serva Electrophoresis
Spectinomycin	Sigma-Aldrich
TEMED 99% p.a. Elektrophorese	ROTH
TNFalpha Recombinant Protein Ratte	Life Technologies
Tris-Cl	Carl Roth
Triton X	Serva Electrophoresis
TRizol-Reagenz	Invitrogen
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Yeast-Extract	BD Biosciences

2.1.3 Enzyme

Caspase-Inhibitor zVAD-FMK	Promega
Collagenase Typ 2	Worthington/Cellsystems
Complete-Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics
Desoxyribonuclease I (DNase I)	Sigma-Aldrich
DreamTaq DNA-Polymerase	Thermo Scientific
LR-Clonase™ II	Invitrogen
Pac I	BD Biosciences Clontech
PB Clonase™ II	Invitrogen
Platinum® Pfx DNA Polymerase	Invitrogen
Phosphatase-Inhibitor 2 und 3	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
0,25% (w/v) Trypsin-EDTA-Lösung	Invitrogen/GIBCO

2.1.4 Antikörper

Anti-Alpha-Actinin (Sarkomer, Maus, monoklonal)	Sigma-Aldrich
Anti-CD3-APC (Maus, Klon 145-2C11)	Miltenyi Biotech
Anti-Cd31-Antikörper (Kaninchen, polyklonal, IgG)	Abcam
Anti-CD11b-APC (Maus, Klon M1/70.15)	Miltenyi Biotech
Anti-CD45-PE (Maus, Klon 30F11)	Miltenyi Biotech
Anti-Cleaved Caspase 3 (Kaninchen, monokl, IgG)	Cell Signaling

Anti-GAPDH (Ziege, polyklonal, IgG)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GAPDH (Maus, monoklonal, IgG)	Sigma-Aldrich
Anti-Kaninchen-IgG Cy3-konjugiert	Jackson Immuno-Research
Anti-Kaninchen-IgG FITC-konjugiert	Jackson Immuno-Research
Anti-Kaninchen-IgG HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Ly6g (Gr-1)-PerCP-Cy5.5 (Maus, RB6-8C5)	eBioscience
Anti-Maus-IgG Cy3-konjugiert (Fab-Fragment)	Jackson Immuno-Research
Anti-Maus IgG Fluorescein (FITC)-konjugiert	Jackson Immuno-Research
Anti-Maus-IgG HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Poly-Ubiquitin (Linkage-specific K63, monokl)	Enzo Life Sciences
Anti-RIP1 (Maus, monoklonal)	BD Biosciences
Anti-RIPK3 (N-term. Region, Kaninchen, polyklonal)	Aviva Systems
Anti-RIP3 (Kaninchen, polyklonal)	Enzo Life Sciences
Anti-Tubulin (Maus, monoklonal, IgG)	Sigma-Aldrich
Anti-Ziege-IgG HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology
MitoTracker [®] Orange CMTMRos (Rosamin-basiert)	Invitrogen

2.1.5 Kits

Accutase [®] Cell Detachment Solution	PAA
Annexin V-FLUOS	Roche Life Science
Block-iT [™] Pol II miR RNAi - Expression Vector Kit	Invitrogen
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche Life Science
ECL-Detektionssystem	GE Healthcare
Nucleo Spin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
OxySelect [™] in vitro ROS/RNS Assay Kit	Cell Biolabs
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen
ProQ Diamond Phosphoprotein Gel Stain	Invitrogen
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Quikchange II Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
Superscript III First Strand Kit	Invitrogen

2.1.6 Oligonukleotide

2.1.6.1 Primer zur Generierung rekombinanter Adenoviren kodierend für RIP3 und RIP3-K51A-Kinase-inaktive-Mutante:

RIP3 Ratte-vorwärts 5'-GCT GGC ACC ATG TCT TCT GTC AAG-3'
 RIP3 Ratte-rückwärts 5'-GCT GGG TCG CCC CAG CCC CTA CCC CTG-3'
 attB1 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC TGG CAC C-3'
 attB2 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GCC-3'

2.1.6.2 Primer zur Generierung rekombinanter Adenoviren kodierend für Gen-spezifische miRNA:

Die Gensequenz für RIPK1 (*rattus norvegicus*, NM_001107350.1) und RIPK3 (*rattus norvegicus*, NM_139342) wurde im Block-iT™ RNAi Designer eingesetzt, um folgende Primer für die Entwicklung spezifischer miRNA mittels BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expressionsvektor-Kit zu erstellen:

mi-RIP1-1 top strand:

5'-TGC TGA AGA GAG CCT CAT TGT ACT CAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC
 TGA GTA CAG AGG CTC TCT T-3'

mi-RIP1-1 bottom strand:

5'-CCT GAA GAG AGC CTC TGT ACT CAG TCA GTC AGT GGC CAA AAC TGA
 GTA CAA TGA GGC TCT CTT C-3'

mi-RIP1-2 top strand:

5'-TGC TGC TTA AAG GAA GCC ACA CCA AGG TTT TGG CCA CTG ACT GAC
 CTT GGT GTC TTC CTT TAA G-3'

mi-RIP1-2 bottom strand:

5'-CCT GCT TAA AGG AAG ACA CCA AGG TCA GTC AGT GGC CAA AAC CTT
 GGT GTG GCT TCC TTT AAG C-3'

mi-RIP3-1 top strand

5'-TGC TGT TGA CTG CTA CAT CAA GGT TCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC
 GAA CCT TGG TAG CAG TCA A-3'

mi-RIP3-1 bottom strand

5'-CCT GTT GAC TGC TAC CAA GGT TCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GAA
CCT TGA TGT AGC AGT CAA C-3'

mi-RIP3-2 top strand:

5'-TGC TGT CTA GAT CCA GCA GAA CAT TGG TTT TGG CCA CTG ACT GAC
CAA TGT TCC TGG ATC TAG A-3'

mi-RIP3-2 bottom strand:

5'-CCT GTC TAG ATC CAG GAA CAT TGG TCA GTC AGT GGC CAA AAC CAA
TGT TCT GCT GGA TCT AGA C-3'

2.1.6.2 Primer für quantitative Real-Time PCR

TNF-Rezeptor 1 (TNFR1)

vorwärts 5'-CCG GGA GAA GAG GGA TAG CTT-3'

rückwärts 5'-TCG TGA CAG TCA CTC ACC AAG -3'

TNF-Rezeptor 2 (TNFR2)

vorwärts 5'-ACA CCC TAC AAA CCG GAA CC-3'

rückwärts 5'-AGC CTT CCT GTC ATA GTA TTC CT-3'

TNF α

vorwärts 5'-ACC ACG CTC TTC TGT CTA CTG A-3'

rückwärts 5'-TCC ACT TGG TGG TGG TTT GCT ACG-3'

TACE

vorwärts 5'-ACC ACT TTG GTG CCT TTC GT-3'

rückwärts 5'-GTC GCA GAC TGT AGA TCC CTT-3'

NPPA

vorwärts 5'-TCC AGG TGG TCT AGC AGG TTC TTG-3'

rückwärts 5'-CCC TGG GCT TCT TCC TCG TCT T-3'

NPPB

vorwärts 5'-GTC GTT TGG GCT GTA ACG CAC T-3'

rückwärts 5'-CAC TTC AAA GGT GGT CCC AGA GC-3'

RCAN

vorwärts 5'-TCC AGC TTG GGC TTG ACT GAG-3'

rückwärts 5'-TGC TGA AGT TTA TCC GGA CAC GT-3'

2.1.7 Puffer und Lösungen

- **ADS-Puffer (zehnfach konzentrierte Stammlösung)**

1,16 M	NaCl
197 mM	HEPES
94 mM	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O
55,5 mM	Glukose
53,6 mM	KCl
8,3 mM	MgSO ₄ , pH 7,4, steril filtriert

- **ELB-Puffer für Co-Immunopräzipitation**

250 mM	NaCl
50 mM	HEPES
0,93 g	EDTA

zum Lysieren wurden kurz vor der Ernte folgende Enzyme hinzugegeben:

2 ml	25x Proteinase-Inhibitor-Cocktail
500µl	Phosphatase-Inhibitor 2
500 µl	Phosphatase-Inhibitor 3
500 µl	Nonidet P 40

und auf 50 ml mit ELB-Puffer aufgefüllt

- **Kernlysepuffer für Proteinextraktion**

20mM	Tris pH 8
12,5% (v/v)	Glycerol
10 mM	DTT
1% (v/v)	NP-40
500 mM	NaCl

zu 1ml Kernlysepuffer wurden kurz vor der Ernte folgende Enzyme hinzugegeben:

40 µl	25x Proteinase-Inhibitor-Cocktail
10 µl	Phosphatase-Inhibitor 2
10 µl	Phosphatase-Inhibitor 3
1 µl	1M DTT

- **Ladepuffer für DNA (sechsfach konzentriert)**
 - 15% Ficoll 400, type 400
 - 0,005% Bromphenolblau
 - 0,005% Xylen
- **Laufpuffer für SDS-PAGE (zehnfach konzentriert)**
 - 250 mM Tris
 - 1,9 M Glycin
 - 1% (w/v) SDS
- **PBS (einfach konzentrierte Gebrauchslösung)**
 - 137 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl
 - 4,3 mM Na₂HPO₄
 - 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4, autoklaviert
- **Proben-Puffer nach Laemmli (vierfach konzentriert)**
 - 250 mM Tris pH 6,8
 - 5% (w/v) SDS
 - 40% (v/v) Glyzerin
 - 0,005% (w/v) Bromphenolblau
 - 10% (v/v) 2-Mercaptoethanol
- **Sammelgelpuffer für SDS-PAGE**
 - 0,5 M Tris-Cl, pH 6,8
- **TAE-Puffer (50-fach konzentriert)**
 - 3 M Tris-Acetat
 - 0,05 M EDTA, pH 8,3
- **TBS-Lösung**
 - 100 mM Tris-Cl, pH 7,5
 - 0,9% (w/v) NaCl
- **Transferpuffer für Western-Blotting**

20% (v/v) Methanol
25 mM Tris
192 mM Glycin
0,037%(w/v) SDS

- **Trenngelpuffer für SDS-PAGE**

1,5 M Tris, pH 8,8

2.1.8 Medien

- **Medium zur Bakterienkultur: 2YT-Medium**

Menge 1 Liter

10g Trypton

10g Yeast Extrakt

5g NaCl

- **Medium zur Bakterienkultur: Luria-Bertani-(LB) Medium**

Menge 100 ml

1g Trypton

0,5g Hefeextrakt

1g NaCl

pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen

- **Medium zur Kultivierung von Säugetierzellen**

Medien zur Zellkultur wurden bei 4°C gelagert und kurz vor dem Einsatz in der Zellkultur in einem Wasserbad auf 37°C erhitzt.

- **Medium zum Anwachsen von Kardiomyozyten aus neugeborenen Ratten**

DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)

10% (v/v) FCS Gold

100 U/l Penicillin G

100 µg/ml Streptomycin

2mM L-Glutamin

- **Medium zur Serumdeprivation von Kardiomyozyten aus neugeborenen Ratten**

DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)

100 U/l Penicillin G
100 µg/ml Streptomycin
2 mM L-Glutamin

- **Medium zur Kultur von HEK 293 und L 929-Zellen**

DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)

10% (v/v) FBS
100 U/l Penicillin G
100 µg/ml Streptomycin
2 mM L-Glutamin

2.1.9 Zelllinien

- **HEK 293**

HEK 293 ist eine humane, embryonale Nierenzelllinie, die durch das Adenovirus Typ 5 transformiert wurde. So sind diese Zellen dazu fähig, aus rekombinanten, adenoviral-basierten Vektoren Adenoviren herzustellen.

- **L 929**

L929-Zellen sind Fibroblastenzellen der Maus. Diese Zellen sind nach Stimulation mit TNF α sehr anfällig für programmierte Nekrose und dienen als Positivkontrolle beim Nachweis von RIP3-Aktivierung *in vitro*.

2.1.10 Versuchstiere

- **Neugeborene Ratten vom Wistar-Stamm**

Um neugeborene Ratten vom Wistar-Stamm zu erhalten, wurden bei Charles-River Laboratories männliche und weibliche Wistar-Ratten bestellt und in der Zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel verpaart.

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden – Bakterien

2.2.1.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Für die Transformation durch Elektroporation werden elektrokompente Bakterien benötigt, die die Fähigkeit besitzen, DNA aus dem Medium aufzunehmen. Um die Bakterien elektrokompent zu machen, wurden 50 ml 2YT-Medium mit DH10B-Zellen einer entsprechenden Menge über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert und geschüttelt. Anschließend wurden 1000 ml 2YT-Medium mit soviel der Übernachtskultur angeimpft, dass eine optische Dichte (OD) von 0,1 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht wurde. Diese Kultur wurde bei 37°C und 250 rpm solange inkubiert (ungefähr 2 h) bis eine OD_{600nm} zwischen 0,4 und 0,8 gemessen werden konnte. Daraufhin wurde die Bakterien-Kultur für 10 min in einem Eiswasserbad abgekühlt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 4°C für 15 min bei 4400 rpm sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet zweimal sofort in eiskaltem autoklaviertem ddH₂O resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet zunächst in 250 ml 10% (w/v) Glycerin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde in 1,5 ml 10% (w/v) Glycerin aufgenommen. Die Lösung wurde anschließend in Reaktionsgefäße zu je 50 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Transfektionseffizienz wurde bestimmt, indem 10 pg pUC-DNA in ein Aliquot elektrokompenter Bakterien transformiert und anschließend 10 µl dieses Ansatzes auf Ampicillin/2YT-Agarplatten ausplattiert wurden. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C konnte anhand der Anzahl der Klone die Transfektionseffizienz bestimmt werden.

2.2.1.2 Transformation von DNA-Plasmiden in Bakterien durch Elektroporation

Für die Transformation mittels Elektroporation wurden elektrokompente E.coli Bakterien verwendet, genauer DH10B für Plasmide ohne ccdB-Gen. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 1-2 µl Plasmid-DNA hinzugefügt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation erfolgte bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Die transformierten Bakterien wurden in 1ml LB-Medium für 1 h bei 37°C und 300 rpm inkubiert und anschließend auf selektive LB-Agarplatten ausplattiert.

2.2.1.3 Herstellung von Selektivnährböden

Es wurde LB-Medium hergestellt, welches zusätzlich 1,5% (w/v) Agar enthielt. Das Gemisch wurde autoklaviert und danach im Wasserbad bis auf ca. 60°C heruntergekühlt. Jetzt konnte zur Herstellung der Selektivnährböden eine adäquate Menge eines Antibiotikums zugefügt werden (Ampicillin 50 µg/ml). Die Petrischalen wurden mit dem gewünschten Volumen befüllt und das Trocknen der Nährböden erfolgte in einer Sterilbank für 30 min bei Raumtemperatur. Die Agarplatten konnten verpackt bei 4°C gelagert werden.

2.2.1.4 Aussaat auf Selektivnährböden

50µl der transformierten Bakterienkultur wurden nach einer einstündigen Inkubation in antibiotikafreiem LB-Medium auf einer mit dem selektierenden Antibiotikum versetzten Agarplatte ausgestrichen und antrocknen gelassen. Es folgte eine Inkubation für 14-16 h bei 37°C, nach der einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze abgenommen und zum weiteren Wachstum in eine Flüssigkultur überführt wurden.

2.2.1.5 Anzucht von Bakterien in Selektivmedium

Ein gewünschtes Volumen LB-Medium wurde je nach Resistenzkassette des zu amplifizierenden Plasmids mit einem Antibiotikum versetzt. Die Flüssigkultur wurde entweder mit einem kleinen Volumen einer Bakteriensuspension oder mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht auf 37°C bei 300 rpm inkubiert.

2.2.2 Kultur von Säugetierzellen

Alle im Folgenden beschriebenen Zellen wurden in Inkubatoren bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Wurden Zellen bearbeitet, so geschah dies unter einer Sterilbank. Für Primärkulturen, Zelllinien und virale Infektionen wurden unterschiedliche Sterilbänke benutzt, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

2.2.2.1 Kulturgefäße

Zur Kultivierung von Säugetierzellen wurden Flaschen mit 75 und 175 cm² Grundfläche sowie Multiwell-Platten mit 6 und 12 Wells benutzt.

2.2.2.2 Beschichtung von Kulturgefäßen mit Kollagen

Alle Gefäße, in denen Kardiomyozyten kultiviert werden sollten, wurden vorher mit Kollagen I beschichtet. Aus einer Kollagen I-Stammlösung (3 mg/ml) in 0,01 N Essigsäure wurde eine 10% (v/v) Kollagen-Lösung in PBS hergestellt. Die Kulturgefäße wurden mit dieser Lösung für 1 h bei 37°C beschichtet. Die Lösung wurde abgenommen und verworfen und die Kulturgefäße für eine weitere Stunde bei 37°C getrocknet.

2.2.2.3 Primärkultur von Kardiomyozyten

Da keine Zelllinien zur Verfügung stehen, die sich universell wie Kardiomyozyten verhalten, wurden für die im folgenden beschriebenen Versuche Primärkulturen von Kardiomyozyten aus neugeborenen Ratten angelegt.

2.2.2.3.1 Isolation

Für die Herstellung einer Primärkultur von ventrikulären Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten wurden pro Präparation ca. 40 neugeborene Ratten vom Wistar-Stamm im Alter von ein bis drei Tagen geopfert. Die Ratten wurden mit Kopf und Brust in eine 75% (v/v) Ethanol-Lösung getaucht. Danach wurden die Tiere dekapitiert und der Thorax mit einer Schere durch einen Längsschnitt links neben dem Sternum eröffnet. Die Herzen wurden durch leichten Druck auf Thorax und Bauch mit einer Pinzette entnommen und sofort in einfach konzentrierten, eiskalten ADS-Puffer überführt. Die verbliebenen Gefäße und Vorhöfe wurden entfernt und die Ventrikel in eine neue Schale mit einfach konzentriertem, eiskalten ADS-Puffer überführt. Danach wurde der ADS-Puffer soweit abgenommen, dass die Ventrikel gerade noch mit Puffer bedeckt waren. Mit einer Schere wurden die Ventrikel zerkleinert und die Gewebstücke in 36 ml einer 37°C warmen Verdauung (0,5 mg/ml Collagenase Typ 2, 0,6 mg/ml Pancreatin in einfach konzentriertem ADS-Puffer, steril filtriert) in einer Kulturflasche (75 cm²) zum Vorverdau aufgenommen. Die Kulturflasche wurde in einem 37°C warmen Wasserbad befestigt und bei 40 rpm geschüttelt. Nach 20 min wurde die Verdauung abgenommen und verworfen. Im ersten Verdauungsschritt wurden die Gewebstücke in 36 ml neuer 37°C warmer Verdauung aufgenommen und in einem 37°C warmen Wasserbad unter Schütteln

(40 rpm) inkubiert. Nach 20 min wurde die erhaltene Zellsuspension aus der Kulturflasche entnommen und durch ein Netz (Cell strainer) in ein 50 ml-Gefäß gegeben. Um die Enzyme der Verdauung zu blockieren wurden 8 ml NCS ebenfalls durch das Netz zu der Zellsuspension gegeben. Die Zellsuspension wurde bei 1060 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml NCS resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C (95% O₂, 5% CO₂) gelagert. Zu den verbliebenen Gewebstücken wurden nun im zweiten Verdauschritt erneut 36 ml 37°C warme Verdauungslösung zugefügt und für 20 min im Wasserbad inkubiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde abgenommen durch ein Netz in ein neues 50 ml Gefäß gegeben und 8 ml NCS zugefügt. Die Zellen wurden bei 1060 rpm für 5 min abzentrifugiert und in 5 ml NCS aufgenommen und zu den bereits im Inkubator gelagerten Zellen hinzugefügt. Insgesamt waren zwischen vier und fünf Verdauschritte von Nöten, um das Myokardgewebe vollständig zu verdauen. Nach dem letzten Verdauschritt wurden die in NCS resuspendierten Zellen bei 1060 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml einfach konzentriertem ADS-Puffer resuspendiert.

2.2.2.3.2 Aufreinigung

Um die bei Isolation aus Rattenmyokard gewonnenen Kardiomyozyten von den ebenfalls isolierten Fibroblasten und Erythrozyten abzutrennen, wurden die Zellen nach ihrer Dichte aufgereinigt mithilfe einer Percollstammlösung aus 27 ml Percoll und 3 ml zehnfach konzentriertem ADS-Puffer (Iwaki, Sukhatme et al. 1990). Aus dieser Percollstammlösung wurde eine Lösung mit niedriger und eine mit hoher Dichte hergestellt. Die Lösung mit niedriger Dichte setzte sich aus 9 ml Percollstammlösung und 11 ml einfach konzentriertem ADS-Puffer mit Phenolrot zusammen. Die Lösung hoher Dichte setzte sich aus 13 ml Percollstammlösung und 7 ml einfach konzentriertem ADS-Puffer zusammen. 2 ml Kardiomyozytensuspension wurden gleichmäßig auf die befüllten 15 ml Gefäße verteilt und bildeten die oberste der drei Phasen. Die Gefäße wurden nun bei 2400 rpm für 30 min auf 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren die Zellen in dem Gradienten gemäß ihrer Dichte aufgetrennt. Die Fibroblasten sammelten sich am Übergang der oberen einfachen ADS-Phase zur mittleren Phase, die Kardiomyozyten am Übergang der mittleren zur unteren Phase. Die Erythrozyten bildeten ein Pellet am Boden der

Gefäße. Die Fibroblasten wurden abgenommen und verworfen. Die Kardiomyozyten wurden entnommen und auf zwei 50 ml Gefäße aufgeteilt und mit einfach konzentriertem ADS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml einfach konzentriertem ADS-Puffer resuspendiert, erneut bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und in 5 ml 37°C warmen Kardiomyozytenmedium resuspendiert und auf 40 ml aufgefüllt.

2.2.2.3.3 Aussaat von NRVCM

Aus der Zellsuspension wurden 25 µl entnommen und 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung gemischt. Danach wurde ein adäquates Volumen in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die ungefärbten Kardiomyozyten ausgezählt. Die Kardiomyozyten wurden in einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro 1 cm^2 in den Kulturgefäßen ausgesät und für 48 h anwachsen gelassen.

2.2.3 Kultur von Säugetier-Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien (HEK 293, L929) wuchsen adhärent in einer singulären Schicht (monolayer) auf dem Boden eines Kulturgefäßes.

2.2.3.1 Auftauen von Zellen

Das Kryokonservierungsgefäß mit den gefrorenen Zellen wurde in ein 37°C warmes Wasserbad eingebracht. Sobald die Zellen gerade aufgetaut waren, wurde das Gefäß von außen mit 70% (v/v) Ethanol gereinigt und die Zellen in einem geeigneten Kulturgefäß ausplattiert.

2.2.3.2 Passagieren von Zellen

Unter optimalen Bedingungen konnte sich die Zellzahl in 36 h verdoppeln. Erreichten die Zellen eine Konfluenz von 70-80%, so wurden sie geteilt. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen. Danach wurden 1-2 ml pro 75 cm^2 Kulturflasche einer vorgewärmten 0,25% (w/v) Trypsin-EDTA-Lösung hinzugefügt. Die Inkubation bei 37°C erfolgte so lange, bis sich die adhärent gewachsenen Zellen von der Unterfläche gelöst hatten. Es wurden 10 ml Medium hinzugefügt, um die Trypsinierung zu stoppen. Die Zellsuspension wurde bei 1580 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das

Zell-Pellet in 5 ml Medium resuspendiert. Die Zellen konnten nun in der gewünschten Dichte in neue Gefäße ausgesät werden.

2.2.3.3 Einfrieren von Zellen

Sobald die Zellen eine Dichte von 80% erreicht hatten, wurden sie trypsinisiert und sedimentiert. Das Zell-Pellet wurde wieder in Kulturmedium, welches mit 20% FBS und 10 % Glycerin (v/v) angereichert worden war, aufgenommen. Die Zelldichte sollte $1-2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml betragen. In ein Kryokonservierungsgefäß wurde 1 ml dieser Zellsuspension überführt. Die Zellen wurden zunächst auf -80°C tiefgefroren und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden – DNA

2.2.4.1 Extraktion kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Extraktion von DNA-Plasmiden aus DH10B-E.coli-Bakterien wurde das NucleoSpin® Mini-Präp-Kit von Macherey&Nagel gemäß Protokoll des Herstellers verwendet.

2.2.4.2 Extraktion mittelgroßer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Extraktion von mittelgroßen Mengen Plasmid-DNA aus DH10B-E.coli-Bakterien wurde das Plasmid Purification Midi-Kit von Qiagen® verwendet. Ein für das Zielgen positiver Bakterien-Klon wurde über Nacht bei 37°C in einem Erlenmeyerkolben mit 100ml LB-Medium und geeignetem 1:1000-verdünntem Antibiotikum hochgezüchtet. Anschließend wurden 100 ml Bakterienkultur auf zwei 50ml-Gefäße verteilt, in denen Bakterienpellets bei 5300 rpm und 4°C für 20 min gesammelt wurden. Der Kulturüberstand wurde verworfen und beide Pellets mit je 2ml P1-Puffer (enthält RNase A) resuspendiert, um dann beide Suspensionen in ein steriles Carbonröhrchen zusammen zu führen. Mithilfe von 4 ml P2-Puffer (enthält Natriumhydroxid) wurde die Bakteriensuspension kurz geschwenkt und dann für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde das Lysat mit 4 ml 4°C kalten P3-Puffer (enthält Essigsäure) für 15 min auf Eis neutralisiert. Um den Bakterienzellrest von der Plasmid-DNA zu trennen, wurde das Carbonröhrchen in einem Carbonrotator für 30 min bei 4°C und 14500 rpm zentrifugiert. Der klare

Überstand enthielt das zu isolierende Plasmid, welche in eine mit QBT-Puffer (enthält Isopropanol) equilibrierte Qiagen-tip 100 Silica Membran-Säule überführt wurde. Die klare Lösung tropfte mittels Schwerkraft in ein Auffangbehältnis, wobei die Plasmid-DNA in der Silica-Membran verblieb. In zwei Schritten wurden je 10 ml QC-Waschpuffer (enthält Isopropanol) auf die Silica-Membran pipettiert und anschließend das Qiagen tip 100 auf ein neues Carbonröhrchen gesetzt, um die Plasmid-DNA mithilfe von 5 ml 65°C warmen QF-Puffer (enthält Isopropanol) zu eluieren. Das Qiagen-tip 100 wurde verworfen und zu der mittels Schwerkraft gewonnenen Plasmid-DNA wurden 3,5ml Isopropanol pipettiert und die Lösung sogleich für 30 min bei 14500 rpm und 4°C im Carbonrotator zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das Pellet in 2 ml 70%igen Ethanol für 10min bei 9500 rpm und 4°C gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde getrocknet und in eine geeignete Lösung (100µl ddH₂O bzw. TE-Puffer, pH 8.0) durch gründliches Auf- und Abpipettieren aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde mit Nano-Drop[®] bestimmt.

2.2.4.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Gewinnung von DNA aus einem 1-2% igem (w/v) Agarosegel in TAE-Puffer wurde das QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen[®] gemäß Protokoll des Herstellers angewandt. Vorher wurde die zu isolierende und mithilfe von Ethidiumbromid sichtbare DNA-Bande mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und das Gel abgewogen. Die Milligramm-Zahl mit 3 multipliziert ergab das Mikroliter-Volumen des QG-Puffers (pH < 7.5). Nach der DNA-Extraktion erfolgte die DNA-Konzentrationsbestimmung mithilfe von Nano Drop[®].

2.2.4.4 Auftrennung von DNA nach der Größe

Um DNA nach der Größe aufzutrennen, wurden 1-2 %ige (w/v) Agarosegele, je nach Größe der erwarteten Fragmente, eingesetzt. Dazu wurden 1-2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer in einem Mikrowellenofen geschmolzen, kurz abgekühlt und Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugefügt. Die auf 50-60°C abgekühlte Lösung wurde in einen Gelschlitten gegossen. Sobald sich das Gel verfestigt hatte, wurde es in eine mit TAE-Puffer beladene Elektrophoresekammer platziert. Die Proben wurden mit einem adäquaten Volumen Ladepuffer versetzt und

aufgetragen. Ebenfalls aufgetragen wurde ein DNA-Größenmarker. Die Elektrophorese wurde bei maximal 10 Volt/cm Gel ausgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator photographiert.

2.2.4.5 Amplifikation von DNA (mithilfe von PCR)

Zur Amplifikation von DNA wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt. Je nach Anwendung wurden dabei unterschiedliche Anforderungen an die DNA-abhängige DNA-Polymerase gestellt. Die Anwendungen unterschieden sich hinsichtlich der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments, Sequenz und Genauigkeit, die bei dem Produkt erreicht werden sollte. Als Vorlage wurden dabei genomische DNA, Plasmid-DNA und cDNA eingesetzt. Sollte DNA zur molekularen Klonierung amplifiziert werden, wurde die Platinum[®] Pfx DNA Polymerase von Invitrogen[™] eingesetzt. Die Standard-Reaktionsmischung (**Tab. 1**) wurde je nach DNA-Vorlage variiert. Zur Amplifikation diente ein Standardprogramm (**Tab. 2**), welches je nach DNA-Länge und Anlagerungstemperatur der Primer variiert wurde.

Tabelle 1: PCR-Reagenzien für das Platinum[®] Pfx DNA-Polymerase-System:

Reagenzien	Volumen
10x Pfx Amplifikationspuffer	5 µl
dNTPs (10mM je dNTP)	1,5 µl
50 mM MgSO ₄	1 µl
Primer vorwärts (10 µM)	1,5 µl
Primer rückwärts (10 µM)	1,5 µl
DNA-Vorlage (10 pg - 100 ng)	variabel
Platinum [®] Pfx DNA-Polymerase	0,5 - 1µl
dd H ₂ O	variabel
Σ	50 µl

Tabelle 2: PCR-Standardprogramm eines Thermocyclers:

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiales Denaturieren	94°C	5 min	1 x
Denaturieren	94°C	30 s	

Anlagerung	53 - 60°C	30 s	35 x
Elongation	68°C	1 min	
Finale Elongation	68°C	10 min	1 x
Kühlen	4°C	unbegrenzt	

2.2.4.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von DNA und RNA wurden über eine Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm mit Hilfe des NanoDrop™ von Thermo Scientific bestimmt. Das Verhältnis dieser beiden Wellenlängen gab die Verunreinigung mit Proteinen wieder, der Wert sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

2.2.4.7 Klonierung mit dem Gateway®-System

Die Gateway®-Technologie von Invitrogen Life Technologies® greift auf ein effektives Rekombinationssystem des Bakterienphagen λ zurück: Es kann enzymatisch seine DNA in das Genom von *Escherichia coli* integrieren. Das Gateway®-System wurde verwendet, um die kodierende Sequenz eines zu exprimierenden Gens mithilfe von bestimmten Klonasen reversibel in ein Plasmid zu klonieren und anschließend in das Genom des Bakteriums *Escherichia coli* zu integrieren. Es wurden auf Lambda basierend einerseits DNA-Rekombinations-Sequenzen (engl. attachment sites *attB1* und *attB2*; *attP1* und *attP2*) und andererseits spezifische Lambda- und *E.coli*-Rekombinationsproteine (Enzym-Mix Clonase™ II) in den folgenden vier Teilschritten angewandt: Im **1. Schritt** wurde das zu exprimierende Gen aus einer cDNA-Mischung einer Spezies mithilfe von spezifischen Primern in einer PCR vervielfältigt. Diese Primer bestanden aus einem Teil der *attB1* (*Vorwärts*)- beziehungsweise *attB2* (*Rückwärts*)-Sequenz, es folgte eine *Kozak-Sequenz*, beim *attB1*-Primer das Start-Codon, beim *attB2*-Primer jedoch kein Stop-Codon, sowie die ersten bzw. letzten zwölf Basen aus der kodierenden Sequenz des Zielgens.

Tabelle 3: PCR-Programm für Gateway-Klonierung:

a) Sechs *Touchdown*-Zyklen zur erleichterten Primeranlagerung (mithilfe der Platinum® Pfx DNA Polymerase):

	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
--	------------	------	---------------

Initiales Denaturieren	94 °C	5 min	1
Denaturieren	94 °C	30 s	6
<i>Touchdown</i> -Anlagerung	54 - 60 °C	30 s	
Amplifizierung	68 °C	1,5 min	

b) gefolgt von 30 Zyklen mit konstanter Anlagerungstemperatur:

	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Denaturieren	94 °C	30 s	30
Anlagerung	54 °C	30 s	
Elongation	68 °C	1,5 min	
finale Elongation	68 °C	10 min	1

Nachdem das Zielgen um einen Teil der *attB1*-Vorwärts- beziehungsweise *attB2*-Rückwärts-Sequenz durch PCR vervielfältigt und das PCR-Produkt mithilfe des Macherey&Nagel™ Plasmid-Minipräp-Kits aufgereinigt wurde, wurden im **2. Schritt** die beiden vollständigen *attB1/attB2*-Adapter-Primer mithilfe des obigen PCR-Protokolls an das Gen angefügt. Hierzu wurden 150 ng der aufgereinigten DNA als Vorlage eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und anschließend mithilfe des Qiagen™ Gel-Extraktions-Kit gemäß Protokoll aufgereinigt. Im **3. Schritt** wurde das aus dem Gel extrahierte PCR-Produkt anhand seiner 3'-Ende- als auch 5'-Ende-*attB*-Rekombinationssequenzen mithilfe der BP-Clonase™ II in einen Donorvektor (pDONR221) integriert und es entstand ein Eintrittsklon (**Abb. 3**). Die BP-Reaktion ermöglichte eine spezifische Anlagerung von *attB1* an *attP1* sowie *attB2* an *attP2* und einen Austausch des sogenannten *ccdB*-Gens (ein Selbstmordgen zur negativen Selektion) gegen das PCR-Produkt. Es wurden 150 ng des Donorvektors, 50 ng des extrahierten Gens sowie 2 µl BP-Clonase™ II in einem Eluierungspuffer (auf 8 µl addiert) über Nacht bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde die BP-Clonase™ II mithilfe von 1 µl Proteinase K für 10 min bei 37°C inaktiviert. Der Eintrittsklon enthielt jetzt das Zielgen mit neu generierten *attL*-Anhangssequenzen sowie eine Kanamycin-Resistenz zur positiven Selektion von transformierten DH10B-E.coli-Zellen gegenüber nicht-transformierten Zellen. Als Beiprodukt der BP-Reaktion blieb das mit *attR*-Sequenzen flankierte *ccdB*-Selbstmord-Gen übrig. Für eine genaue Sequenzierung wurden 2 µl dieses Eintrittsklons in 50 µl DH10B-Bakterien durch Elektroporation transformiert und 1 h in 1 ml LB-Medium bei 37°C inkubiert. Es

wurden 20 µl dieser Bakterienlösung auf einer Kanamycin-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C gelagert. Anschließend wurden von jeder Kanamycinplatte jeweils 8 einzeln liegende Klone mittels Pipettenspitze entnommen und die gelungene Transformation des Gens in das Bakterium mithilfe einer „Kolonie-PCR“ überprüft, indem das zu untersuchende Gen sowie der Donor-Vektor ohne Aufreinigung der Plasmid-DNA direkt im Bakterium ansequenziert wurden. Diejenigen Klone, die das Zielgen enthielten, zeigten eine Bande in der Agarosegel-Elektrophorese. Ein ausgewählter positiv ausgesuchter Klon wurde mithilfe des Macherey&Nagel™ Plasmid-Minipräp Kits aufgereinigt. Zwei Plasmide wurden für eine Durchsequenzierung des gesamten Zielgens an Eurofins™ MWG Operon gesandt.

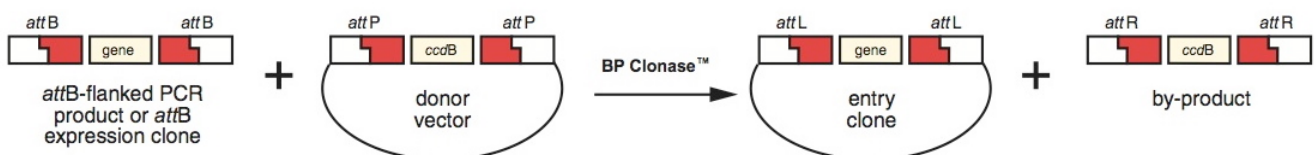


Abbildung: Gateway®Technology Manual 25-0522, Version E, Mai 2010

Abbildung 3: BP-Reaktion. Rekombination eines attB-flankierten PCR-Produkts in einen Eintrittsklon mithilfe der BP-Clonase™

Nach erfolgreicher Sequenzierung des Plasmids wurde im **4. Schritt** der Gateway-Klonierung mithilfe der LR-Clonase™ II das im Eintrittsklon eingebaute Zielgen in einen Zielvektor namens pAd/CMV/V5-Destination-Vektor übertragen. Der Zielvektor enthielt ebenfalls das ccdB-Selbstmord-Gen zwischen attR1- und attR2-Sequenzen. Durch LR-Reaktion zwischen attL1 (vom Eintrittsklon) und attR1 (vom Zielvektor) sowie attL2 und attR2 entstand der entscheidende Expressionsvektor (expression clone, **Abb. 4**) mit attB-Sequenzen sowie ein Beiprodukt bestehend aus pDONR221-Vektor inklusive ccdB-Selbstmord-Gen und attP-Sequenzen. Die LR-Reaktion entsprach folglich einer umgekehrten BP-Reaktion.

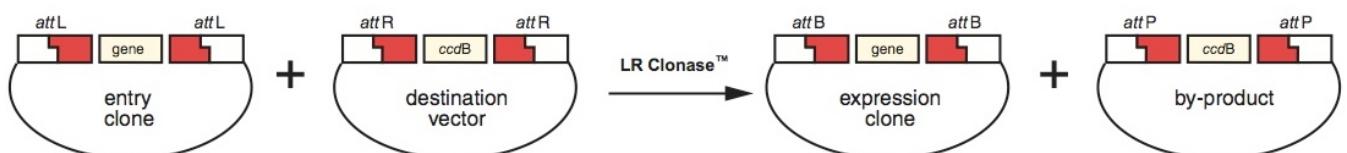


Abbildung: Gateway®Technology Manual 25-0522, Version E, Mai 2010

Abbildung 4: LR-Reaktion. Transformation eines attL-flankierten Gens im Eintrittsklon in einen Expressionsklon mittels LR-Clonase™

Der Zielvektor pAd/CMV/V5-Dest enthielt zur positiven Selektion eine Carbenicillin-Resistenz. Für die LR-Reaktion wurden 300 ng Zielvektor, 150 ng Eintrittsklon sowie 2 µl LR-Clonase™ II in Elutionspuffer (ad 8 µl) über Nacht bei 25°C inkubiert und danach die LR-Clonase™ II mithilfe von 1 µl Proteinase K für 10 min bei 37°C inaktiviert. Vom Reaktionsprodukt wurden 2 µl durch Elektroporation in DH10B-Zellen transformiert und nach einstündiger Inkubation in LB-Medium 20 µl dieser Bakterienlösung auf einer Carbenicillin-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C gelagert. Es wurde erneut eine "Kolonie-PCR" mit 8 ausgewählten einzeln liegenden Klonen pro Platte durchgeführt und aus zwei laut PCR das Zielgen enthaltenden Klonen die Plasmid-DNA aufgereinigt und zur Durchsequenzierung an Eurofins™ MWG Operon gesandt. Mit dem LB-Medium-Ansatz desjenigen Klons, welches ein fehlerfrei durchsequenziertes Zielgen enthielt, wurden 250 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (Ampicillin/Carbenicillin) für die Extraktion großer Mengen Plasmid-DNA angesetzt, um hohe Plasmidkonzentrationen für beispielsweise Adenovirusherstellung herzustellen.

2.2.4.8 Generierung eines Kinase-inaktiven Mutanten von RIP3

Zur Herstellung eines Kinase-inaktiven Mutanten der Serin-Threonin-Kinase RIP3 wurde das QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent Technologies™ nach Protokoll des Herstellers verwendet. Mithilfe dieser Methode wurde in der kodierenden Sequenz von RIP3 eine spezifische Aminosäure ausgetauscht, sodass RIP3 seine Kinaseaktivität verlor. Die Kinase-inaktive Mutante erhielt in dieser Arbeit den Namen AdV RIP3 K51A. Sie wurde mittels Gateway®-Klonierung nach Protokoll 2.2.4.7 in ein Bakterienplasmid und anschließend nach Protokoll 2.2.7.1 in einen adenoviralen Expressionsvektor integriert und diente bei Zellversuchen als Negativkontrolle.

2.2.5 Molekularbiologische Arbeitsmethoden – RNA

2.2.5.1 Klonierung mit dem Block-iT™ Pol II miR RNAi-Expression Vektor-Kit (Invitrogen®)

MikroRNAs (miRNA) sind kurze, nichtkodierende RNAs, die eine wichtige Rolle in der Inhibierung der Expression eines Zielgens auf speziell post-transkriptionaler

Ebene spielen. Das künstliche Einbringen von MikroRNA in Zellen ist ein Verfahren, um die Synthese eines Zielgens unter Zuhilfenahme der RNAi-Maschinerie hochspezifisch zu unterdrücken. Bei dem verwendeten System des Block-iT™ Pol II miR RNAi-Expression Vektor-Kit von Invitrogen® wurde ein mithilfe der RNAi-Designer-Software (Invitrogen®) vom Zielgen abgeleitetes und durch die Firma MWG™ Operon produziertes miRNA-Oligo mit ca. 21 Nukleotiden Länge zunächst mit 10-fachem Oligo-Anlagerungspuffer zu einem weniger empfindlichen doppelsträngigen Oligo zusammengeführt. Anschließend wurde dieser doppelsträngige Oligo mithilfe der T4 DNA Ligase (1 U/μl) hinter einen Pol II-Promotor in den Vektor pcDNA6.2-GW/miR kloniert. Die Transformation dieses Vektors in Bakterien erfolgte gemäß Protokoll 2.2.1.2 mittels Elektroporation in OneShot TOP10 elektrokompetente E.coli-Bakterien, weil diese im Gegensatz zu DH10B-E.colis keine natürliche Spectinomycin-Resistenz besitzen. Nach der Pulsgabe bei einer Spannung von 1,8 kV wurde sofort 1 ml LB-Medium zum Ansatz hinzugegeben und die Bakterien für 1 h bei 37°C und 500 rpm geschüttelt. Anschließend wurde 100μl der transformierten Bakterienkultur auf Spectinomycin-enthaltene Agar-Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Mithilfe einer Kolonie-PCR wurden miRNA-enthaltene, positive Klone ausgewählt, durchsequenziert und anschließend mithilfe einer Midi-Präp (Protokoll 2.2.4.2) größere Mengen des miRNA-enthaltenden Plasmids gewonnen. Die miRNA-enthaltenden Plasmide wurden anschließend gemäß Protokoll 2.2.4.7 (Gateway®-Klonierung) in den Zielvektor pAd/CMV/V5-Dest kloniert und anschließend zur Adenovirusherstellung verwendet.

2.2.5.2 Extraktion von RNA aus Herzgewebe

Zur RNA-Gewinnung wurde das von der Maus entnommene Herz in einem 14 ml-Röhrchen auf Eis gelagert und 1 ml TRIzol-Reagenz hinzu pipettiert. Danach wurde das Herz im 14 ml-Röhrchen, umgeben von Eiswasser, mittels Ultra-Turrax®-Dispergiergerät homogenisiert. Dieses Röhrchen wurde anschließend bei 5300 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert, das Homogenat in 1,5 ml-Gefäße überführt und bis zur RNA-Isolierung auf Eis gelagert. Zum Homogenat wurde 200 μl Chloroform hinzu pipettiert, das Gefäß für 30 s durch Vortexen gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung wurde die RNA bei 10300 rpm und

4°C für 20 min pelletiert und der Überstand, unter Rücksichtnahme des RNA-haltigen Pellets am Boden, komplett verworfen. Das Pellet wurde mit 1ml 75% (v/v) Ethanol gewaschen und kurz geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 8200 rpm für 15 min. Der Überstand wurde erneut komplett abgenommen und das Pellet für 5 min bei Raumtemperatur im 1,5 ml-Gefäß getrocknet. Zur Konzentrationsbestimmung mit NanoDrop™ wurde das Pellet in 30 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

2.2.5.2 DNase-Verdau und Reverse Transkription von RNA

Die aus Herzgewebe isolierte RNA wurde mittels DNase I von DNA eliminiert, indem 5 µg der zu untersuchenden RNA mit 5 µl DNase I und 10 µl 10-fachem Reaktionspuffer für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die RNA-Extraktion wurde mithilfe von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol durch Vortexen und Phasentrennung für 10 min bei 14000 rpm und 4°C erreicht. Die RNA-haltige obere Phase wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt. Danach wurde die RNA mit 300 µl Ethanol und 10 µl 3M Natriumacetat in DEPC-Wasser über Nacht bei -20°C ausgefällt. Am nächsten Tag wurde der Reaktionsansatz für 60 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert, danach mit 500 µl 75% Ethanol gewaschen und wiederum bei 14000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde in 11 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die Reverse Transkription von RNA in cDNA wurde mit dem Superscript® III First Strand Kit gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die synthetisierte cDNA konnte anschließend für die Real-Time PCR verwendet werden.

2.2.5.3 Quantitative Real-Time PCR

Für die Quantifizierung der Transkripte von Genen wurde das Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix-UDG verwendet. SYBR Green I bindet als Fluoreszenz-Farbstoff direkt an amplifizierte cDNA. Das Signal ist proportional zur DNA-Konzentration und wurde mithilfe des CFX96 Real Time PCR Detection System detektiert. Als interner Standard zur relativen Quantifizierung wurde eine Primerkombination für 18 S rRNA eingesetzt.

Tabelle 4: Standard-Reaktionsansatz für qRT-PCR:

Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG	15 µl
ROX-Referenz-Farbstoff	0,6 µl
ddH ₂ O	7,2 µl
Primer vorwärts 100µM	0,6 µl
Primer rückwärts 100µM	0,6 µl
cDNA	6 µl

Tabelle 5: Standardprogramm für die qRT-PCR:

	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
UDG Inkubation	50°C	2 min	1 x
initiales Denaturieren	95°C	2 min	1 x
Denaturieren	95°C	15 s	40x
Anlagerung	57°C	15 s	
Elongation	72°C	1 min	
Dissoziationsprotokoll	95°C	15 s	1 x
	60°C	20 s	
	95°C	15 s	

Im Rahmen dieser Messungen wurden die relativen Fluoreszenzeinheiten pro Zyklus der PCR und Reaktionsansatz ermittelt. Für die Quantifizierung wurde das Konzept des Threshold Cycle herangezogen. Der Schwellen-Zyklus stellt denjenigen Zyklus in der PCR dar, in dem die Fluoreszenz einer Probe erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt.

2.2.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden – Protein

2.2.6.1 Extraktion von Protein aus Zellen

Zur Gewinnung von Proteinen wurden Zellen eines Wells einer Platte zunächst mit 4°C kalter 1x PBS-Lösung gewaschen und dann mithilfe eines sterilen Zellschabers und 100 µl zuvor angesetzten Kernlysepuffers gründlich vom Untergrund abgeschabt. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem sterilen 1,5 ml-Gefäß gesammelt und 30 min auf Eis gelagert und durch Vortexen aufgelöst. Zum endgültigen Aufbrechen der Zellen wurden die Gefäße in drei Durchläufen für 10 min in flüssigen Stickstoff gelagert und anschließend für 15 min im Thermomixer auf maximal 30°C aufgewärmt. Die Proteine wurden mittels Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C von den Zellmembranresten separiert. Der Proteinüberstand wurde in sterilen Gefäßen gesammelt und bis zur Konzentrationsmessung bei -80°C gelagert.

2.2.6.2 Extraktion von Protein aus Herzgewebe

Das zuvor von der Maus entnommene Herz wurde in ein 15 ml-Röhrchen bei -80°C gelagert. Zur Proteingewinnung wurde das Herz auf Eis getaut und 1 ml Kernlysepuffer mit Verdauungsenzymen hinzu pipettiert. Anschließend wurde das Herz im Röhrchen, umgeben von Eiswasser, mit einem Ultra-Turrax[®]-Dispergiergerät so lange homogenisiert, bis eine Suspension entstand, welche anschließend bei 5300 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert wurde. Der proteinhaltige Überstand wurde in 1,5 ml-Gefäße überführt und bis zur Konzentrationsmessung bei -80°C gelagert.

2.2.6.3 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Methode nach Bradford. Dazu wurde zuerst eine Standardreihe mit BSA erstellt. Die BSA-Standards wurden in folgenden Konzentrationen angelegt: 0, 200, 400, 600 und 800 $\mu\text{g/ml}$. Es wurden jeweils 10 μl des Standards oder 10 μl einer 1:10 Verdünnung der zu messenden Probe mit 790 μl ddH₂O verdünnt und dann 200 μl Protein Assay-Reagenz zugefügt. 200 μl dieses Gemischs wurden im Triplikat auf eine 96-Well-Messplatte aufgetragen. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm in einem Spectrophotometer. Anhand der Konzentrationen der Standardreihe konnte nun die unbekannte Konzentration der Proben errechnet werden.

2.2.6.4 Co-Immunopräzipitation

Bei einer Immunopräzipitation wird ein bestimmtes Protein mittels eines Antikörpers aus einem Proteingemisch heraus präzipitiert. Eine Erweiterung dieser Technik ist die sogenannte Co-Immunopräzipitation, welche zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt wird. Hier bindet an das Protein noch zusätzlich ein Interaktionspartner. Mit dieser Methode können also Proteinkomplexe präzipitiert werden. Hierfür wurde zu jeder 1000 μg -Proteinprobe ein Antikörper des zu untersuchenden Proteinkomplexes über Nacht hinzugegeben und diese Probe auf dem Rotationsschüttler um 360° rotiert. Anschließend wurden pro Ansatz 50 μl magnetischer Protein G -Agarosekügelchen (Dynabeads[®] von LifeTechnologies[™]) dreimal mit ELB-Puffer (ohne Enzyme und ohne Nonidet P 40) gewaschen, zu den Proteinproben gegeben und 2 h rotiert. Mithilfe eines starken Magneten wurden nur die Agarosekügelchen inklusive Antikörper-Proteinkomplex am Boden des Gefäßes magnetisch angezogen und der restliche Proteinüberstand komplett verworfen.

Anschließend wurden die Agarosekügelchen dreimal mit ELB-Puffer gewaschen, mit vierfach konzentriertem Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Durch die Denaturierung konnte der Nachweis der co-immunopräzipitierten Proteine über einen Western Blot erfolgen.

2.2.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Durch die Verwendung von Natriumdodecyl-Sulfat (SDS) erfolgte die Auftrennung der Proteine vorwiegend nach Molekulargewicht, da SDS sich an Proteinen anlagert und ihnen dadurch eine einheitliche negative Ladung verleiht. Die verwendeten Polyacrylamid-Gele verfügten über ein Sammelgel, das der Konzentration der aufgetragenen Probe diente, und dem eigentlichen Trenngel. Für die Elektrophorese wurde das Mini-Protean-Tetra-Elektrophorese-System eingesetzt. Nach Reinigung zweier Glasplatten mit Wasser und 70% (v/v) Ethanol wurden diese in die dafür vorgesehenen Rahmen eingespannt. Das Trenngel wurde aus den angegebenen Lösungen gemischt und durch Zufügen von 16 µl TEMED und 150 µl 10% (w/v) APS wurde der Polymerisationsvorgang eingeleitet. Zwischen die Glasplatten wurden etwa 8 ml der Trenngel-Lösung gegossen. Nach Abschluss des Polymerisationsvorgangs (ca. 1 h) wurde ein Sammelgel mit einer Acrylamid-Konzentration von 4% auf das Trenngel bis zur oberen Kante der Glasplatten gegossen und ein Kamm zur Ausbildung von Probestaschen eingeschoben. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in eine Vertikal-Elektrophoresekammer eingesetzt und Laufpuffer in den Kathodentank eingefüllt. Die Proben wurden mit vierfach konzentriertem Laemmli-Puffer versetzt, für 5 min bei 95°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die verwendeten Farbmarker erforderten keine Denaturierung. Die Elektrophorese wurde bei 150 V ausgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande die untere Kante der Glasscheiben erreicht hatte.

2.2.6.6 Immunoblotting

2.2.6.6.1 Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran

Um Proteine aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine Amersham® Hybond P PVDF-Membran zu transferieren, wurde die Mini Trans-Blot Zelle, ein Tank-Transfer-System, benutzt. Das SDS-Polyacrylamid-Gel wurde nach der Elektrophorese aus dem Glasrahmen entnommen, das Sammelgel entfernt und in den Transferpuffer

überführt. Dort wurden folgende Bestandteile aufeinander geschichtet: ein Plastikschwämmchen, zwei Blätter Whatman-Papier, das Gel, eine PVDF-Membran, zwei Blätter Whatman-Papier und ein Plastikschwämmchen. Alle Schichten waren auf die Größe des Gels zugeschnitten. Das Whatman-Papier war zuvor für 5 min in Transferpuffer, die PVDF-Membran in Methanol eingelegt worden. In dieser Schichtung wurde eine Kassette in das Tank-Transfer-System eingespannt. Der Tank wurde mit Transferpuffer aufgefüllt. Der elektrophoretische Transfer wurde unter Eiskühlung für 90 min bei 100 V durchgeführt. Danach wurde die Kassette dem Tank entnommen und die PVDF-Membran sofort in eine TBS-Block-Lösung mit 2,5% (w/v) BSA überführt.

2.2.6.6.2 Immunchemischer Nachweis mit spezifischen Antikörpern

Die Membran wurde für 1 bis 3 h in TBS-Block-Lösung mit 5% (w/v) Milchpulver bei 4°C abgeblockt. Anschließend wurde die Blocklösung gegen TBS-Block-Lösung mit 5% (w/v) BSA ausgetauscht, die einen Primär-Antikörper enthielt. Nach mindestens einstündiger Inkubation wurde die Membran dreimal mit TBS-Lösung mit 2,5% BSA und 0,3% (v/v) Tween gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 1 h mit einem Sekundär-Antikörper, der in 5% (w/v) Milchpulver gelöst wurde. Als sekundäre Antikörper wurden Antikörper genutzt, die jeweils speziesspezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet und an eine Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) konjugiert waren. Die Membran wurde erneut dreimal in TBS-Lösung mit 2,5% BSA und 0,3% (v/v) Tween für jeweils 10 min gewaschen.

2.2.6.6.3 ECL-Detektionssystem

Das Enhanced-Chemiluminescence (ECL) System ist eine nicht-radioaktive Methode zur Detektion von immobilisierten Antigenen, die direkt oder indirekt mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Antikörper markiert wurden. Die Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) oxidiert ein geeignetes organisches Substrat, das Diacylhydrazid Luminol, unter Umsetzung von H_2O_2 zu H_2O . Das Oxidationsprodukt befindet sich in einem angeregten Zustand aus dem es unter Lichtemission wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Für die Detektion wurden die ECL-Detektions-Lösungen 1 und 2 zu gleichen Teilen gemischt (0,125 ml/cm² Membranfläche). Die Membran wurde aus der Waschlösung entnommen und auf einer Frischhaltefolie

liegend für exakt 1 min mit der Detektionslösung inkubiert. Die Detektionslösung wurde danach abgegossen und die Membran mittig auf eine schwarze Platte in der Kammer des FluorChem Q-Gerätes gelegt. Mithilfe der Kamera und der AlphaView Q Software konnten die jeweiligen Lichtemissionen auf Höhe der zu untersuchenden Proteinbanden detektiert und mittels Densitometrie quantifiziert werden.

2.2.6.7 Detektion phosphorylierter Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel

Zur direkten Detektion phosphorylierter Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel wurde das Pro-Q Diamond[®] Gel Stain-Kit von Invitrogen[®] gemäß Protokoll des Herstellers angewandt. Zuvor wurden äquivalent zu Protokoll 2.2.6.5 ein Trenn- und Sammelgel für die Elektrophorese erstellt und Proteinproben mit vierfachem Laemmli-Puffer für 5 min bei 95°C denaturiert, aufs Gel aufgetragen und bei 100 Volt nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Alle weiteren Schritte des Kits erfolgten unter Lichtausschluss. Das Gel wurde anschließend für 36 h in Aqua Dest bei 4°C gelagert. Die Detektion erfolgte mithilfe der FluorChem Q-Kamera und im CY5-Filter. Mithilfe der AlphaView Q Software konnten die jeweiligen Lichtemissionen auf Höhe der zu untersuchenden Proteinbanden detektiert und mittels Densitometrie quantifiziert werden.

2.2.7 Molekularbiologische Arbeitsmethoden – Adenovirus

2.2.7.1 Generierung eines Adenovirus

Das Zielgen wurde bereits mithilfe des Gateway[®]-Systems in den Donorvektor (pDONR221) gebracht, um anschließend in den adenoviralen pAd/CMV/V5-Expressionsvektor integriert zu werden (Protokoll 2.2.4.7). Mithilfe des Maxi-Präp-Kits von Qiagen[®] wurden zunächst große Mengen des Expressionsvektors aus DH10B-E.coli-Bakterien extrahiert und anschließend 10 µg des Vektors durch das Restriktionsenzym Pac I über Nacht bei 37°C verdaut. Der Ansatz wurde für 10 min auf 65°C erhitzt, um Pac I zu inaktivieren. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des linearisierten Expressionsvektors mit Isopropanol und Ethanol sowie die Konzentrationsmessung mit Nano Drop[®]. Es wurden 2 µg des aufgereinigten Klons in 250 µl DMEM-Medium (ohne Antibiotikum) zu 10 µl Lipofectamine 2000 in 250 µl DMEM-Medium (ohne Antibiotikum) langsam pipettiert und 20 min inkubiert. Für die

Transfektion wurden 500 µl dieser Expressionsvektor-Lipofectamine-Emulsion auf eine 6-Well-Platte mit HEK-Zellen getropft. Mithilfe von 293-HEK-A-Zellen konnte sich das Adenovirus in ausreichender Menge vermehren, denn diese Zelllinie enthält gezielte regulatorische Gensequenzen, die den deletierten Adenoviren zum Replizieren fehlen. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 37°C. Transfizierte HEK-Zellen wurden mittels 500 µl 0,25% (w/v) Trypsin-EDTA-PBS-Lösung vom Boden gelöst und in eine sterile T-75-Flasche mit 12 ml DMEM-Medium überführt. Nach 14-20 Tagen waren die Zellen zu fast 100% infiziert und lösten sich teilweise vom Boden ab. Durch mechanisches Abklopfen wurden infizierte HEK-Zellen inklusive Medium nach 14 bis 20 Tagen geerntet und in einem 15ml-Gefäß für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Lysat-Überstand enthielt viel Virus und wurde inklusive des gewonnen Virus-Überstands nochmals in größere mit HEK-Zellen ausgesäte T-175-Flaschen gegeben, um einen höheren Titer zu erreichen. Nach ungefähr 2-3 Tagen waren fast 100% der HEK-Zellen infiziert und konnten durch mechanisches Ablösen aus den T175-Flaschen geerntet und in ein neues steriles Gefäß überführt werden. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1,5 ml PBS resuspendiert. Durch dreimaliges Gefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 30°C wurden die HEK-Zellen lysiert und anschließend das Virus von den zellulären Bestandteilen durch Zentrifugation für 10 min bei 12000 rpm und 4°C getrennt. Der hochkonzentrierte Virus-Überstand wurde aliquotiert und bis zur Titerbestimmung bei -80°C gelagert.

2.2.7.2 Titerung eines Adenovirus

Zur Bestimmung der Infektiosität des erstellten Adenovirus und für die Vergleichbarkeit einzelner Adenoviren in einem Experiment wurde der Titer mithilfe einer 293-HEK-A-24-well-Platte errechnet. Pro Virus-Konstrukt wurden 12 wells à 300 000 HEK-Zellen benötigt, wobei das erste well für die Negativkontrolle und alle weiteren Wells für die Verdünnungsreihe des Virus-Konstrukts in DMEM-Vollmedium (10^{-2} bis 10^{-7}) in doppelter Ausführung vorgesehen war. Jedes well erhielt 50 µl einer Verdünnungsstufe tropfenweise zu den 500 µl DMEM-Vollmedium. Nach 48 h bei 37°C Inkubation wurde mittels Lichtmikroskop diejenige Verdünnungsstufe beurteilt, bei der noch genügend adhärenente HEK-Zellen vorhanden waren, um infizierte auszuzählen (üblicherweise zwischen 10^{-4} und 10^{-6}). Dann wurde das Medium

abgenommen, die Zellen für 5 min getrocknet und vorsichtig mit eiskaltem Methanol im 24-Well bei -20°C für 10 min fixiert. Das Methanol wurde abgenommen, ein FITC-gekoppelter Anti-Hexon-Antikörper 1:50 in 1% BSA in PBS verdünnt und je 100 μl auf die zuvor ausgewählten Wells pipettiert. Nach einer Stunde wurde der Anti-Hexon-Antikörper abgesaugt und die zu titernden wells dreimal mit 1% BSA in PBS gewaschen sowie mit PBS übergeschichtet. Unter einem Fluoreszenzmikroskop wurden infizierte (grün leuchtende) Zellen aus 10 Gesichtsfeldern eines wells bei einem 20x Objektiv gezählt, addiert und das arithmetische Mittel gebildet. Der Mittelwert (infizierte Zellen/well) wurde mit dem Faktor 313 (Felder/well) multipliziert und durch das Produkt aus Verdünnungsfaktor, bei dem ausgezählt wurde, sowie Virusvolumen (0,05ml) dividiert. Das Ergebnis gab die sogenannten „infectious units“ pro ml (ifu/ml) an, also die Anzahl der infektiösen Viruspartikel.

2.2.8 Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay

Lebende Zellen können gelbes wasserlösliches Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium (MTT) in blau-violettes wasserunlösliches Formazan umwandeln. Dieses metabolische Produkt wird anschließend mittels Dimethylsulfoxid löslich gemacht. Für das MTT-Assay wurde MTT-Lösung sowie Löslichkeitsreagenz bei Raumtemperatur aufgetaut und die MTT-Lösung 1:10 mit serumfreien Kardiomyozytenmedium verdünnt. Anschließend wurde das alte Medium auf den Kardiomyozyten verworfen und auf jedes Well einer 24-Well-Multiplatte sowie in ein steriles 1,5 ml-Gefäß als Negativkontrolle 300 μl der 1:10 verdünnten MTT-Lösung (enthält 5 mg/ml MTT) gegeben und für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach 4 h wurden 300 μl der Dimethylsulfoxid-Lösung zu jedem Well sowie zur Negativkontrolle hinzu gegeben und für 5 min auf einem Plattenschüttler bei 700 rpm geschüttelt. Anschließend wurde aus jedem der 24 Wells 100 μl -Tripletts des Zellüberstandes in eine sterile 96-well-Platte pipettiert und die Absorption mithilfe eines Spektrophotometers bei 570 nm gemessen.

2.2.9 Durchflusszytometrie

2.2.9.1 Bestimmung der Zelltodrate

Die zuvor behandelten Kardiomyozytenzellen wurden von altem Medium befreit und mit eiskaltem Kalzium- und Magnesium-freiem PBS inklusive 5 mM EDTA, pH 7,2 gewaschen. Adhärenz Zellen wurden mithilfe von Accutase[®] vom Untergrund abgelöst und anschließend für 5 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit eiskaltem EDTA-haltigem PBS gewaschen und für die Durchflusszytometrie vorbereitet. Die Messung der Zelltodrate erfolgte mithilfe von Propidiumiodid, welches in nekrotischen Zellen durch Verlust der Zellmembranintegrität angereichert wird. Eine Minute vor der Messung wurden die Zellen mit 2 µg/mL Propidiumiodidlösung versetzt und pro 10000 Zellen die Fluoreszenz mittels Durchflusszytometer FACSCalibur™ flow cytometer gemessen und mit der Software CellQuest™ Pro ausgewertet.

2.2.9.2 Bestimmung der Reaktiven Sauerstoffspezies

Zur Messung des Redoxsystems von zuvor behandelten Kardiomyozytenzellen wurden die Zellen analog zu Protokoll 2.2.9.1 mit eiskaltem Kalzium- und Magnesium-freiem PBS inklusive 5 mM EDTA, pH 7,2 gewaschen. Adhärenz Zellen wurden mithilfe von Accutase[®] vom Untergrund abgelöst und anschließend für 5 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Jede Zellprobe eines Wells wurde für 30 min bei 37°C unter Lichtabschluss mit einer 10 µM CM-H₂DCFDA-ROS-Detektions-Reagenz in 5 mM EDTA-haltigem PBS inkubiert. CM-H₂DCFDA ist ein nicht-fluoreszierender, für Oxidation anfälliger und somit sinnvoller Indikator von oxidativem Stress in Zellen. Mittels Durchflusszytometrie wurde eine grüne Fluoreszenz in denjenigen Kardiomyozyten gemessen, welche CM-H₂DCFDA durch vermehrte reaktive Sauerstoffspezies in ein fluoreszierendes Molekül umwandelten.

2.2.9.3 Messung von Leukozyten und T-Lymphozyten im peripheren Blut

In Kooperation mit Prof Dr. Ulrich Flögel (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurde mittels automatisierter Zellgemisch-Sortierung (MACS: Magnetic Activated Cell Sorting) Granulozyten und T-Lymphozyten aus dem Vollblut von Versuchsmäusen erkannt und sortiert. Die Zell-spezifischen Oberflächenstrukturen CD45, CD11b, Ly6g und CD3 wurden mittels Antikörper der Firma Miltenyi Biotec[®] markiert und im Durchflusszytometer (FACSCanto II Flow Cytometer, BD Biosciences™) quantifiziert.

2.2.10 Immunzytochemie

Zur Immunzytochemie wuchsen Kardiomyozyten auf sterilen Deckgläsern, verteilt in einer 12-Well-Multiplatte an, die 24 h zuvor mit Kollagen I beschichtet wurden. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 300000 Zellen pro Deckglas ausgesät. Die Kardiomyozyten wurden nach 48h mit 4% Paraformaldehyd in PBS pH 7,4 für 5 min fixiert. Nach Waschen mit PBS wurden die fixierten Zellen mit einer Blocklösung bestehend aus 2,5% BSA und 0,1% Triton X-100 in PBS für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Alle folgenden Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Ein gegen das nachzuweisende Protein gerichteter Erstantikörper wurde in 2,5% BSA in PBS verdünnt und auf die Zellen aufgebracht. Nach einstündiger Inkubation wurde die Antikörperlösung abgenommen und ein zweiter Antikörper, verdünnt in 2,5% BSA, der gegen das F_c-Fragment des ersten gerichtet war, aufgebracht. An diesen zweiten Antikörper war ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal mit PBS und zweimal mit ddH₂O gewaschen. Die Deckgläser wurden mit Klebstoff (engl. mounting medium), welches DAPI zur Färbung von Zellkernen enthielt, auf einem Objektträgerglas eingedeckt und über Nacht bei 4°C getrocknet.

2.2.11 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Die Morphologie von Mitochondrien in neugeborenen Ratten-Kardiomyozyten wurde mittels Elektronenmikroskopie untersucht (mit freundlicher Unterstützung von Frau Prof. Dr. Lüllmann-Rauch, Anatomisches Institut, Kiel). Hierfür wurden Kardiomyozyten als einfache Zellschicht in 35x10mm großen und 24 h zuvor mit Kollagen I beschichteten Petrischalen ausgesät und für 24 h anwachsen gelassen. Die Kardiomyozyten-Kontrollgruppe wurde 48 h mit LacZ-Adenovirus und die zu untersuchende Gruppe für 48 h mit RIP3-Adenovirus infiziert. Die Zellen wurden mit 3% Glutaraldehyd fixiert und als Kontrastmittel zum Anfärben der Zellorganellen wurde das elektronendichte Schwermetall Osmiumtetroxid (OsO₄) für 2 h auf die Zellen gegeben. Die Zellschicht wurde im Epoxidharz Araldit[®] eingebettet und durch Polymerisation ausgehärtet. Anschließend wurden Ultradünnschnitte von 40-80 nm Dicke mithilfe eines Diamantmessers erstellt und durch Immersion mit Uranylacetat

und Bleiacetat nachkontrastiert. Abbildungen wurden mit dem Zeiss EM 900 Mikroskop mit 7000-facher Vergrößerung erstellt.

2.2.12 Tierversuche

2.2.12.1 Haltung der Tiere

Untergebracht waren alle Tiere in der Tierhaltung am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu einem standardisiertem Trockenfutter und zu Trinkwasser. Der Hell-Dunkel-Rhythmus betrug jeweils 12 Stunden. Die Raumtemperatur wurde konstant bei $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ gehalten.

2.2.12.1 Myokardinfarkt mittels Ligatur der vorderen Koronararterie

Alle untersuchten Mäuse waren männliche C57/BL6N-Mäuse mit einem Körpergewicht von 20g bis 25g und einem Alter von 70 bis 75 Tagen zum Zeitpunkt der Operation. Es wurden vier Versuchsgruppen mit je 12 Tieren gebildet. Diese bestanden aus zum einen Wildtyp-Mäusen mit LAD-Ligatur oder Scheinoperation sowie zum anderen konstitutiven RIP3-Knockout-Mäusen (mit freundlicher Genehmigung von Genentech Inc.™) mit LAD-Ligatur oder Scheinoperation. Alle Operationen unserer Versuchstiere wurden durch Dr. med. Matthias Lutz (Medizinische Klinik III, UKSH Kiel, Labor Molekulare Kardiologie) durchgeführt. Die Mäuse wurden anästhesiert, intubiert und an ein Beatmungsgerät angeschlossen. Die Narkose wurde mit 2% Isofluran bei einer Atemfrequenz von 150 pro min sowie einem Tidalvolumen von 250 bis 300 μl aufrecht erhalten und die beiden Vorderpfoten und linke Hinterpfote an ein EKG-Gerät angeschlossen, um ST-Streckenhebungen während des operativ herbeigeführten Myokardinfarkts abzubilden. Die Maus wurde in Rückenlage auf einer beheizbaren Operationsfläche gelagert und die Körpertemperatur bei 37°C konstant gehalten. Es erfolgte eine Thorakotomie links des Sternums mittels Durchtrennung zweier Rippen sowie vorsichtige Präparation des Perikards. Die Anatomie der Koronararterien wurde visualisiert und daraufhin am schlagenden Herzen 1 - 3 mm kaudal des linken Vorhofohrs mithilfe einer 8-0 Polypropylen-Naht der vordere Ast der linken Koronararterie (LAD) mit einer feinen Nadel unterkreuzt und mittels Knoten

verschlossen. Der verschwindende Blutfluss im Epikard sowie signifikante ST-Strecken-Hebungen im EKG verdeutlichten die erfolgreiche Platzierung der Ligatur. Der Brustkorb wurde daraufhin mit einer 6-0 Polypropylnaht in der Muskelschicht und in der darüberliegenden Hautschicht zugenäht. Scheinoperierten Mäusen wurde die gleiche Operation zugeführt, allerdings ohne LAD-Ligatur. Postoperative Analgesie wurde mittels subkutaner Injektion von 0,1 mg/kg Temgesic erreicht. In einer ersten Versuchsreihe wurden die Tiere 3 oder 4 Tage später zur Organentnahme getötet, bei einer anderen Versuchsreihe erst 30 Tage nach der Operation. Alle Tierversuche erfolgten in Übereinstimmung mit den ethischen Richtlinien des Tierschutzkomitees Schleswig-Holstein.

2.2.12.2 Magnetresonanztomographie

Die Bestimmung der Infarktgröße, der Herzmuskel-Kontraktilität und Auswurfleistung fand in Herzen von Wildtyp- und RIP3-Knockout-Mäusen vor der Operation sowie 24 h und 30 Tage nach LAD-Ligatur mittels Echtzeit-MRT statt. Daten wurden in Kooperation mit Prof. Dr. rer. nat. U. Flögel (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) mithilfe des Kleintier-MRT-Gerätes Bruker DRX 9.4 Tesla Wide Bore (89mm) NMR Spektrometer (Frequenzen bei 400.13 MHz für 1 h) gesammelt und mithilfe der ParaVision 4-Software von Bruker analysiert. Während der Messungen wurden die Mäuse mit 1,5% Isofluran in einer Gasmixtur bestehend aus 20% Sauerstoff in Stickstoff bei einer Rate von 75 ml/min und Atemfrequenz von 100/min anästhesiert und beatmet. Die Vorderpfoten und linke Hinterpfote wurden mit einem EKG-Gerät verbunden und die Körpertemperatur konstant bei 37°C gehalten. Das paramagnetische Kontrastmittel (KM) Gadolinium reichert sich mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung, unter anderem aufgrund der reduzierten Kapillardichte im Infarktareal, im infarzierten Myokard an (Schaefer, Malloy et al. 1988). Die Abbildung der gesamten Herzbewegung auf Höhe der Ventrikel und die Berechnung der Ejektionsfraktion wurde mittels kurzer Herzachse im MRT erreicht.

2.2.12.3 Messung des Troponin T im Serum

Für die Messung des Troponin T im Serum operierter Tiere wurde 3 Tage nach LAD-Ligatur die Organentnahme durchgeführt und gleichzeitig Blut aus der Vena cava inferior abgenommen. Das Serum wurde bis zur Messung bei -80°C gelagert und der

Troponin T-Spiegel mit freundlicher Genehmigung des Zentrallabors der Universitätsklinik Düsseldorf mit klinischen Routinegeräten untersucht.

2.2.12.4 Messung freier Radikale im Herzgewebe

Die Messung der totalen freien Radikale im Herzgewebe von Wildtyp- und RIP3^{-/-}-Mäusen 24h nach operativem Herzinfarkt wurde mithilfe des OxySelect™ *in vitro* ROS/RNS Assay Kit von Cell Biolabs™ gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.12.5 Immunhistochemie

Nachdem operierte oder scheinoperierte Mäuse zur Organentnahme getötet wurden, erfolgte die Lagerung der Herzen in 4% PFA in PBS. Aus den Herzen wurden 2 µm dicke in PFA fixierte und in Paraffin eingebettete Schnitte mithilfe des automatisierten Immunhistochemie-Gerätes Leica BOND-MAX™ erstellt, vorbehandelt, gewaschen und mit einem Erstantikörper (entweder gegen Cleaved Caspase 3, CD3 oder Cd31) bedeckt. Anschließend wurde ein Spezies-spezifischer Zweitantikörper auf die Schnitte gegeben, welcher an einer Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Mithilfe des Olympus BX53 Mikroskops und der Olympus DP72-Kamera wurden Gewebeschnitte vorwiegend aus dem Infarktgebiet der Herzen fotografiert und ausgewertet.

2.2.13 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert sowie dazugehörige Standardabweichungen und Standardfehler angegeben. Um die Ergebnisse aller Experimente auf signifikante Unterschiede zu überprüfen, wurde die ein- oder zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt vom zweiseitigen gepaarten Student'schen t-Test, herangezogen. Zur Errechnung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Student'schen t-Tests wurde die Software Microsoft Office Excel 2007 und Graph Pad Prism verwendet. Ein P-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant erachtet.

* = $P < 0,05$

† = $P < 0,01$

3 Ergebnisse

Die Bedeutsamkeit der programmierten Nekrose und seines Aktivators RIP3 konnte bereits in einigen Organen wie der Leber (Cho, Challa et al. 2009) oder auch chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Welz, Wullaert et al. 2011) sowie im Pankreas (He, Wang et al. 2009) belegt werden. Erklärtes Ziel dieser Arbeit war die Klärung der Frage, welche Rolle RIP3 und das Zusammenspiel der Moleküle RIP3 und RIP1 in Kardiomyozyten und im ischämischen Myokard spielen.

In den Organen der Maus wird RIP3 unter Ruhebedingungen auf Proteinebene unterschiedlich stark exprimiert. Im Herzen wird RIP3 signifikant höher als im Gehirn und den Nieren exprimiert, allerdings weniger als in Milz, Lunge und Leber (**Abb. 5**). Für *in vivo* Versuche mit Mäusen stand uns neben C57/BL6N-Wildtyp-Mäusen auch eine konstitutive C57/BL6N-RIP3^{-/-}-Knockout-Mauslinie zur Verfügung (mit freundlicher Genehmigung von Prof. V.M. Dixit, Genentech Inc.). Im vorliegenden Immunoblot wurde die erfolgreiche Deletion von RIP3 im Herzen konstitutiver RIP3^{-/-}-Mäuse überprüft. Es wird angenommen, dass die Expression von RIP3 mit der funktionellen Relevanz der programmierten Nekrose korreliert (He, Wang et al. 2009), wir fokussierten uns daher auf die Untersuchung der programmierten Nekrose im Herzen und speziell im ischämischen Myokard.

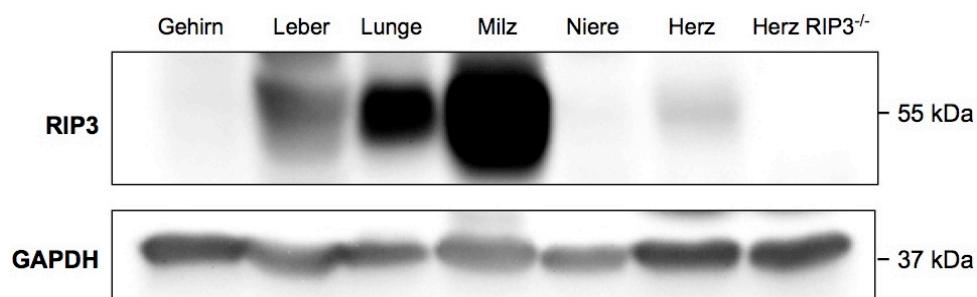


Abbildung 5: Expression von RIP3 in Organen der Maus. Immunoblot mit Proteinen aus verschiedenen Mausorganen. Anti-RIP3-Antikörper von Enzo Life Sciences® (Kaninchen, 1:500); Anti-GAPDH-Antikörper von Sigma-Aldrich® (Maus, 1:10 000); 30µg Protein pro Tasche.

3.1 Expression von RIP3 in Kardiomyozyten

Die endogene Expression von RIP3 wurde zunächst *in vitro* in neonatalen ventrikulären Ratten-Kardiomyozyten (NRVCM) bestätigt (**Abb. 6**). Die adenoviral herbeigeführte RIP3-Überexpression (AdV RIP3) zeigte im Immunoblot eine

Verschiebung des Molekulargewichts von ursprünglich 55 kDa auf 100 kDa. Eine mögliche Erklärung ist die Aktivierung von RIP3 im Sinne einer Nekrosom-Formierung mit RIP1 in NRVCN (Wang, Jiang et al. 2012). Als Negativkontrolle wurden RIP3-spezifische miRNA (miRIP3_1 und miRIP3_2) hergestellt, welche die endogene RIP3-Expression inhibierten. Zur Bestätigung der spezifischen RIP3-Bande bei 100 kDa wurde auch die RIP3-Überexpression durch miRIP3_1 und miRIP3_2 runterreguliert. Für dieses und alle weiteren Experimente mit adenoviraler RIP3-Überexpression wurden neonatale Ratten-Kardiomyozyten für 48 h mit 10 ifu AdV RIP3 und als Negativkontrolle mit 10 ifu AdV LacZ beziehungsweise AdV RIP3 K51A (Kinase-inaktive Mutante) infiziert. Zur RIP3-Inhibierung wurden NRVCN mit den beiden miRNA-Konstrukten miRIP3_1 und miRIP3_2 für 72 h mit 60 ifu infiziert.

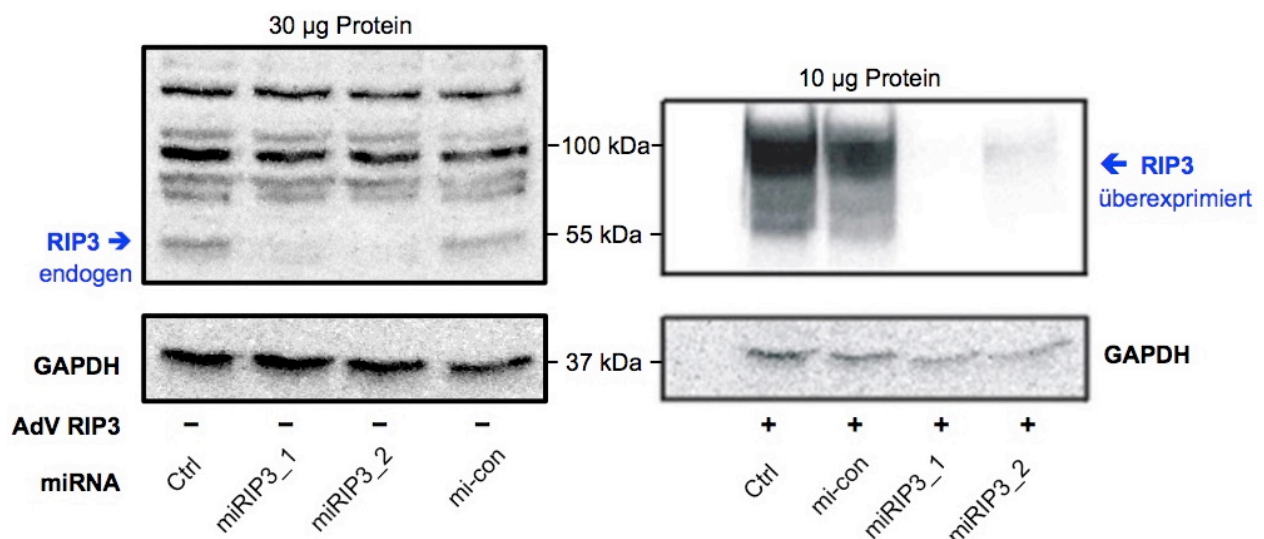


Abbildung 6: Endogene RIP3-Expression sowie adenovirale Überexpression und Inhibierung von RIP3 in NRVCN. Links: Immunoblot mit 30µg Protein zum Nachweis von endogenem RIP3 sowie miRNA-basierte RIP3-Inhibierung. Rechts: Immunoblot mit 10µg Protein zum Nachweis von überexprimiertem RIP3 und Verschiebung des Molekulargewichts von 55 kDa auf 100 kDa; miRNA-basierte RIP3-Inhibierung als Bestätigung der spezifischen RIP3-Bande. Anti-RIP3-Antikörper von Enzo Life Sciences (Kaninchen, 1:500); Anti-GAPDH-Antikörper von Santa Cruz Biotechnology (Ziege, 1:500).

Als Positivkontrolle wurden L929-Maus-Fibroblastenzellen stimuliert. L929-Fibroblasten sind nach gleichzeitiger Stimulation mit TNF- α sowie dem Pan-Caspasen-Inhibitor zVAD besonders anfällig für programmierte Nekrose (He, Wang et al. 2009) (Wang, Jiang et al. 2012). Ein Shift des RIP3-Molekulargewichts von 55 kDa auf 100 kDa (**Abb. 7**) wurde auch in L929-Zellen als ein Hinweis für die Aktivierung des Nekrosom-Komplexes beobachtet.

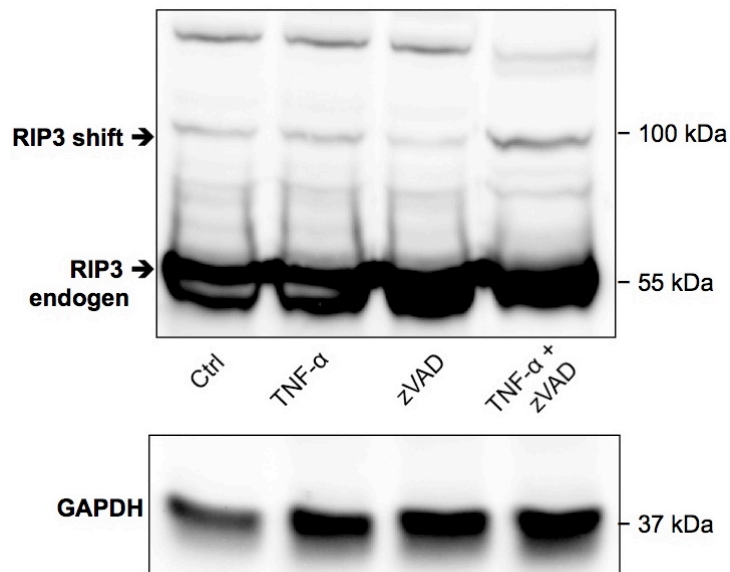


Abbildung 7: Expression von RIP3 in L929-Zellen. Immunoblot aus Protein von L929-Fibroblastenzellen nach dreistündiger Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) und zVAD (50 μ M). Anti-RIP3-Antikörper von Enzo Life Sciences (Kaninchen, 1:500); Anti-GAPDH-Antikörper von Sigma-Aldrich (Maus, 1:5000), 20 μ g Protein pro Tasche.

3.2 Auswirkung der RIP3-Überexpression auf RIP1

3.2.1 RIP1 als Bindungspartner von RIP3 in NRVC

Es ist bekannt, dass RIP3 für die Aktivierung der programmierten Nekrose Receptor Interacting Protein 1 (RIP1) phosphoryliert (Declercq, Vanden Berghe et al. 2009) (Cho, Challa et al. 2009). Zunächst sollte dieser Bindungspartner von RIP3 in NRVC mittels Durchführung einer Co-Immunopräzipitation verifiziert werden (**Abb. 8**). Hierzu wurden NRVC für 48 h mit 10 ifu AdV RIP3 infiziert sowie 2 h vor TNF α -Stimulation mit dem Pan-Caspasen-Inhibitor zVAD (50 μ M) stimuliert, um eine Inaktivierung von RIP1 durch Caspase 8 zu verhindern. O'Donnell *et al.* haben gezeigt, dass die Bindung von Caspase 8 an RIP1 zur Induktion von Apoptose führt (O'Donnell, Legarda-Addison et al. 2007). Anschließend wurden die Zellen unterschiedlich lange mit rekombinantem rattenspezifischem TNF α (100 ng/ml) stimuliert. AdV GFP (Green Fluorescent Protein) diente als Kontrollvirus. Mithilfe der Co-Immunopräzipitation wurde ein gegen RIP1 gerichteter Antikörper an magnetische Agarosekügelchen (Dynabeads[®]) gebunden und so der am Antikörper gebundene RIP1-RIP3-Komplex von restlichen Proteinen getrennt und mittels Immunoblot nachgewiesen. Nach 60-minütiger TNF α -Stimulation war auf

Proteinebene ein Maximum an RIP1-RIP3-Komplexbildung erkennbar, welches nach 4 h kaum noch detektierbar war (**Abb. 8**).

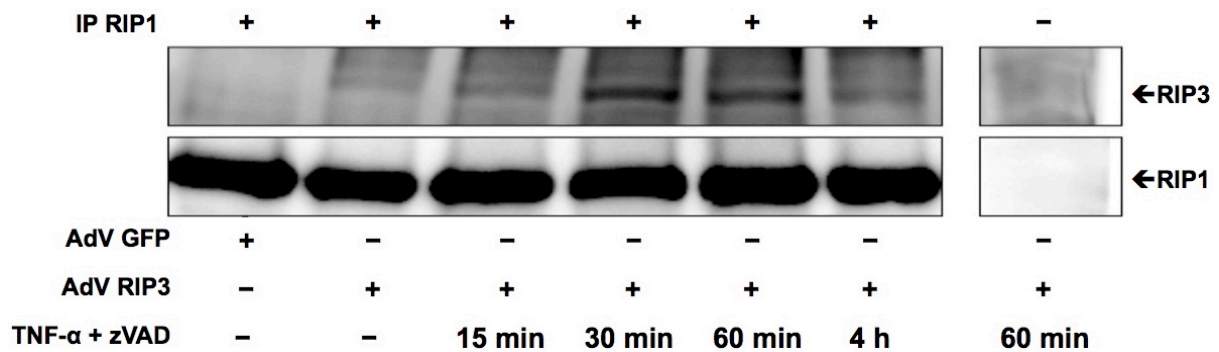
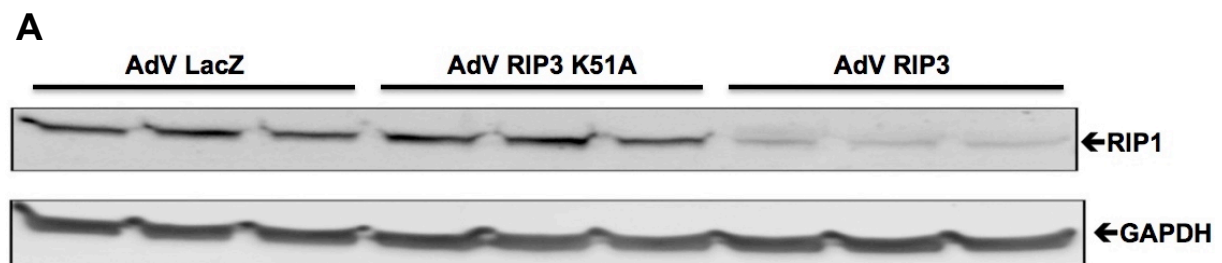


Abbildung 8: Co-Immunopräzipitation. Nachweis einer kovalenten RIP1-RIP3-Bindung nach RIP3-Überexpression in NRVCM. RIP1-Antikörper (Maus, BD Biosciences, 15 μ l je Probe) wurde zu Proteinen aus NRVCM für eine Immunpräzipitation (IP RIP1) gegeben. Nach RIP1-Antikörperbindung an magnetische IgG-Agarosekügelchen und Extraktion derselbigen, wurde mittels Immunoblot RIP3 mit einem Maximum nach 30 - 60 min detektiert. Anti-RIP3-Antikörper von Enzo Life Sciences (Kaninchen, 1:500); Anti-RIPK1-Antikörper von BD Biosciences (Maus). 1000 μ g Protein pro Tasche.

3.2.2 Abnahme der RIP1-Detektion nach RIP3-Überexpression

Als weiterer Anhaltspunkt für gesteigerte RIP1-RIP3-Komplexbildung nach adenoviraler RIP3-Überexpression diente die signifikante Abnahme von detektierbarem RIP1 auf Proteinebene in NRVCM im Vergleich zu Kontrollvirus LacZ (-87,6% \pm 2,7%, $P < 0,001$, $n = 3$, **Abb. 9 A/B**) und darüber hinaus im Vergleich zu adenoviraler Überexpression einer künstlich mutierten und RIP3-Kinase-inaktiven Mutante (AdV RIP3 K51A).



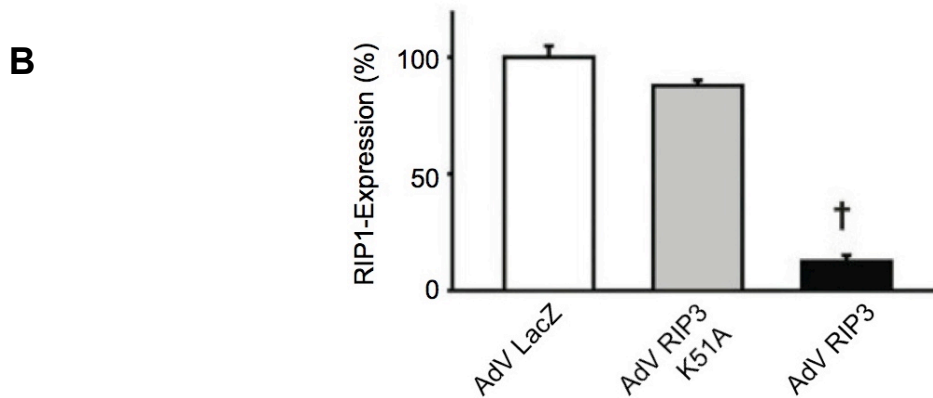


Abbildung 9 A und B: Abnahme des detektierbaren RIP1 nach RIP3-Überexpression in NRVCM. Immunoblot mit Proteinen aus NRVCM verdeutlicht eine signifikante Runterregulierung ($P < 0,001$) der RIP1-Detektion nach RIP3-Überexpression. Anti-RIPK1-Antikörper von BD Biosciences (Maus, 1:500); Anti-GAPDH-Antikörper von Sigma-Aldrich (1:10 000); 50µg Protein pro Tasche.

Der Nachweis phosphorylierter Proteinresiduen in NRVCM mithilfe des Pro Q Diamond® *Phosphostaining* von Invitrogen® diente als Bestätigung für eine erfolgreiche adenovirale Überexpression des RIP3-Gens sowie eine vermehrte Aktivität von RIP3 im Vergleich zur RIP3-Kinase-inaktiven Mutante (**Abb. 10**).

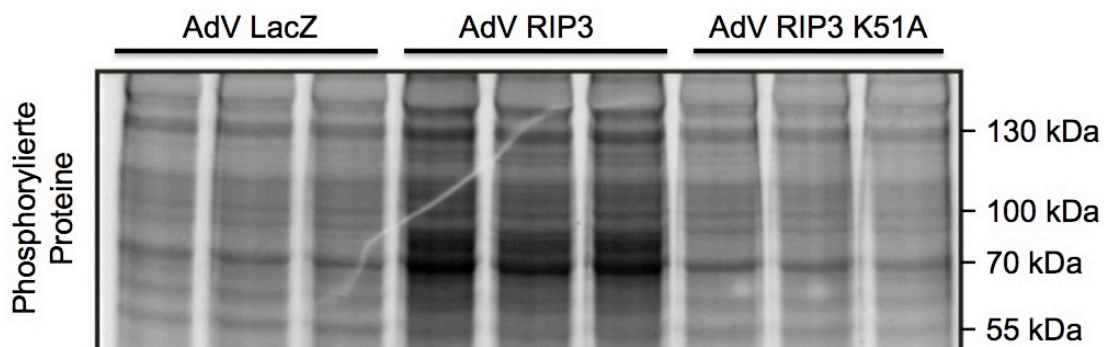


Abbildung 10: Nachweis phosphorylierter Proteine in NRVCM. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und direkte Anfärbung phosphorylierter Proteinresiduen mittels 25 ml Pro Q Diamond® Phosphoprotein Gel Stain-Lösung (Invitrogen®) für 60 min auf dem Gel. Anschließende Entfärbung und Lagerung in ddH₂O für 36 h. 60µg Protein pro Tasche. (Artefakt in der Aufnahme durch eingerissenes Gel).

3.2.3 Zunahme von Polyubiquitin-Verbindungen

Mit dem folgenden Immunoblot wurde untersucht, ob RIP3 selbst ubiquitiniert wird und sich hierdurch eine Verschiebung im Molekulargewicht von 55 kDa auf etwa 100 kDa ergibt. Tatsächlich wurden auf Höhe von aktiviertem RIP3 (**Abb. 11**) vermehrt Lysin-63-Polyubiquitin-Ketten mithilfe des Antikörpers Anti-Ub-K63 detektiert. Es

muss allerdings relativiert werden, dass möglicherweise nicht RIP3 selbst, sondern ein anderes Molekül auf der Höhe von RIP3 ubiquitiniert wurde. Kinase-inaktives AdV RIP3 K51A diene als Negativkontrolle.

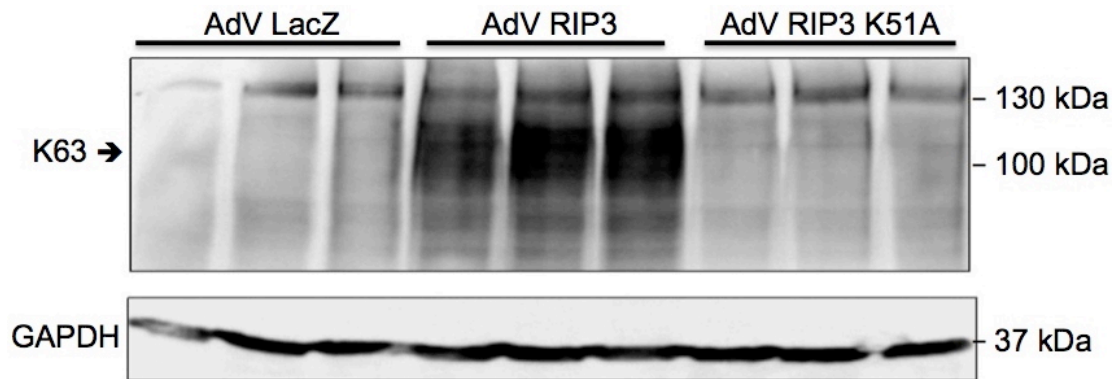


Abbildung 11: Mögliche Ubiquitinierung von RIP3 in NRVCM. Immunoblot mit Proteinen aus NRVCM. Anti-Ub-K63-Antikörper von Millipore (Kaninchen, 1:1000); Anti-GAPDH-Antikörper von Sigma-Aldrich (1:10 000); 65 µg Protein pro Tasche.

3.3 Auswirkung der RIP3-Überexpression auf die Zellviabilität

Nachdem wir RIP3 im Herzen und in NRVCM nachwiesen und als Bindungspartner von RIP1 *in vitro* bestätigten, wurde der Fokus auf die möglichen Effekte einer RIP3-Überexpression auf Nekrose, Apoptose oder Entzündung in Ratten-Kardiomyozyten untersucht.

3.3.1 Auswirkung auf Troponin T im Medium durch RIP3-Überexpression

Zur Untersuchung des Einflusses eines Adenovirus auf NRVCM wurde in einem ersten Experiment die Ausschüttung von herzspezifischem Troponin T ins Zellmedium nach Infektion mit 10 ifu AdV LacZ sowie 10 ifu AdV RIP3 mithilfe klinischer Routinelaborgeräte gemessen. RIP3-Überexpression führte zu einer signifikant höheren Ausschüttung von Troponin T ins Zellmedium ($P < 0,01$, $n = 4$, **Abb. 12**) verglichen mit Kontrollvirus LacZ.

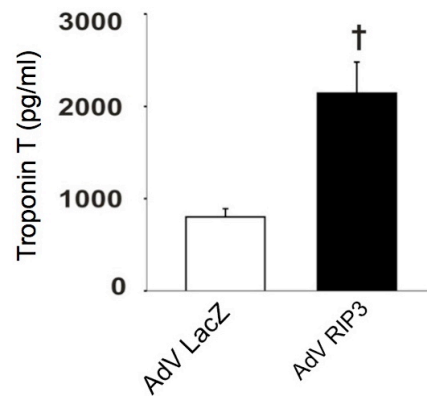


Abbildung 12: Troponin T-Konzentration im NRVC-Medium. Nach 48-stündiger RIP3-Überexpression wurde das auf den Kardiomyozyten befindliche Vollmedium vorsichtig abgenommen und darin das Troponin T gemessen.

3.3.2 Messung der Zellviabilität von NRVC mit Hilfe des MTT-Assay

Zur genaueren Bestimmung des Einflusses von RIP3 und RIP3-Kinase-dead-Mutante auf das Überleben von NRVC wurde das *Cell Proliferation Kit* (MTT) von Roche™ angewandt. In lebenden Kardiomyozyten fand eine Reduktion eines gelben, wasserlöslichen Farbstoffs (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan statt. Die Absorptionsmessung bei 570 nm mittels Spektrophotometer ergab, dass nach RIP3-Überexpression kaum noch lebende NRVC mittels blau-violettem Farbstoff nachweisbar waren, während eine Infektion mit LacZ-Kontrollvirus keinen signifikant negativen Einfluss auf die Zellviabilität hatte. Interessanterweise nahm die Zellviabilität nach Infektion mit der RIP3-Kinase-inaktiven Mutante zwar im Vergleich zu LacZ signifikant ab, es überlebten jedoch signifikant mehr NRVC als nach Überexpression von Kinase-aktivem RIP3 (**Abb. 13**).

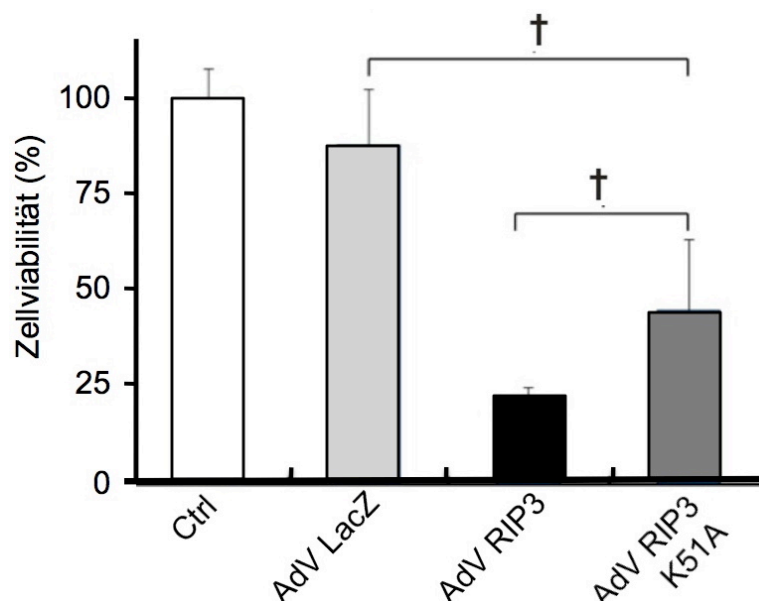


Abbildung 13: MTT-Assay. Bestimmung der Zellviabilität von NRVCN nach RIP3-Überexpression. $P < 0,01$, $n = 6$.

3.3.3 Einfluss von Nekrose auf NRVCN nach RIP3-Überexpression

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie ist eine Methode zur quantitativen Messung einer bestimmten Anzahl markierter Zellen in einer kurzen Zeit, indem jede Zelle einen Laserstrahl passiert und entsprechend des Fluoreszenzsignales vom Gerät sortiert wird. Propidiumiodid (PI) kann in Zellen mit beschädigter Zellmembran (nach beispielsweise nekrotischem Zelltod) eindringen und in die DNA interkalieren. In diesem Versuch wurde mithilfe der Durchflusszytometrie ein signifikanter Anstieg der Kardiomyozyten-Zelltodrate mittels PI-Färbung nach RIP3-Überexpression beobachtet ($P < 0,05$). Der Anteil toter Zellen nach Überexpression von Kinase-inaktivem RIP3 stieg im Widerspruch zum MTT-Assay (**Abb. 13**) nicht höher an als bei LacZ-Kontrollvirus.

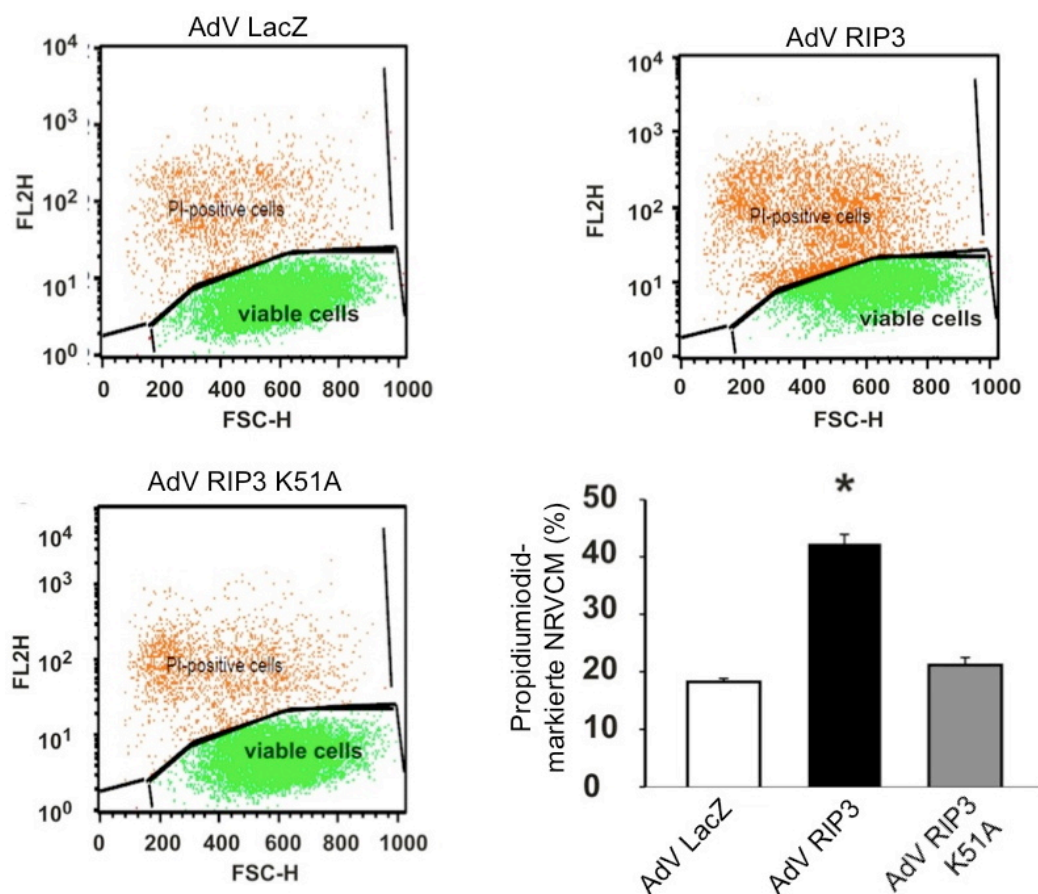


Abbildung 14: Durchflusszytometrie Propidiumiodid-markierter NRVCN. Die Diagramme sind repräsentativ für jede Versuchsgruppe; $P < 0,05$, $n = 6$, für alle drei Diagramme gilt: rot = PI-positive NRVCN, grün = lebende Zellen.

3.3.4 Einfluss von zVAD und TNF α auf die Zellviabilität von NRVCVM

Zur Erforschung des Einflusses von TNF α und dem Caspasen-Inhibitor zVAD auf RIP3-vermittelten Zelltod in NRVCVM stellten wir uns die Frage, ob zum einen die kombinierte Stimulation mit rekombinantem TNF α und dem Caspasen-Inhibitor zVAD einen Einfluss auf die Zelltodrate von Kardiomyozyten hat. Zum anderen untersuchten wir die Zellviabilität von NRVCVM bei der kombinierten Behandlung aus RIP3-Überexpression, TNF α -Stimulation und Caspasen-Inhibierung. Für diese Versuchsreihe wurden Kardiomyozyten mit 10 ifu AdV RIP3 beziehungsweise AdV LacZ infiziert, 48 h später mit 100 ng/ml TNF α und 50 μ M zVAD stimuliert und anschließend die Zelltodrate mittels Propidiumiodidfärbung und Durchflusszytometrie gemessen. **Abb. 15** zeigt die Zellviabilität (in %) umgekehrt zur Zelltodrate, abgeleitet von Propidiumiodid-positiven Zellen, wobei der Wert nach LacZ-Infektion gleich 100% gesetzt und alle weiteren Werte auf das LacZ-Kontrollvirus bezogen wurden. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass eine LacZ-Virusinfektion und gleichzeitige Stimulation mit TNF α und zVAD keinen negativen Einfluss auf die Zellviabilität von NRVCVM hat (**Abb. 15**). Im Vergleich dazu führt eine adenovirale RIP3-Überexpression auch nach Inaktivierung aller Caspasen zu einer signifikanten Induktion von Nekrose in Kardiomyozyten.

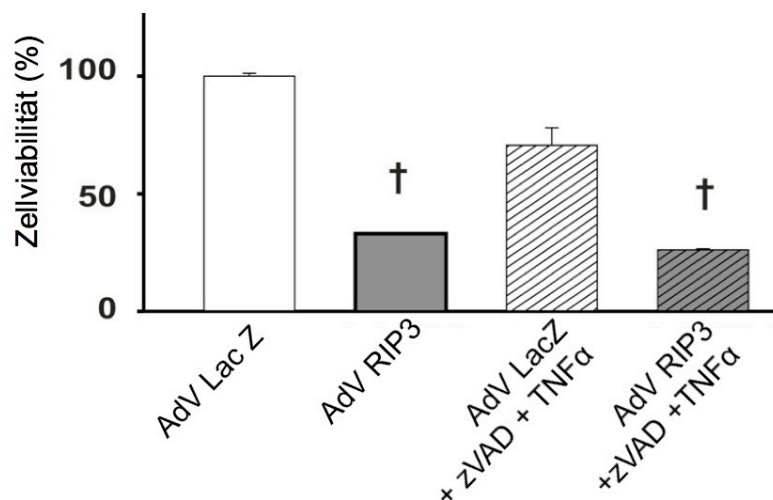


Abbildung 15: Durchflusszytometrie PI-positiver NRVCVM nach TNF α -/zVAD-Stimulation. Messung der Zellviabilität von NRVCVM mit und ohne TNF α -/ zVAD-Behandlung sowie RIP3-Überexpression ($P < 0,01$, $n = 4$).

3.3.5 Einfluss von RIP1-Knockdown auf RIP3-überexprimierende NRVCVM

Zur Inhibierung der Expression von RIP1 in Kardiomyozyten wurden mithilfe des Block-iT™ Pol II miR RNAi-Expression Vektor-Kit (Invitrogen®) RIP1-spezifische miRNAs kloniert und adenoviral in NRVCM transfiziert. Ein Immunoblot in **Abb. 16** zeigt eine deutlich verminderte RIP1-Expression auf Proteinebene nach Transfektion mit 60 ifu AdV mi RIP1_1 für 72 h. Das zweite miRNA-Konstrukt AdV mi RIP1_2 führte nicht zur gewünschten Abnahme der RIP1-Detektion und wurde für weitere Experimente ausgeschlossen. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von fehlendem RIP1 (AdV mi RIP1_1) auf die Zellviabilität von RIP3-überexprimierenden NRVCM mittels Propidiumiodid-Färbung und Durchflusszytometrie untersucht. Die Zelltodrate (Propidiumiodid-positive NRVCM) blieb nach miRNA-RIP1-Knockdown im Vergleich zum mi_con-Kontrollvirus bei gleichzeitiger RIP3-Überexpression konstant (**Abb.16**).

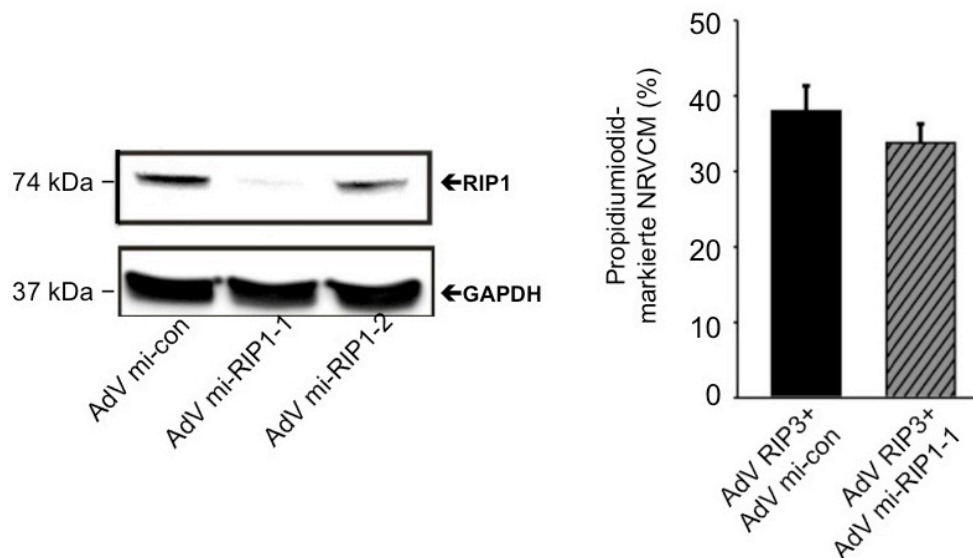


Abbildung 16: miRNA-basierter RIP1-Knockdown. Links: Immunoblot zur Bestätigung des miRNA-basierten RIP1-Knockdown (Anti-RIP1-Antikörper von BD Biosciences, Maus, 1:500; Anti-GAPDH-Antikörper von Santa Cruz, Ziege, 1:500). Rechts: Diagramm zur Zelltodrate mittels Durchflusszytometrie PI-positiver NRVCM bei RIP1-Runterregulierung und gleichzeitiger RIP3-Überexpression (n = 4; n.s.).

3.4 RIP3-Lokalisation in NRVCM

3.4.1 Nachweis von endogenem RIP3 in NRVCM

Mithilfe eines konfokalen Laser-scanning-Mikroskops und Immunzytochemie wurde endogenes RIP3 (**Abb. 17** rot) im Zytosol von NRVCM nachgewiesen. Als Kardiomyozyten-Kontrollfärbung diente das in **Abb. 17** grün (FITC-) markierte

Strukturprotein α -Actinin, welches mit den Z-Scheiben im Sarkomer verknüpft ist. Die Zellkerne sind blau (DAPI-) gefärbt.

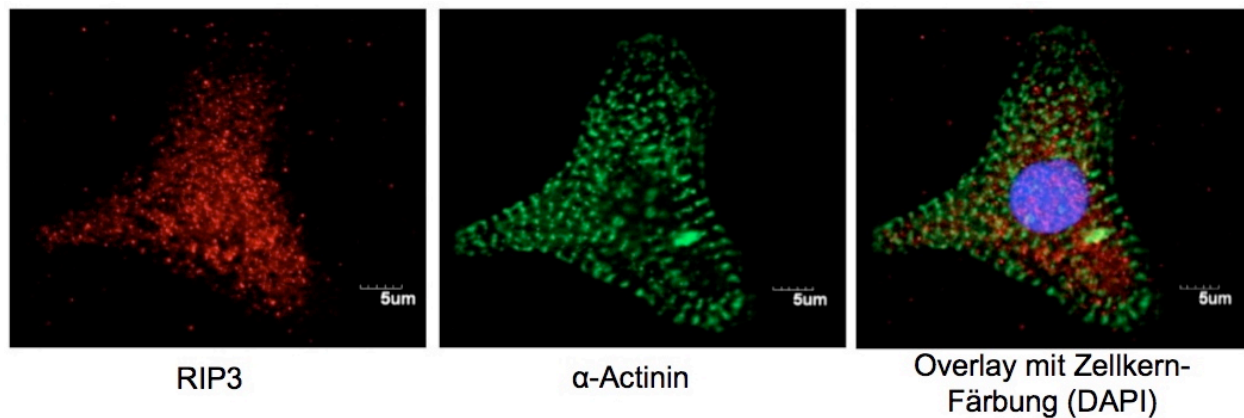


Abbildung 17: Nachweis von molekularem RIP3 in NRVCM. Repräsentatives Bild eines neonatalen Kardiomyozyts und Nachweis von molekularem endogenem RIP3 (rot). Messbalken: 5 μ m.

3.4.2 Perinukleäre Häufung von endogenem RIP3 in NRVCM

Galluzzi *et al.* haben herausgefunden, dass Mitochondrien während des programmierten Zelltods zunehmend um den Zellkern herum lokalisiert sind (Galluzzi, Kepp et al. 2012). Wir stellten die Hypothese auf, dass es einen Zusammenhang zwischen Hypoxie-induzierten Stress in den Mitochondrien und RIP3-vermittelten Zelltod gibt. Mithilfe des sogenannten Mito-Tracker[®]-Farbstoffs in **Abb. 18** (rot) konnten wir Mitochondrien in Kardiomyozyten visualisieren und zudem eine Ko-Lokalisierung von RIP3 und Mitochondrien beobachten. Repräsentative Aufnahmen von NRVCM in **Abb. 18** verdeutlichen im rechten Bild, dass bei nachträglicher Überlagerung der grünen und roten Farbe ("Overlay") gelbes Licht sichtbar wird.

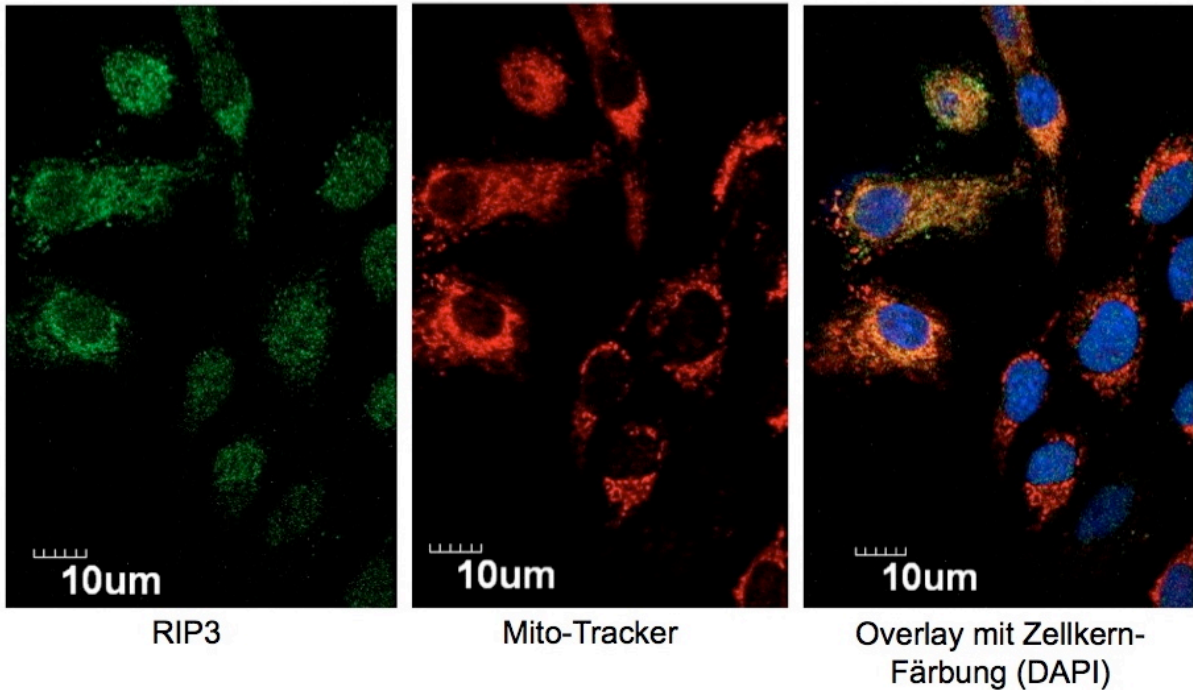


Abbildung 18: Ko-Lokalisation von RIP3 und Mitochondrien in NRVCM. Bei nachträglicher Überlagerung der grünen und roten Farbe ("Overlay") wird gelbes Licht auf Höhe von RIP3 (grün) und Mitochondrien (rot) sichtbar.

Zur genaueren Beurteilung der Ko-Lokalisation von RIP3 und Mitochondrien wurden bei einzelnen NRVCM eine sogenannte *Line of Interest* (weiße Linie in **Abb. 19**) durch die Aufnahme gezogen und anschließend mithilfe der Software Olympus™ FV1000 emittierte Fluoreszenzen im Histogramm aufgeschlüsselt. Ein signifikanter Intensitätsanstieg der CY3-Fluoreszenz von RIP3 auf Höhe des Mito-Trackers® sowie kaum Nachweis von RIP3 im Bereich des DAPI-Fluoreszenzanstieges im Zellkern (**Abb. 19**) war regelhaft in NRVCM zu beobachten. Diese Histogramm-Resultate unterstützen unsere Hypothese einer möglichen Ko-Lokalisation von RIP3 und Mitochondrien.

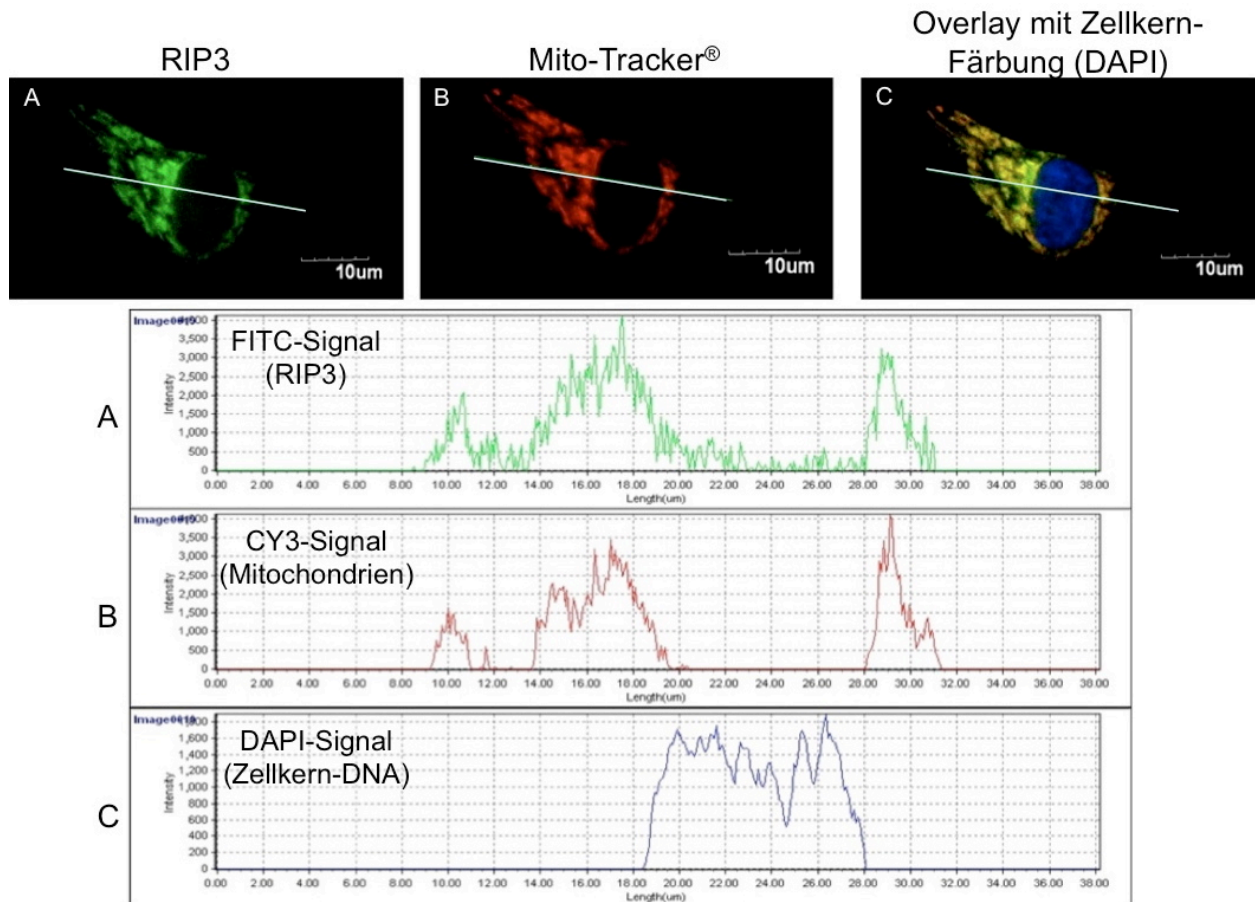


Abbildung 19: Unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten in NRVC. Repräsentativer Kardiomyozyt zur Darstellung von ko-lokalisiertem RIP3 und Mitochondrien mittels Fluoreszenzmessung im Histogramm.

3.4.3 Morphologie von Mitochondrien *in vitro* unter Ruhebedingungen und bei RIP3-induziertem Zellschaden

Zur genaueren Beurteilung der Mitochondrienstruktur wurden Kardiomyozyten zunächst für 48 h mit 10 ifu RIP3-Adenovirus und 10 ifu LacZ-Kontrollvirus infiziert, in 3% Glutaraldehyd fixiert, um anschließend für eine Transmissions-Elektronenmikroskopie eingebettet zu werden. Es wurden verschiedene Bereiche im Zytosol der Kardiomyozyten elektronenmikroskopisch aufgenommen und anschließend die Größen der Mitochondrien gemessen. Wir haben die Hypothese aufgestellt, dass Mitochondrien nach RIP3-Überexpression als Zeichen von Nekrose stärker anschwellen als in den Kontrollgruppen. Der wahrgenommene Größenunterschied und das partielle Anschwellen von Mitochondrien nach RIP3-Überexpression stellte sich als nicht signifikant gegenüber dem Kontrollvirus AdV LacZ heraus (**Abb. 20**).

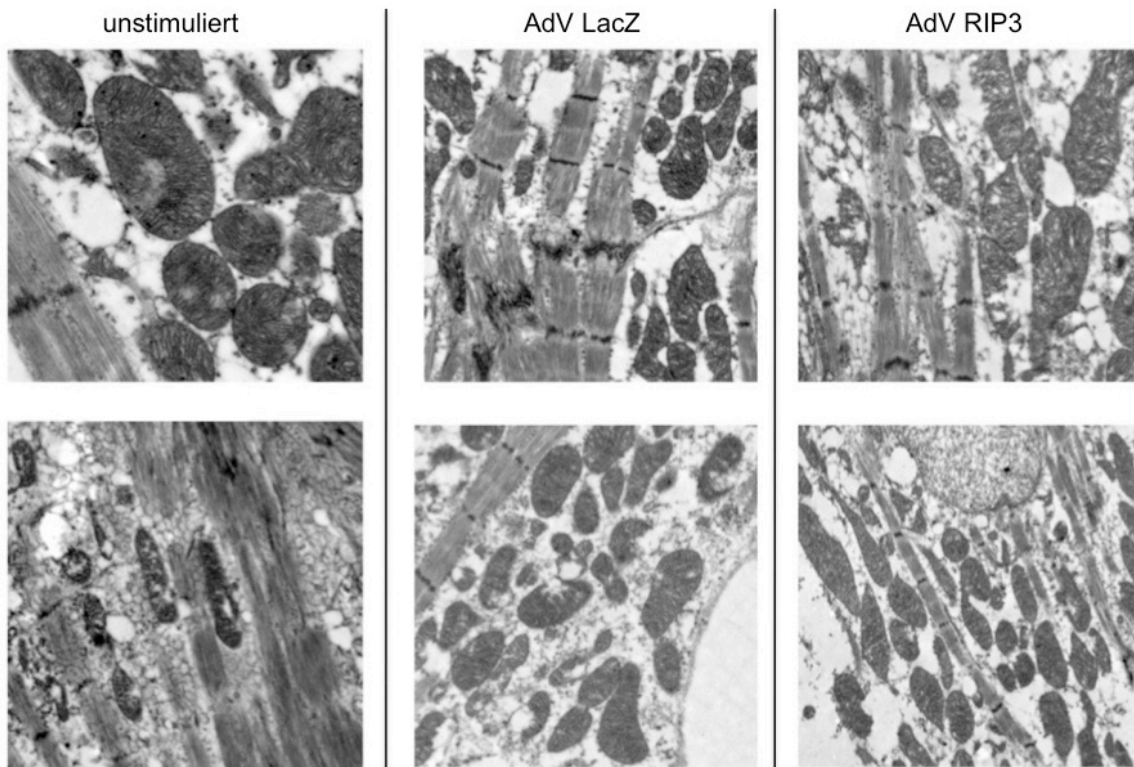


Abbildung 20: Ultrastruktur von Mitochondrien in NRVCM. Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien im Zytosol von basalen und RIP3-überexprimierenden NRVCM (obere Reihe 7000x Vergrößerung, untere Reihe 3000x Vergrößerung).

3.5 Expression von RIP3 im ischämischen Myokard *in vivo*

Die Funktion von RIP3 bei Myokardischämie ist eine wichtige Frage, die wir mithilfe eines Infarktmodells der Maus untersuchen wollten. Durch operativen Verschluss des wichtigsten Astes der linken Koronararterie, der LAD (engl. left anterior descending), wurde zunächst bei Wildtyp-Mäusen ein Herzinfarkt induziert. Kontrolltiere wurden scheinoperiert und die LAD wurde im selben Maße freipräpariert, allerdings nicht ligiert. Nach 24 h wurden alle operierten Mäuse getötet und die Herzen zur Proteingewinnung entnommen. Der Immunoblot in **Abb. 21** zeigt eine Hochregulation von RIP3 auf Proteinebene nach myokardialer Ischämie, während RIP3 nach Scheinoperationen kaum zu detektieren war. Zur weiteren Klärung der Bedeutung von RIP3 nach Myokardinfarkt stand uns eine konstitutive RIP3^{-/-}-Knockout-Mauslinie zur Verfügung. Im Immunoblot wurde außerdem bei einem operiertem RIP3^{-/-}-Tier sichergestellt, dass kein RIP3 im Herzen nachweisbar war (**Abb. 21**).

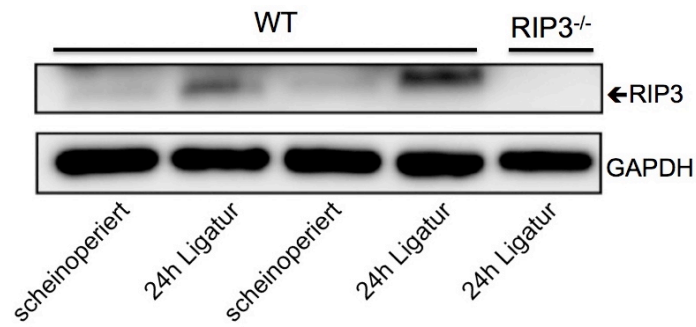


Abbildung 21: Hochregulierung von RIP3 nach experimentellem Myokardinfarkt. Anti-RIP3-Antikörper von Enzo Life Sciences (Kaninchen, 1:500); Anti-GAPDH-Antikörper von Sigma-Aldrich (Maus, 1:5000), 100µg Protein / Tasche.

3.6 Charakterisierung des Phänotyps konstitutiver RIP3^{-/-} Knockout-Mäuse in extrakardialen Organen und Blutzellen

Die konstitutive RIP3^{-/-} Knockout-Maus ist lebensfähig und fortpflanzungsfähig (Newton, Sun et al. 2004). Der Phänotyp der RIP3^{-/-} Knockout-Maus zeigt im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren keine Auffälligkeiten, weder im Herzen, noch histologisch in extrakardialen Organen (**Abb. 22**), noch in der Anzahl Leukozyten im peripheren Blut (**Abb. 23**).

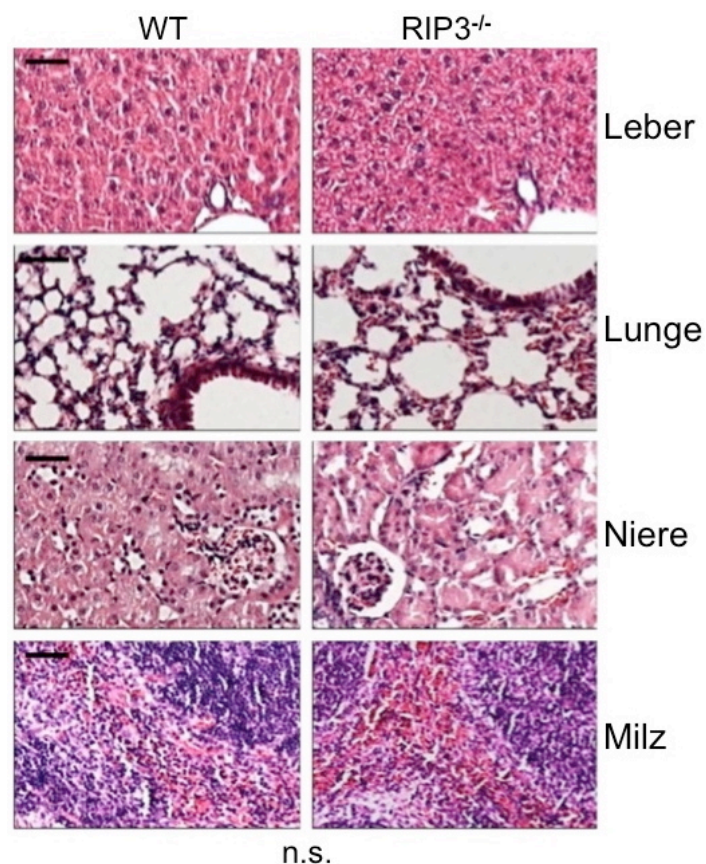


Abbildung 22: HE-Färbung von extrakardialen Gewebe. Histologische Aufnahmen von Organen nicht operierter $RIP3^{-/-}$ -Mäuse zeigen keine morphologischen Auffälligkeiten gegenüber WT-Mäusen (Messbalken: 50 μ m).

Der Anteil peripherer Leukozyten im Vollblut von Wildtyp- und $RIP3^{-/-}$ -Mäusen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurden die gewonnenen Leukozyten zuvor mit verschiedenen Antikörpern angefärbt. Zum Nachweis von Granulozyten wurden Anti-CD45, Anti-CD11b sowie Anti-Ly6g verwendet. Zur Detektion von T-Lymphozyten dienten die Antikörper Anti-CD45 und Anti-CD3. Der Anteil von Leukozyten total sowie von T-Lymphozyten im Blut von Wildtyp- und $RIP3^{-/-}$ -Mäusen unter Ruhebedingungen hat sich als gleichwertig herausgestellt (**Abb. 24**), sodass eine Beeinflussung der Granulopoese durch $RIP3$ -Deletion ausgeschlossen wurde.

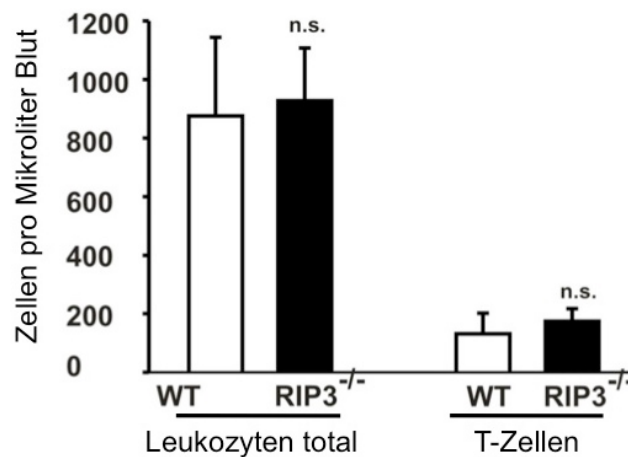


Abbildung 23: Vergleichbare Leukozytenspiegel in $RIP3^{-/-}$ - und WT-Mäusen. Durchflusszytometrische Untersuchung des Anteils von Leukozyten und T-Zellen im peripheren Blut nicht operierter Wildtyp- und $RIP3^{-/-}$ -Mäuse.

3.7 Bedeutung von Apoptose und Angiogenese im Periinfarktgebiet

3.7.1 Auswirkung auf Spaltung der Caspase 3 nach Myokardischämie

Der Einfluss von Apoptose auf postischämisches Remodeling nach Myokardinfarkt ist bisher unzureichend geklärt. Wegweisend für die Initiierung von Apoptose gilt der Nachweis von gespaltener Caspase 3. Im Immunoblot konnten wir 24 h nach experimentellem Myokardinfarkt weder in Wildtyp- noch in $RIP3^{-/-}$ -Mäusen Unterschiede in der Regulierung ungespaltener Caspase 3 (**Abb. 24**, Diagramm) feststellen und keine gespaltene Caspase 3 (als Hinweis für induzierte Apoptose) auf Proteinebene nachweisen. Als Positivkontrolle für Caspase 3-Spaltung diente Proteinextrakt von leberspezifischen TAK1-Knockout-Mäusen (engl. transforming

growth factor beta activated kinase 1), die zuvor mit Lipopolysaccharid zur TNF- α -Ausschüttung behandelt wurden. TAK1 aktiviert NF- κ B und damit einhergehend proinflammatorische Signalwege. Das Fehlen von TAK1 bei TNF- α -Stimulation in der Leber führt daher zur Aktivierung der Apoptose (Bettermann, Vucur et al. 2010).

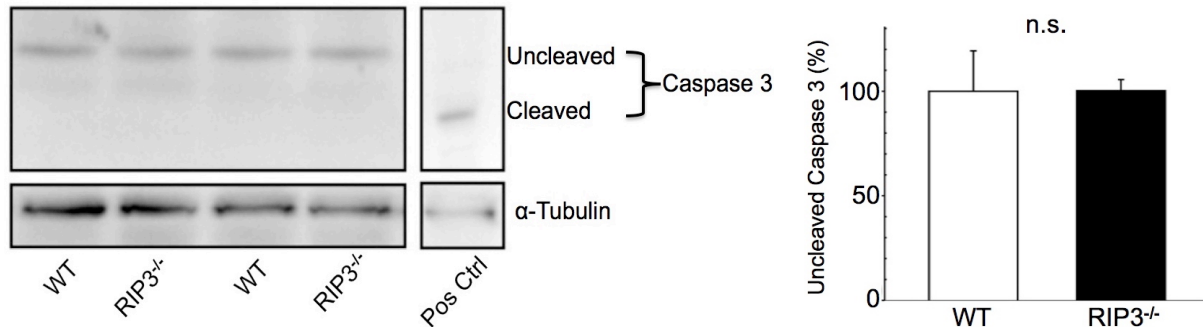


Abbildung 24: Fehlende Spaltung von Caspase 3 nach Myokardinfarkt. Immunoblot aus Proteinen 24 h operierter Wildtyp- und RIP3^{-/-}-Mäuse sowie Densitometrie der ungespaltenen Caspase 3-Bande (Diagramm, n.s.). Anti-Cleaved Caspase 3-Antikörper von Cell Signaling (Kaninchen, 1:500); Anti-Tubulin-Antikörper von Sigma-Aldrich (Maus, 1:10000).

Nachdem wir auf Proteinebene keine gespaltene Caspase 3 im Herzen detektierten, wurde im nächsten Schritt auf histologischer Ebene im Periinfarktgebiet von RIP3^{-/-}- sowie Wildtyp-Herzen Cleaved Caspase 3 immunhistochemisch angefärbt. Dabei wurde 4 Tage nach LAD-Ligatur nur vereinzelt braun gefärbtes Cleaved Caspase 3 detektiert (**Abb. 25**), sodass übereinstimmend mit **Abb. 24** weder im Wildtyp- noch im RIP3^{-/-}-Infarktgebiet vermehrt Apoptose initiiert wurde.

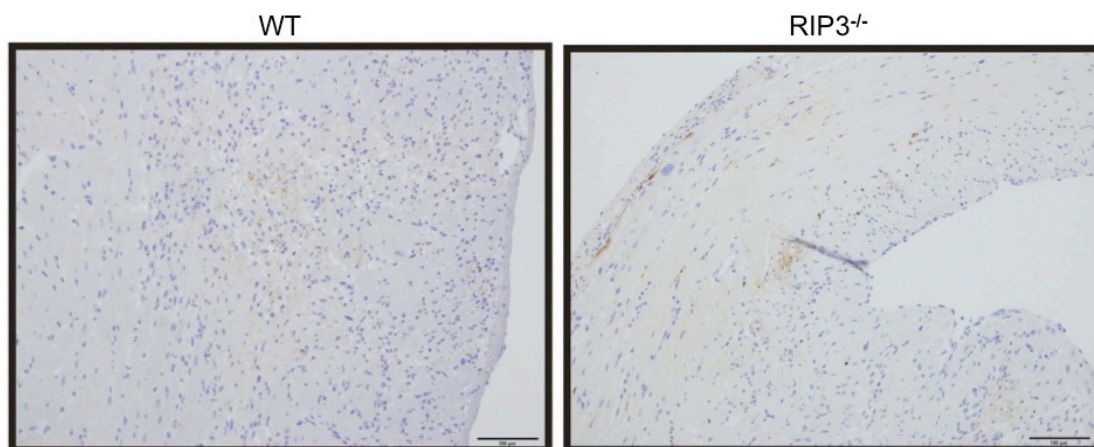


Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung von gespaltener Caspase 3 im Herzen. 4 Tage nach induziertem Herzinfarkt wurden histologische Aufnahmen aus dem Periinfarktgebiet von WT- und RIP3^{-/-}-Herzen erstellt. Messbalken: 100 μ m.

3.7.2 Auswirkung auf Angiogenese nach Myokardischämie

Ein bekanntes Protein zum Nachweis endothelialer Zellen stellt Cd31 (Cluster of Differentiation 31) dar, welches auf histologischer Ebene im Infarktgebiet von $RIP3^{-/-}$ - sowie Wildtyp-Herzen nur schwach immunhistochemisch anzufärben war. Es wurden keine Unterschiede in der Vaskularisierung des Perinfarktgebietes beider Versuchsgruppen 4 Tage nach LAD-Ligatur beobachtet (**Abb. 26**).

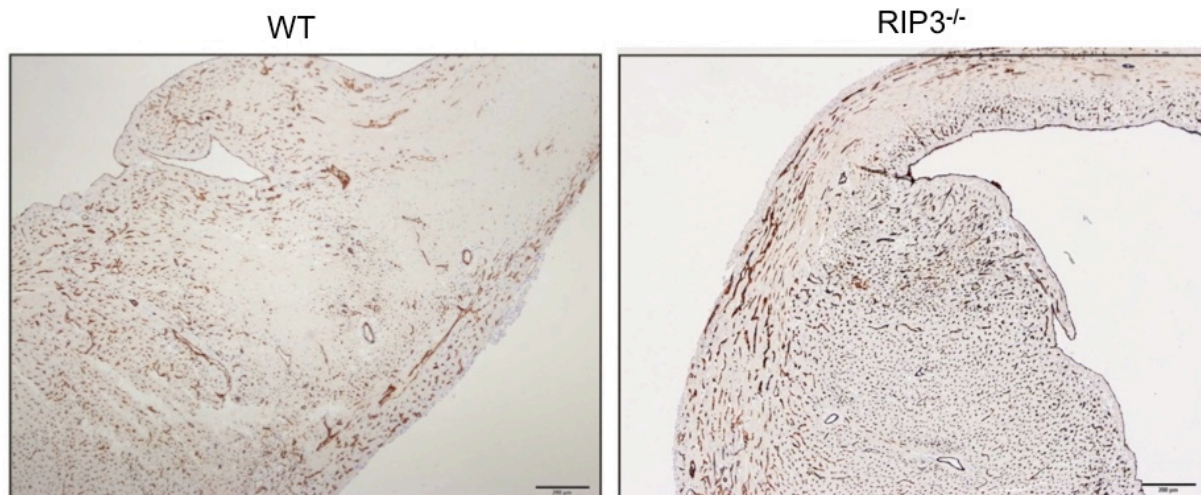


Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung endothelialer Zellen. 4 Tage nach LAD-Ligatur wurden histologische Färbungen mittels Anti-Cd31-Antikörper (Abcam) aus dem Perinfarktgebiet von WT- und $RIP3^{-/-}$ -Herzen erstellt. Messbalken: 200 μ m.

3.8 Einfluss von RIP3 auf Entzündungsparameter im Herzen

3.8.1 Proinflammatorische T-Zell-Infiltration bei Myokardischämie

Der histologische Nachweis proinflammatorischer CD3-positiver T-Helferzellen im Perinfarktgebiet operierter Wildtyp- und $RIP3^{-/-}$ -Mäuse lieferte Hinweise auf den Einfluss der Aktivierung von RIP3 im Herzen auf Entzündungszeichen wie das Einwandern von T-Helferzellen. Hierzu wurden 48 h sowie 4 Tage nach LAD-Ligatur histologische Schnitte aus dem Infarkt-Randgebiet von operierten Herzen erstellt und CD3-positiv T-Lymphozyten angefärbt. Die Auszählung der braun gefärbten T-Lymphozyten (Pfeile in **Abb. 27**) pro Gesichtsfeld bestätigte eine signifikant niedrigere T-Zell-Einwanderung in operierten $RIP3^{-/-}$ -Herzen verglichen mit operierten Wildtyp-Kontrolltieren.

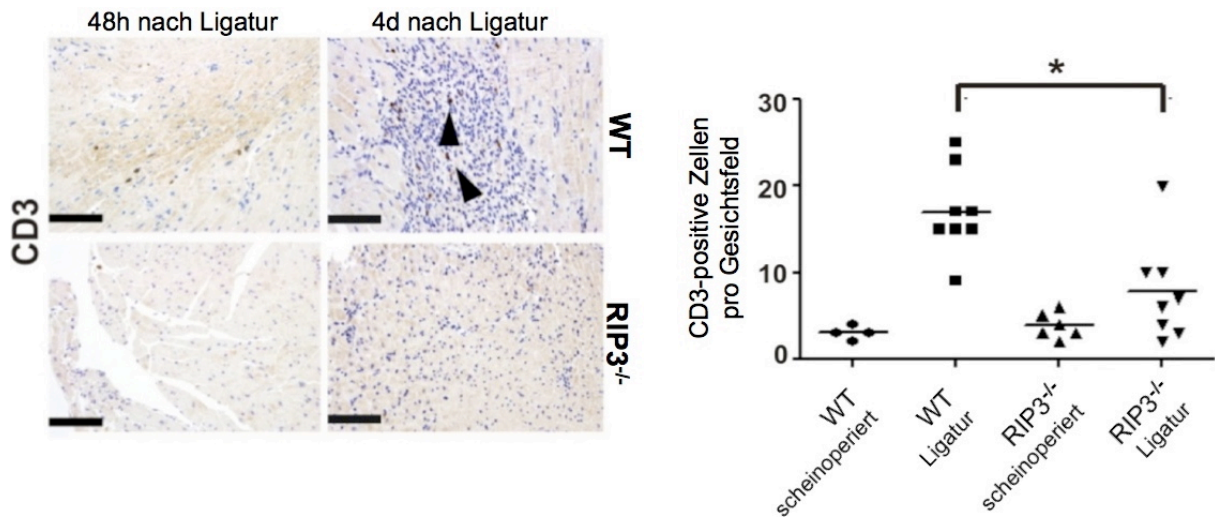


Abbildung 27: Einwanderung CD3-positiver T-Zellen. 48 h sowie 4 Tage nach LAD-Ligatur wurden histologische Schnitte aus dem Infarkt-Randgebiet operierter Versuchstiere erstellt ($P < 0,05$; Messbalken: 100 μm).

3.8.2 Schutz vor Sauerstoff-Radikalen bei Fehlen von RIP3

RIP3-induzierte programmierte Nekrose und Entzündungsreaktion werden seit einiger Zeit im Zusammenhang mit sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies und oxidativem Stress diskutiert (Zhang, Shao et al. 2009). Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen zu verminderten proinflammatorischen Signalen in RIP3-defizienten Herzen (**Abb. 27**) ergaben Messungen (in Kooperation mit Dr. M. Vucur, Universität Aachen) im ischämischen Myokard 24 h nach LAD-Ligatur, dass RIP3^{-/-}-Herzen signifikant weniger Sauerstoff-Radikale generierten als Wildtyp-Kontrolltiere (**Abb. 28**). Dieses Ergebnis unterstützt bereits bekannte Daten über RIP3 sowie unsere Hypothese, dass Entzündungsreaktionen und der Anstieg von Sauerstoffradikalen einen RIP3-vermittelten Zellschaden induzieren.

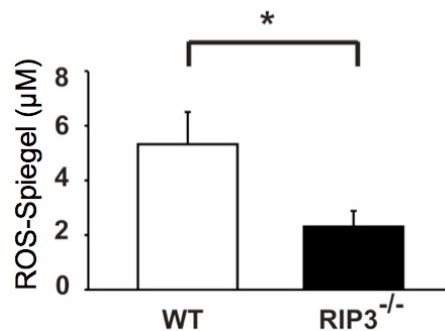


Abbildung 28: Messung reaktiver Sauerstoffspezies im Herzgewebe von RIP3^{-/-}- und WT-Mäusen 24 h nach LAD-Ligatur ($2,31 \pm 0,58$ vs. $5,32 \pm 1,18$, $P < 0,05$, $n = 8$).

3.8.3 Bestimmung der Troponin T-Konzentration im Serum

Im vorhergehenden Versuch konnte gezeigt werden, dass es unter RIP3-Einfluss zu einem signifikanten Anstieg von Sauerstoffradikalen als Zeichen für oxidativen Stress nach Myokardischämie kommt. In diesem Versuch wurde ein klassischer Parameter zur Beurteilung der myokardialen Zellschädigung, das herzspezifische Troponin T, im Serum operierter Mäuse gemessen. Übereinstimmend mit unseren bisherigen Ergebnissen zum RIP3-abhängigen Zelltod wurde ein signifikant verminderter Troponin T-Spiegel in RIP3^{-/-}-Mäusen festgestellt im Vergleich zu operierten Wildtyp-Mäusen (**Abb. 29**).

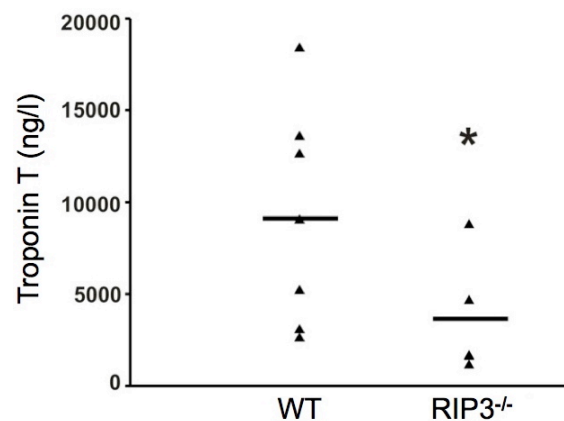


Abbildung 29: Troponin T-Konzentration *in vivo*. Messung von Troponin T im Serum von Versuchstieren 3 Tage nach LAD-Ligatur ($P < 0,05$).

3.8.4 Ausmaß des strukturellen Remodeling im Myokard

Der fibrotische Umbau der ischämischen Herzmuskelwand als schwerwiegende Spätfolge eines Myokardinfarktes wurde 30 Tage nach LAD-Ligatur auf histologischer Ebene bei RIP3^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen mittels Elastica-van-Gieson-Färbung untersucht. Wir stellten die Hypothese auf, dass durch Aktivierung von RIP3 in Wildtyp-Mäusen negatives Remodeling gesteigert wurde und somit RIP3^{-/-}-Mäuse vor Fibrosierung geschützt sind. Bei makroskopischer Begutachtung war eine klare Tendenz erkennbar, aber ein signifikanter Unterschied in der Größe des fibrosierten Areals konnte in beiden Versuchsgruppen entgegen unserer Hypothese nicht bestätigt werden (**Abb. 30**).

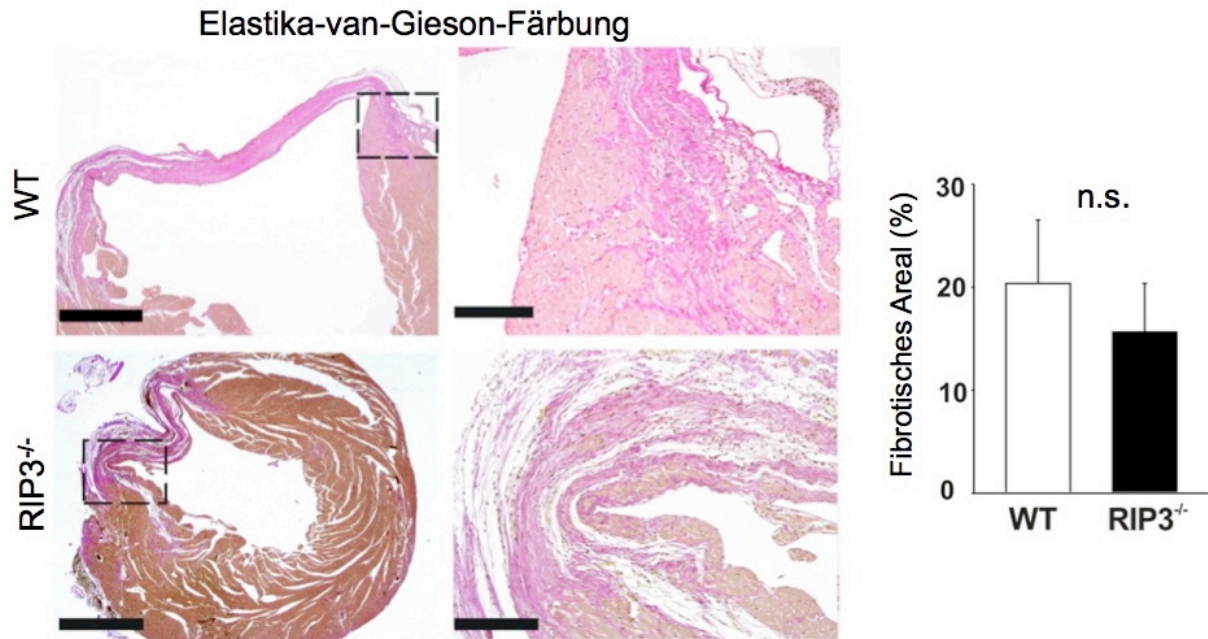


Abbildung 30: Färbung von Kollagenanteilen operierter Herzen. Elastika-van-Gieson-Färbung des Herzgewebes ergab 30 Tage nach Myokardinfarkt keine signifikante Zunahme der Fibrose in Wildtyp- Herzen gegenüber RIP3^{-/-}-Herzen (Messbalken linke Spalte: 1000µm; Messbalken rechte Spalte: 200µm).

3.8.5 Messung der Genexpression von TNF α , TNF-Rezeptor 1 und 2 sowie TNF α -Converting Enzyme (TACE) im Herzen

Die Regulierung der mRNA kodierend für TNF α sowie TNF α -verwandte Proteine wurde jeweils in scheinoperierten und operierten Wildtyp- und RIP3^{-/-}-Herzen mittels Realtime-PCR untersucht. Die Herzen wurden 4 Tage nach LAD-Ligatur entnommen und die RNA daraus isoliert. Die Realtime-PCR offenbarte keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und RIP3^{-/-}-Herzen in der mRNA-Hochregulierung von *tnf- α* , *tace*, *tnf-receptor 1* oder *tnf-receptor 2* (**Abb. 31**).

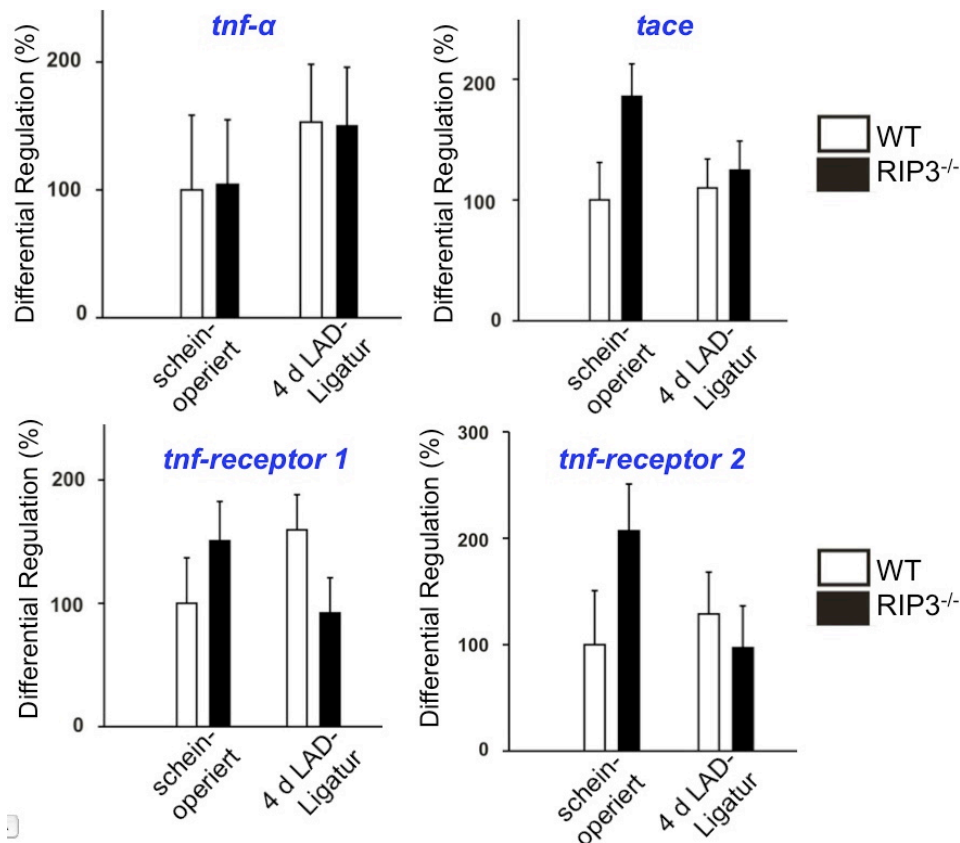


Abbildung 31: Genexpression von TNF α und TNF α -verwandter Gene bei 4 Tage operierten WT- und RIP3^{-/-}-Mäusen mittels quantitativer Real-Time PCR (n = 12).

3.9 Langfristige Auswirkungen auf Größe und Pumpfunktion ischämischer RIP3^{-/-}-Herzen im Vergleich zu Wildtyp-Herzen

3.9.1 Beurteilung der Infarktgröße mittels kardialem Maus-MRT

Zur Einschätzung der Infarktgröße und allgemeinen Kontraktilität der Herzen wurden MRT-Aufnahmen von Wildtyp- und RIP3^{-/-}-Mäusen vor LAD-Ligatur (basal), 24 h nach LAD-Ligatur und 30 d nach LAD-Ligatur erstellt. Der Anstieg des Gadolinium-Kontrastmittelsignals im infarzierten Myokard 24 h nach LAD-Ligatur offenbarte in Wildtyp-Mäusen keinen signifikanten Unterschied gegenüber RIP3^{-/-}-Herzen (**Abb. 32**).

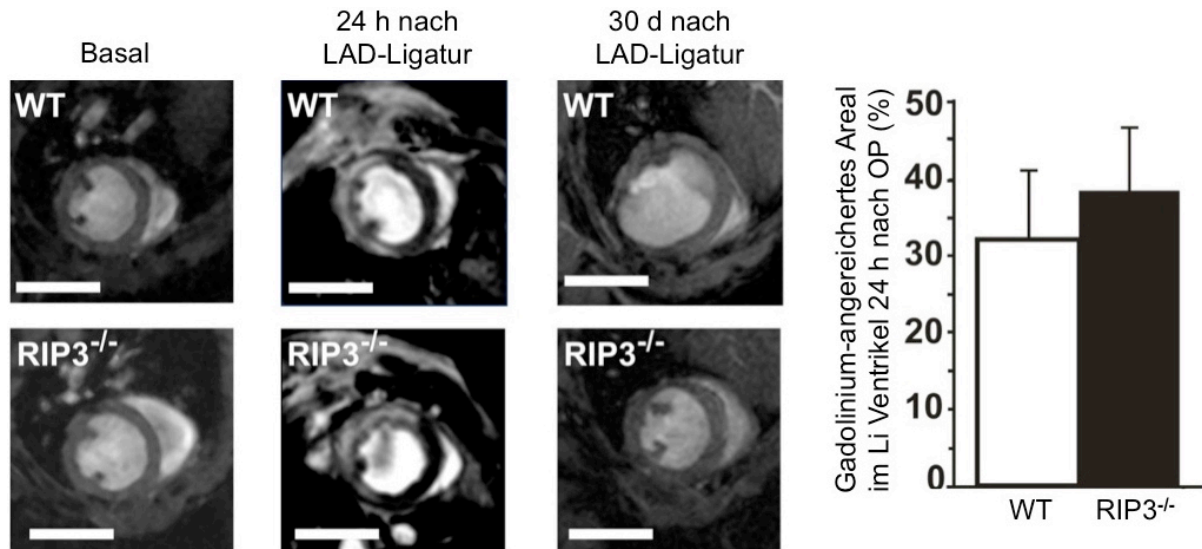


Abbildung 32: Repräsentative MRT-Bilder mittels kurzer Herzachse. Messung der Infarktgröße operierter WT- und RIP3^{-/-}-Mäuse mithilfe des intensivierten Gadoliniumsignals 24 h nach LAD-Ligatur (Diagramm); n = 4; Messbalken: 5mm

3.9.2 Hypertrophes Genprogramm operierter RIP3^{-/-}- und Wildtyp-Herzen

Drei Hypertrophie-assoziierte Gene im fetalen Genprogramm kodieren für Brain Natriuretic Peptide (*nppb*), Calcineurin-abhängiges RCAN 1-4 (*rca*n 1-4) sowie Atrialer Natriuretischer Faktor (*nppa*) (Crabtree 1999) (Leenders, Pinto et al. 2011). Eine quantitative Realtime-PCR zeigte 30 Tage nach LAD-Ligatur eine starke Hochregulierung der Genexpression von *rca*n 1-4 und *nppa* in operierten Wildtyp-Herzen, es konnte allerdings keine Signifikanz gegenüber RIP3^{-/-}-Herzen festgestellt werden. Die Realtime-PCR-Messung von *nppb* offenbarte wiederum bei operierten RIP3^{-/-}-Mäusen eine signifikante Herabsetzung der *nppb*-mRNA-Regulierung im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren (**Abb. 33**) als erster signifikanter Hinweis für RIP3-abhängiges postischämisches Remodeling im Herzen.

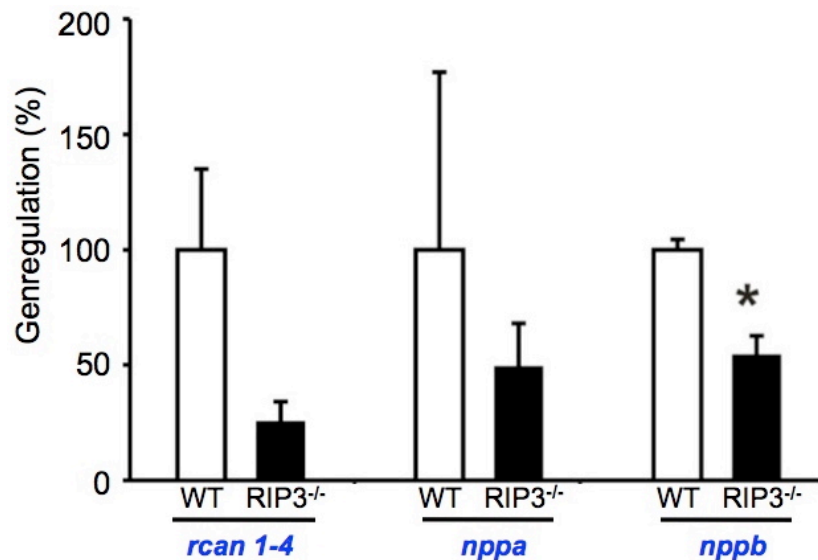


Abbildung 33: Regulation Hypertrophie-assoziiierter Gene. Messung der Genregulation von *rcan 1-4*, *nppa* und *nppb* 30 Tage nach LAD-Ligatur mittels quantitativer Real-Time-PCR (*nppb*: $P < 0,05$, $n = 12$).

3.9.3 Bestimmung von Ejektionsfraktion und Linksherzhypertrophie

Zur Beurteilung der Pumpfunktion von Herzen wurden RIP3^{-/-}- und Wildtyp-Mäuse unter Ruhebedingungen sowie 30 Tage nach LAD-Ligatur mithilfe eines Echtzeit-Herz-MRT untersucht. **Tabelle 6** gibt sämtliche mittels Maus-MRT gemessene Parameter zur Morphologie und Pumpfunktion von WT- und RIP3^{-/-}-Herzen wieder:

Parameter	WT		RIP3 ^{-/-}	
	Basal	30 d nach OP	Basal	30 d nach OP
Körpergewicht (g)	23,6 ± 0,5	27,7 ± 0,4	24,9 ± 0,6	26,8 ± 0,5
Herzfrequenz (/min)	487 ± 15,1	562 ± 14,6	495 ± 22,0	531 ± 15,1
EDV (µl)	62 ± 2,3	121 ± 19,9	71 ± 4,8	83 ± 8,6
ESV (µl)	23 ± 1,6	89 ± 20,4	30 ± 3,9	48 ± 8,7
Schlagvolumen (µl)	39 ± 1,3	32 ± 1,8	42 ± 1,6	35 ± 1,4
Ejektionsfraktion (%)	63 ± 1,6	32 ± 4,4	59 ± 2,3	45 ± 3,6 *
Herzminutenvolumen (ml/min)	19 ± 0,6	18 ± 1,3	21 ± 1,3	19 ± 0,6
Linker Ventrikel (mg)	89 ± 4,0	116 ± 6,0	84 ± 2,3	94 ± 4,4 *

Linker Ventrikel / Körpergewicht (mg/g)	3,6 ± 0,1	4,2 ± 0,2	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1 *
--	-----------	-----------	-----------	-------------

Tabelle 6: Morphologische und funktionelle Herz-Parameter im MRT von RIP3^{-/-}- und WT-Herzen basal und 30 d nach LAD-Ligatur (n = 12; * = P<0,05 vs. WT)

30 Tage nach induziertem Myokardinfarkt zeigten RIP3^{-/-}-Mäuse eine signifikant bessere Ejektionsfraktion (**Abb. 34**) und eine signifikant verminderte Hypertrophie-Entwicklung (**Abb. 35**) im Vergleich zu operierten Wildtyp-Kontroll-Tieren.

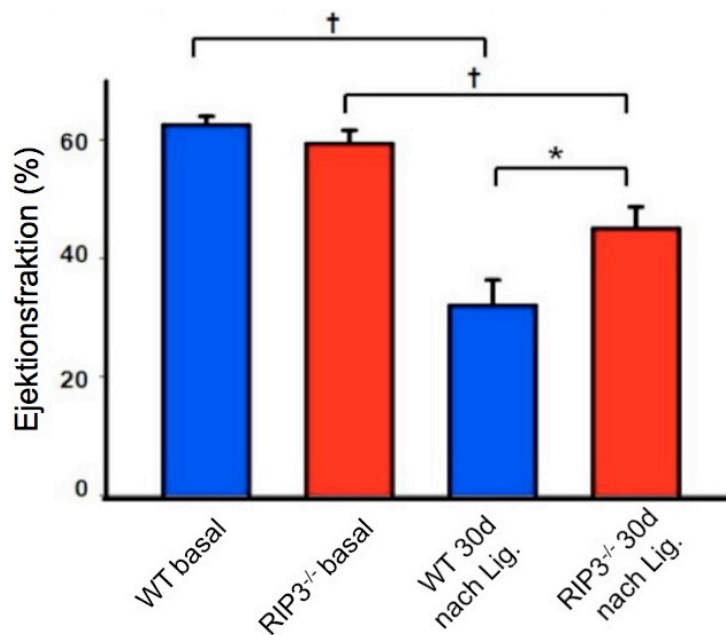


Abbildung 34: Ejektionsfraktion. Messung der Ejektionsfraktion mittels Echtzeit-MRT vor und 30 Tage nach LAD-Ligatur (45% ± 3,6% vs. 32% ± 4,4%, P<0,05, n = 12).

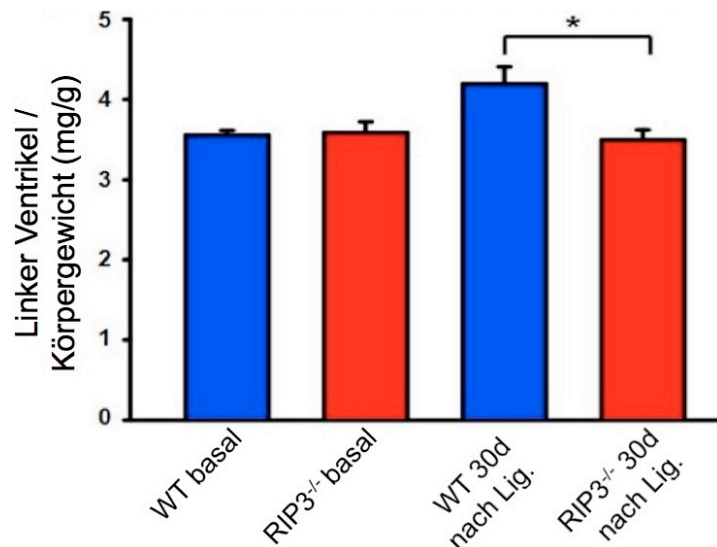


Abbildung 35: Linksherzhypertrophie. Bestimmung des Quotienten aus Gewicht des linken Ventrikels zum Körpergewicht der Maus vor und 30 Tage nach LAD-Ligatur sowie Rückschluss auf Hypertrophie des linken Ventrikels (-17% vs. WT \pm 7%, $P < 0,05$, $n = 12$)

Eine Kaplan-Meier-Kurve zeigt den uniformen Verlauf der Überlebensrate operierter $RIP3^{-/-}$ -Mäuse sowie Wildtyp-Kontrolltiere (**Abb. 36**). Nach ca. 35 Tagen wurden alle Versuchstiere zur Organentnahme getötet.

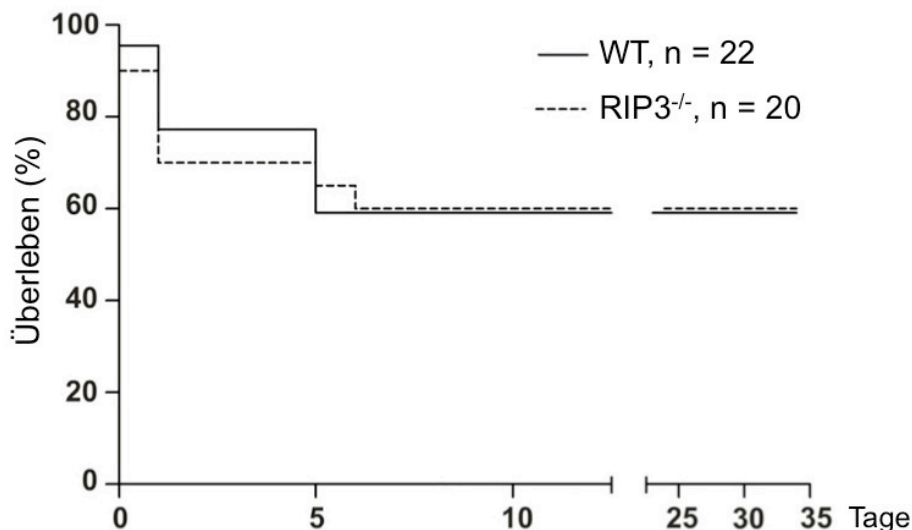


Abbildung 36: Kaplan-Meier-Kurve nach LAD-Ligatur von $RIP3^{-/-}$ - und WT-Mäusen

Zusammenfassend zeigen die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Resultate, dass RIP3 eine wichtige Rolle im Rahmen der Myokardischämie spielt: RIP3 wird unter Ruhebedingungen im Herzen exprimiert und im ischämischen Myokard hochreguliert. Zudem bildet RIP3 mit RIP1 in Kardiomyozyten $TNF\alpha$ -abhängig einen Komplex und induziert Nekrose in NRVCM. Mäuse mit konstitutiv deletiertem RIP3 präsentieren signifikant weniger Entzündungszeichen im Infarktgebiet sowie herabgesetzte ROS- und Troponin T-Spiegel. Wegweisend sind darüber hinaus die signifikant bessere Auswurfleistung und geringere Linksherz-Hypertrophie 30 Tage nach LAD-Ligatur in $RIP3^{-/-}$ - Herzen.

4 Diskussion

Publizierte Daten legen nahe, dass das Ausmaß der RIP3-Expression mit der funktionellen Relevanz der programmierten Nekrose oder Nekroptose korreliert (He, Wang et al. 2009). Aus diesem Grund haben wir in einem ersten Kontrollexperiment die endogene Expression von RIP3 im Herzen von Mäusen nachgewiesen (**Abb. 5**) und die Hypothese aufgestellt, dass Nekroptose als neu definierter Zelltodmechanismus im Herzen eine wichtige Rolle spielt und womöglich negatives Remodeling im ischämischen Myokard vermittelt. Speziell die Funktion der Serin-Threonin-Kinase RIP3 im Zusammenhang mit negativem Remodeling nach Herzinfarkt wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

4.1 RIP1-RIP3-Interaktion in NRVCM

Wie in der Einleitung bereits dargelegt, geht RIP3 eine Bindung mit der verwandten Serin-Threonin-Kinase RIP1 ein und initiiert damit den Signalweg der Nekroptose (Cho, Challa et al. 2009). Die RIP1-RIP3-Bindung konnte in unserer Arbeit mittels Co-Immunopräzipitation *in vitro* bisher nur in RIP3-überexprimierenden NRVCM, jedoch nicht bei endogener RIP3-Expression, nachgewiesen werden (**Abb. 8**). Die alleinige zVAD-Caspasen-Inhibierung und TNF- α -Stimulierung reichte nicht für eine RIP1-RIP3-Interaktion aus. Desweiteren konnten unsere bisherigen Versuche einer Co-Immunopräzipitation mit RIP1 und RIP3 aus dem Herzgewebe 24 h-operierter und scheinoperierter Versuchstiere keine RIP1-RIP3-Bindung *in vivo* bestätigen. In RIP3-überexprimierenden NRVCM zeigte interessanterweise die RIP1-RIP3-Komplexbildung nach 30 bis 60 min TNF- α -Stimulation im Immunoblot ein Maximum als Hinweis für eine schnelle und kurzweilige Initiierung dieses pronekrotischen Komplexes, welcher nach 4 h kaum noch detektierbar war (**Abb. 8**). Daraus schließen wir, dass RIP3 *in vivo* unmittelbar nach Hypoxie-abhängigem TNF- α -Anstieg mit RIP1 den sogenannten Nekrosom-Komplex initiiert und diese Bindung kurzfristig wieder aufgelöst wird. Somit wurden Proteine aus Herzgewebe zum Nachweis einer RIP1-RIP3-Interaktion mittels Co-Immunopräzipitation 24 h nach induziertem Herzinfarkt möglicherweise bisher zum falschen Zeitpunkt gewonnen.

In einem weiteren Immunoblot wurde RIP1 in RIP3-überexprimierenden NRVCM signifikant weniger detektiert als bei Überexpression von Kinase-inaktivem RIP3

(Abb. 9). Ursächlich könnte eine Konformationsänderung von RIP1 nach Bindung an RIP3 sein, zudem ist bereits in der Einleitung erwähnt worden, dass RIP3 aktiv RIP1 phosphoryliert. Nach adenoviraler Überexpression eines RIP3-Kinase-inaktiven Mutanten wurde ebenso wie nach AdV LacZ-Infektion kein Verlust der RIP1-Detektion nachgewiesen, als wichtiger Hinweis für die essentielle Kinaseaktivität zur RIP1-RIP3-Komplexbildung und Nekroptose-Initiierung. Zur genaueren Untersuchung der Kinaseaktivität von RIP3 wurden in RIP3-überexprimierenden NRVCN signifikant mehr phosphorylierte Proteinresiduen (**Abb. 10**) nachgewiesen als bei Überexpression einer RIP3-Kinase-inaktiven Mutante. Der Nachweis von vermehrtem Ubiquitin-Protein nach RIP3-Überexpression (**Abb. 11**) auf Höhe von aktivem RIP3 (100 kDa) lässt vermuten, dass RIP3 selbst oder andere Moleküle auf derselben Höhe ubiquitiniert werden, wohingegen bei Überexpression von Kinase-inaktivem RIP3 kein vermehrtes Ubiquitin detektiert wurde. Diese Hypothese sollte in zukünftigen Experimenten mithilfe einer Co-Immunopräzipitation mit Ubiquitin und RIP3 im Immunoblot genauer untersucht werden.

Nachweis von adenoviral überexprimiertem RIP3 in NRVCN (**Abb. 6**) sowie endogenem RIP3 in L929-Maus-Fibroblasten (**Abb. 7**) zeigte regelhaft eine Steigerung im Molekulargewicht von ursprünglich 55 kDa auf cirka 100 kDa. Wir vermuten einerseits, dass aktives RIP3 eine kovalente Bindung mit mehreren Molekülen des Proteins Ubiquitin eingeht. Andererseits könnte die Gewichtsverschiebung auf die Formierung eines RIP3-Dimers mit dem Ziel der Autophosphorylierung zurückzuführen sein. Publierte Daten von Wu *et al.* konkretisierten, dass die alleinige RIP1-RIP3-Interaktion nicht zur Nekroptose-Initiierung ausreicht. Ihrer Studie nach gibt erst der Nekrosom-Komplex, bestehend aus RIP1, einem RIP3-Dimer sowie MLKL und nachfolgend PGAM5 den entscheidenden Impuls zur Nekroptose-Aktivierung (Wu, Yang et al. 2014). Daraus schließen wir, dass RIP3 nach Überexpression in NRVCN durch RIP3-RIP3-Bindung und Autophosphorylierung aktiviert und durch dieses RIP3-Dimer das Molekulargewicht gesteigert wird. Nach adenoviraler miRNA-basierter Inhibierung von RIP1 in NRVCN wurde die Zelltodrate nach RIP3-Überexpression nicht vermindert (**Abb. 17**). Daraus schließen wir, dass RIP3-vermittelte Nekroptose auch in Abwesenheit von RIP1 in NRVCN aktiviert wird. Unsere Resultate und bereits publizierte Daten (Wu, Yang et al. 2014) sprechen dafür, dass die alleinige

Herrunterregulierung von RIP1 nicht ausreicht, um Nekroptose zu inhibieren und somit RIP3 im Nekroptose-Signalweg RIP1 übergeordnet zu sein scheint beziehungsweise RIP3 andere noch unbekannte Mechanismen in Gang setzt, die unabhängig von RIP1 Nekroptose initiieren.

4.2 RIP3 aktiviert programmierte Nekrose in NRVCN

Unsere Daten zur *in vitro* RIP3-Überexpression und RIP3-abhängigem NRVCN-Zelltod (gemessen im MTT-Assay, Anstieg von Troponin T im Zellmedium und Propidiumiodid-gefärbten NRVCN in der Durchflusszytometrie) unterstützen die Hypothese, dass nur Kinase-aktives RIP3 in Kardiomyozyten zu einer Nekroptose-Initiierung führt, da nach Überexpression einer RIP3-Kinase-inaktiven Mutante eine signifikant niedrigere Zelltodrate festgestellt wurde (**Abb. 14**). Eine Ursache dafür könnte sein, dass RIP3 bei Verlust der Kinaseaktivität keine Autophosphorylierung und RIP1-Phosphorylierung mehr induzieren kann, welches für die Nekrosom-Formierung essentiell ist (Wu, Yang et al. 2014). Unsere *in vitro* Resultate nach alleiniger zVAD-Caspasen-Inhibierung und TNF- α -Stimulierung zeigten keinen negativen Einfluss auf das Überleben von NRVCN (**Abb. 16**). Der Grund dafür könnte sein, dass RIP3 in Kardiomyozyten unabhängig von Caspasen den Nekroptose-Signalweg initiiert. Allerdings weichen die hier gezeigten Daten von anderen Experimenten mit Jurkat-Zellen (Cho, Challa et al. 2009) oder L929-Zellen (He, Wang et al. 2009) ab, denn im Gegensatz zu NRVCN sind diese Zelllinien sehr anfällig für zVAD- und TNF- α -abhängige Nekroptose. Wir nehmen an, dass RIP3 in NRVCN nicht der Caspase-abhängigen Apoptose unterliegt. Unsere Ergebnisse bestätigen aktuelle Publikationen, die den hohen Stellenwert von RIP3 beim Umschalten zwischen Apoptose und programmierter Nekrose berichten (Newton, Dugger et al. 2014); (Mandal, Berger et al. 2014). Denkbar wäre auch, dass die TNF- α -abhängige Nekroptose-Initiierung erst *in vivo* nachzuweisen ist. Wir haben RIP3 stets *in vitro* adenoviral überexprimiert und andere proinflammatorische und pronekrotische Liganden und Stimuli wie Hypoxie in unseren Zellversuchen nicht berücksichtigt.

4.3 Ko-Lokalisierung von RIP3 und Mitochondrien

Unsere Experimente zur Ko-Lokalisierung von RIP3 und Mitochondrien in NRVCN lassen eine räumliche Nähe und Interaktion von RIP3 mit mitochondrialen Substanzen zur Nekroptose-Initiierung vermuten. Zudem ist bekannt, dass RIP3 über MLKL mit der mitochondrialen Phosphatase PGAM5 interagiert (Wang, Jiang et al. 2012) und somit an der Generierung von Sauerstoffradikalen aus Mitochondrien beteiligt ist (Vanlangenakker, Vanden Berghe et al. 2011). Aktuelle Publikationen diskutieren hingegen kontrovers, ob Mitochondrien überhaupt essentiell für Nekroptose sind (Tait, Oberst et al. 2013).

4.4 RIP3 vermittelt kardiales Remodeling

4.4.1 Frühe postischämische Phase: RIP3-abhängige Entzündung

Im Mittelpunkt unserer Arbeit stand die systematische Erforschung des Ausmaßes der Entzündung postischämischer RIP3-defizienter Herzen verglichen mit Wildtyp-Herzen. Wir stellten die Hypothese auf, dass fehlendes RIP3 einen Schutz vor Entzündung und damit verbundenem postischämischen Remodeling im Herzen darstellt. Frantz *et al.* konnten bereits Entzündungsreaktionen als eine Ursache von kardialem Remodeling belegen (Frantz, Bauersachs et al. 2009). Der Nachweis eines TNF- α -abhängigen RIP1-RIP3-Komplexes in NRVCN nach bereits 30 min sowie hochregulierte Expression von RIP3 in Wildtyp-Herzen bereits 24 h nach Myokardinfarkt implizierten, dass RIP3 kurzfristig durch exogenen Stress wie Hypoxie aktiviert wird. Dies bedeutet eine schnelle Reaktion von RIP3 auf Stresssignale. Die erhöhten Werte von Troponin T und Sauerstoffradikalen in operierten Wildtyp-Mäusen verglichen mit RIP3^{-/-}-Mäusen (**Abb. 28, 29**) deuten auf einen RIP3-abhängigen Zelltod im ischämischen Myokard hin. RIP3^{-/-}-Herzen wurden somit vor schädlichen Sauerstoffradikalen, die an den Mitochondrien als Nebenprodukte der Zellatmung entstehen, geschützt. Der Hochregulierung von Sauerstoffradikalen wird derzeit eine Schlüsselfunktion beim Übergang von kurzfristigen RIP3-abhängigen Zellschäden hin zu langfristigen nachteiligen Fibrosierungen im Herzmuskel (Whelan, Kaplinskiy et al. 2010) zugeschrieben. Auf histologischer Ebene wurde mittels Auszählung CD3-positiver T-Lymphozyten im Perinfarktgebiet bewiesen, dass durch Ischämie aktiviertes RIP3 eine Entzündungsreaktion durch einwandernde T-Lymphozyten drei Tage nach Herzinfarkt begünstigt. Übereinstimmend mit unserer Hypothese wurden RIP3-

defiziente Herzen vor T-Zell-Einwanderung signifikant geschützt (**Abb. 27**). Unsere durchflusszytometrischen Ergebnisse verdeutlichten, dass der proinflammatorische Mechanismus herzspezifisch abzulaufen scheint, da die Gesamtzahl von Leukozyten und T-Zellen im peripheren Blut von Wildtyp- und RIP3^{-/-}-Mäusen sowohl vor als auch nach LAD-Ligatur übereinstimmend war (**Abb. 23**).

4.4.2 Einfluss von Apoptose auf kardiales Remodeling

Auf Grundlage unserer Daten zu RIP3-bedingten Entzündungsreaktionen im Myokard und dem Schutz vor Entzündungssignalen bei Fehlen von RIP3 wurde im nächsten Schritt der Kernfrage nachgegangen, welche Rolle die Apoptose im postischämischen Remodeling spielt. Der fehlende Nachweis von gespaltener Caspase 3 in operierten Herzen auf Proteinebene und mittels histologischer Färbung (**Abb. 24, 25**) sowie der Nachweis Apoptose-untypischer Entzündungsreaktionen im ischämischen Myokard bekräftigten unsere Hypothese, dass RIP3 unabhängig von Apoptose Nekroptose aktiviert und Apoptose somit im kurzfristigen Remodeling-Prozess eine untergeordnete Rolle spielen könnte (Kung, Konstantinidis et al. 2011). Apoptose wird bisher als einzig regulierte Form des Zelltods im kardialen Remodeling eine größere Bedeutung beigemessen (Hirota, Chen et al. 1999). Die Daten zu RIP3-abhängigen, kurzfristigen Entzündungssignalen im postischämischen Herzen beantworten allerdings nicht vollständig die Frage nach den zellulären Auslösern für langfristige, über Jahre entwickelte Fibrose und daran geknüpfte Herzinsuffizienz mit Kardiomyozytenuntergang nicht vollständig und sollten daher Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.4.3 RIP3 vermittelt linksventrikuläres Remodeling im Herzen

Unsere Untersuchungen zur Infarktgröße, Pumpfunktion und Herzmorphologie mittels nicht-invasivem Echtzeit-MRT demonstrierten eine schützende Wirkung auf das postischämische, RIP3-defiziente Herz. Dreißig Tage nach operativem Myokardinfarkt zeigten RIP3^{-/-}-Mäuse eine signifikant bessere Ejektionsfraktion und eine signifikant niedrigere Linksherzhypertrophie verglichen mit Wildtyp-Mäusen (**Abb. 34, 35; Tab. 6**). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei exogenem Stress wie Hypoxie RIP3-abhängige Nekroptose und Entzündungssignale im Myokard aktiviert werden, denn RIP3-defiziente infarzierte Herzen wiesen ein

signifikant verbessertes Remodeling gegenüber Wildtyp-Kontrolltieren auf. Das in unserer Arbeit verwendete Infarkt-Modell der Maus mittels permanenter LAD-Ligatur berücksichtigt allerdings nicht den Aspekt der Reperfusion. Vorübergehende Hypoxie durch Verschluss der LAD und anschließende Reperfusion durch Lösung der LAD-Ligatur könnte ein Auslöser für RIP3-abhängige Nekroptose sein. Bezogen auf den Menschen ist im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes die Zeit kurz nach Wiedereröffnung einer verschlossenen Koronararterie mithilfe eines Stents für das beeinträchtigte Myokard sehr kritisch und klinisch streng zu überwachen. Die Gefahr von beispielsweise erneuten pektanginösen Beschwerden, Reizleitungsstörungen, Papillarmuskelabriss und plötzlichem Herztod ist in den ersten Tagen nach Myokardinfarkt am größten. Zytokine wie TNF- α werden aufgrund von Hypoxie vermehrt ausgeschüttet und durch Reperfusion ins Myokard eingeschwemmt. RIP3 könnte im reperfundierten Myokard Entzündungsprozesse wie T-Zell-Einwanderung aktivieren. Auch aufgrund der klinischen Relevanz einer Koronararterien-Reperfusion für den Menschen sollte der Einfluss von RIP3 auf Entzündungszeichen und Pumpfunktion des Herzen künftig auch im Ischämie-Reperfusion-Modell der Maus untersucht werden.

Unsere Resultate eröffnen eine neue Sichtweise auf die molekularen Zusammenhänge zwischen verschiedenen programmierten Zelltodformen im Herzen. Die Daten stellen vielversprechende neue Ansatzpunkte für protektive Therapien dar, wie beispielsweise eine pharmakologische Behandlung mit spezifischen Nekroptose-Inhibitoren, um die potentiell lebensbedrohlichen Folgen eines Herzinfarktes oder das Endstadium der Herzinsuffizienz frühzeitig zu bekämpfen. Um diesen Mechanismus der programmierten Nekrose im Herzen noch genauer zu verstehen und die in dieser Arbeit zusammengestellten Ergebnisse zu bestätigen, sollen unsere *in vivo* Daten in konstitutiven RIP3 / herzspezifischen Caspase-8-Doppel-Knockout-Mäusen vertieft werden. Dazu wird derzeit eine Doppel-Knockout-Maus, bei der RIP3 konstitutiv und Caspase-8 herzspezifisch deletiert wird, generiert.

Die Ergebnisse unserer Arbeit zu RIP3 im ischämischen Myokard lassen einige Fragen offen und regen neue Diskussionen zur funktionellen Bedeutung der Nekroptose im Herzen an:

- Grundlegend muss darüber debattiert werden, ob Nekroptose überhaupt als Zelltod-Signalweg aktiviert werden kann, wenn Caspasen *nicht* durch virale Caspasen-Inhibitoren aktiv inhibiert werden.
- Gibt es einen RIP1-unabhängigen Aktivator von RIP3?
- Kann Nekroptose überhaupt als eigenständiger Zelltod-Signalweg auftreten, wenn Caspasen aktiv sind?
- Gibt es die Möglichkeit, Nekroptose spezifisch *in vivo* zu detektieren?

4.5 Mögliche Einordnung RIP3-abhängiger Signale im Herzen

Versucht man unsere Ergebnisse in bekannte Daten zu integrieren, ergibt sich das unten abgebildete Modell im Herzen von Wildtyp-Mäusen (**Abb. 37**). Aus unseren Resultaten schlussfolgern wir, dass RIP3 im Herzen unter Ruhebedingungen geringgradig exprimiert wird. Ein akuter Myokardinfarkt (das blaue Kreuz illustriert die LAD-Ligatur) führt zu einer Hochregulierung der RIP3-Expression, Einwanderung von Immunzellen sowie Generierung von Sauerstoffradikalen (**Abb. 37, B**). 30 Tage nach Myokardinfarkt vermittelt RIP3 ungünstiges Remodeling im Herzen (**Abb. 37, C**) und eine verminderte Ejektionsfraktion. Die Lokalisation von RIP3 in räumlicher Nähe zu Mitochondrien (dargestellt als blaue Punkte in der Skizze) konnten wir bisher nur *in vitro* bestätigen. Möglicherweise interagiert RIP3 *in vivo* intrazellulär mit TNF- α -Rezeptor-1-verknüpften Proteinen oder wird in Mitochondrien gespeichert. Mithilfe der spezifischen Extraktion mitochondrialer Proteine zum endogenen RIP3-Nachweis in Mitochondrien sowie mithilfe einer Co-Immunopräzipitation mit TNF-Rezeptor-1 assoziierten Proteinen beziehungsweise mitochondrialen Proteinen aus Herzgewebe operierter Mäuse könnten zusätzliche Informationen generiert werden, die zur Aufschlüsselung des RIP3-abhängigen Signalwegs der Nekroptose helfen würden.

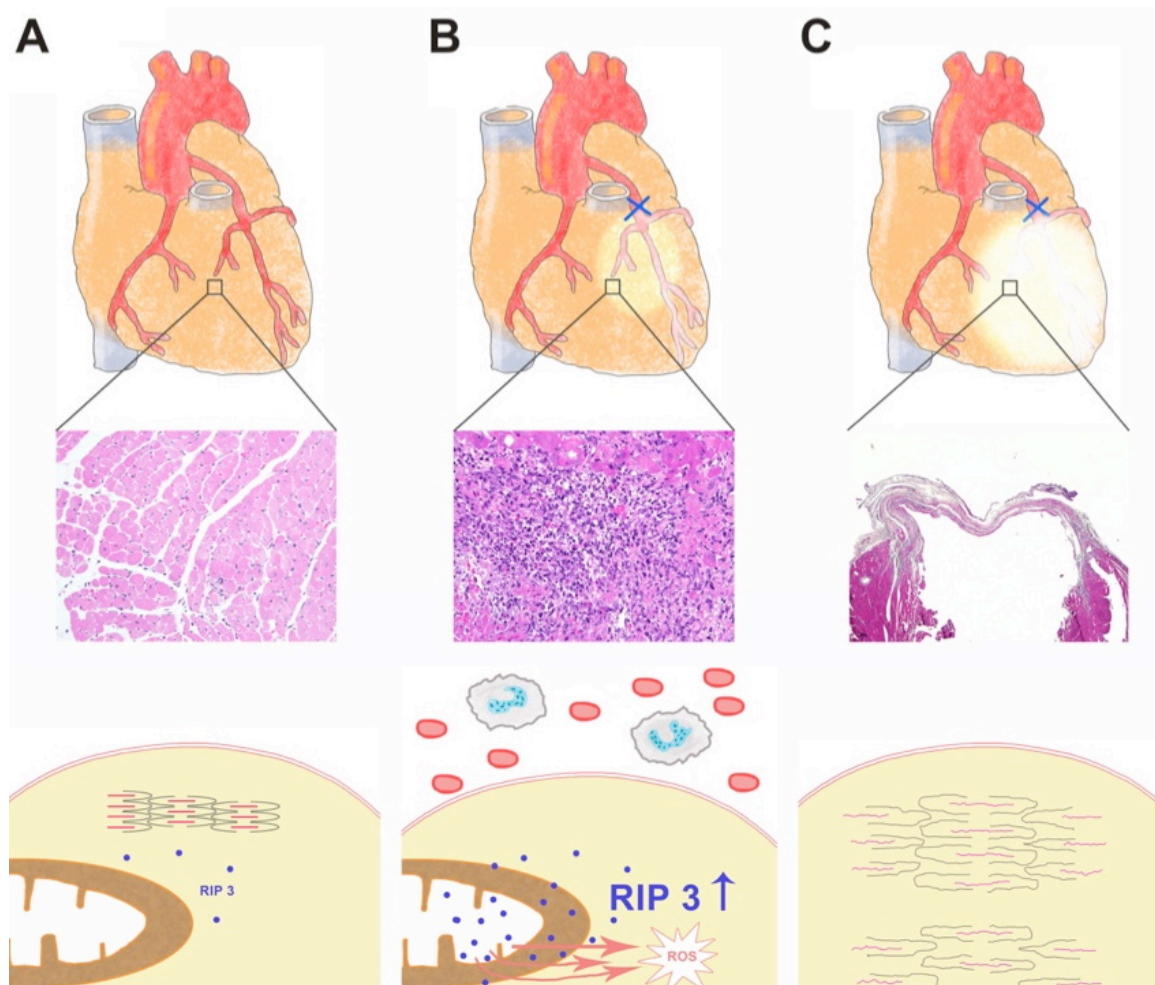


Abbildung 37: Modell zu RIP3- abhängigen Signalen im ischämischen Myokard. Unter Ruhebedingungen wird RIP3 geringfügig im Myokard nachgewiesen (A). Akuter Myokardinfarkt führt zu einer Hochregulierung der RIP3-Expression, Einwanderung von Immunzellen sowie Generierung von Sauerstoffradikalen (B). Langfristig gesehen vermittelt RIP3 ungünstiges Remodeling im Herzen und eine verminderte Ejektionsfraktion 30 Tage nach Myokardinfarkt (C).

5 Zusammenfassung

Lange Zeit wurde programmierter Zelltod mit Apoptose gleichgesetzt und Nekrose als unregelter Prozess verstanden, welcher durch passives Anschwellen von Zellorganellen und Ruptur der Plasmamembran charakterisiert ist. Eine neu erforschte Form des Zelltods, die sogenannte programmierte Nekrose oder Nekroptose wird jedoch, ähnlich der Apoptose, durch noch teils unbekannte Moleküle streng reguliert. Der Serin-Threonin-Kinase Receptor Interacting Protein 3 (RIP3) wird als Schlüsselmolekül der Nekroptose in einigen Organen eine große Bedeutung beigemessen. Allerdings wurde RIP3 im Herzen bisher nicht untersucht. Wir stellten die Hypothese auf, dass in Versuchsmäusen nach operativem Myokardinfarkt RIP3-defiziente Herzen eher vor Entzündung und postischämischer Fibrosierung geschützt werden als Wildtyp-Hezen. Ziel dieser Arbeit war es daher, die bisher nicht untersuchte Rolle von RIP3 in Zusammenhang mit kardialem Remodeling zu untersuchen. Wir konnten *in vivo* zeigen, dass RIP3 unter Ruhebedingungen im Herzen exprimiert und anhand eines Infarktmodells der Maus (Verschluss der linken Koronararterie) im ischämischen Myokard hochreguliert wird. In konstitutiven RIP3^{-/-}-Knockout-Mäusen wurden signifikant weniger Entzündungszellen im Periinfarktgebiet angefärbt sowie signifikant geringere Sauerstoffradikalen- und Troponin T-Spiegel gemessen als in Wildtyp-Kontrolltieren. Echtzeit-MRT-Aufnahmen zeigten eine signifikant verbesserte Auswurfleistung und geringere Linksherz-Hypertrophie in RIP3-defizienten Mäusen 30 Tage nach Myokardinfarkt. *In vitro* - Versuche mit RIP3-überexprimierenden Kardiomyozyten bestätigten eine TNF α -abhängige Interaktion von RIP3 mit dem Bindungspartner RIP1 zur Formierung eines pronekrotischen Komplexes sowie einen Anstieg nekrotischer Kardiomyozyten durch RIP3-abhängige Initiierung der Nekroptose. In Kardiomyozyten wurde eine räumliche Nähe von RIP3 zu Mitochondrien visualisiert, als Hinweis für eine RIP3-abhängige Aktivierung mitochondrialer Moleküle sowie Generierung von Sauerstoffradikalen im Signalweg der Nekroptose. Unsere Resultate könnten einen neuen Ansatzpunkt für die Entwicklung spezifischer molekularer Therapieformen in Patienten mit akutem Myokardinfarkt darstellen, um RIP3-bedingte pronekrotische Signalwege und damit einhergehend irreversiblen Kardiomyozytenverlust im Periinfarktgebiet zu minimieren.

6 Literaturverzeichnis:

Bettermann, K., M. Vucur, J. Haybaeck, C. Koppe, J. Janssen, F. Heymann, A. Weber, R. Weiskirchen, C. Liedtke, N. Gassler, M. Müller, R. de Vos, M. J. Wolf, Y. Boege, G. M. Seleznik, N. Zeller, D. Erny, T. Fuchs, S. Zoller, S. Cairo, M. A. Buendia, M. Prinz, S. Akira, F. Tacke, M. Heikenwalder, C. Trautwein and T. Luedde (2010). "TAK1 suppresses a NEMO-dependent but NF-kappaB-independent pathway to liver cancer." Cancer Cell **17**(5): 481-496.

Cai, Z., S. Jitkaew, J. Zhao, H. C. Chiang, S. Choksi, J. Liu, Y. Ward, L. G. Wu and Z. G. Liu (2014). "Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis." Nat Cell Biol **16**(1): 55-65.

Chen, G. and D. V. Goeddel (2002). "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway." Science **296**(5573): 1634-1635.

Chen, W., Z. Zhou, L. Li, C. Q. Zhong, X. Zheng, X. Wu, Y. Zhang, H. Ma, D. Huang, W. Li, Z. Xia and J. Han (2013). "Diverse sequence determinants control human and mouse receptor interacting protein 3 (RIP3) and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) interaction in necroptotic signaling." J Biol Chem **288**(23): 16247-16261.

Cho, Y. S., S. Challa, D. Moquin, R. Genga, T. D. Ray, M. Guildford and F. K. Chan (2009). "Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation." Cell **137**(6): 1112-1123.

Crabtree, G. R. (1999). "Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT." Cell **96**(5): 611-614.

Declercq, W., T. Vanden Berghe and P. Vandenabeele (2009). "RIP kinases at the crossroads of cell death and survival." Cell **138**(2): 229-232.

Degterev, A., Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G. D. Cuny, T. J. Mitchison, M. A. Moskowitz and J. Yuan (2005). "Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury." Nat Chem Biol **1**(2): 112-119.

Dorn, G. W. (2009). "Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling." Cardiovasc Res **81**(3): 465-473.

Ellis, R. E., J. Y. Yuan and H. R. Horvitz (1991). "Mechanisms and functions of cell death." Annu Rev Cell Biol **7**: 663-698.

Feng, S., Y. Yang, Y. Mei, L. Ma, D. E. Zhu, N. Hoti, M. Castanares and M. Wu (2007). "Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain." Cell Signal **19**(10): 2056-2067.

Frantz, S., J. Bauersachs and G. Ertl (2009). "Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation." Cardiovasc Res **81**(3): 474-481.

Galluzzi, L., O. Kepp and G. Kroemer (2012). "Mitochondria: master regulators of danger signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(12): 780-788.

He, S., L. Wang, L. Miao, T. Wang, F. Du, L. Zhao and X. Wang (2009). "Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha." Cell **137**(6): 1100-1111.

Hirota, H., J. Chen, U. A. Betz, K. Rajewsky, Y. Gu, J. Ross, Jr., W. Muller and K. R. Chien (1999). "Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress." Cell **97**(2): 189-198.

Hsu, H., J. Huang, H. B. Shu, V. Baichwal and D. V. Goeddel (1996). "TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex." Immunity **4**(4): 387-396.

Iwaki, K., V. P. Sukhatme, H. E. Shubeita and K. R. Chien (1990). "Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response." J Biol Chem **265**(23): 13809-13817.

Kaiser, W. J., J. W. Upton, A. B. Long, D. Livingston-Rosanoff, L. P. Daley-Bauer, R. Hakem, T. Caspary and E. S. Mocarski (2011). "RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice." Nature **471**(7338): 368-372.

Kreuz, S., D. Siegmund, P. Scheurich and H. Wajant (2001). "NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling." Mol Cell Biol **21**(12): 3964-3973.

Kubota, T., C. F. McTiernan, C. S. Frye, S. E. Slawson, B. H. Lemster, A. P. Koretsky, A. J. Demetris and A. M. Feldman (1997). "Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha." Circ Res **81**(4): 627-635.

Kung, G., K. Konstantinidis and R. N. Kitsis (2011). "Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart." Circ Res **108**(8): 1017-1036.

Leenders, J. J., Y. M. Pinto and E. E. Creemers (2011). "Tapping the brake on cardiac growth-endogenous repressors of hypertrophic signaling." J Mol Cell Cardiol **51**(2): 156-167.

Lin, Y., A. Devin, Y. Rodriguez and Z. G. Liu (1999). "Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis." Genes Dev **13**(19): 2514-2526.

Linkermann, A., M. J. Hackl, U. Kunzendorf, H. Walczak, S. Krautwald and A. M. Jevnikar (2013). "Necroptosis in immunity and ischemia-reperfusion injury." Am J Transplant **13**(11): 2797-2804.

Mandal, P., S. B. Berger, S. Pillay, K. Moriwaki, C. Huang, H. Guo, J. D. Lich, J. Finger, V. Kasparcova, B. Votta, M. Ouellette, B. W. King, D. Wisnoski, A. S. Lakdawala, M. P. DeMartino, L. N. Casillas, P. A. Haile, C. A. Schon, R. W. Marquis, J. Upton, L. P. Daley-Bauer, L. Roback, N. Ramia, C. M. Dovey, J. E. Carette, F. K. Chan, J. Bertin, P. J. Gough, E. S. Mocarski and W. J. Kaiser (2014). "RIP3 induces apoptosis independent of pronecrotic kinase activity." Mol Cell **56**(4): 481-495.

Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." Cell **114**(2): 181-190.

Newton, K., D. L. Dugger, K. E. Wickliffe, N. Kapoor, M. C. de Almagro, D. Vucic, L. Komuves, R. E. Ferrando, D. M. French, J. Webster, M. Roose-Girma, S. Warming and V. M. Dixit (2014). "Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis." Science **343**(6177): 1357-1360.

Newton, K., X. Sun and V. M. Dixit (2004). "Kinase RIP3 is dispensable for normal NF-kappa Bs, signaling by the B-cell and T-cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4." Mol Cell Biol **24**(4): 1464-1469.

O'Donnell, M. A., D. Legarda-Addison, P. Skountzos, W. C. Yeh and A. T. Ting (2007). "Ubiquitination of RIP1 regulates an NF-kappaB-independent cell-death switch in TNF signaling." Curr Biol **17**(5): 418-424.

Oberst, A., C. P. Dillon, R. Weinlich, L. L. McCormick, P. Fitzgerald, C. Pop, R. Hakem, G. S. Salvesen and D. R. Green (2011). "Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis." Nature **471**(7338): 363-367.

Reimer, K. A., J. E. Lowe, M. M. Rasmussen and R. B. Jennings (1977). "The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs." Circulation **56**(5): 786-794.

Schaefer, S., C. R. Malloy, J. Katz, R. W. Parkey, L. M. Buja, J. T. Willerson and R. M. Peshock (1988). "Gadolinium-DTPA-enhanced nuclear magnetic resonance imaging of reperfused myocardium: identification of the myocardial bed at risk." J Am Coll Cardiol **12**(4): 1064-1072.

Sun, L., H. Wang, Z. Wang, S. He, S. Chen, D. Liao, L. Wang, J. Yan, W. Liu, X. Lei and X. Wang (2012). "Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase." Cell **148**(1-2): 213-227.

Sun, M., F. Dawood, W. H. Wen, M. Chen, I. Dixon, L. A. Kirshenbaum and P. P. Liu (2004). "Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility

of myocardial rupture and left ventricular dysfunction." Circulation **110**(20): 3221-3228.

Tait, S. W., A. Oberst, G. Quarato, S. Milasta, M. Haller, R. Wang, M. Karvela, G. Ichim, N. Yatim, M. L. Albert, G. Kidd, R. Wakefield, S. Frase, S. Krautwald, A. Linkermann and D. R. Green (2013). "Widespread mitochondrial depletion via mitophagy does not compromise necroptosis." Cell Rep **5**(4): 878-885.

Takimoto, E. and D. A. Kass (2007). "Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling." Hypertension **49**(2): 241-248.

Thome, M., P. Schneider, K. Hofmann, H. Fickenscher, E. Meinel, F. Neipel, C. Mattmann, K. Burns, J. L. Bodmer, M. Schröter, C. Scaffidi, P. H. Krammer, M. E. Peter and J. Tschopp (1997). "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors." Nature **386**(6624): 517-521.

Vanden Berghe, T., N. Vanlangenakker, E. Parthoens, W. Deckers, M. Devos, N. Festjens, C. J. Guerin, U. T. Brunk, W. Declercq and P. Vandenabeele (2010). "Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features." Cell Death Differ **17**(6): 922-930.

Vanlangenakker, N., T. Vanden Berghe, P. Bogaert, B. Laukens, K. Zobel, K. Deshayes, D. Vucic, S. Fulda, P. Vandenabeele and M. J. Bertrand (2011). "cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production." Cell Death Differ **18**(4): 656-665.

Vieira, M., J. Fernandes, L. Carreto, B. Anuncibay-Soto, M. Santos, J. Han, A. Fernández-López, C. B. Duarte, A. L. Carvalho and A. E. Santos (2014). "Ischemic insults induce necroptotic cell death in hippocampal neurons through the up-regulation of endogenous RIP3." Neurobiol Dis **68**: 26-36.

Wang, L., F. Du and X. Wang (2008). "TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways." Cell **133**(4): 693-703.

Wang, Z., H. Jiang, S. Chen, F. Du and X. Wang (2012). "The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways." Cell **148**(1-2): 228-243.

Weber, K. T., J. S. Janicki, S. G. Shroff, R. Pick, R. M. Chen and R. I. Bashey (1988). "Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium." Circ Res **62**(4): 757-765.

Welz, P. S., A. Wullaert, K. Vlantis, V. Kondylis, V. Fernández-Majada, M. Ermolaeva, P. Kirsch, A. Sterner-Kock, G. van Loo and M. Pasparakis (2011). "FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation." Nature **477**(7364): 330-334.

Whelan, R. S., V. Kaplinskiy and R. N. Kitsis (2010). "Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance." Annu Rev Physiol **72**: 19-44.

Wu, X. N., Z. H. Yang, X. K. Wang, Y. Zhang, H. Wan, Y. Song, X. Chen, J. Shao and J. Han (2014). "Distinct roles of RIP1-RIP3 hetero- and RIP3-RIP3 homo-interaction in mediating necroptosis." Cell Death Differ **21**(11): 1709-1720.

Zhang, D. W., J. Shao, J. Lin, N. Zhang, B. J. Lu, S. C. Lin, M. Q. Dong and J. Han (2009). "RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis." Science **325**(5938): 332-336.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: TNF- α -abhängiger Zelltod	4
Abbildung 2: Nekrosom-Komplex	6
Abbildung 3: BP-Reaktion	31
Abbildung 4: LR-Reaktion	31
Abbildung 5: Expression von RIP3 in Organen der Maus	47
Abbildung 6: Endogene RIP3-Expression sowie Überexpression und Inhibierung in NRVCM	48
Abbildung 7: Expression von RIP3 in L929-Zellen	49
Abbildung 8: Co-Immunopräzipitation	50
Abbildung 9: Abnahme des detektierbaren RIP1 nach RIP3-Überexpression	51
Abbildung 10: Nachweis phosphorylierter Proteine in NRVCM	51
Abbildung 11: Mögliche Ubiquitinierung von RIP3 in NRVCM	52
Abbildung 12: Troponin T-Konzentration im NRVCM-Medium	53
Abbildung 13: MTT-Assay	53
Abbildung 14: Durchflusszytometrie PI-positiver NRVCM	54
Abbildung 15: Durchflusszytometrie PI-positiver NRVCM nach TNF α -/zVAD-Stimulation	55
Abbildung 16: miRNA-basierter RIP1-Knockdown	56
Abbildung 17: Nachweis von molekularem RIP3 in NRVCM	57
Abbildung 18: Ko-Lokalisation von RIP3 und Mitochondrien in NRVCM	58
Abbildung 19: Unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten in NRVCM	59
Abbildung 20: Ultrastruktur von Mitochondrien in NRVCM	60
Abbildung 21: Hochregulierung von RIP3 nach experimentellem Myokardinfarkt	61
Abbildung 22: HE-Färbung von extrakardialen Gewebe	61
Abbildung 23: Vergleichbare Leukozytenspiegel in RIP3 ^{-/-} - und WT-Mäusen	62
Abbildung 24: Fehlende Spaltung von Caspase 3 nach Myokardinfarkt	63
Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung von gespaltenen Caspase 3	63
Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung endothelialer Zellen	64
Abbildung 27: Einwanderung von CD3-positiven T-Zellen	65
Abbildung 28: Messung reaktiver Sauerstoffspezies	65
Abbildung 29: Troponin T-Konzentration <i>in vivo</i>	66
Abbildung 30: Färbung von Kollagenanteilen operierter Herzen	67
Abbildung 31: Genexpression von TNF- α	68
Abbildung 32: Repräsentative MRT-Bilder mittels kurzer Herzachse	69

Abbildung 33: Regulation Hypertrophie-assoziiierter Gene	70
Abbildung 34: Ejektionsfraktion	71
Abbildung 35: Linksherzhypertrophie	71
Abbildung 36: Kaplan-Meyer-Kurve	72
Abbildung 37: Modell zu RIP3-abhängigen Signalen im ischämischen Myokard	80

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Reagenzien	28
Tabelle 2: PCR-Standardprogramm eines Thermocyclers	28
Tabelle 3: PCR-Programm für Gateway [®] -Klonierung	29
Tabelle 4: Standard-Reaktionsansatz für qRT-PCR	34
Tabelle 5: Standardprogramm für die qRT-PCR	35
Tabelle 6: Morphologische und funktionelle Herz-Parameter im MRT	70

9 Veröffentlichungen

Internationale Kongressbeiträge:

American Heart Association - Scientific Sessions 2012, Los Angeles, CA (USA)
 „Programmed Necrosis Mediates Adverse Remodeling after Myocardial Infarction“
N. CARTER, M. LÜDDE, N. FREY et al. (2012)

Teile dieser Doktorarbeit wurden veröffentlicht in:

Cardiovascular Research (2014 Jun 11; 103, 206-216. Doi: 10.1093/crv/cvu146):
 „RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction“.

M. LÜDDE*, M. LUTZ*, **N.CARTER***, N. FREY¹ et al.

* Erstautoren; ¹ Korrespondenzautor

10 Lebenslauf

Name Natalie Carter
 Geburtstag 29. September 1989
 Geburtsort Hamburg
 Familienstand Ledig

HOCHSCHULSTUDIUM

10/2008 - 10/2014 *Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*
Studium der Humanmedizin
 14.10.2014 Staatsexamen und Abschluss des Medizinstudiums (Note: 2,6)

Wissenschaftliche Tätigkeiten

seit 06/2011 *Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel*
Labor für Molekulare Kardiologie
Dissertation unter Prof. Dr. med. N. Frey
 „Charakterisierung der Funktion des *Receptor Interacting Protein 3* (RIP3) im Herzen nach Myokardischämie“

05/2012 - 04/2013 *Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung e.V.*
Doktoranden-Stipendium

- Isolierung von Herzmuskelzellen aus Ratten
- Assistenz bei Herzoperationen an Mäusen

07/2013 *Bruhn-Stiftung*
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Förderpreis

- Förderung der experimentellen Forschung während des Medizinstudiums

PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN

06/2014 *Cardiovascular Res.* (2014 Jun 11; **103**, 206-216. Doi: 10.1093/crv/cvu146)
 „RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodeling after myocardial infarction“
 Autoren: M. LÜDDE*, M. LUTZ*, **N.CARTER***, N. FREY¹
 * Erstautoren
¹ Korrespondenzautor

11/2012 *Hot Topics in Protection of Ischemic Myocardium*
AHA Scientific Sessions 2012, Los Angeles (USA)
 „Programmed Necrosis Mediates Adverse Remodeling after Myocardial Infarction“
N. CARTER, M. LÜDDE, N. FREY (2012)

PRAKTISCHES JAHR

04 - 07/2014 *Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel*

Innere Medizin

12/2013 - 04/2014 *Städtisches Krankenhaus Kiel GmbH*
Chirurgie

08 - 12/2013 *Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel*
Gynäkologie und Geburtshilfe

ZUSATZQUALIFIKATIONEN

2012 - 2013 *Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*
Zertifikatstudium Sexualmedizin

- Verbesserung der Sexualanamnese
- Störungen und Forensik in der Sexualmedizin

SCHULBILDUNG

06/2008 *Gymnasium Hochrad, Hamburg*
Allgemeine Hochschulreife

BERUFLICHER WERDEGANG

seit 16.03.2015 **Assistenzärztin am Klinikum Fulda gAG**
Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe
Chefarzt: PD Dr. T. Hawighorst

SONSTIGE KENNTNISSE

Englisch Fließend
Französisch Grundkenntnisse

11 Danksagungen

Für meine Dissertation schulde ich sehr vielen Menschen meinen herzlichsten Dank.

Ich danke Herrn Professor Frey für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seinem Labor und für die wertvolle Unterstützung bei der Lösung auftauchender Fragen und Probleme. Darüber hinaus möchte ich mich für sein Engagement in der Förderung meiner wissenschaftlichen Karriere und sein uneingeschränktes Vertrauen bedanken, welches er mir unter anderem für die aktive Teilnahme am weltweit größten Kardiologen-Kongress der AHA in Los Angeles 2012 geschenkt hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. M. Lüdde für die exzellente und vertrauensvolle Zusammenarbeit. Jede Phase dieser Arbeit wurde durch ihn intensiv, professionell und stets motiviert betreut und seine wegweisenden Ideen haben wesentlich zum Erstellen dieser Dissertation beigetragen.

Ich danke allen Mitarbeiter/innen der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. N. Frey für ihre Geduld und Unterstützung beim Erlernen molekularbiologischer Methoden. Hervorzuheben ist dabei die wertvolle und kompetente Zusammenarbeit mit Frau Vanessa Mangels. Ich möchte mich bei Vanessa für ihre jederzeit herzliche und tatkräftige Unterstützung und die daraus entstandene Freundschaft bedanken. Den Mitarbeiterinnen Frau Gabriele Brunke, Frau Susanne Hille, Frau Franziska Dierck und Frau Violetta Harazin möchte ich für ihre unermüdliche Bereitwilligkeit, fachliche Fragen mit mir zu erörtern, bedanken.

Dankbar anerkennen möchte ich auch die ausgezeichnete chirurgische Arbeit von Herrn Dr. med. Matthias Lutz. Seine Operationen am Herzen von Versuchsmäusen haben zu hervorragenden Ergebnissen geführt.

Frau Dr. rer. nat. Justyna Sosna danke ich für ihre ausgezeichnete und akribische Hilfe bei durchflusszytometrischen Untersuchungen. Herzlichen Dank für die zahlreichen konstruktiven Gespräche und für die Auswertung der eindrucksvollen Ergebnisse.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. med. Lüllmann-Rauch und bei Frau Dagmar Niemeier für ihre ausgezeichneten elektronenmikroskopischen Untersuchungen sowie konstruktiven inhaltlichen Anmerkungen und Ratschlägen bei der Auswertung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ich möchte mich bei der Familie Prof. Dres. Hans Dietrich und Annegret Bruhn für deren großzügigen Förderpreis der Bruhn-Stiftung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel 2013 bedanken, die Bruhn-Stiftung fördert und ermutigt jährlich junge Nachwuchswissenschaftler zu medizinischer Forschung auf höchstem Niveau.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Tobias Diewock und bei Herrn Alexander Bernt für die kritische Durchsicht meines Manuskripts und das geduldige Korrekturlesen bedanken.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern. Danke dafür, dass sie immer das Beste für meine Schwestern und mich tun. Ohne ihre liebevolle und emotionale Unterstützung wäre mir weder das Medizinstudium noch die Doktorarbeit möglich gewesen.

Kopie der Genehmigung von Tierversuchsvorhaben

Ministerium für Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume
des Landes Schleswig-Holstein



Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Herrn
Dr. Mark Lüdde
Klinik für Kardiologie und Angiologie
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 6
24105 Kiel

Ihr Antrag vom: 16.11.2010

Mein Zeichen: V 312-72241.121-4 (5-1/11)

Herr Butschereit

Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:

Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
Tierschutzbeauftragter der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Olshausenstraße 40
24098 Kiel

26. Januar 2011

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Dr. Lüdde,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 15. Juli 2009 (BGBl. I S. 1950), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Untersuchung des Einflusses des Moleküls Receptor interacting Kinase-3 (RIP3)
auf die Myokardischämie der Maus

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 36 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Januar 2013 befristet.
Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.
3. Leiter des Versuchsvorhabens:
Herr Prof. Dr. Norbert Frey

4. Sein Stellvertreter:
Herr Dr. Matthias Lutz
5. Wechselt der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
6. Verantwortlicher Tierarzt nach § 9 Abs. 2 Nr. 8 Tierschutzgesetz:
Herr Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
7. Weitere Nebenbestimmungen:
Die Genehmigung beschränkt sich zunächst auf den Versuchsabschnitt 1 mit jeweils 10 Versuchstieren sowie 8 Kontrolltieren pro Gruppe. Danach ist ein Zwischenbericht vorzulegen.
Zusätzlich zur postoperativen Schmerztherapie ist eine Lokalanästhesie der Thoraxwand vorzunehmen.

Die Bestimmungen der §§ 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 9 Abs. 1 Tierschutzgesetz genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Sekulla



Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Herrn
Dr. Mark Lüdde
Klinik für Innere Medizin III
Kardiologie und Angiologie
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Schittenhelmstr. 12
24105 Kiel

Ihr Antrag vom: 22.12.2011

Mein Zeichen: V 312-72241.121-4 (5-1/11)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:
Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
Tierschutzbeauftragter der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Olshausenstraße 40
24098 Kiel

23. Februar 2012

Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken

Sehr geehrter Herr Dr. Lüdde,

aufgrund Ihres o. a. Antrages können im Rahmen meiner Genehmigung vom 26. Januar 2011 für das Versuchsvorhaben „Untersuchung des Einflusses des Moleküls Receptor interacting Kinase-3 (RIP3) auf die Myokardischämie der Maus“ weitere 100 Mäuse verwendet werden.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Sekulla