

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

**Untersuchung zur Spezies-spezifischen Regulation von Nekroptose durch  
Caspasen in humanen U-937-Zellen**

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

vorgelegt von  
Jaqueline Klausewitz  
aus Witten

Kiel 2021



1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dieter Adam, Institut für Immunologie

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Karina Reiß, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 01.10.2021

gez.: Prof. Dr. Petra Bacher

Meinem Großvater

Jürgen Klausewitz

(1940-2003)

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
1.1    Caspasen - Schlüsselmoleküle zellulärer Prozesse .....	1
1.2    Apoptose .....	3
1.3    TNF-Superfamilie.....	4
1.3.1    TNF-Rezeptor 1 und 2 .....	5
1.3.2    Signalkaskaden von TNF-R1 .....	6
1.4    Regulierte Nekrose.....	8
1.4.1    Nekroptose.....	9
1.4.1.1    Ablauf der Nekroptose.....	10
1.4.2    Nekroptose aus klinischer Sicht .....	12
1.5    Von der Maus zum Menschen – eine Spezies-spezifische Rolle von Caspase -8 in der Regulation der Nekroptose?.....	14
1.6    Ziel der Arbeit.....	15
2. Material und Methoden.....	16
2.1    Materialien .....	16
2.1.1    Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Kits .....	16
2.1.2    Verwendete Geräte und Materialien.....	17
2.1.3    Verwendete Antikörper .....	19
2.1.4    Verwendete siRNAs (small interfering RNAs) und Konstrukte .....	20
2.1.5    Zelllinie.....	20
2.2    Methoden.....	21
2.2.1    Herstellung von Zelllysaten.....	21
2.2.2    Eosin Färbung.....	21
2.2.3    Bestimmung der Proteinkonzentration .....	21
2.2.4    Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Membranintegrität .....	22
2.2.5    Elektrophorese .....	22

2.2.5.1	Westernblot .....	23
2.2.6	Koimmunpräzipitation .....	23
2.2.7	Transfektion .....	24
2.2.8	Herstellung von CRISPR/Cas Knockout Zelllinien.....	25
2.2.9	Dichtezentrifugation – Ficoll-Gradient.....	25
2.2.10	Statistische Analyse.....	26
3.	Ergebnisse .....	27
3.1	U-937 Zellen als Modellorganismus.....	27
3.1.1	Marker des Zelltodes der U-937-Zellen .....	27
3.2	Caspase-8-defiziente U-937-Zellen. ....	29
3.2.1	Merkmale des Zelltodes in den Caspase-8-defizienten Zellen und Inhibitoren des Zelltodes .....	31
3.3	Caspase-10-defiziente U-937-Zellen .....	34
3.3.1	Merkmale des Zelltods der Caspase-10-defizienten Zellen und Inhibitoren des Zelltodes .....	34
3.4	Herunterregulierung weiterer Nekroptose-relevanter Proteine.....	35
3.4.1	Einfluss der Nekroptose-relevanten Proteine in den Caspase-8-defizienten Zellen.....	35
3.4.2	Einfluss der Nekroptose-relevanten Proteine in den Caspase-10-defizienten Zellen.....	37
3.5	Veränderungen des Nekrosoms.....	39
4.	Diskussion .....	42
4.1	Spezies-spezifischer Einfluss von Caspase-8 in Maus und Mensch.....	42
4.1.1	Caspase-8 und Caspase-10 sind beide an der Ausführung des Zelltods beteiligt .....	43
4.1.2	Caspase-10 spielt beim Menschen auch bei der Nekroptose eine wichtige Rolle ....	44
4.2	Aufbau des Nekrosoms .....	46
4.3	Substrate der beiden Initiatorcaspasen.....	47
4.3.1	Vergleich der Caspase-8 bei Maus und Mensch .....	49
4.4	Unabhängigkeit des Einflusses der einzelnen Nekroptose-relevanten Proteine .....	49

4.5	Unterschiedliche Phänotypen durch eine genetische Deletion von Caspase-8 und Caspase-10 .....	50
4.6	Nekroptose als mögliche Alternative in der Tumortherapie .....	52
4.7	Fazit und Ausblick.....	54
5.	Zusammenfassung.....	55
6.	Summary .....	57
7.	Literaturverzeichnis.....	59
	Eidesstattliche Erklärung.....	72
	Danksagung .....	73

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifikation der Caspasen.....	2
Abbildung 2: TNF-R1 vermittelten Signalwege, welche entweder zu einem Überleben oder zum Zelltod führen.....	7
Abbildung 3: Marker der Nekroptose in den U-937-Zellen .....	27
Abbildung 4: Caspase-8-Defizienz der U-937-Zellen .....	29
Abbildung 5: Merkmale der durch TNF ausgelösten Nekroptose in den Caspase-8- defizienten U-937-Zellen.....	31
Abbildung 6: Veränderungen des Zelltodverhaltens in den Caspase-8-defizienten Zellen, wenn zusätzlich weitere nekroptotische Proteine herunterreguliert worden sind .....	35
Abbildung 7: Veränderungen des Zelltodverhaltens in den Caspase-10-defizienten Zellen, wenn zusätzlich weitere nekroptotische Proteine herunterreguliert worden sind .....	37
Abbildung 8: Bestandteile des Nekrosoms und die Veränderung der Zusammensetzung in Bezug auf die Defizienz von Caspase-8 oder Caspase-10 in den U-937-Zellen.....	40
Abbildung 9: Defekte der Apoptose.....	50

## Abkürzungsverzeichnis

ALPS	Autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom
Apaf-1	Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSA	Bovines Serumalbumin
CARD	caspase activation and recruitment domain
CASc	Caspase-katalytische-Region
CEDs	Caspase-8-defizienter Status
cFLIP	zelluläres FLICE-inhibitorisches Protein
cFLIP <sub>L</sub>	zelluläres FLICE-inhibitorisches Protein, lange Isoform
cFLIP <sub>S</sub>	zelluläres FLICE-inhibitorisches Protein, kurze Isoform
clAPs	zelluläre Inhibitoren der apoptotischen Proteine
CL	Cardiolipin
CYLD	Cylindromatosis
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DD	death domain; Todesdomäne
DED	death effector domain; Todes-Effektor-Domäne
DIABLO	direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI
DISC	death-inducing signaling complex
DR	Todesrezeptoren
DUB	Deubiquitinierungsenzym
FADD	Fas-associated protein with death domain
FasL	Fas Ligand
FLICE	FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme
GFP	green- fluorescent- protein
HSV	Herpes simplex Virus
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IP	Immunpräzipitation
LUBAC	linear ubiquitination chain assembly complex

MAP	mitogen-activated protein
MLKL	mixed lineage kinase domain like pseudokinase
NaF	Natriumfluorid
Nec-1	Necrostatin-1
Nec-1s	stabiles Necrostatin-1
NF-κB	nuclear factor-κB
NSA	necrosulfonamide
NT	non-targeting
PARP1	Poly (ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	phosphate buffered saline
PCD	programmed cell death
PI	Propidium Iodid
PIPs	Phosphatidylinositolphosphate
pMLKL	phosphorylated mixed lineage kinase domain like pseudokinase
RHIM	RIP homotypisches Interaktions-Motiv
RIPK	Rezeptorinteraktions-Serin/Threonin-Protein-Kinase
RN	Regulierte Nekrose
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelektrophorese
siRNA	small interfering RNA
Smac	second mitochondria-derived activator of caspases
SODD	silencer of death domains
TACE	tumour necrosis factor alpha converting enzyme
TAK1	transforming growth factor-β-activated kinase 1
TNF	tumour necrosis factor
TNF-R1	tumour necrosis factor receptor 1
TNF-R2	tumour necrosis factor receptor 2
TRADD	TNF receptor type 1-associated death domain protein

TRAF	TNF receptor associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
WT	Wildtyp
zVAD-fmk	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon

## 1. Einleitung

Ohne ein ausgeglichenes Verhältnis von Überleben und Zelltod kann sich kein Lebewesen entwickeln, es handelt sich um eines der essentiellsten Vorgänge der Welt. 1842 wurde der Prozess des physiologischen Zelltodes erstmals beschrieben (Vogt, 1842). Fast ein Jahrhundert später wurde das Konzept des programmierten Zelltods (PCD; programmed cell death) als ein wichtiger zellulärer Mechanismus deklariert, der in viele humane Pathologien involviert ist (Lockshin und Williams, 1964). Wiederum 20 Jahre danach wurde unter anderem von Ellis und Horvitz das genetische Programm der Apoptose entschlüsselt (Ellis und Horvitz, 1986). Apoptose wird inzwischen definiert als genetisch regulierter Zelltod, welcher in den Zellen über die Aktivierung von Caspasen vermittelt wird (Galluzzi et al. 2012a; Galluzzi et al. 2018) und stellt die typische, und am besten untersuchte Form des regulierten Zelltodes dar. Lange Zeit wurde angenommen, Apoptose sei in ihrer Komplexität einzigartig, während die Nekrose hingegen unkontrolliert und zufällig ablaufe und mit vielen Krankheiten negativ assoziiert wurde. In den letzten Jahren wurde jedoch erkannt, dass auch eine geregelte Form dieser Zelltodart existiert, man fasst sie unter dem Begriff der regulierten Nekrose (RN) zusammen. Es wird in Zukunft immer wichtiger werden, die Schlüsselmoleküle und Pathophysiologie dieser Art des Zelltods besser zu verstehen, um ihre Rolle bei der Entstehung und Bekämpfung entzündlicher und tumor-assozierter Pathologien besser einschätzen zu können und neue Therapiemöglichkeiten im Kampf gegen zum Beispiel Schlaganfälle oder neurodegenerative Krankheiten zu entwickeln (Degterev und Yuan, 2008; Vandenabeele et al. 2010; Wang et al. 2017; Chen et al. 2019).

### 1.1. Caspasen - Schlüsselmoleküle zellulärer Prozesse

Caspasen gehören zu der Gruppe der Cysteinproteasen, welche spezifische Tetrapeptidmotive erkennen und ihre Substrate im Anschluss an Aspartatreste spalten (Sakamaki et al. 2015). Sie sind nicht nur essentiell für den Ablauf der Apoptose (siehe auch Abschnitt 1.2), sondern auch maßgeblich involviert in Prozesse, wie zelluläre Proliferation, Differenzierung und Entzündungsvorgänge (Lamkanfi et al. 2007; Sakamaki und Satou, 2009; Shalini et al. 2015). Eine Vielzahl von unterschiedlichen Caspasen wurde sowohl in hoch entwickelten Säugetieren, als auch in einfachsten Lebensformen, wie dem Süßwasserpolypen Hydra,

gefunden, ihre Anzahl und einige ihrer Eigenschaften sind dabei einzigartig für jede Spezies. Trotzdem werden immer wieder orthologe Sequenzen und Aktivierungsmuster aufgedeckt, ein Indiz dafür, dass ein Teil ihrer Sequenz evolutionär konserviert geblieben ist (Sakamaki und Satou, 2009). Beim Menschen wurden bisher 13 verschiedene Caspasen (Caspase-1 bis -10, -12, -14, -16) entdeckt. Bei Säugetieren insgesamt fand man bisher 18 verschiedene Caspasen (Shalini et al. 2015), die jeweils anhand von phylogenetischen Verbindungen und funktionellen Zusammenhängen in Untergruppen eingeteilt werden können. Dabei werden apoptotische Caspasen, die wiederum in Initiator- (Caspase-2, -8 bis -10) und Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) unterteilt werden, von inflammatorischen Caspasen (Caspase-1, -4 und -5, -11 und -12) unterschieden (Sakamaki und Satou, 2009; Shalini et al. 2015).

Caspases	Species specificity
Inflammation	Caspase-1 Mouse, Human
	Caspase-4 Human
	Caspase-5 Human
	Caspase-11 Mouse
	Caspase-12 Mouse, Human
Apoptosis	Caspase-2 Mouse, Human
	Caspase-9 Mouse, Human
	Caspase-8 Mouse, Human
	Caspase-10 Human
Executioner	Caspase-3 Mouse, Human
	Caspase-6 Mouse, Human
	Caspase-7 Mouse, Human
Caspase-13 Bovine	
Caspase-14 Mouse, Human	
Caspase-16 Mouse, Human	

Todes-  
Effektor-  
Domäne (DED)

**Abbildung 1: Klassifikation der Caspasen.** Caspase-1, -4, -5, -11 und -12 werden als inflammatorische Caspasen bezeichnet. Zu den apoptoseinduzierenden Caspasen gehören Caspase-2, -8, -9 und -10 als Initiator- und Caspase-3, -6 und -7 als Effektorcaspasen. Caspase-13, -14, -16 und auch -18 haben andere Funktionen.

**Abbildung verändert nach Shalini et al. 2015.**

Initial liegen die Caspasen als inaktives Proenzym vor, bestehend aus einer Prodomäne am Amino-Ende und einer Caspase-katalytischen-Region (CASC) am Carboxy-Ende. Sie werden entweder durch Selbstspaltung oder durch Spaltung vorangegangener Caspasen aktiviert und setzen sich im aktiven Zustand dann aus jeweils zwei kleinen und zwei großen Einheiten zusammen (Sakamaki und Satou, 2009; Shalini et al. 2015). Caspase-14, genauso wie die

Effektor-Caspasen, besitzen eine kurze Prodomäne, wohingegen die Initiator- und inflammatorischen Caspasen eine lange Prodomäne aufweisen. Diese Prodomäne setzt sich bei den Caspasen-8, -10 und -18 aus repetitiven Motiven zusammen und wird Todes-Effektor-Domäne (DED) genannt. Die Prodomäne der meisten übrigen Caspasen wird als Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD, caspase activation and recruitment domain) bezeichnet, mit der es ihnen möglich ist, eine Zell-Zell-Interaktion einzugehen. Über die DED und CARD, welche jeweils aus einer 6-Helix-Kettenstruktur bestehen, wird der Aufbau von großen Signalkomplexen ermöglicht (Lamkanfi et al. 2007; Sakamaki und Satou, 2009; Shalini et al. 2015).

## 1.2 Apoptose

Die Induktion der Apoptose über die Aktivierung von Caspasen stellt die am besten charakterisierte Form des Zelltodes dar und galt lange Zeit als Einzige, die kontrolliert ausgeführt werden kann (Degterev et al. 2008; Galluzzi et al. 2012a; Vanden Berghe et al. 2014). Sie mündet in der Schrumpfung der Zelle, das Chromatin kondensiert und es kommt zur Fragmentierung des Nukleus und der DNA. Ein Anschwellen der Organellen wird nicht beobachtet, dafür bildet die Plasmamembran Blasen aus und es formen sich apoptotische Körperchen, welche von Phagozyten abtransportiert werden, ohne dass es zu einem Schaden der Nachbarzellen kommt. Eine Entzündungsreaktion findet bei der Apoptose in der Regel nicht statt (De Almagro und Vucic, 2015). 1972 wurde der, diesem Vorgang zugrunde liegende, biochemische Mechanismus erstmals beschrieben (Kerr et al. 1972). Grundsätzlich kann die Apoptose über zwei verschiedene Signalwege vermittelt werden. Der extrinsische Signalweg beginnt mit der Aktivierung von, sich auf der Zelloberfläche befindlichen, Todesrezeptoren (DR), welche zur TNF (tumour necrosis factor) -Rezeptor-(TNF-R) Superfamilie gehören. Im Zellinneren entsteht ein sogenannter todes-induzierender Signalkomplex (DISC, death-inducing signaling complex), zu dem neben TRADD (TNF receptor type 1-associated death domain protein) und FADD (Fas-associated protein with death domain) auch pro-Caspase-8 und pro-Caspase-10 gehören (Locksley et al. 2001; Galluzzi et al. 2012a; Chen et al. 2019). Die Rekrutierung der Caspasen führt zu ihrer autokatalytischen Aktivierung und zur nachfolgenden Aktivierung von Effektor-Caspasen, wie Caspase-3 und -7 (Ashkenazi und Dixit, 1999; Galluzzi et al. 2012a).

Der intrinsische, oder auch Mitochondrien-basierte, Signalweg hat seinen Anfang im Gegensatz dazu bereits im Inneren der Zelle, als Folge von DNA-Schäden, zellulärem Stress, fehlenden Wachstumsfaktoren oder auch zum Beispiel Steroiden (Galluzzi et al. 2012b; Lalaoui et al. 2015; Galluzzi et al. 2018). Pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie (B-cell lymphoma 2), wie Bax und Bak, sorgen dafür, dass die äußere Membran der Mitochondrien durchlässig wird. Dadurch wird es weiteren pro-apoptotischen Proteinen, wie Cytochrom C und Smac (second mitochondria-derived activator of caspases)/DIABLO (direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI), die sich eigentlich im intermitochondrialen Raum befinden, ermöglicht, ins Zytosol einzuströmen (Du et al. 2000; Bratton und Salvesen, 2010; Lalaoui et al. 2015). Dort bildet Cytochrom C zusammen mit Desoxyadenosintriphosphat (dATP) und Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) das sogenannte Apoptosom, welches verantwortlich ist für die Caspase-9-vermittelte Aktivierung der Caspase-3 und -7 (Du et al. 2000; MacEwan, 2002; Galluzzi et al. 2012a; Kaiser et al. 2013; Sakamaki et al. 2015).

Darüber hinaus verstärken sich diese beiden Signalwege auch gegenseitig. Bid, ein ebenfalls pro-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie, wird von Caspase-8 gespalten. Das gespaltene Bid interagiert mit Bax und Bak, was wiederum zu einer verstärkten Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien führt (MacEwan, 2002; He et al. 2009; Kaiser et al. 2013; Shalini et al. 2015). Auf der anderen Seite induziert Smac den Abbau von cIAP 1 und 2 (zelluläre Inhibitoren der apoptotischen Proteine), was schlussendlich wieder in einer verstärkten Aktivierung von Caspase-8 mündet (Du et al. 2000; Wang et al. 2008).

### 1.3 TNF-Superfamilie

Mitglieder der TNF-Superfamilie gehören zu den am besten untersuchten Zytokinen des Immunsystems und sind nicht nur für die pro-inflammatorische Antwort der Zelle verantwortlich, sondern spielen auch bei Prozessen wie Zellinteraktion, Zelldifferenzierung und Zelltod eine entscheidende Rolle (Aggarwal et al. 2012; Brenner et al. 2015). Zu dieser Proteinfamilie gehören 19 verschiedene Liganden, wie etwa TNF, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) oder FasL (Fas Ligand). Die zugehörige TNF-Rezeptor-Superfamilie umfasst 29 unterschiedliche Rezeptoren, dazu werden TNF-R1 (tumour necrosis factor receptor 1) oder -R2 (tumour necrosis factor receptor 2) und Fas gezählt (Aggarwal et al.

2012). Die Rezeptoren sind charakterisiert durch eine cysteinreiche extrazelluläre Domäne, an die die Liganden binden können. Unterschieden wird jeweils die intrazelluläre Domäne jener Rezeptoren, welche eine Todesdomäne (DD; death domain) tragen und somit als Todesrezeptoren bezeichnet werden, von solchen, die diese Domäne nicht tragen (MacEwan, 2002; Lavrik et al. 2005; Aggarwal et al. 2012).

Das wohl bekannteste Mitglied der TNF-Superfamilie ist TNF. Es wird als 26 kDa großes trimeres Transmembranprotein von aktivierten Makrophagen, NK-Zellen oder auch B-/T-Lymphozyten exprimiert und kann durch die Metalloproteinase TACE (tumour necrosis factor alpha converting enzyme) in die lösliche 17kDa Form gespalten werden (MacEwan, 2002; Aggarwal et al. 2012; Brenner et al. 2015). Dysregulationen des TNF und weiterer Mitglieder der Superfamilie werden mit vielerlei Krankheiten, wie der Rheumatoiden Arthritis oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen in Verbindung gebracht (Aggarwal et al. 2012; Brenner et al. 2015). Anhand der Blockierung des TNF-Signalweges, zum Beispiel in Form von monoklonalen Antikörpern wie Infliximab, wurden bereits wichtige therapeutische Erfolge bei der Behandlung verschiedener entzündlichen Erkrankungen erzielt, es sollten jedoch auch die erheblichen systemischen Nebenwirkungen beachtet werden, die auftreten können (Aggarwal et al. 2012; Brenner et al. 2015).

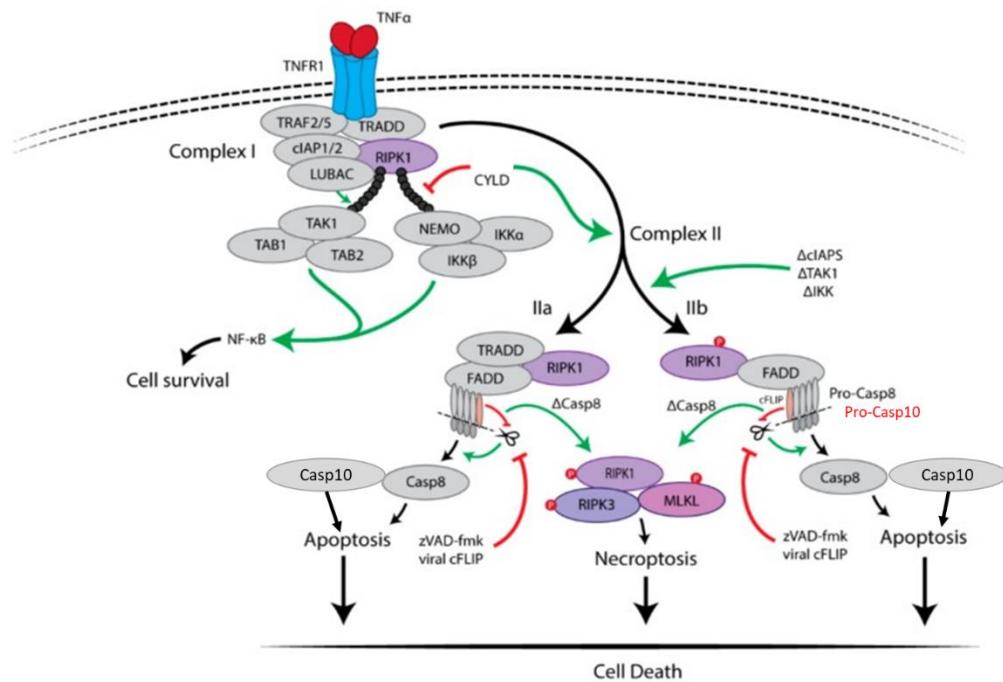
### **1.3.1 TNF-Rezeptor 1 und 2**

Es wurden zwei verschiedene Rezeptoren gefunden, an die TNF binden kann und die sich in ihrer Struktur, ihrem Expressionsmuster und in ihren Signalwegen unterscheiden. TNF-R1 wird auf nahezu allen Zellen exprimiert, die Expression von TNF-R2 (TNF-Rezeptor 2) ist auf Endothelzellen und Zellen des Immunsystems beschränkt (Faustman und Davis, 2010, Aggarwal et al. 2012). Jedoch gibt es auch Zellen, die beide Rezeptoren exprimieren, die genauen Abläufe, wann welcher Rezeptor angesteuert wird, sind jedoch noch nicht vollständig untersucht. Anders als der TNF-R2, welcher über TRAF 1 und 2 (TNF receptor associated factor 1 und 2) vor allem den NF-κB (nuclear factor-κB) Signalweg im Sinne des Zellüberlebens ansteuert und nur in wenigen Zelllinien überhaupt zum Zelltod führen kann (McEwan, 2002), gehört TNF-R1 zu den Todesrezeptoren der TNF-Superfamilie. Seine Aktivierung kann somit sowohl zum Überleben, als auch zum Tod der Zelle führen (Hsu et al. 1996b; Brenner et al. 2015).

### 1.3.2 Signalkaskaden von TNF-R1

Das Gleichgewicht zwischen Zellüberleben und Zelltod wird anhand von Proteinkomplexen entschieden, die unter bestimmten Bedingungen innerhalb der Zelle entstehen. In der unstimulierten Zelle wird die Todesdomäne des TNF-R1 durch ein Molekül namens SODD (silencer of death domains) blockiert, was die Bindung anderer Moleküle bzw. die Autoaggregation des Rezeptors verhindert (Jiang et al. 1999). Kommt es nun zur TNF-Bindung, verändert sich die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors (Brenner et al. 2015), SODD löst sich und es kommt zur Rekrutierung des Adapterproteins TRADD, welches über seine eigene Todesdomäne an jene DD von TNF-R1 bindet (Hsu et al. 1995). Zu diesem membranständigen „Komplex I“ gehört weiterhin RIPK1 (Rezeptorinteraktions- Serin/Threonin-Protein-Kinase 1), welches ebenfalls mit TRADD über sich an beiden Proteinen befindlichen Todesdomänen verbunden ist. TRAF2 und TRAF5 (TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 2 und 5) stabilisieren diesen Komplex und rekrutieren die Ubiquitin-E3-Ligasen cIAP1 und 2 und LUBAC (linear ubiquitination chain assembly complex) (Hsu et al. 1996a; Hsu et al. 1996b; Micheau und Tschopp, 2003; Sun und Wang, 2014; Vanden Berghe et al. 2014; Silke und Bring, 2010; Wang et al. 2017; Chen et al. 2019).

Im Verbund des TNF-R1-Signalkomplexes kommt es zu einer Dimerisierung der cIAPs, woraufhin sie selbst und auch LUBAC, RIPK1 mit Polyubiquitin-Ketten versehen (Bertrand et al. 2008; Varfolomeev et al. 2008; Dynek et al. 2010; Chen et al. 2019), wozu auch TRAF2 selbst in der Lage zu sein scheint (Lee et al. 2004; O'Donnell et al. 2007). Zu diesem Zeitpunkt spielt die Kinase-Funktion von RIPK1 eine eher untergeordnete Rolle, benötigt wird es in ubiquitiniert Form vor Allem als Gerüstprotein (Lee et al. 2004, Polykratis et al. 2014). In dieser Funktion trägt RIPK1 zur Rekrutierung wichtiger Komponenten des NF-κB- und MAP (mitogen-activated protein)-Kinase-Signalweges bei, wie den TAK1-Komplex (transforming growth factor-β-activated kinase 1) oder auch den IκB-Kinase (IKK) Komplex (Shim et al. 2005; Haas et al. 2009; Chen, 2012). Die Aktivierung der zugehörigen Signalwege führt zur Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern und dort zur Expression von Genen wie c-FLIP (zelluläres FLICE-inhibitorisches Protein), die letztendlich zum Überleben der Zelle führen, was in Abbildung 2 schematisch aufgezeigt ist (Scheidereit, 2006; Bertrand et al. 2008; Vanden Berghe et al. 2014; Chen et al. 2019).



**Abbildung 2: TNF-R1 vermittelte Signalwege, welche entweder zum Überleben oder zum Tod der Zelle führen.** Die Bindung von TNF an TNFR1 löst verschiedene Signalwege aus, dazu gehören NF-κB, Apoptose und Nekroptose. Bei der Stimulation des Rezeptors induziert TNF die Entstehung eines membrangebundenen Komplexes I, dieser besteht aus RIPK1, TRADD, TRAF2/5, LUBAC und cIAP1/2. In diesem Komplex induzieren cIAP 1/2 und LUBAC eine Lys63-verknüpfte Polyubiquitinierung von RIPK1, welche als Gerüst für die weitere Rekrutierung von Komplexen aus IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und NEMO bzw. TAK1, TAB1 and TAB2 dient. Diese Ereignisse führen schließlich zur Aktivierung des NF-κB Signalweges und zum Überleben der Zelle. Die Deubiquitinierung von RIPK1 durch CYLD induziert eine Loslösung von TRADD und RIPK1 vom TNFR1 und führt entweder zur Entstehung von Komplex IIa oder Komplex IIb. FADD, pro-Caspase-8 und pro-Caspase-10 werden zu TRADD und RIPK1 rekrutiert und formen Komplex IIa, was in der Aktivierung der Caspaseen durch Oligomerisation und Spaltung resultiert. In Abwesenheit von cIAP1/2, TAK1 oder dem IKK-Komplex entsteht Komplex IIb, dieser enthält RIPK1, FADD, pro-Caspase-8 und pro-Caspase-10, nicht aber TRADD. Die Caspaseen induzieren dann Apoptose. RIPK3-basierte Nekroptose wird induziert, wenn die Caspase-Aktivität geblockt ist, zum Beispiel durch cFLIP oder den Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone). **Abbildung verändert nach Chen et al. 2019.**

Kommt es nun aber zu der Situation, dass das Deubiquitinierungsenzym (DUB) Cyldromatosis (CYLD) die Polyubiquitin-Ketten von RIPK1 entfernt, wird ein zweiter Komplex im Zytosol gebildet, welcher in zwei verschiedenen Varianten erscheinen kann (Wertz et al. 2004; O'Donnell et al. 2011; Moquin et al. 2013; Lalaoui et al. 2015; Feoktistova et al. 2020). Komplex IIa setzt sich aus TRADD, RIPK1, FADD, cFLIP (zelluläres FLICE-inhibitorisches Protein), Caspase-8 und Caspase-10 zusammen (Micheau und Tschopp, 2003; Wang et al. 2008; Vanden Berghe et al. 2014; Galluzzi et al. 2018; Chen et al. 2019).

Eine ähnliche Situation entsteht in Abwesenheit der cIAPs, welche zum Beispiel durch Smac abgebaut werden können oder durch die Inhibierung des TAK1- oder IKK-Komplexes. RIPK1 bildet dann im Zytosol die Grundlage von Komplex IIb (Du et al. 2000; Bertrand et al. 2008; Wang et al. 2008; He et al. 2009; Vanden Berghe et al. 2014). Dieser ist ähnlich aufgebaut wie Komplex IIA, nur dass in ihm kein TRADD zu finden ist (Feoktistova et al. 2011; Vanden Berghe et al. 2014; Chen et al. 2019). Solange anti-apoptotische Proteine in ausreichend hoher Konzentration vorliegen, kann die Aktivierung von Caspase-8 verhindert werden. Lässt ihre Konzentration jedoch nach, kann cFLIP die Caspase-8-Aktivität nicht mehr ausreichend inhibieren und die Bildung beider Komplexe kann letztendlich in der Apoptose-Kaskade münden (Micheau und Tschopp, 2003; Boatright et al. 2004, Pop et al. 2011). Zusammenfassend führt also Komplex I zum Überleben der Zelle, Komplex IIA führt zu einer Caspase-8-vermittelten Apoptose, unabhängig von der Kinase-Aktivität von RIPK1 und Komplex IIb resultiert in einer Caspase-8-vermittelten Apoptose, welche jedoch auf der Kinase-Aktivität von RIPK1 basiert (Wang et al. 2008; Polykratis et al. 2014; Chen et al 2019). Aus beiden Komplexen kann unter der Bedingung der Caspasen-Inhibierung auch der Signalkomplex des Nekrosoms entstehen. Der genaue Mechanismus, der dazu führt, wird unter 1.4.1.1 beschrieben, die unterschiedlichen Signalwege sind in Abbildung 2 noch einmal zusammengefasst.

## 1.4 Regulierte Nekrose

Zusätzlich zur nicht regulierbaren, zufällig ablaufenden Nekrose, konnten auch immer wieder Caspase-unabhängige Formen des PCD beobachtet werden, welche unter anderem als Back-up-Mechanismus funktionieren, wenn die Signalwege der Apoptose blockiert sind (He et al. 2009; Vandenabeele et al. 2010; Sosna et al. 2013). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Behandlung mit TNF, je nach getesteter Zelllinie, sowohl Apoptose als auch Nekrose auslösen konnte. Manche Zelllinien waren bei zusätzlicher Behandlung mit einem Caspase-Inhibitor, wodurch die Apoptose unterdrückt wird, nicht etwa vor dem Zelluntergang geschützt, sondern zeigten sogar eine gesteigerte Zelltodrate (Vercammen et al. 1998; Fricker et al. 2013; Sun und Wang, 2014). Darüber hinaus wurden Gene gefunden, die entscheidend sind für Nekroptose, nicht aber für Apoptose (Hitomi et al. 2008). Im Zuge dessen wurden verschiedene Formen der regulierten Nekrose identifiziert, die sich gewisse morphologische

Merkmale teilen, jedoch allesamt eigene Aspekte des Zelltods aufweisen (Vanden Berghe et al. 2014).

Als die, auf molekularer Ebene, am besten charakterisierte Form der RN hat sich die Nekroptose etabliert (Vandenabeele et al. 2010; Vanden Berghe et al. 2016, siehe 1.4.1), auf die sich die vorliegende Arbeit konzentriert.

Als weitere Formen der regulierten Nekrose können zum Beispiel auch die Ferroptose, jene wird über den intrazellulären Eisenmetabolismus der Zelle reguliert und wurde vor Allem bei neurodegenerativen Erkrankungen gefunden, oder der Parthanatos, bei welchem eine Überaktivierung von PARP1 (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1), vorliegt, aufgeführt werden (Vanden Berghe et al. 2014; Galluzzi et al. 2018).

#### **1.4.1 Nekroptose**

Die Nekroptose stellt eine proinflammatorische Art des Zelltods dar, bei der die hauptsächlichen Schritte Caspase-unabhängig verlaufen. Sowohl das Zytoplasma, als auch die zellulären Organellen schwellen massiv an, die Zellmembran platzt und es kommt zu einer Freisetzung der Zellbestandteile ins Gewebe, wodurch eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird (De Almagro und Vucic, 2015; Chen et al. 2019). Der Begriff Nekroptose ist 2005 eingeführt worden, um eine TNF vermittelte regulierte Nekrose zu beschreiben, bei der die Caspase-Aktivität blockiert ist (Degterev et al. 2005).

RIPK1 war das erste Molekül, welches man als am Signalweg der regulierten Nekrose beteiligt, beschrieben hat (Holler et al. 2000; Degterev et al. 2008). In den folgenden Jahren wurde herausgefunden, dass RIPK3 (Rezeptorinteraktions-Serin/Threonin-Protein-Kinase-3) eines der entscheidendsten Schlüsselmoleküle darstellt, wobei RIPK3 die Nekroptose wohl auch unabhängig von RIPK1 auslösen kann (Cho et al. 2009; He et al. 2009; Vanlangenakker et al. 2011; Moujalled et al. 2013). MLKL (mixed lineage kinase domain like pseudokinase) wurde als entscheidender nachgeschalteter Mediator identifiziert (Zhao et al. 2012; Sun et al. 2012; Vanden Berghe et al. 2014). Vermittelt werden kann die Nekroptose unter anderem über Mitglieder der TNF Rezeptorfamilie, wozu neben dem TNF-Rezeptor 1, zum Beispiel auch die Toll-like-Rezeptoren oder die TRAIL-Rezeptoren gehören (Vandenabeele et al. 2010; Vanden Berghe et al. 2016; Galluzzi et al. 2018).

Ein besseres Verständnis der Abläufe der Nekroptose wurde durch die Entdeckung

inhibitorischer Moleküle erreicht, dazu gehören neben Nec-1 (Necrostatin-1) (Degterev et al. 2008) und NSA (necrosulfonamide) (Sun et al. 2012) auch die RIPK3-Inhibitoren GSK'840, GSK'843 und GSK'872 (Kaiser et al. 2013).

#### **1.4.1.1 Ablauf der Nekroptose**

Der Ablauf der Nekroptose kann exemplarisch am Beispiel des TNF-R1 gezeigt werden. Wie bereits unter 1.3.2 beschrieben, entstehen unter bestimmten Bedingungen im Zytosol die Komplexe IIa oder IIb, die beide zur Apoptose führen können.

Unter normalen Umständen wird die Nekroptose durch Caspase-8 unterdrückt, was sich durch ihre Eigenschaft begründet, sowohl RIPK1 und RIPK3, als auch CYLD spalten und somit inaktivieren zu können (Lin et al. 1999; Feng et al. 2007; O'Donnell et al. 2011; Salvesen und Walsh, 2014). Wird Caspase-8 jedoch nicht mehr ausreichend aktiviert oder sogar inhibiert, zum Beispiel durch virale oder chemische Inhibitoren (He et al. 2009; Kaiser et al. 2011; Vanlangenakker et al. 2011; Vanden Berghe et al. 2016; Wang et al. 2017), können beide Komplexe auch zur Nekroptose führen (siehe Abbildung 2) (Chen et al. 2019). Es kommt zu einer Interaktion von RIPK1 und seinem Homolog RIPK3, welches am Serin 227 phosphoryliert und so aktiviert wird und das sogenannte Nekrosom entsteht, eines der bedeutendsten Schlüsselemente der Nekroptose (He et al. 2009; Cho et al. 2009; Li et al. 2012; Vanden Berghe et al. 2014). Derselbe Vorgang konnte in vitro auch in Gang gesetzt werden, wenn Caspase-8 zwar nicht inhibiert, aber RIPK3 überexprimiert wurde (Zhang et al. 2009).

RIPK1 und RIPK3 interagieren über ihre jeweilige RHIM (RIP homotypisches Interaktions-Motiv)-Domäne durch die Ausbildung von Amyloid-ähnlichen-Strukturen miteinander, wodurch ein funktioneller Signalkomplex ausgebildet wird, ohne den keine Nekroptose stattfinden kann (Cho et al. 2009; He et al. 2009; Li et al. 2012; Sun et al. 2012; Chen et al. 2019). Im weiteren Verlauf bindet RIPK3 über seine Kinase-Domäne an die C-terminale Kinase-ähnliche Domäne des MLKL (Murphy et al. 2013), welches beim Menschen an den Stellen Threonin 357 und Serin 358 phosphoryliert wird (Sun et al. 2012; Lalaoui et al. 2015; Chen et al. 2019). Wird MLKL ausgeschaltet, wie in diversen Mauseexperimenten gezeigt, kann auch keine Nekroptose stattfinden (Sun et al. 2012; Zhao et al. 2012; Murphy et al. 2013). MLKL ist zwar ausschlaggebend für die Ausführung der Nekroptose, hat jedoch keinen Einfluss auf die Entstehung des Nekrosoms, da es nur mit RIPK3 und nicht mit RIPK1 interagiert und auch

dessen Phosphorylierung nicht beeinflusst, woraus sich auch schließen lässt, dass MLKL ein dem RIPK3 nachgeschaltetes Element darstellt (Zhao et al. 2012; Wu et al. 2013).

Das normalerweise im Zytosol als inaktives Monomer vorliegende MLKL wird durch die vorangegangene Aktivierung durch RIPK3 in eine andere Konformation überführt und es kommt zur Oligomerisation (Cai et al. 2014; Chen et al. 2014; Dondelinger et al. 2014; Wang et al. 2014; Chen et al. 2019). Das MLKL-Oligomer kann nun über sein N-terminales Ende Phosphatidylinositolphosphate (PIPs) und das Mitochondrien-spezifische Phospholipid Cardiolipin (CL) binden und transloziert daher zu PIP- und CL- angereicherten Regionen in der Plasmamembran (Dondelinger et al. 2014; Wang et al. 2014; Galluzzi et al. 2017; Johnston und Wang, 2018). Über die weiteren Geschehnisse gibt es unterschiedliche Auffassungen, die jedoch in dem Punkt übereinstimmen, dass die Plasmamembran durchlässig wird, wodurch es letztendlich zur Zerstörung der Membranintegrität und somit zur Morphologie der Nekroptose kommt (Wang et al. 2014; Chen et al. 2019).

Auf der einen Seite wird angenommen, dass das membrangebundene MLKL-Oligomer selbst Poren in der Plasmamembran entstehen lassen kann (Dondelinger et al. 2014). Andere Studien zeigten, dass aufgrund der MLKL-Bindung Ionenkanäle in der Membran angetrieben werden und es entweder durch einen Calcium-, einen Natrium-, oder sogar einen Magnesiumeinstrom zum Integritätsverlust der Membran kommt (Cai et al. 2014; Chen et al. 2014, Xia et al. 2016). Darüber hinaus führt die MLKL-Aktivierung bzw. die Entstehung des Nekrosoms zur Akkumulierung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) aus den Mitochondrien (Sakon et al. 2003; Festjens et al. 2006; Cho et al. 2009; Zhao et al. 2012; Sosna et al. 2013). Normalerweise werden diese schnell eliminiert, unter zelltodinduzierenden Bedingungen führen sie jedoch zu einer Unterbrechung des mitochondrialen Membranpotentials und somit zum Untergang der Zelle (Sakon et al. 2003). Insgesamt lässt sich festhalten, dass es für die der MLKL-Aktivierung nachfolgenden Signalwege verschiedene Überlegungen gibt (Wang et al. 2012; Chen et al. 2013). Allein die Aktivierung von MLKL wurde als zellübergreifender, universaler Mechanismus der Nekroptose beschrieben (Zhao et al. 2012), was es zu jenem Schlüsselement macht, wodurch das Nekrosom mit den nachgeschalteten Effektoren verbunden wird (Sun et al. 2012).

Eine darüber hinausgehende Möglichkeit der Regulation der verschiedenen Zelltodarten ist das Zusammenspiel von Caspase-8 mit cFLIP, einem Caspase-8-Homolog. Die Aktivierung der in Komplex II noch als inaktives Proenzym vorliegenden Caspase kann über zwei verschiedene Mechanismen erfolgen. Auf der einen Seite kommt es zur Homodimerisierung von Caspase-8, was dann in ihrer vollständigen Aktivierung mündet und somit zur Apoptose führt. Auf der anderen Seite kann cFLIP, in diesem Fall handelt es sich um cFLIP<sub>L</sub> (zelluläres FLICE-inhibitorisches Protein, lange Isoform), ein Heterodimer mit Caspase-8 bilden und aktiviert sie so zumindest zu einem gewissen Grad (Boatright et al. 2004, Pop et al. 2011). Bei einem geringen zellulären Level von cFLIP<sub>L</sub> hat es einen vor allem proapoptotischen Effekt, da es die Caspase-8-Homodimerisierung erlaubt (Oberst et al. 2011; Cuda et al. 2015). Wenn cFLIP<sub>L</sub> in ausreichend hoher Konzentration vorliegt, wird die Heterodimerisierung mit FLIP<sub>L</sub> der Homodimerisierung mit sich selbst wohl vorgezogen, da die kinetische Barriere dafür vermutlich geringer ist (Boatright et al 2004; Strasser et al. 2009). Das cFLIP<sub>L</sub>/Caspase-8-Heterodimer ist zwar katalytisch aktiv, spaltet jedoch nur eine eingeschränkte Anzahl von Substraten (Pop et al. 2011). So reicht die Aktivität zwar nicht aus, um die Apoptose-Kaskade zu starten, RIPK1 und auch RIPK3 können jedoch von diesen Komplex gespalten und somit inaktiviert werden, wodurch wiederum die Nekroptose verhindert wird (Feoktistova et al. 2011; Oberst et al. 2011; Dillon et al. 2012; Lalaoui et al. 2015; Chen et al. 2019). Bei der Nekroptose spielt jedoch auch cFLIP<sub>S</sub> (zelluläres FLICE-inhibitorisches Protein, kurze Isoform) eine wichtige Rolle. Auch cFLIP<sub>S</sub> bildet ein Heterodimer mit Caspase-8, dieses ist jedoch vollkommen katalytisch inaktiv, was sowohl durch die nicht stattfindende Aktivierung von Caspase-8 die Apoptose verhindert, als auch durch die ausbleibende Spaltung von RIPK1 und RIPK3 in der Nekroptose mündet (Feoktistova et al. 2011; Salvesen und Walsh, 2014).

#### **1.4.2 Nekroptose aus klinischer Sicht**

Nekroptose ist in viele essenzielle Vorgänge des menschlichen Organismus involviert. Man findet sie in physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel der negativen Selektion von Lymphozyten, der Regulierung des Knochenwachstums über einen physiologischen Zelltod von Chondrozyten oder bei der Ovulation (Doerfler et al. 2000; Festjens et al. 2006; Kaczmarek et al. 2013). Auch bei der angeborenen und erworbenen Immunabwehr von malignen und infektiösen Pathogenen durch das Immunsystem spielt die Nekroptose eine entscheidende

Rolle (Galluzzi et al. 2017; Chen et al. 2019). So kann sie als Back-up-Mechanismus in jenen Zellen fungieren, in denen die Caspase-Aktivität und somit die Fähigkeit der Zelle zur Apoptoseinduktion funktionsunfähig gemacht wurde (Festjens et al. 2006; Cho et al. 2009; Mocarski et al. 2011; Kaczmarek et al. 2013; Silke et al. 2015; Wang et al. 2017). Dieses Phänomen ist vor allem bei bestimmten Viren, wie zum Beispiel dem Vaccinia-virus, zu beobachten, da dieses in der Lage ist, Caspase-8-Inhibitoren zu exprimieren und somit die Apoptose zu umgehen (Cho et al. 2009; Kaiser et al. 2011). RIPK3-defiziente Mäuse waren empfänglicher dafür, an einer Infektion durch das Vaccinia-virus zu erkranken bzw. daran zu versterben, als die zu vergleichenden Wildtypen, was die Wichtigkeit der Nekroptose als alternative Zelltodform zur Eliminierung von virusbefallenen Zellen aufzeigt (Cho et al. 2009). Auf der anderen Seite wird die Bedeutung der Nekroptose in Bezug auf virale Infektionen jedoch auch aus der gegensätzlichen Perspektive deutlich. Viren, wie das Cytomegalievirus, können über eigene Proteine mit der RHIM-Domäne von RIPK1 und RIPK3 interagieren und somit das Nekrosom beeinträchtigen (Upton et al. 2010). Das humane Cytomegalievirus ist auch in der Lage, die Nekroptose zu inhibieren, der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht verstanden (Omoto et al. 2015). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das HI-Virus 1 nicht nur Apoptose, sondern auch Nekroptose in infizierten T-Lymphozyten verursacht. Die Blockierung der Nekroptose hemmt dagegen den cytopathischen Effekt des HI-Virus (Pan et al. 2014).

Darüber hinaus kann die Nekroptose auch bei vielen humanen Pathologien beobachtet werden, wie zum Beispiel dem hyperakuten Schock (Cauwels et al. 2003), bei renalen Ischämie-Reperfusions-schäden (Linkermann et al. 2012), chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Günther et al. 2011) oder neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer und Parkinson (Chi et al. 2018; Chen et al. 2019). In Mausmodellen hat sich gezeigt, dass RIPK3-defiziente Mäuse nicht nur weniger stark, sondern auch erst zu einem späteren Zeitpunkt, von Krankheiten wie dem Medikamenten-induzierten Leberschaden (Ramachandran et al. 2013), Atherosklerose (Lin et al. 2013) oder der Zapfen-Degeneration der Retina (Murakami et al. 2012) betroffen waren. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die RIPK3-induzierte Nekroptose in diesen Fällen Teil eines sekundären Schadens ist, der vom Immunsystem selbst, zum Beispiel in Form einer Entzündung, verursacht wird, nachdem dieses mit einer Infektion oder anderweitig hervorgerufenem Schaden konfrontiert wurde (He et al. 2009, Sun und Wang, 2014).

## **1.5 Von der Maus zum Menschen- eine Spezies-spezifische Rolle von Caspase-8 in der Regulation der Nekroptose**

Schon eine ganze Weile ist bekannt, dass RIPK1-defiziente Mäuseembryonen aufgrund einer systemischen Multiorganentzündung infolge massiver Nekroptose perinatal versterben (Kelliher et al. 1998; Rickard et al 2014; Silke et al. 2015). Schaltet man bei diesen Mäusen zusätzlich Caspase-8 aus, überleben die Embryonen zwar bis zur Geburt, versterben jedoch kurz darauf (Rickard et al. 2014). Mäuse, bei denen entweder RIPK3 oder MLKL zusätzlich zu RIPK1 ausgeschaltet wurde, überleben die Geburt und scheinen sich erst einmal normal zu entwickeln, gedeihen aber schlecht und sterben im Verlauf an exzessiver Apoptose (Rickard et al. 2014).

Nur wenn sowohl RIPK1 und RIPK3, als auch Caspase-8 ausgeschaltet wurden, waren die Mäuse vor Entzündung geschützt und entwickeln sich ähnlich, wie die zu vergleichenden Wildtypen (Rickard et al. 2014). RIPK1 scheint also eine sehr wichtige Rolle während der Embryogenese und Entwicklung zu spielen, RIP3 und MLKL werden wohl erst im späteren Leben entscheidend (Murphy et al. 2013; Wu et al. 2013; Newton et al. 2014; Rickard et al. 2014). Auch der alleinige, homozygote, Verlust von Caspase-8 ist für die Mäuse schon vor der Geburt letal. Gerettet werden konnten sie nur durch eine zusätzliche Ausschaltung von RIPK3 (Varfolomeev et al. 1998; Kaiser et al. 2011; O'Donnell et al. 2011). Durch die Ausschaltung oder Inhibierung von Caspase-8 wurde die Induktion massiver Nekroptose beobachtet (Oberst et al. 2011; Dillon et al. 2012; Silke et al. 2015).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bisher alle Studien Caspase-8 als einen Inhibitor der Nekroptose identifiziert haben. Ihre Blockierung oder Defizienz führte zu dem klinischen Bild massiver Nekroptose. Diese Studien wurden jedoch alle mit murinen Zellen durchgeführt. Auch unser Labor konnte bestätigen, dass eine Herunterregulierung von Caspase-8 in murinen Zellen zu einer deutlich gesteigerten Nekroptoserate führte. Deswegen war der naheliegende Gedanke, dass auch in menschlichen Zellen eine Herunterregulierung von Caspase-8 zu einer gesteigerten Nekroptoserate führen würde. Jedoch scheint genau der entgegengesetzte Fall einzutreffen. In mehreren unabhängigen menschlichen Zelllinien hat einer Herunterregulierung von Caspase-8 in unserem Forschungslabor zu einem Schutz vor Nekroptose geführt, während in Pilotexperimenten die Herunterregulierung von Caspase-10 beim Menschen zu einer Nekroptosesteigerung zu führen scheint.

Caspase-8 und Caspase-10 gehören beim Menschen zu einem gemeinsamen Gencluster und sind aneinander gereiht in der gleichen Region auf Chromosom 2 zu finden, gemeinsam mit cFLIP (Sakamaki und Satou, 2009, Shalini et al. 2015). Die beiden Caspasen werden als Proenzym exprimiert und zeigen einen ähnlichen Aufbau, mit jeweils einer aktiven CASc-Protease-Domäne am Carboxy-Ende und einem Tandem-DED-Motiv an der Amino-Prodomäne, was sie einzigartig in Bezug auf die menschlichen Caspasen macht und beiden Caspasen eine Interaktion mit FADD ermöglicht (Lamkanfi et al. 2002; Sprick et al. 2002; Su und Lenardo, 2008; Sakamaki und Satou, 2009, Tummers und Green, 2017). Während Caspase-8 und -10, die von einer gemeinsamen Vorläufercaspase abstammen, in menschlichen Zellen gleichermaßen zu finden sind, ist Caspase-10 evolutionär in Mäusen verloren gegangen (Sakamaki et al. 2015; Salvesen und Walsh, 2014). Es scheint also möglich zu sein, dass Caspase-8 die Rolle von Caspase-10 in Mäusen übernehmen kann oder als wäre Caspase-10 für das Leben der Mäuse nicht mehr nötig (Sakamaki und Satou, 2009).

Der Mechanismus, auf dem diese unerwarteten Unterschiede bei Mensch und Maus basieren, ist bisher jedoch noch völlig unklar.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es daher, zum einen herauszufinden, ob sich die gegensätzlichen Effekte von Caspase-8 und Caspase-10 bestätigen, wenn man die Gene dieser Proteine in der humanen histiozytären Lymphomzelllinie U-937 ausschaltet, wozu die CRISPR/Cas-Technologie genutzt werden sollte. Außerdem sollten in beiden, daraus resultierenden, Caspase-8- und Caspase-10-knock-out Zelllinien weitere Proteine der Nekroptose herunterreguliert werden, um ihren jeweiligen Einfluss auf die Nekroptoserate zu untersuchen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Komponenten des Nekrosoms und der Vergleich seines Aufbaus in den beiden Zelllinien. Ein besseres Verständnis des Einflusses der beiden Caspasen auf die Nekroptose und ihre Spezies-spezifischen Rollen werden in Zukunft sehr wichtig sein für die Entwicklung klinischer Strategien, um Nekroptose im gewünschten Sinne therapeutisch beeinflussen zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Kits

Firma	Chemikalien
Bachem AG, Bubendorf, Schweiz	zVAD –fmk (20 µM)
BASF Bioresearch, Ludwigshafen, Deutschland	TNF (2 mg/ml)
Biochrom, Berlin, Deutschland	Biocoll Separating Solution L-Glutamin 200 mM PBS (phosphate buffered saline) Dulbecco- w/o Ca <sup>2+</sup> w/o Mg <sup>2+</sup> Penicillin-/Streptomycin
Biovision Incorporated, Milpitas, CA, USA	Nec-1s (50 µM)
Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	LumiGLO® Chemilumineszenz Substrate
GE Healthcare, München, Deutschland	Ammoniumperoxodisulfat (APS) TEMED
Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell, Deutschland	Magermilchpulver, Frema Reform
Lonza Group, Basel, Schweiz	Transfektions-Kit (Amaxa <sup>TM</sup> Cell Line Nucleofector <sup>TM</sup> Kit C)
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	β-Mercaptoethanol Glyzerin 85 % (v/v) GSK'872 (10 µM) Salzsäure (HCL) 37 % (v/v)
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	µMACS <sup>TM</sup> Protein G MicroBeads
PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland	Click's RPMI 1640
Promega, Madison, WI, USA	Cell Titer-Glo® Luminescent Viability Assay
Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	Complete <sup>®</sup> Protease-Inhibitor-Cocktail-Tabletten Mini
Roth, Karlsruhe, Deutschland	EDTA Ethanol Glycin Wasserstoffperoxid 30 % (v/v) Methanol Natriumchlorid 99.8 % (w/v) Tris
Serva, Heidelberg, Deutschland	Acrylamid/Bis-solution SDS (Natriumlaurylsulfat) in Pellets
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	Propidium Iodid (PI) Tween <sup>®</sup> 20

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Albumin (BSA) Standard Fetales Kalbsserum (Life Technologies) NP-40 Detergenz Page Ruler™ vorgefärbter Proteinmarker Pierce™ BCA Protein Assay Kit
--	--

## 2.1.2 Verwendete Geräte und Materialien

Firma	Gerät
AGFA, Düsseldorf, Deutschland	Entwicklermaschine CP 1000
BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	FACSCalibur Durchflusszytometer Software: BD CellQuest™ Pro V. 4.0.2 5 ml Polystyrol FACS Tubes, runder Boden
Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland	TL-100 Ultrazentrifuge, SW-32 Rotor Ultra clear™ Zentrifugenröhrchen, 11 x 60 mm
Bender & Hobein, Zürich, Schweiz	Vortex Genie 2™
Biometra, Göttingen, Deutschland	Stromquelle Power Pack P25T
Bio-Rad, München, Deutschland	SDS-PAGE-Kammer Mini Protean II™ Spannungsquelle PowerPac 300 Mini PROTEAN® Tetra System Glasplatten 1.0 mm , 10-Taschen-Kamm
BRAND, Wertheim, Deutschland	Neubauer Zählkammer
Corning Incorporated, Corning, NY, USA	Gewebekulturschalen 100 x 20mm
Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Kühlzentrifuge 5417R, Rotor F45-30-1 I Pipettenständer Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)
Forma Scientific, Marietta, USA	Brutschrank Model 3336
GE Healthcare, München, Deutschland	Amersham Hyperfilm™ Nitrozellulose Blotting-Membran 0.2 µm Whatman™ Filterpapier Grad 3 CHR
GFL, Wunstorf, Deutschland	Wasserbad 1003
Gilson, Middleton, WI, USA	Pipettenständer Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl)
Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	15 und 50 ml Tubes Serologische Pipetten (1, 5, 10, 25, 50 ml) 6- und 12-Kavitätäten Platten Zellkulturflaschen (50, 250, 650 ml) Pipettenspitzen (10/100/200/1000) Cryo.S™ Reaktionsgefäße
Hans-S. Schröder GmbH, Hamburg, Deutschland	Kühltruhe Kryotec -80 °C BSC-1
Hecht-Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland	Mikroskop Objektträger 76 x 26 mm Mikroskop runde Deckgläser 12 mm

Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland	Polymax 1040 Schüttler
Heraeus, Osterode, Deutschland	Sterile Werkbank LaminAir HB2472K Megafuge 1.0R, Rotor BS4402/A Megafuge 16R, Rotor TX-400
Hettich, Tuttlingen, Deutschland	Mikro 200R Zentrifuge
Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland	Pipettierhilfe Pipetus®
IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland	IKA® Magnetrührer mit Heizplatte (RCT basic) IKA® Rütteltisch HS 260 basic
Kern & Sohn, Balingen, Deutschland	KERN 440-47N Präzisionswaage
Kisker, Steinfurt, Deutschland	X-Ray Kassette 24 x 30 cm
Lonza Group, Basel, Schweiz	Amaxa Biosystems Nucleofector® IIb Device
Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA	Wasserfilteranlage Milli-Q
Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	Magnetständer OctoMACS™ Separator µ MACS™ Separationssäulen
National Labnet CO, Edison, NJ, USA	Mini Zentrifuge C-1200
Nunc GmbH&Co. KG Wiesbaden, Deutschland	96-Kavitäten-Platte, unsteril
Ritter GmbH, Schwabmünchen, Deutschland	Pipette groß Ritips®
Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Reaktionsgefäße (0.5, 1.5, 2 ml) Pipettenspitze mit Filter (10, 100, 200, 1000 µl)
Sartorius Group, Göttingen, Deutschland	Präzisionswaage A120S-D1
Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA	Eismaschine Scotsman ice maker AF-10
Severin® Elektrogeräte, Sundern, Deutschland	Wasserkocher
Stuart, Stone, Staffordshire, UK	Roller mixer SRT9
Tecan Gruppe, Männedorf, Deutschland	Infinite M200 ELISA Microplate Reader, Software: i-Control 1.3
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Brutschrank HERAcell 240i CO <sub>2</sub> Inkubator 96-Kavitäten-Platte, steril, flach und rund
Zeiss, Göttingen, Deutschland	Inverses Mikroskop Axiovert 100

### 2.1.3 Verwendete Antikörper

Zielprotein	Firma/ Artikelnummer	Verwendete Verdünnung
<b>Primäre Antikörper</b>		
β-Actin, AC-15	Sigma-Aldrich, München, Deutschland / A1978	1: 10.000
Cleaved-Caspase-3, D175	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA / 9661	1:1.000
Caspase-8, 1C12	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA / 9746	1:1.000
Caspase-10	Abcam, Cambridge, UK / ab 177475	1:1.000
cFLIP, NF6	AdipoGen, Liestal, Schweiz / AG-20B-0056	1:1.000, 1:500
PARP-1	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA / 9542	1:2.000
pMLKL, EPR9514	Abcam, Cambridge, UK / ab187091	1:1.000
RIPK1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland / 610459	1:1.000
RIPK3, E1Z1D	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA / 13526	1:1.000
<b>Sekundäre Antikörper</b>		
Goat anti-mouse IgG Peroxidase-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK	1:10.000
Goat anti-rabbit IgG Peroxidase-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK	1:10.000

## 2.1.4 Verwendete siRNAs (small interfering RNAs) und Konstrukte

Produkt	Katalognummer	Firma
siGENOME CASP8 (A)	D-003466-01	Horizon Discovery, Cambridge, UK
siGENOME CASP8 (B)	D-003466-02	Horizon Discovery, Cambridge, UK
siGENOME CASP8 (C)	D-003466-07	Horizon Discovery, Cambridge, UK
siGENOME CASP10 (A)	D-004402-02	Horizon Discovery, Cambridge, UK
siGENOME CASP10 (B)	D-004402-01	Horizon Discovery, Cambridge, UK
siGENOME CFLIP	M-003772-06	Horizon Discovery, Cambridge, UK
siGENOME RIPK1	D-004445-03	Horizon Discovery, Cambridge, UK
siGENOME RIPK3	D-003534-01	Horizon Discovery, Cambridge, UK
NT	D-001206-13-20	Horizon Discovery, Cambridge, UK
Konstrukt	Vektor	Firma
CASP8 CRISPR/Cas	pCMV-Cas9-GFP CRISP/Cas	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

## 2.1.5 Zelllinie

Als Modellorganismus ist in der vorliegenden Arbeit die menschliche histiozytäre Lymphomzelllinie U-937 verwendet worden, sie stammen im Original von ATCC und wurden unserem Labor durch Prof. Holger Kalthoff (Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Deutschland) zugänglich gemacht. Sowohl die originalen Wildtyp-(WT)-Zellen, als auch die später hergestellten Caspase-defizienten Zellklone, wurden in einem Click's/RPMI 1640-Nährmedium (50/50 % v/v) gehalten, welches mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Penicillin-/Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol in 0.9 % (w/v) NaCl versetzt worden war. Alle zwei Tage wurden die Zellkulturen mit frischem Medium versorgt. Kultiviert wurden sie in einem Brutschrank bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % (w/v).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Um proteinbasierte Analysen durchführen zu können, wurden aus den Zellen entweder direkt Totallysate hergestellt oder es fand eine vorherige Stimulation und Inkubation im Verlauf einer vorgegebenen Zeitkinetik statt. Die sich noch im Nährmedium befindlichen Suspensionszellen wurden mit Hilfe einer 5-minütigen Zentrifugation mit 400 x g bei 4 °C präzipitiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in kaltem PBS gelöst und noch einmal 1 Minute lang zentrifugiert. Die Zellen wurden dann für 10 Minuten auf Eis mit kaltem TNE-Puffer (50 mM Tris pH 8.0, 1 % (v/v) NP-40 , 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 1 mM Natriumorthovanadat, 5 mM NaF (Natriumfluorid) und 10 µg/ml Protease-Inhibitor-Cocktail (Boehringer Complete®) lysiert. Anschließend wurden die Lysate erneut für 10 Minuten mit 20.800 x g und bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde entweder direkt für weitere Analysen verwendet und ansonsten bei -20 °C oder -80 °C aufbewahrt.

### 2.2.2 Eosin Färbung

Um festzustellen, wie viele lebende Zellen sich in einer Zellkultur oder einer Probe befanden, wurden die Zellen in PBS suspendiert. Ein Teil der Probe wurde im Verhältnis 1:1 mit Eosin vermischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgebracht. Lebende Zellen, welche eine intakte Membran besitzen, nehmen den Farbstoff nicht auf und können so von toten, rot gefärbten Zellen unterschieden werden.

### 2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinkonzentration der vorher hergestellten Lysate zu bestimmen, wurden diese mit Pierce® BCA Protein Assay Reagenzien, nach Angaben des Herstellers, versetzt und jeweils in Vergleich zu einem Proteinstandard (Albuminstandard 2 mg/ml) bestimmt. Nach einer 30-minütigen Inkubation der befüllten Platten im Brutschrank bei 37 °C fand die Messung der Proteinkonzentration, mithilfe der entsprechenden Absorption bei 562 nm, mit einem Infinite M200 Microplate reader statt.

## **2.2.4 Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Membranintegrität**

Mithilfe einer durchflusszytometrischen Analyse (FACS) ist es möglich, in einem Zellgemisch quantitativ zwischen toten und lebenden Zellen zu unterscheiden, in dem man den Verlust der Membranintegrität der Zellen detektiert. Zu diesem Zweck wurden jeweils  $1-1.5 \times 10^5$  Zellen auf einer 12-Kavitäten-Platte ausgesät und diese 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag fand eine Stimulation der Zellen und eine Inkubation für weitere 24 Stunden im Brutschrank statt. Anschließend wurden die Zellen gesammelt und mit  $400 \times g$  für 5 Minuten bei  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das übrig bleibende Zellpellet wurde wiederum in kaltem PBS resuspendiert, welches  $4 \text{ } \mu\text{g/ml}$  Propidium Iodid (PI) enthielt. PI kann nur in jene Zellen gelangen, deren Membran aufgrund von Zelltod oder Zellschädigung durchlässig dafür geworden ist. Nun konnte der Verlust der Membranintegrität mit Hilfe des FACSCalibur Durchflusszytometers bei roter Fluoreszenz bestimmt und analysiert werden (Anzahl der PI-positiven Zellen).

## **2.2.5 Elektrophorese**

Proteine können mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Das Trenngel wurde aus 30 % (w/v) Acrylamid, 0.375 mM Tris/HCL pH 8.8, 0.1 % (w/v) SDS in 20 % (v/v) Glycerin, 1 % (v/v) APS und 1 % (v/v) TEMED gegossen. Dabei orientierte sich die Menge des Acrylamids (10-15 % (w/v) an dem Molekulargewicht des Zielproteins, da große Proteine in niederprozentigen, und kleine Proteine besser in hochprozentigen Gelen aufgetrennt werden. Darüber wurde ein Sammelgel geschichtet, welches sich aus 0.5 M Tris pH 6.8, 0.1 % (w/v) SDS, 30 % (w/v) Acrylamid, 1 % (v/v) TEMED und 1 % (v/v) APS zusammensetzte.

Die Proteinproben wurden nach einer 4:1 Mischung des Zelllysats mit fünffach konzentriertem Probenpuffer (125 mM Tris/HCL pH 6.8, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin und 10 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.02 % (w/v) Bromophenol-Blau) auf ein Zielvolumen von 25  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und für 4 Minuten in  $100 \text{ } ^\circ\text{C}$  warmen Wasser erhitzt. Die Geltaschen wurden mit äquivalenten Mengen an Proteinen beladen und die Elektrophorese erfolgte für eine Stunde mit einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel bei Raumtemperatur (RT). Um die Proteingröße der Zielproteine identifizieren zu können, wurde ein Größenstandard (PageRuler<sup>TM</sup> Prestained

Protein Ladder) benutzt und jeweils am Anfang und am Ende jeder Probenreihe in eine Geltasche geladen.

### **2.2.5.1 Westernblot**

Durch den anschließenden Westernblot fand eine Übertragung der aufgetrennten Proteine von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran bei einer über 60 Minuten angelegten Spannung von 100 V statt. Danach erfolgte die Inkubation der Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer (5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST (PBS und 0,1 % (v/v) Tween 20), um unspezifische Antikörperbindestellen zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen (je 10 Minuten) mit PBST wurde die Membran erneut bei 4 °C über Nacht in Blockierungspuffer, in dem sich ein primärer Antikörper befand, zur Inkubation gegeben. Am nächsten Tag wurde die Membran wiederum dreimalig mit PBST gewaschen und anschließend für eine Stunde in Blockierungspuffer, welcher dieses Mal den jeweils passenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper enthielt, gelegt. Ungebundene Sekundärantikörper wurden anschließend durch erneutes dreimaliges Waschen mit PBST entfernt. Abschließend wurden die reaktiven Proteine auf der Membran sichtbar gemacht, indem man sie mit Hilfe des Chemolumineszenz Reagenz LumiGLO® nach Angaben des Herstellers entwickelte und das Signal mit einem Amersham™ Hyperfilm detektierte. Die Belichtungszeit variierte dabei zwischen 5 und 60 Sekunden.

### **2.2.6 Koimmunpräzipitation**

Mithilfe der Immunpräzipitation (IP) ist es möglich, ein bestimmtes Protein aus einem Zellgemisch zu isolieren und anzureichern. Bei der Koimmunpräzipitation nun können Proteinbindungen zwischen dem isolierten Protein und weiteren Proteinen aufgezeigt bzw. deren quantitativer Anteil detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die IP in einem Magnetfeld durchgeführt, wofür Miltenyi µMACS™ Separierungs-Säulen verwendet wurden. Nach Stimulation der Zellen jeweils in entsprechender Zeitkinetik, Herstellung von Lysaten und Hinzugabe von 1-2 µg des Antikörpers und 50 µl Protein G- Mikrokügelchen pro 500 µg Lysatprobe fand eine Inkubation für mindestens 45 Minuten auf Eis statt. Für jede Probe wurde eine Separierungssäule im Magnetfeld des µMACS™ Säulenständers angebracht und

diese mit je 200 µl TNE-Lysepuffer gespült, um sie zu aktivieren. Nach 45 Minuten auf Eis wurden die vorbereiteten Proben auf die Säulen aufgebracht und diese dreimal mit jeweils 200 µl TNE-Lysepuffer gewaschen. Daraufhin spülte man jede Säule nochmal mit 100 µl High Salt Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 M NaCl, 1 % (v/v) NP-40, 2 mM EDTA) und als letzten Schritt wiederum mit 100 µl TNE-Lysepuffer. Um das zu untersuchende Protein von den Protein G-Mikrokügelchen zu trennen und als Probe zu gewinnen, wurde je 20 µl eines auf 95 °C erhitzten 1x SDS- Gel-Ladepuffers (5x Ladepuffer, 10 % (v/v) Mercaptoethanol, 1:5 mit H2O verdünnt) auf die Säulen gegeben. Nach genau 5 Minuten pipettierte man noch einmal je 30 µl des vorgeheizten Ladepuffers auf die Säulen. Die mit dem Ladepuffer eluierten Proben wurden in einem frischen Reaktionsgefäß gesammelt. Durch darauffolgende Gelelektrophorese und Westernblot-Analysen konnte das entsprechende Protein und die daran bindenden, koimmunpräzipitierten Proteine dargestellt werden.

## 2.2.7 Transfektion

Alle benutzten siRNAs sind unter 2.1.4 gelistet.

Für die Transfektion von U-937-Zellen wurde das Amaxa® Zelllinien Nucleofector™ Kit C entsprechend der Herstelleranweisung mit dem Programm W001 verwendet. Pro Transfektionsansatz wurden jeweils  $1,5 \times 10^6$  Zellen in 100 µl Solution C bei Raumtemperatur resuspendiert. In einer Küvette ist jeweils 1,5 µmol der zu untersuchenden siRNA vorgelegt und mit 100 µl der Zellsuspension vermischt worden. Anschließend überführte man die transfizierten Zellen wieder in 6-Kavitäten-Platten inklusive vorgewärmtem Nährmedium, inkubierte sie für 48 Stunden und analysierte sie anschließend. Jede Transfektion fand ebenfalls auch mit einer Negativkontrolle mit einer „non-targeting“ (NT) siRNA statt, die kein Gen in den Zielzellen herunterreguliert. Die Effektivität der Herunterregulierung wurde jeweils durch eine Westernblot-Analyse bestimmt.

## 2.2.8 Herstellung von CRISPR/Cas Knockout Zelllinien

Zu allererst musste die verwendete Zellkultur auf ihre Mykoplasmenfreiheit getestet werden. War dies der Fall, konnten pro Ansatz  $1 \times 10^6$  Zellen mit 2  $\mu\text{g}$  DNA (Caspase-8-targeting Konstrukt mit exprimiertem green- fluorescent- protein (GFP) als Detektionsmarker), wie unter 2.2.7 beschrieben, transfiziert werden. Die transfizierten Zellen wurden wiederum auf 6-Kavitäten-Platten ausgesät und 48 Stunden bebrütet. Anschließend wurden diese Zellen, die das Plasmid für den Knockout während der Transfektion aufgenommen haben, mit Hilfe des FACS Aria cell sorters selektiert. GFP war als Marker verwendet worden, um die transfizierten Zellen zu identifizieren. 96-Kavitäten- Platten wurden mit 100  $\mu\text{l}$  vorgewärmten Medium pro Kavität vorbereitet und in jede Kavität wurde jeweils eine einzelne Zelle überführt. Die Platten wurden anschließend erneut für 2-3 Wochen kultiviert, um Einzelzellklone zu gewinnen.

## 2.2.9 Dichtegradientenzentrifugation - Ficoll-Gradient

Zur Trennung von lebenden und toten Zellen nach einer Transfektion wurden die Zellen am folgenden Tag jeweils für 6 Minuten bei Raumtemperatur und  $100 \times g$  zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 7 ml PBS aufgenommen. In einem 50 ml Falcon Röhrchen wurden pro Ansatz 3 ml Biocoll-Separating Solution (RT) vorgelegt und die 7 ml des PBS-Zellgemisches darüber geschichtet, wobei die beiden Phasen sich nicht vermischen durften. Es fand eine erneute Zentrifugation (RT,  $753 \times g$ , 20 Minuten, acc.: 9, dec.: 2) statt, der dabei entstandene Überstand musste bis kurz über den nun zu sehenden Ring im Röhrchen abgenommen werden. In diesem Ring befanden sich die lebenden Zellen, die toten Zellen hatten sich als Sediment am Boden abgesetzt. Der Zellring wurde vorsichtig aufgenommen und in einem 15 ml Tube auf 12 ml mit PBS aufgefüllt, wiederum herunterzentrifugiert (RT,  $482 \times g$ , 5 Minuten) und der Überstand abgenommen. Diesen Vorgang wiederholte man noch jeweils für 10 Minuten bei RT und  $188 \times g$ . Die sich im Überstand befindlichen Zellen konnten nun im Nährmedium ausgesät und anschließend analysiert werden.

### **2.2.10 Statistische Analyse**

Die gezeigten Experimente wurden jeweils mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und jede Messung innerhalb eines Experiments wurde ebenfalls jeweils dreimal wiederholt. Um die Signifikanz der Ergebnisse zu testen, wurde der Student's T-Test verwendet. Dabei galten p-Werte weniger als 0.05 als signifikant, unter 0.01 als sehr signifikant und Werte unter 0.001 als hochsignifikant.

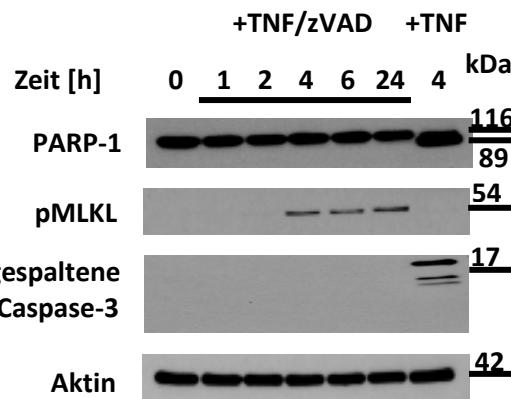
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 U-937-Zellen als Modellorganismus

Für gewisse Zelllinien, wie die murine Fibrosarkomzelllinie L929 oder humane Jurkat T-Zellen, war bereits nachgewiesen worden, dass sie zu einer TNF-induzierten Nekroptose fähig sind (Vandenabeele et al. 2010; Chen et al. 2013; Sosna et al. 2013). Auch für die humane histiozytäre Lymphom-Zelllinie U-937, mit der im nachfolgenden gearbeitet wurde, konnte gezeigt werden, dass sie nach Stimulation mit TNF und gleichzeitiger Inhibition von Caspisen zur Nekroptose fähig ist (He et al. 2009; Voigt et al. 2014). Daher eignet sie sich hervorragend als Modellsystem, um die molekularen Abläufe und beteiligten Elemente zu untersuchen und besser zu verstehen, welchen protektiven bzw. verstärkenden Einfluss jeweils Caspase-8 und Caspase-10 auf die TNF-induzierte Nekroptose beim Menschen haben kann. Da der TNF-R1 auf allen menschlichen Zellen, mit Ausnahme der roten Blutkörperchen, zu finden ist (Aggarwal und Natarajan, 1996), wurde von einem entsprechenden experimentellen Nachweis der Expression von TNF-R1 abgesehen. Normalerweise würde eine TNF-Stimulierung in den Zellen Apoptose auslösen. Damit explizit die Nekroptose untersucht werden konnte, wurden die U-937-Zellen in den dargestellten Experimenten zusätzlich mit dem Pancaspase-Hemmer zVAD-fmk behandelt, um jegliche Caspase-Aktivität zu unterdrücken (Degterev et al. 2005; Hitomi et al. 2008).

##### 3.1.1 Marker des Zelltods in den U-937-Zellen

Als erstes wurden die U-937-Zellen auf die typischen Zelltodmarker der Nekroptose nach Zugabe von TNF/zVAD untersucht, um die Unterschiede zwischen dieser Art des Zelltods und der Apoptose, unter Stimulation allein mit TNF, zu verdeutlichen. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 3 dargestellt. Während der Apoptose wird PARP-1 durch eine Caspase-3-vermittelte Spaltung vom ausgereiften 116-kDa Protein in ein 89-kDa Spaltprodukt umgewandelt, welches inaktiv ist (Los et al. 2002; Chaitanya et al. 2010, Duclos et al. 2017). Sowohl die nicht stimulierten Zellen, als auch die mit TNF/zVAD stimulierten Zellen, zeigten über die komplette Zeitkinetik kein 89-kDa Spaltprodukt. Dieses konnte nur in Lysaten aus allein mit TNF stimulierten, apoptotischen Zellen gesehen werden.



**Abbildung 3: Marker der Nekroptose in den U-937-Zellen** Die U-937-Zellen wurden mit 100 ng/ml TNF und 50  $\mu$ M zVAD-fmk oder mit TNF alleine (zur Apoptoseinduktion), entsprechend der angezeigten Zeitpunkte, stimuliert. Der Westernblot zeigt das Ergebnis der Detektion mit Antikörpern auf, die entweder sowohl PARP-1 in voller Länge (116 kDa), als auch sein apoptotisch gespaltenes Fragment (89kDa), pMLKL (54kDa) oder die aktivierte Spaltform von Caspase-3 (17kDa) erkennen. Die Spaltform von PARP-1 und die aktivierte Caspase-3 sind jeweils nur nach Induktion von Apoptose, pMLKL ist nur nach Induktion von Nekroptose zu sehen. Der Nachweis von Aktin diente als Ladekontrolle.

Darüber hinaus ist auch das Voranschreiten der Caspase-Kaskade als wichtiges Merkmal der Apoptose zu sehen. Im Zuge dessen wurden die Zellen auf die Spaltung von Caspase-3 hin untersucht. Diese wird als eine der Haupteffektor-Caspase der Apoptose gehandelt, die den Großteil der Substrate katalysiert (Fischer et al. 2003) und, ähnlich wie Caspase-6 und -7, durch Initiator-Caspasen, wie zum Beispiel Caspase-8, aktiviert werden muss (Sakamaki und Satou, 2009). Wiederum ist allein in der mit TNF stimulierten Probe eine Caspase-3 Spaltung zu sehen (Abbildung 3), woraus sich schließen lässt, dass in den mit TNF/zVAD stimulierten Proben keine Aktivierung von Caspase-3 und somit keine Apoptose stattfindet.

Als letztes wurde noch untersucht, bei welcher Stimulation eine MLKL Aktivierung stattfindet. Phosphoryliertes MLKL (pMLKL, phosphorylated mixed lineage kinase domain like pseudokinase), welches während der Nekroptose dadurch entsteht, dass phosphoryliertes RIP3 wiederum das nachgeschaltete MLKL phosphoryliert, sollte bei der Apoptose nicht vorkommen, da es bei dieser Art des Zelltodes keine Rolle spielt (Zhao et al. 2012; Wu et al. 2013). Im vorliegenden Experiment konnte pMLKL nur in den mit TNF/zVAD stimulierten Zellen beginnend nach etwa 4 Stunden Stimulationszeit detektiert werden, in der TNF-stimulierten Kontrolle für Apoptose, die genauso lang stimuliert wurde, war kein pMLKL zu sehen (Abbildung 3).

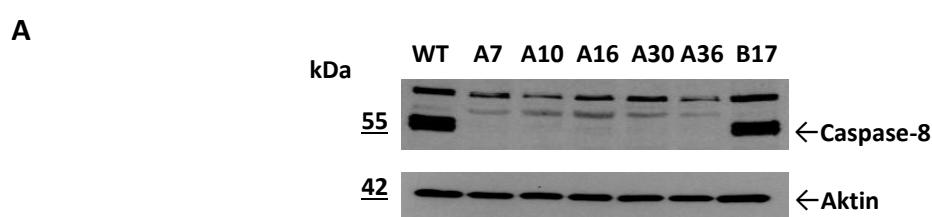
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die TNF/zVAD-Stimulation, ein für Nekroptose

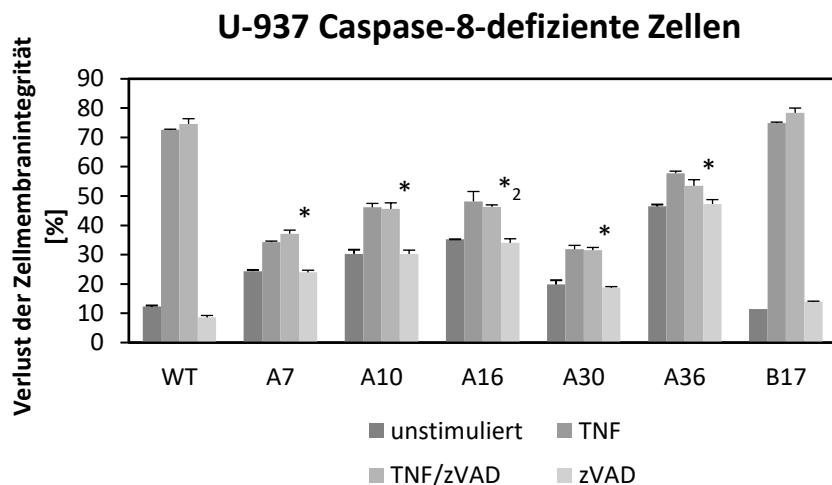
typisches Merkmal in den U-937-Zellen auslöst, nämlich das Auftauchen von pMLKL (Sun et al. 2012; Wang et al. 2014). Merkmale, wie die Spaltung von Caspase-3 oder PARP-1, wie man sie bei der Apoptose erwarten würde, sind dort jedoch nicht zu finden.

### 3.2 Caspase-8-defiziente U-937-Zellen

In der Arbeitsgruppe von Prof. D. Adam war in Vorarbeiten beobachtet worden, dass die Herunterregulierung von Caspase-8 und -10 in humanen Zellen einen gegensätzlichen Effekt in Bezug auf die Nekroptose erzeugt. Durch Verwendung der CRISPR/Cas Technologie ist es möglich, bestimmte Gene der Zellen gezielt auszuschalten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es dadurch, U-937-Zellen herzustellen, in denen Caspase-8 durch eine enzymatisch inaktive Form ersetzt wurde.

Der erste experimentelle Schritt lag in der Überprüfung der vollständigen Caspase-8-Defizienz der entstandenen Zellklone; die unveränderten Wildtyp-U-937-Zellen wurden als Positivkontrolle zum Vergleich herangezogen. Der Westernblot in Abbildung 4 (A) lässt erkennen, dass es bei 5 verschiedenen Zellklonen, den Klonen A7, A10, A16, A30 und A36, nicht gelang, eine für Caspase-8 charakteristische Bande bei 55 kDa nachzuweisen. Diese Klone weisen also eine „echte“ Caspase-8-Defizienz auf. Bei einem auf die gleiche Art und Weise generiertem Zellklon B17 ist diese Bande, wie auch beim WT, deutlich darstellbar, dieser Zellklon wird im Folgenden als Negativkontrolle verwendet.



**B**

**Abbildung 4: Caspase-8-Defizienz der U-937-Zellen.** Der dargestellte Westernblot zeigt, dass die Zellklone A7, A10, A16, A30 und A36 eine komplette Caspase-8-Abwesenheit aufwiesen. Aktin fungierte als Ladekontrolle (A). Die Zellen des WT, die des Zellklons B17 als negative Kontrolle, und die aller „echten“ Knockout-Klone, wurden mit 100 ng/ml TNF und zusätzlich mit 50  $\mu$ M zVAD-fmk, oder nur mit zVAD-fmk stimuliert. Nach 24 Stunden wurde die Zelltodrate (in Form des Verlustes der Membranintegrität) mit Hilfe der Durchflusszytometrie über die Zählung der PI-positiven und –negativen Zellen erfasst. Die aufgeführten Daten zeigen eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken führen die Standardabweichung von drei parallel durchgeführten Messungen, Sternchen die statistische Signifikanz auf (t-Test \* $p<0.001$  bzw. \* $_2p<0.01$ ) (B). Ein signifikant geringerer Verlust der Membranintegrität ist bei den Caspase-8-defizienten Zellen im Vergleich zu den WT und B17 Zellen zu sehen, sodass anzunehmen ist, dass die Abwesenheit von Caspase-8 in humanen U-937-Zellen vor Nekrose schützt.

Von großem Interesse war dementsprechend auch, welche Unterschiede sich durch die Abwesenheit von Caspase-8 in den humanen U-937-Zellen in Bezug auf ihr Zelltodverhalten ergeben. Zu diesem Zweck wurden sowohl die Zellen des Wildtypen, als auch Zellen aller oben erwähnten Caspase-8-defizienten Klone mit TNF/zVAD stimuliert, um Nekrose zu induzieren und anschließend in Relation zueinander gesetzt (Abbildung 4 (B)). Vergleicht man die genetisch unveränderten Zellen mit all jenen Zellklonen, die eine vollständige Caspase-8-Defizienz aufweisen, zeigte sich bei allen eine statistisch signifikant erniedrigte Zelltodrate. Auch wenn sich die Zelltodraten der einzelnen Klone bereits im nicht stimulierten Zustand, welcher auch als Grundumsatz bezeichnet werden kann, unterscheiden, sind die Zelltodraten durch die Nekrose-Induktion bei allen Klonen auf einem sehr ähnlichen Niveau. Anders verhält es sich mit dem Klon B17, welcher keine Caspase-8-Defizienz aufwies. Er zeigte eine deutlich erhöhte Sterblichkeit unter Zugabe von TNF/zVAD, welche sich nicht signifikant von der des WT unterschied. Die alleinige Stimulation mit zVAD-fmk dient dem Nachweis, dass zVAD-fmk selbst keinen Einfluss auf das Zelltodverhalten der Zellen nimmt.

Insgesamt lässt sich also feststellen, dass die Abwesenheit von Caspase-8 in den menschlichen U-937-Zellen, nicht zu einem erhöhten Zelltod, wie vorher angenommen, sondern zu einer deutlichen Reduktion der Nekroptoserate führt. Caspase-8 scheint in menschlichen Zellen Nekroptose zu fördern, ihre Abwesenheit kann somit als protektiver Faktor angesehen werden.

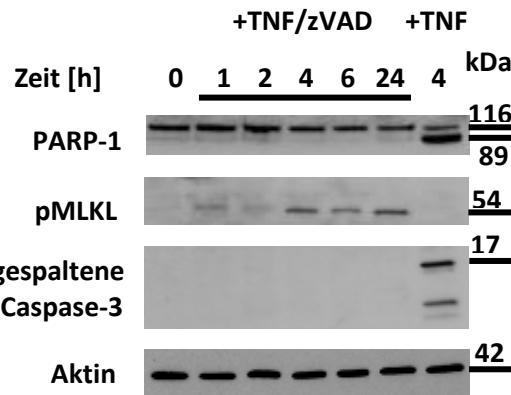
### **3.2.1 Merkmale des Zelltodes in den Caspase-8-defizienten Zellen und Inhibitoren des Zelltodes**

Die obigen Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, Caspase-8-defiziente U-937-Zellklone zu generieren, welche zumindest über eine gewisse Zeit in Kultur gehalten werden können. Anders als die Caspase-10-defizienten Klone, welche im nächsten Abschnitt beschrieben werden, wiesen diese jedoch eine deutlich schlechtere Kultivierbarkeit und ein sehr langsames Wachstumsverhalten auf. Alleine der Zellklon A7 konnte so kultiviert werden, dass genügend lebende Zellen für die anstehenden Experimente vorhanden waren, sodass die folgenden Experimente alleine mit diesem Zellklon durchgeführt wurden. Wie schon bei den Wildtyp U-937-Zellen sollte auch bei den Caspase-8-defizienten Klonen gezeigt werden, dass es sich bei dem beobachteten Zelltod unter TNF/zVAD-Stimulation um Nekroptose handelt und welche Unterschiede sich zur Apoptose (TNF-Stimulation) ergeben. Der zu diesem Zweck verwendete Versuchsaufbau wurde bereits unter 3.1 ausführlich beschrieben, ein entsprechender Westernblot dazu, ist unter der Abbildung 5 (A) zu finden. Die Ergebnisse sind äquivalent zu denen bereits bei den U-937-Wildtypzellen beschriebenen. Sowohl PARP-1, als auch Caspase-3 lagen nur in der TNF-induzierten Apoptosekontrolle in gespaltener Form vor, pMLKL konnte jedoch in genau dieser Stimulation nicht aufgezeigt werden, ließ sich aber ab einer Stimulationszeit von 4 Stunden in den Nekroptose-induzierten Proben detektieren. So lässt sich also festhalten, dass unter TNF/zVAD-Stimulation auch in den Caspase-8-defizienten Zellen Nekroptose stattfindet.

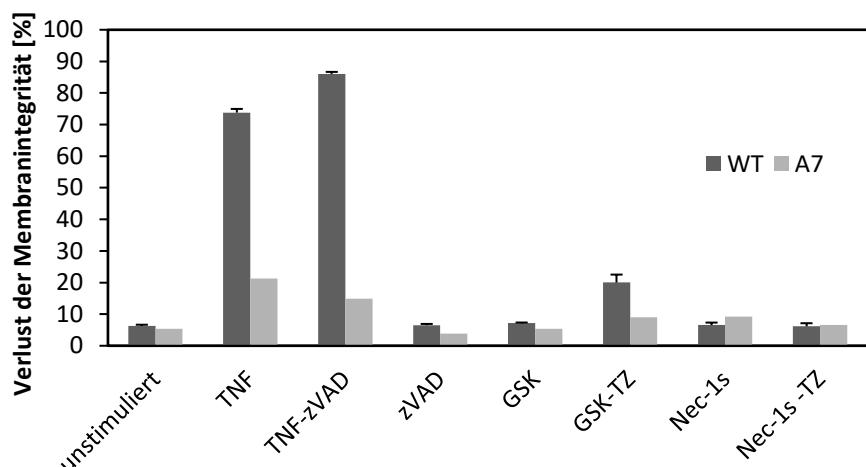
Zusammenfassend zeigte sich jedoch, dass in den Caspase-8-defizienten U-937-Zellen das Signal für pMLKL im Vergleich zu dem der Wildtypzellen weniger ausgeprägt erscheint (Abbildung 3), entsprechend dem Schutz dieser Zellen vor Nekroptose. Die Caspase-8-defizienten Zellklone weisen stattdessen ein schwächeres Signal für gespaltete Caspase-3 und

gespaltenes PARP-1 auf, als Indikator für eine Resistenz gegenüber Apoptose aufgrund der Caspase-8-Abwesenheit.

**A**



**B**



**Abbildung 5: Merkmale der durch TNF ausgelösten Nekroptose in den Caspase-8-defizienten U-937-Zellen.** Die Caspase-8-defizienten U-937-Zellen wurden mit 100 ng/ml TNF und 50  $\mu$ M zVAD-fmk oder mit TNF (zur Apoptoseinduktion), entsprechend der angezeigten Zeitpunkte, stimuliert. Der Westernblot zeigt das Ergebnis der Inkubation von Zelllysaten mit einem Antikörper, der entweder sowohl PARP-1 in voller Länge (116 kDa), als auch sein apoptotisch gespaltenes Fragment (89kDa), pMLKL (54kDa) oder die aktivierte Spaltform von Caspase-3 (17kDa) nachweist. Wie auch bereits beim WT gezeigt, findet man auch in den Caspase-8-defizienten Zellen pMLKL alleine in den Nekroptose-induzierten Proben, wohingegen die typischen Merkmale der Apoptose nur in den TNF-induzierten Lysaten gesehen wurden (A). Nekroptose wurde durch 24-stündige Stimulation mit 100 ng/ml TNF und 50  $\mu$ M zVAD-fmk in U-937-WT-Zellen und dem Klon A7 induziert. Zusätzlich sind beide Zelllinien noch sowohl mit, als auch ohne den RIPK1 Inhibitor Nec-1s (50  $\mu$ M) und den RIPK3 Inhibitor GSK'872 (10  $\mu$ M) für 2 Stunden prästimuliert worden. Der Verlust der Membranintegrität wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie über die Zählung der PI-positiven und –negativen Zellen erfasst. Die aufgeführten Daten zeigen eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken führen die Standardabweichung von drei parallel durchgeführten Messungen auf (B). Der beobachtete Zelltod in dem A7 Klon weist typische morphologische Merkmale der Nekroptose auf. Diese kann in beiden Zelllinien jedoch effektiv von den beiden Nekroptose-Inhibitoren unterdrückt werden.

Darüber hinaus wurde untersucht, wie sich die unveränderten U-937-Zellen im Vergleich zu dem Caspase-8-defizienten Klon verhalten, wenn sie mit Inhibitoren der Nekroptose, welche bereits in der Vergangenheit als solche identifiziert worden waren, zusätzlich zur Nekroptoseinduktion stimuliert werden.

Necrostatin-1 (Nec-1) war der als erster in der Literatur beschriebene Inhibitor der Nekroptose, was durch seine Fähigkeit zur Inhibierung der Kinase-Aktivität von RIPK1 erreicht wird (Degterev et al. 2008). In den vorliegenden Experimenten wurde Nec-1s, eine stabilere Variante von Nec-1, verwendet, da dieses sich als deutlich spezifischer in Bezug auf die RIPK1-Kinaseaktivität herausgestellt hat (Takashi et al. 2012). Zusätzlich wurde noch mit GSK'872 gearbeitet, ein selektiver RIPK3-Kinase-Inhibitor, welcher die Akkumulation von RIP3 verhindert und auf diesem Wege die Nekroptose blockiert (Kaiser et al. 2013).

Die Ergebnisse dieses Experiments, hier nur der Klon A7 gezeigt, sind in Abbildung 5 (B) zu sehen. Zunächst lässt sich auch hier wieder eine signifikant niedrigere Zelltodrate bei der Nekroptoseinduktion des Caspase-8-defizienten Klons, im Vergleich zu den Wildtypzellen, detektieren. Beide Zellreihen wurden jeweils nur mit dem Inhibitor und einmal mit Inhibitor und zusätzlich TNF/zVAD stimuliert. Eine deutliche Unterdrückung der Nekroptose lässt sich dabei bei beiden pharmakologischen Inhibitoren aufzeigen. Die Zelltodraten beider nicht stimulierten Zellreihen entsprechen einem ähnlichen Zelltodniveau, wie bei der alleinigen Inhibitorstimulation zu sehen ist. Dabei ist auch jeweils zwischen den beiden Zelllinien kein Unterschied zu sehen, was wiederum dafür spricht, dass die Inhibitoren alleine keinen Einfluss auf die Zelltodrate des Caspase-8-defizienten Klons haben. Nimmt man nun noch die zusätzliche TNF/zVAD Stimulation zu der Inhibitorstimulation hinzu, sieht man, dass auch hier keine wegweisenden Unterschiede zwischen den Wildtypzellen und dem Klon A7 zu finden sind. Da sich die noch nachweisbare Zelltodrate unter TNF/zVAD-Stimulation durch den Einsatz der Inhibitoren noch weiter reduzieren lässt, muss es sich bei dem gesehenen Zelltod um Nekroptose handeln.

### **3.3 Caspase-10-defiziente U-937-Zellen**

Bereits im Vorfeld der Generierung von Caspase-8-defizienten U-937-Zellklonen war es Frau C. Saggau gelungen, mit Hilfe der CRISPR/Cas Technologie einen Klon von U-937-Zellen herzustellen, welche keine Caspase-10-Expression mehr aufwies. Dieser wird im Folgenden als A3 bezeichnet. Zusammenfassend konnte dabei beobachtet werden, dass der Caspase-10-defiziente Klon im Vergleich zu den WT-Zellen eine statistisch signifikant höhere Zelltodrate aufweist. Somit lässt sich festhalten, dass die Abwesenheit von Caspase-10 in den humanen U-937-Zellen tatsächlich zu einer deutlichen Steigerung der Nekroptoserate führt.

#### **3.3.1 Merkmale des Zelltodes in den Caspase-10-defizienten Zellen und Inhibitoren des Zelltods**

Auch bei den Caspase-10-defizienten Zellen wurde von Frau C. Saggau nachgewiesen, dass es sich bei dem beobachteten Zelltod des Caspase-10-defizienten Zellklons A3 unter der TNF/zVAD-Stimulation tatsächlich um Nekroptose handelt. Auch hierbei konnte eine Spaltung von sowohl PARP-1, als auch Caspase-3 nur in der TNF-induzierten Apoptosekontrolle detektiert werden. Dagegen konnte das Vorhandensein von pMLKL in eben dieser Stimulation nicht beobachtet werden, wohl aber in Ansätzen, in denen Nekroptose induziert worden war. Das pMLKL war auch in dieser Versuchsreihe erst ab einer Inkubationszeit von 4 Stunden sichtbar, bis zur Phosphorylierung von MLKL scheint also, sowohl bei den Wildtypen, als auch den Klonen A7 und A3, dieselbe Zeit zu vergehen.

Frau Saggau konnte ebenfalls zeigen, dass sich der beobachtete Zelltod sowohl in den WT U-937-Zellen als auch in dem Caspase-10-defizienten Klon A3 durch die Nekroptose-Inhibitoren Nec-1s und GSK'872 unterdrücken lässt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der beobachtete Zelltod bei dem Caspase-10-defizienten Klon wiederum auf Nekroptose zurückzuführen ist. Zum einen weisen die Zellen unter Nekroptose-Induktion entsprechende morphologische Merkmale auf, zum anderen lässt sich der gesehene Zelltod fast vollständig durch die beschriebenen Nekroptose-Inhibitoren verhindern.

### 3.4 Herunterregulierung weiterer Nekroptose-relevanter Proteine

Um den Einfluss einzelner Proteine im Nekrosom-Komplex besser verstehen zu können, wurden in einer weiteren Reihe von Experimenten entsprechende Proteine in den Caspase-8- und Caspase-10-defizienten Zellklonen durch eine umgekehrte Transfektion herunterreguliert. Diese Zellen wurden anschließend auf eine Veränderung in Bezug auf ihr Zelltodverhalten untersucht. Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit eine Transfektion mit unterschiedlichen siRNAs durchgeführt. Eine Probe von jeder Zellpopulation wurde zusätzlich mit einer siRNA transfiziert, welche keine Zielsequenz im zellulären Genom aufweist, diese Probe (NT) gilt jeweils als Referenzwert. Anschließend wurde in allen transfizierten Proben Nekroptose induziert (TNF/zVAD-Stimulation).

#### 3.4.1 Einfluss der Nekroptose-relevanten Proteine in den Caspase-8-defizienten Zellen

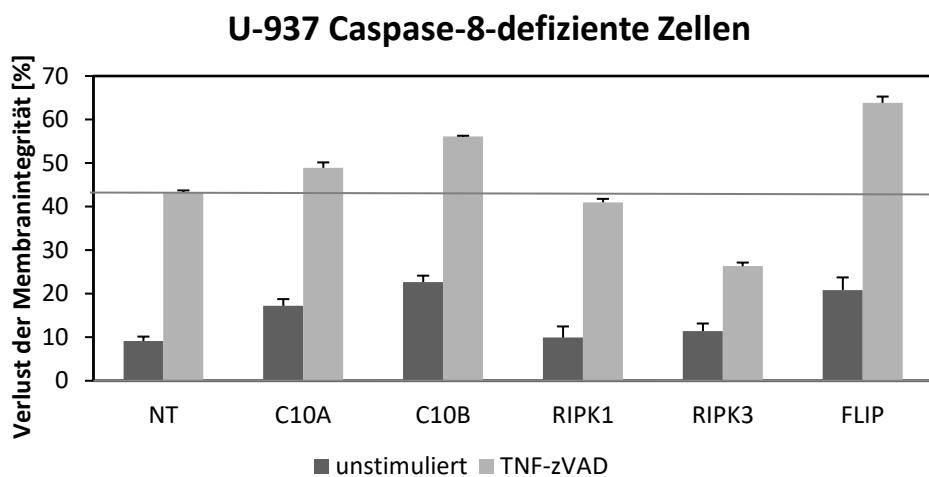
Als erstes wurde in den Caspase-8-defizienten Zellen jeweils Caspase-10 mit zwei verschiedenen siRNAs (A und B), sowie RIPK1, RIPK3 und FLIP als weitere, für die Regulation der Nekroptose relevante, Proteine herunterreguliert. Da die Zellen des Caspase-8-defizienten Zellklons nach einer ersten Transfektion jedoch in allen Ansätzen so hohe Zelltodraten aufwiesen, dass der Einfluss der einzelnen Proteine nicht mehr zu unterscheiden war, wurden die nach der Transfektion noch vitalen Zellen durch einen Ficollgradienten (siehe Abschnitt 2.2.9) angereichert. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 6 (A) festgehalten. Zunächst lässt sich feststellen, dass auch bei bestehender Caspase-8-Defizienz eine zusätzliche Herunterregulierung von Caspase-10 im Vergleich zu den Zellen mit unveränderter Caspase-10 zu einer gesteigerten Zelltodrate führt. Der Unterschied ist jedoch deutlich weniger ausgeprägt, als bei reiner Caspase-10-Defizienz, da die siRNAs die Caspase-10 nicht vollständig herunterregulieren. Auch gibt es Unterschiede bei den verschiedenen Caspase-10 siRNAs, da diese eine unterschiedliche Effektivität der Herunterregulation aufweisen. Auch durch die Reduktion von RIPK1 kann ein gewisser Schutz vor Nekroptose erreicht werden, dieser ist jedoch ebenfalls nicht sehr stark ausgeprägt.

Demgegenüber gestellt, erweist sich die Herunterregulierung von RIPK3 als sehr effektiv, was den Schutz vor Nekroptose angeht. Es kann beinahe eine Halbierung der Zelltodrate im Vergleich zu den Zellen erreicht werden, bei denen kein Protein zusätzlich herunterreguliert worden ist.

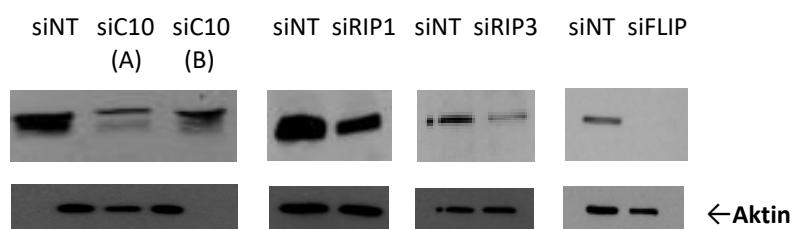
Einzig und allein die zusätzliche Reduktion von cFLIP führt zu einer gesteigerten Zelltodrate.

Durch den in Abbildung 6 (B) dargestellten Westernblot, konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulierung bei allen dargestellten Proteinen funktioniert hatte.

**A**



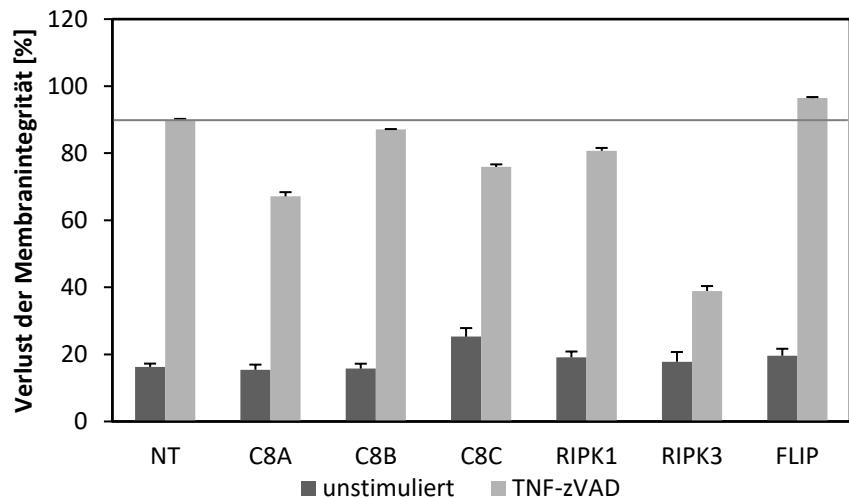
**B**



**Abbildung 6: Veränderungen des Zelltodverhaltens in den Caspase-8-defizienten Zellen, wenn zusätzlich weitere nekroptotische Proteine herunterreguliert worden sind.** U-937-Zellen wurden mit einer non-targeting siRNA (siNT) als Negativkontrolle und siRNA, welche spezifisch für Caspase-10 (zwei verschiedene siRNAs), RIPK1, RIPK3 oder FLIP transfiziert. Anschließend fand eine Stimulation der Zellen mit 100 ng/ml TNF und 50 µM zVAD-fmk statt. Nach insgesamt 48 Stunden wurde der Verlust der Membranintegrität mit Hilfe der Durchflusszytometrie über die Zählung der PI-positiven und –negativen Zellen erfasst. Die gezeigten Daten zeigen eines von drei unabhängig durchgeföhrten Experimenten auf, die Fehlerbalken die Standardabweichung von drei parallel durchgeföhrten Messungen (A). Ein Kontroll-Westernblot der transfizierten (siC10, siRIPK1, siRIPK3, siFLIP), aber unstimulierten, Zellen wurde zur Verifizierung des Erfolgs der Transfektion durchgeföhrt. Aktin fungiert hierbei als Ladekontrolle (B). Wenn Caspase-10 zusätzlich in den Caspase-8 defizienten Zellen herunterreguliert wird, kann ein Anstieg der Zelltodrate gemessen werden. Darüber hinaus schützt auch hier wieder die Reduktion von RIPK3 deutlich vor Nekroptose, während die Herunterregulierung von FLIP zu einem Anstieg der Nekroptose führt.

### 3.4.2 Einfluss der Nekroptose-relevanten Proteine in den Caspase-10-defizienten Zellen

Auch in den Caspase-10-defizienten Zellen sollte der Einfluss der bereits erwähnten nekroptotischen Proteine untersucht werden. Der diesbezüglich verwendete Versuchsaufbau entsprach dem unter 3.4.1 beschriebenen, mit der Ausnahme, dass die Verwendung des Ficollgradienten nicht notwendig war und dass keine siRNAs für Caspase-10, sondern für Caspase-8 verwendet wurden. Auch in den Caspase-10-defizienten Zellen führte die zusätzliche Herunterregulierung von Caspase-8 zu einer verminderten Nekroptoserate, wobei es wiederum ein Unterschied zwischen den drei verwendeten siRNAs gab. Wie bereits bei den Caspase-8-defizienten Zellen führte auch bei den Caspase-10-defizienten Zellen eine zusätzliche Reduktion von RIPK1 zu einem leichten Schutz vor Nekroptose. Auch bei diesem Versuchsaufbau zeigte die negative Beeinflussung von RIPK3 eine deutlich verminderte Nekroptoserate, während wiederum cFLIP das einzige Protein ist, durch dessen Herunterregulierung eine gesteigerte Nekroptoserate erzielt werden konnte. Die Ergebnisse sind unter Abbildung 7 (A) aufgezeigt. Durch den in Abbildung 7 (B) dargestellten Westernblot konnte gezeigt werden, dass auch diese Transfektion bei allen dargestellten Proteinen erfolgreich funktioniert hatte. Insgesamt lässt sich festhalten, dass der Einfluss der weiteren nekroptotischen Proteine bestehen bleibt, unabhängig davon, ob die Zellen eine Caspase-8 oder -10-Defizienz aufweisen. Der Einfluss von Caspase-8 und Caspase-10 ist auch dann in den Zellen nachzuweisen, wenn die jeweils andere Caspase nicht mehr vorhanden ist.

**A****U-937 Caspase-10-defiziente Zellen****B**

**Abbildung 7: Veränderungen des Zelltodverhaltens in den Caspase-10-defizienten Zellen, wenn zusätzlich weitere nekroptotische Proteine herunterreguliert worden sind.** U-937-Zellen wurden mit einer non-targeting siRNA (siNT) als Negativkontrolle und siRNA, welche spezifisch für Caspase-8 (drei verschiedenen siRNAs), RIPK1, RIPK3 oder cFLIP transfiziert. Anschließend fand eine Stimulation der Zellen mit 100 ng/ml TNF und 50  $\mu$ M zVAD-fmk statt. Nach 24 Stunden wurde der Verlust der Membranintegrität mit Hilfe der Durchflusszytometrie über die Zählung der PI-positiven und –negativen Zellen erfasst. Die gezeigten Daten zeigen eines von drei unabhängig durchgeföhrten Experimenten auf, die Fehlerbalken die Standardabweichung von drei parallel durchgeföhrten Messungen **(A)**. Ein Kontroll-Westernblot der transfizierten (siC8, siRIPK1, siRIPK3, siFLIP), aber unstimulierten, Zellen wurde zur Verifizierung des Erfolgs der Transfektion durchgeföhrte. Aktin fungiert hierbei als Ladekontrolle **(B)**. Auch in Caspase-10-defizienten Zellen scheint die Herunterregulierung von Caspase-8 zur Protektion vor Nekroptose zu führen. Reduktion von RIPK3 scheint am meisten zu schützen, jene von FLIP jedoch führt zur höchsten Nekroptoserate.

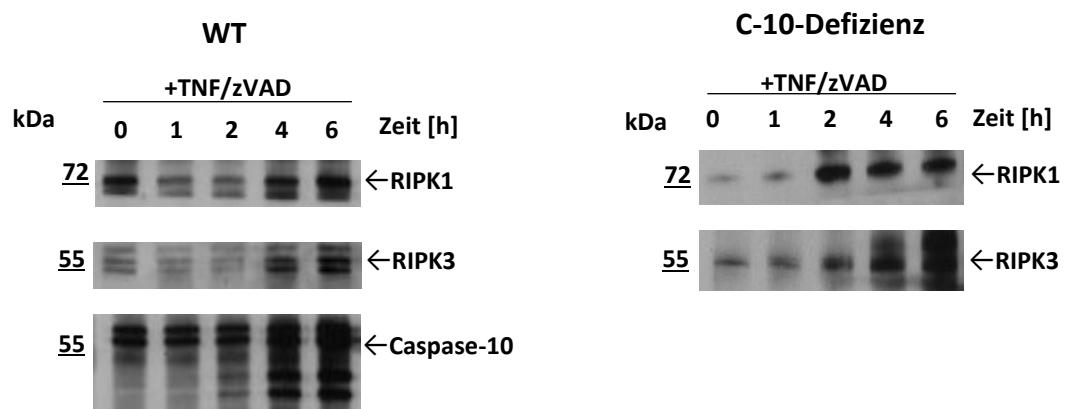
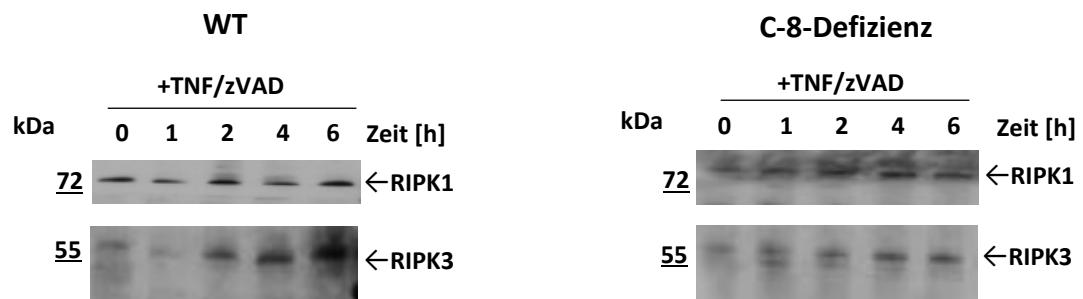
### 3.5 Veränderungen des Nekrosoms

Wichtig für die Herausarbeitung der Spezies-spezifischen Rollen von Caspase-8 und -10 war die Gegensätzlichkeit ihres Einflusses auf die Zelltodrate bei der Nekroptose-Induktion. Im Zuge dessen war es jedoch auch wichtig, herauszufinden, welchen Einfluss die beiden Caspase auf den Aufbau des Nekrosoms als Schlüsselement der Nekroptose haben. Mithilfe der Immunpräzipitation war es möglich, einzelne Proteine des Nekrosoms zu isolieren und mithilfe der Koimmunpräzipitation konnten die daran gebundenen Proteine untersucht werden. Sowohl bei den Wildtypzellen, als auch bei den Caspase-8- und Caspase-10-defizienten Zellen wurden in Abhängigkeit von ihrer Defizienz jeweils eine Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Caspase-8, Caspase-10 und RIPK3 durchgeführt.

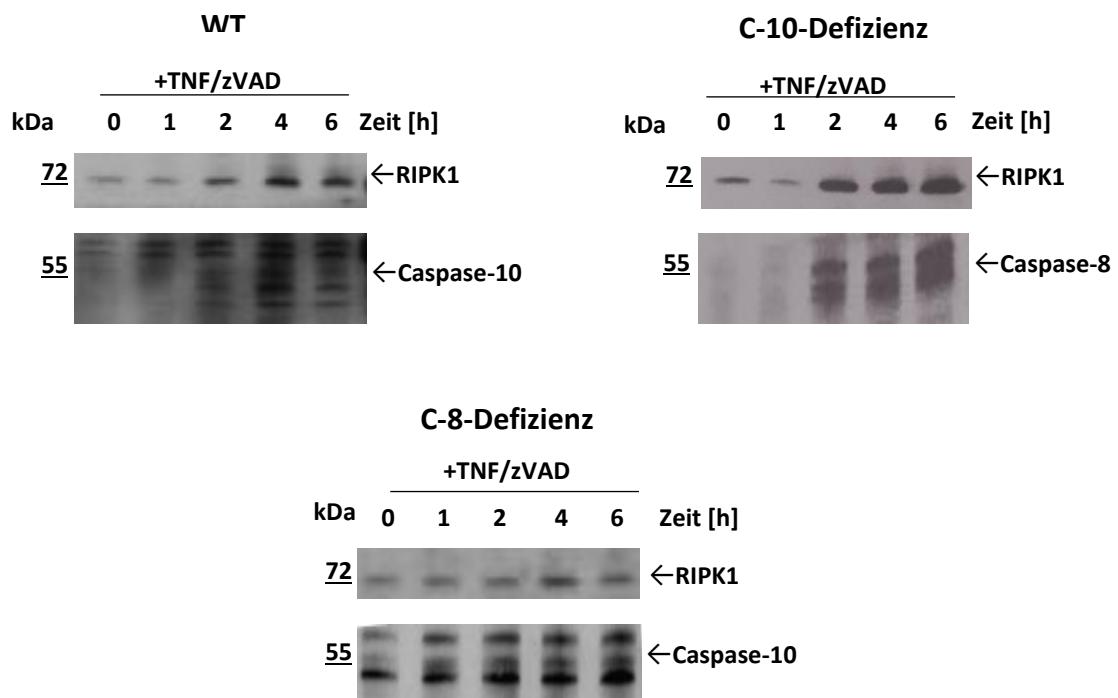
Betrachtet man nun zuerst die Immunpräzipitation von Caspase-8 in den Wildtypzellen (Abbildung 8 (A)), sieht man eine deutliche Zunahme von RIPK1, RIPK3 und Caspase-10 über den zeitlichen Verlauf im Nekrosom. Auch in den Caspase-10-defizienten Zellen lässt sich eine deutliche Zunahme von RIPK1 und RIPK3 über den zeitlichen Verlauf nachvollziehen.

Als nächstes wurde eine Immunpräzipitation mit Caspase-10 durchgeführt (Abbildung 8 (B)). In den Wildtypzellen zeigte sich eine Zunahme von RIPK1 und besonders auch eine deutlichere Zunahme von RIPK3 über den zeitlichen Verlauf im Nekrosom. Vergleicht man damit die Caspase-8-defizienten Zellen, findet man keine bzw. nur eine sehr geringe Zunahme, sowohl von RIPK1 als auch von RIPK3. Als letztes wurde noch eine Immunpräzipitation mit RIPK3 durchgeführt (Abbildung 8 (C)). Wiederum lässt sich bei den Wildtypen eine Zunahme von RIPK1 und Caspase-10 über den zeitlichen Verlauf erkennen. Auch bei den Caspase-10-defizienten Zellen sieht man eine deutliche Zunahme von RIPK1 und Caspase-8. Wie bereits bei der Immunpräzipitation mit Caspase-10, ist auch dieses Mal keine bzw. nur eine sehr geringe Zunahme von RIPK1 und auch Caspase-10 in den Caspase-8-defizienten Zellen nachzuvollziehen.

Die durch die Immunpräzipitation erhaltenen Daten sind jedoch bisher nur als vorläufig zu betrachten und müssen noch weiter verifiziert werden. Jedoch scheint es so, als ob Caspase-8 sehr wichtig für die Stabilität des Nekrosoms sei, da in ihrer Abwesenheit keine wirkliche Anreicherung der untersuchten Proteine zu beobachten war. Dahingegen scheint die Caspase-10-Defizienz den Aufbau des Nekrosoms nicht zu beeinträchtigen, es sieht sogar so aus, als ob es zu einer stärkeren Anreicherung der untersuchten Proteine kommt.

**A****B**

C



**Abbildung 8: Bestandteile des Nekrosoms und die Veränderung der Zusammensetzung in Bezug auf die Defizienz von Caspase-8 oder Caspase-10 in den U-937-Zellen.** Die U-937 Wildtyp-Zellen und die Caspase-8- (C8) und Caspase-10- (C10) defizienten Zelllinien wurden mit 100 ng/ml TNF und 50 µM zVAD-fmk entsprechend der angezeigten Zeitpunkte stimuliert. Nach der Immunpräzipitation mit 2 µg Caspase-8 (A), 1 µg Caspase-10 (B) oder 1 µg RIPK3 (C) sind die koimmunpräzipitierten Proteine Caspase-8, Caspase-10, RIPK1 oder RIPK3 mithilfe eines Westernblots, wie angezeigt, dargestellt worden. In den U-937 Wildtyp-Zellen sieht man eine Zunahme aller getesteten Proteine über die Zeit. Außerdem lässt sich eine Zunahme der Proteine in den Caspase-10-defizienten Zellen, nicht aber in den Caspase-8-defizienten Zellen nachvollziehen. Caspase-8 scheint also sehr wichtig für die Rekrutierung von RIPK1, RIPK3 und Caspase-10 zum Nekrosom zu sein.

## 4. Diskussion

Regulierte Nekrose rückte in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Wissenschaft, da sie sowohl in physiologischen Prozessen, wie der angeborenen Immunität (Hitomi et al. 2008; Zhou und Yuan, 2014), als auch in humanen Pathologien, wie zum Beispiel neurodegenerativen Erkrankungen (Chi et al. 2018), der Rheumatoiden Arthritis (Lee et al. 2017), myokardialen Infarkten (Oerlemans et al. 2012), akuter Nierenschädigung (Liu et al. 2018) oder auch der Hypothermie (Polykratis et al. 2014) eine entscheidende Rolle spielt. Nekroptose scheint darüber hinaus wichtig bei der Abwehr des Organismus gegen virale und bakterielle Infektionen zu sein, in dem der infizierten Zelle auch bei einer Blockade der Apoptose durch die Pathogene eine neue Möglichkeit zum Suizid, und damit zur Kontrolle der Infektion geboten wird (Mocarski et al. 2011). Bestimmte Viren können die Nekroptose jedoch auch selber als alternative Zelltodform zum Erhalt der Infektion ansteuern (Festjens et al. 2006; Pan et al. 2014). Durch ein besseres Verständnis der Signalwege, der beteiligten Komponenten und der Einflussfaktoren der Nekroptose, besteht die Möglichkeit zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansatzpunkte und Strategien für zukünftige Forschung und Behandlung entsprechender Krankheiten.

### 4.1 Spezies-spezifischer Einfluss von Caspase-8 in Maus und Mensch

Lange Zeit galt das Dogma, dass Nekroptose durch die proteolytische Aktivität von Caspase-8 gehemmt wird, gestützt durch die Beobachtungen, dass Caspase-8-defiziente Mäuseembryonen bereits vor der Geburt im Zuge einer unkontrollierten Nekroptose-Induktion verstorben sind (Kaiser et al. 2011; Oberst et al. 2011; Orozco et al. 2014; Feltham et al. 2017). Caspase-8 ist in der Lage, RIPK1, RIPK3 und CYLD, und somit wichtige Mediatoren der Nekroptose, zu spalten und schützt die Zellen so vor einer Nekroptoseinduktion (Salvesen und Walsh, 2014; Vanden Berghe et al. 2016). Auch unser Forschungslabor hatte bereits im Vorfeld zeigen können, dass eine Herunterregulierung von Caspase-8 in murinen Zellen eine deutliche Steigerung der Nekroptoserate nach sich zieht. Im Zuge dessen wurde nachvollziehbarer Weise angenommen, dass die protektive Funktion von Caspase-8 im Sinne einer Nekroptoseinhibition auch in menschlichen Zellen Bestand habe. Unerwarteterweise hat unser Labor jedoch in Pilotexperimenten, wie bereits in der Einleitung erwähnt, herausgefunden, dass in humanen Zellen die Herunterregulierung von Caspase-8 zu einem

Schutz vor Nekroptose führt. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern die daraus abgeleitete Theorie, dass in menschlichen Zellen, anders als in murinen Zellen, nicht die Reduktion von Caspase-8, sondern von Caspase-10 eine verstärkte Nekroptoserate hervorruft und andersherum die Abwesenheit von Caspase-8 in menschlichen Zellen sogar vor Nekroptose schützt. Es lässt sich also annehmen, dass ein Spezies-spezifischer Einfluss von Caspase-8 zwischen Maus und Mensch besteht und dass in diesem Kontext beim Menschen auch die Caspase-10 eine wichtige Rolle zu spielen scheint.

Dies wäre nicht der erste Unterschied, den man zwischen Maus und Mensch in Bezug auf die Nekroptose gefunden hat. Nekroptose ist, wie bereits erwähnt, auch wichtig bei der Abwehr gegen Viren. Bei einer Infektion mit dem Herpes simplex Virus (HSV) 1 und 2 kommt es zu einer direkten Interaktion der RHIM-Domänen von RIPK1 und RIPK3 mit bestimmten Proteinen der HS Viren. Bei Mäusen führt diese Interaktion zur Induktion der Nekroptose, im Sinne einer antiviralen Abwehr des Wirts (Huang et al. 2015; Silke et al. 2015). Beim Menschen inhibieren jedoch die Virusproteine die Nekroptose, was auch die Relevanz spezifischer Wirtsfaktoren aufzeigt (Kaczmarek et al. 2013; Huang et al. 2015; Silke et al. 2015), da sehr ähnliche Proteine in verschiedenen Spezies gegensätzliche Effekte zu haben scheinen.

#### **4.1.1 Caspase-8 und Caspase-10 sind beide an der Ausführung des Zelltods beteiligt**

Die Rolle von Caspase-8 als Initiatorcaspase der Apoptose ist unumstritten, die physiologische Rolle von Caspase-10 ist jedoch bei weitem nicht so genau verstanden, auch wenn sie ebenso zur Gruppe der apoptotischen Initiator-Caspasen gehört (Fischer et al. 2006; Sakamaki und Satou, 2009). Eine Beteiligung von Caspase-10 an der Ausführung der Apoptose war jedoch bereits in vorangegangenen Studien bei vielen Säugetieren, außer natürlich Mäusen, gezeigt worden (MacEwan, 2002; Strasser et al. 2009; Kaiser et al. 2013; Cisterne et al. 2014). Die Möglichkeit der Beteiligung von Caspase-10 an der Ausführung von Zelltodvorgängen, lässt sich auch darüber ableiten, dass, wie oben bereits erwähnt, auch sie ein DED-Motiv besitzt und somit über die Bindung an FADD ebenfalls zum DISC rekrutiert werden kann (Sprick et al. 2002; Boatright et al. 2004; Strasser et al. 2009; Hedrick et al. 2010; Galluzzi et al. 2012a). Es gibt wohl ebenfalls keinen Unterschied bezüglich des Zeitpunktes der Aktivierung von Caspase-8 oder Caspase-10 im DISC (Sprick et al. 2002; Snow et al. 2010). Auch in der vorliegenden Arbeit lässt sich zuerst einmal feststellen, dass dieselben menschlichen Zellen,

sowohl zur Apoptose, als auch zur Nekroptose fähig sind, je nachdem wie sie stimuliert werden. Auch die eindeutige Beteiligung von Caspase-10 an der Ausführung der Apoptose lässt sich aufzeigen. Dieselben typischen Apoptose-Marker konnten nach der Induktion dieser Zelltodform gesehen werden, egal ob Caspase-8 in den entsprechenden Zellen vorhanden war oder nicht (Experimente 3.1.1, 3.2.1 und 3.3.1). Wang und andere hatten die Theorie aufgestellt, dass Caspase-10 beim Menschen Caspase-8 funktionell ersetzen könnte, da Caspase-10 auch unabhängig von Caspase-8 eine TNF- vermittelte Apoptose initiieren kann (Wang et al. 2001). Auch andere Studien zeigten, eine mögliche, voneinander unabhängige, Apoptoseinduktion durch Caspase-8 und -10 (Kischkel et al. 2001). In menschlichen Zellen können Caspase-8 und Caspase-10 während der Apoptose interagieren, wobei sogar eine stärkere Interaktion bei Zunahme des Zelltodes gesehen werden konnte (Micheau und Tschopp, 2003).

Während jedoch bei einer Caspase-10-Mutation und normaler Caspase-8 Funktion die TNF-induzierte Apoptose zwar beeinträchtigt ist, aber vollends ausgeführt werden kann, wurde wiederholt berichtet, dass bei normaler Caspase-10 Funktion und einer Caspase-8-Defizienz Apoptose nur unter eingeschränkten Bedingungen stattfindet (Wang et al. 1999; Kischkel et al. 2001; Sprick et al. 2002; Milhas et al. 2005). In dieser Arbeit ist es jedoch gelungen, eine Apoptoseinduktion und –ausführung bei vollständiger Caspase-8-Abwesenheit nachzuweisen. So ist zusammenfassend zu sagen, dass Caspase-10 beim Menschen als alternative Initiatorcaspase der Apoptose in Frage kommt (Galluzzi et al. 2016), jedoch nicht komplett die Funktion von Caspase-8 übernehmen kann (Wang et al. 2001; Sprick et al. 2002; Galluzzi et al. 2012a), besonders was den rezeptorunabhängigen Zelltod angeht (Sakamaki et al. 2015). Dies spricht somit insgesamt gegen die Theorie einer vollständigen Redundanz der beiden Caspase beim Menschen.

#### **4.1.2 Caspase-10 spielt beim Menschen auch bei der Nekroptose eine wichtige Rolle**

Lange Zeit war unklar, ob Caspase-10 überhaupt am Signalweg der Nekroptose beteiligt ist. Es wurde angenommen, sie habe bezüglich der Zelltodinduktion eine exklusive Rolle bei der Regulation der extrinsischen Apoptose, während Caspase-8 sowohl die Apoptose, als auch die Nekroptose regulieren könne (Mocarski et al. 2011; Kaiser et al. 2013). Andere Autoren gingen davon aus, dass in menschlichen Zellen, in denen Caspase-8 defekt ist, Apoptose überhaupt

nicht stattfinden kann, Nekroptose jedoch schon, so wie es in murinen Zellen auch gesehen worden war (Kaczmarek et al. 2013; McIlwain et al. 2013; Shalini et al. 2015). Die Wirklichkeit scheint jedoch weit darüber hinaus zu gehen. Zum einen konnte eine Beteiligung von Caspase-10 nicht nur an der extrinsischen, sondern auch an der intrinsischen Apoptose gezeigt werden (Milhas et al. 2005; Mühlthaler-Mottet et al. 2011). Außerdem ergaben sich in früheren Studien immer wieder Hinweise auf eine Beeinflussung der Nekroptose durch Caspase-10 (Tummers und Green, 2017). In menschlichen Zellen kann Nekroptose auch bei intakter Caspase-8 ausgelöst werden (Moriwaki und Chan, 2013). Beide Caspasen können eine Interaktion mit cFLIP<sub>L</sub>, aber auch cFLIP<sub>S</sub> eingehen, wodurch wiederum gezeigt werden kann, dass beide Caspasen, sowohl in eine pro-apoptotische, als auch in eine pro-nekroptotische Richtung hin beeinflusst werden können (Boatright et al. 2004; Safa, 2013). Auch beim Ripoptosom, ein Komplex, welcher große Ähnlichkeiten zum TNF-Komplex II aufweist, jedoch unabhängig davon durch z.B. zellulären Stress und den Verlust der cIAPs entsteht, spielt Caspase-10 eine Rolle. Das Ripoptosom setzt sich aus FADD, RIPK1, Caspase-8, Caspase-10 und cFLIP<sub>L/S</sub> zusammen und ist sowohl zur Ausführung der Apoptose, als auch der Nekroptose fähig. Welche Art des Zelltods initiiert wird, wird auch hier durch cFLIP beeinflusst (Feoktistova et al. 2011; Feoktistova et al. 2012; Safa, 2013; Tanzer et al. 2017; Feoktistova et al. 2020). Dass Caspase-10 nicht nur an der Ausführung der Nekroptose beteiligt ist, sondern sogar einen entscheidenden Einfluss auf diese hat, wurde in der vorliegenden Arbeit hinlänglich gezeigt. Wie bereits für die Apoptose erwähnt, konnte in den Zellklonen sowohl bei Caspase-8-, als auch bei Caspase-10-Abwesenheit nicht nur Apoptose, sondern auch Nekroptose je nach Stimulation ausgelöst werden (Experimente 3.1.1, 3.2.1 und 3.3.1). Bei der Apoptose kann Caspase-10 in bestimmten Fällen als alternative Initiatorcaspase zu Caspase-8 fungieren (Galluzzi et al. 2016).

Auf die Nekroptoseinduktion scheinen diese beiden Caspasen jedoch vollständig unterschiedliche Einflüsse zu haben. Anders als in murinen Zellen schützt eine Abwesenheit von Caspase-8 in menschlichen Zellen deutlich vor Nekroptose (Experiment 3.2). Intakte Caspase-8 scheint also für die Nekroptose nötig zu sein. Im Gegensatz dazu führt eine Caspase-10-Abwesenheit in menschlichen Zellen zu einer gesteigerten Nekroptoserate (Experiment 3.2). Die entscheidende Frage ist nun natürlich, wie dieser Spezies-spezifische Unterschied bezüglich der Caspasen-8 bei der Nekroptose zwischen Maus und Mensch zu Stande kommt und welchen Einfluss Caspase-10 diesbezüglich beim Menschen hat.

## 4.2 Aufbau des Nekrosoms

Auch wenn die Abwesenheit von Caspase-8 menschliche Zellen vor Nekroptose schützt, scheint sie jedoch die entscheidende Caspase für die Homöostase der Zellen zu sein. Caspase-10-defiziente U-937-Zellen und die Wildtypzellen zeigten ein ähnlich gutes Wachstumsverhalten, während die Caspase-8-defizienten Zellen deutlich schlechter in Zellkultur zu halten waren. Im Rahmen von Koimmunpräzipitationen war es möglich, die Bestandteile des Nekrosoms und ihre Veränderung über die Zeit herauszuarbeiten. Dabei zeigte sich, dass sowohl in den Wildtypzellen als auch in den Caspase-8- und Caspase-10-defizienten Zellen RIPK1, RIPK3 und beide Caspase (bei den Wildtypzellen), als auch die jeweils nicht defiziente Caspase in den Zellklonen im Nekrosom grundsätzlich zu finden sind. Dies spricht grundsätzlich erst einmal dafür, dass trotz der Abwesenheit von Caspase-8 oder -10 die Bildung des Nekrosoms zu Stande kommt. Alle dazugehörigen Proteine nehmen bei den Wildtypzellen und den Caspase-10-defizienten Zellklonen über die Zeit zu, die Abwesenheit von Caspase-10 scheint also keinen großen Einfluss auf die Stabilität des Nekrosoms zu haben. Dadurch kann die Nekroptose ungehindert voranschreiten, was sich dann auch wiederum in der erhöhten Zelltodrate widerspiegelt. Bei den Caspase-8-defizienten Zellen werden die untersuchten Proteine kaum bis gar nicht über die Zeit angereichert. Der Aufbau des Nekrosoms ist anscheinend massiv gestört, was auch den beobachteten Schutz vor Nekroptose erklären würde, wenn das Nekrosom nicht adäquat ausgebildet werden kann. Dass Nekroptose jedoch auch bei einer Caspase-8-Defizienz nicht vollständig unterdrückt wird, wird durch die auch dabei zu findende Aktivierung von MLKL (Abbildung 3.3.1) nachgewiesen. Diese Aktivierung fällt bei den Caspase-8-defizienten Zellklonen jedoch deutlich geringer aus, was wiederum eine Erklärung für die verringerte Zelltodrate darstellen könnte, da eine schwächere MLKL-Aktivierung in der Folge auch zu einer möglichen verminderten Permeabilität der Zelle führt.

Schon Fischer und andere hatten die Vermutung aufgestellt, dass Caspase-8 nicht nur bei der Apoptoseinduktion deutlich mehr reguliert zu sein scheint, als Caspase-10 (Fischer et al. 2006). Auch beim Aufbau des DISC war gezeigt worden, dass Caspase-8 eine sehr wichtige Rolle als Gerüstprotein einnimmt. Ist Caspase-8 abwesend, wird auch Caspase-10 kaum rekrutiert (Horn et al. 2017). Ein möglicher Ansatzpunkt des unterschiedlichen Einflusses von Caspase-8

und -10 könnte also im Aufbau bzw. der Stabilität des Nekrosoms liegen. Wieso Caspase-8 aber anscheinend so viel wichtiger dafür ist, ist bisher nicht vollständig geklärt.

#### 4.3 Substrate der beiden Initiator-Caspasen

Eine weitere mögliche Erklärung der unterschiedlichen Zelltodeeffekte von Caspase-8 und -10 könnte sein, dass sie verschiedene Substratspezifitäten haben oder dieselben Substrate mit unterschiedlicher Effektivität spalten (Wang et al. 2001). Sieht man sich als Erstes die beiden Caspasen selbst an, lässt sich feststellen, dass beide hydrophobische Reste ihrer Substrate favorisieren (Duclos et al. 2017).

Nur nicht-gespaltene oder DISC-gebundene Caspase-8-Dimere, jedoch nicht vollständig aktivierte Caspase-8, haben eine hohe Affinität zu ihren eigenen Proenzymen und können dieses aktivieren. Auf der anderen Seite kann jedoch Caspase-10 nicht nur ihr eigenes Proenzym spalten, sondern darüber hinaus kann sie auch Pro-Caspase-8 effektiv aktivieren. Procaspsase-10 kann andersherum auch von Caspase-8 aktiviert werden (Fischer et al. 2006). Dieser Zusammenhang spricht nicht nur für eine wichtige Interaktion der beiden Caspasen bei der Apoptoseinduktion, sondern auch dafür, dass die Aktivierung von Caspase-10 durch sich selbst effektiver ausfällt, als bei Caspase-8. Dies würde für eine stärkere Zelltodinduktion bei der Aktivierung von Caspase-10 sprechen.

Auch scheint Caspase-10 resistenter gegenüber Caspase-Inhibitoren, wie zum Beispiel das in dieser Arbeit verwendete zVAD-fmk, zu sein (Wang et al. 2001; Mühlethaler-Mottet et al. 2011).

Ein wichtiges Substrat von Caspase-8 ist RIPK1, ein entscheidendes Element der Nekroptose und darüber hinaus Bestandteil vieler weiterer zellulärer Prozesse (Chen et al. 2019). Lange Zeit galt die Annahme, Caspase-10 sei nicht in der Lage, RIPK1 zu prozessieren, da bei Caspase-8-defizienten Jurkat T-Zellen keine RIPK1-Spaltung nachgewiesen werden konnte (Wang et al. 2001). Neuere Studien zeigten jedoch, dass Caspase-10 sehr wohl in der Lage ist, RIPK1 zu spalten, bei beiden Enzymen konnte dasselbe Spaltungsmuster detektiert werden und es wird sogar spekuliert, dass Caspase-10 RIPK1 deutlich effektiver spalten kann, als Caspase-8 (Fischer et al. 2006; Wachmann et al. 2010). Dies könnte ein vielversprechender Ansatz sein, wieso es in menschlichen Zellen bei Caspase-10-Defizienz zu einer erhöhten Nekroptoserate kommt, wenn Caspase-10 RIPK1 nicht mehr spaltet und somit in dieser Hinsicht keinen Schutz

vor Nekroptose mehr bietet. Genauso wie RIPK1 wird auch RIPK3 von Caspase-8 gespalten. Caspase-8 stellt die Haupt- jedoch nicht die einzige Caspase dar, welche RIPK3 spalten kann, Caspase-10 scheint nach bisherigen Ergebnissen dazu jedoch nicht in der Lage zu sein (Feng et al. 2007).

Ein weiteres gemeinsames Substrat beider Caspase ist Bid, worüber der extrinsische und intrinsische Weg der Apoptose verknüpft werden kann (MacEwan, 2002; Milhas et al. 2005; Wang et al. 2008). Caspase-8 und -10 spalten Bid jeweils an unterschiedlichen Stellen, was vermutlich eine Konsequenz in Bezug auf den nachgeschalteten mitochondrialen Signalwege und die Interaktion mit Bax und Bak hat und somit die Induktion des Zelltodes unterschiedlich beeinflusst (Milhas et al. 2005; Fischer et al. 2006; Ekcharyawat et al. 2011; Safa, 2013). Auch die Effektor-Caspase-3 kann sowohl von Caspase-8, als auch -10 gespalten werden, wobei sich die Literatur auch hier unsicher ist, ob sich das Spaltungsmuster unterscheidet und ob ein vergleichbares Level an gespaltener Caspase-3 vorliegt (Wang et al. 2001; Fischer et al. 2006; Ekcharyawat et al. 2011). In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass gespaltene Caspase-3 zu gleichen Zeitpunkten bei Apoptoseinduktion, sowohl bei Caspase-8-, als auch Caspase-10-defizienten Zellen zu finden ist (Experimente 3.1.1, 3.2.1 und 3.3.1) und somit beide Caspase in der Lage sind, Caspase-3 zu spalten.

Man hat jedoch gesehen, dass sich die Substratspezifität von Caspase-8 mit ihrer anti-apoptotischen Funktion im nicht-gespalteten Zustand hin zu einer pro-apoptotischen Funktion im aktivierte Zustand verändert. Bei Caspase-10 gibt es keine Änderung der Substratspezifität in Bezug auf ihren Aktivierungsgrad, auch nicht gespaltene Caspase-10 scheint eine pro-apoptotische Rolle zu spielen (Wachmann et al. 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für Caspase-8 eine gewisse Anzahl an Substraten bekannt ist, die vor allem für den Zelltod verantwortlich sind. Es gibt jedoch auch zelltodinduzierende Substrate, welche besser durch Caspase-10, als durch Caspase-8 gespalten werden können, wie es zum Beispiel für RIPK1 angenommen wird (Fischer et al. 2006; Wachmann et al. 2010). Insgesamt ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass Caspase-10 beim Menschen nicht als überzählige, sondern in manchen Fällen sogar als primäre Caspase agieren könnte (Fischer et al. 2006).

#### 4.3.1 Vergleich der Caspase-8 bei Maus und Mensch

Eine darüber hinausgehende Möglichkeit, die Spezies-spezifische Rolle zwischen Maus und Mensch zu erklären, könnte in den strukturellen Unterschieden der humanen und der murinen Caspase-8 liegen. Die dreidimensionalen Strukturen der aktiven Formen von Caspase-8 bei der Maus und beim Menschen sind sich sehr ähnlich und weisen keine Unterschiede auf funktioneller Ebene auf. Jedoch gibt es immer wieder Hinweise auf post-transkriptionale Modifizierungen, welche den entscheidenden Faktor bei der Spezies-spezifischen Rolle der menschlichen und murinen Caspase-8 ausmachen könnten. Die humane Caspase-8 wird durch eine Tyrosinkinase phosphoryliert, dieser Schritt unterdrückt ihre Selbstspaltung und Proteaseaktivierung und führt somit zu einer Inhibition der Apoptose. Ein vergleichbarer Tyrosinrest ist in Zellen von Mäusen nicht zu finden, was einen möglicherweise entscheidenden Unterschied bei der Ausführung der Apoptose bedeuten könnte (Sakamaki et al. 2015).

#### 4.4 Unabhängigkeit des Einflusses der einzelnen Nekroptose-relevanten Proteine

In dieser Arbeit wurde zusätzlich der Einfluss bestimmter, für die Nekroptose relevanter, Proteine auf den Zelltod in den Caspase-defizienten Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die protektive Rolle der Caspase-8-Defizienz auch bei Reduktion von Caspase-10 bestehen bleibt. Genauso weisen die Caspase-10-defizienten Zellen auch weiterhin eine erhöhte Zelltodrate auf, auch wenn Caspase-8 zusätzlich herunterreguliert worden ist.

Regulierte man sowohl bei den Caspase-8-, als auch den Caspase-10-defizienten Zellen zusätzlich RIPK1 herunter, zeigte sich bei beiden Zellreihen ein leichter Schutz vor Nekroptose. RIPK1 ist in viele verschiedene Signalwege eingebunden. Je nach Phosphorylierungs-Status kann es allein den Zelltod über mindestens drei verschiedene Signalwege initiieren. Dazu gehört die RIPK1-unabhängige Apoptose über Komplex IIa, die RIPK1-basierte Apoptose über Komplex IIb und die RIPK3- und MLKL-vermittelte Nekroptose (Chen et al. 2019). Auf der anderen Seite ist RIPK1 jedoch auch ein Mediator des Zellüberlebens. So kann man insgesamt zusammenfassen, dass RIPK1 eine sehr variable Funktion mit sowohl pro-und anti-apoptotischen, als auch Nekroptose-beeinflussenden Eigenschaften aufweist (Kearney et al. 2014; Orozco et al. 2014; Zhou und Yuan, 2014; Vanden Berghe et al. 2016; Tummers und Green, 2017; Chen et al. 2019).

Darüber hinaus weisen beide Caspase-defizienten Zelllinien durch die zusätzliche Reduktion von RIPK3 einen deutlichen Schutz vor Nekroptose auf. Dies lässt sich dadurch erklären, dass RIPK3 essentiell für die Ausführung der Nekroptose und besonders die Rekrutierung von MLKL ist, so dass in Abwesenheit von RIPK3 keine Nekroptose stattfinden kann (Cho et al. 2009; He et al. 2009; Zhang et al. 2009; Koo et al. 2015).

Als letztes Protein wurde in dieser Arbeit noch in beiden Caspase-defizienten Zelllinien cFLIP herunterreguliert. Dieses cFLIP wird als eines der Gene des Zellüberlebens exprimiert und kann somit, je nach Isoform, sowohl den apoptotischen, als auch den nekroptotischen Zelltod verhindern (Bertrand et al. 2008, Feoktistova et al. 2011; Vanden Berghe et al. 2014; Chen et al. 2019). Dementsprechend verursachte die Herunterregulierung von cFLIP in den Caspase-defizienten Zelllinien, wie erwartet, eine deutlich gesteigerte Zelltodrate.

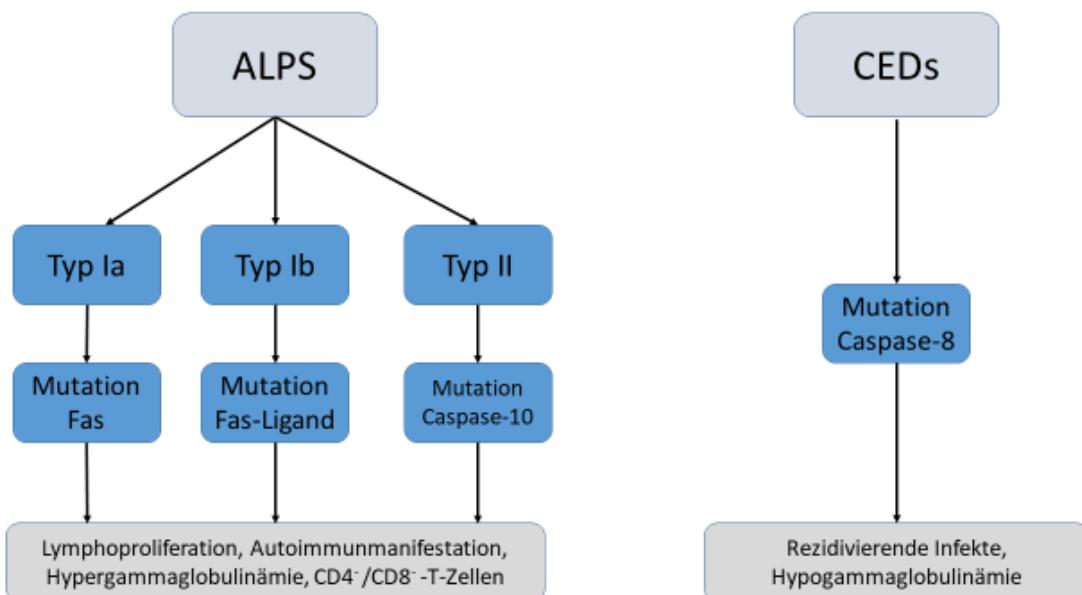
Es lässt sich festhalten, dass der Einfluss der einzelnen Proteine auf den Verlauf der Nekroptose bestehen bleibt, egal ob Caspase-8 oder Caspase-10 abwesend ist, sodass man insgesamt von einem gewissen unabhängigen Einfluss der einzelnen Faktoren ausgehen kann. Trotzdem gibt es im lebenden Organismus ein dynamisches Zusammenspiel der beschriebenen Proteine.

#### **4.5 Unterschiedliche Phänotypen durch eine genetische Deletion von Caspase-8 und Caspase-10**

Bisherige Experimente zum Einfluss der Caspase, in Bezug auf die Regulation der Nekroptose, wurden hauptsächlich in murinen Zellen durchgeführt, sodass vergleichbare Resultate in humanen Zellen fehlen (Galluzzi et al. 2016). Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte jedoch eine klare Spezies-spezifische Rolle von Caspase-8 zwischen Maus und Mensch und eine darüber hinausgehende Rolle der Caspase-10 beim Menschen, bezüglich der Nekroptose, herausgearbeitet werden.

Schon Sakamaki und Satou beschrieben unterschiedliche Phänotypen zwischen Maus und Mensch nach einer Deletion oder funktionellen Inaktivierung von Caspase-8 (Sakamaki und Satou, 2009). Während in Mäusen, wie bereits beschrieben, eine Caspase-8-Defizienz in embryonaler Letalität aufgrund massiver Nekroptose endet, ist der Verlust von Caspase-8 beim Menschen durchaus vereinbar mit einer relativ normalen Entwicklung (Varfolomeev et al. 1998; Chun et al. 2002, Sakamaki et al. 2002; McIlwain et al. 2013; Silke et al. 2015).

Führt eine homozygote Caspase-8 Mutation beim Menschen meist nur zu einer milden Immundefizienz (Chun et al. 2002), ruft eine Caspase-10 Mutation dagegen meist bereits im frühen Kindesalter ein schweres Krankheitsbild namens Autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom (ALPS) hervor (Straus et al. 1999; Su und Lenardo, 2008). Das ALPS wurde in den frühen 1990ern charakterisiert und ist gekennzeichnet durch eine Lymphoproliferation mit Lymphadenopathie, Spleno- und Hepatomegalie, Autoimmunmanifestationen, einer Hypergammaglobulinämie und dem Vorkommen von CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. In der Folge kann es bei diesen Patienten zur Hypersplenie, autoimmunhämolytischen Anämie, Thrombozytopenie, Neutropenie und einer erhöhten Lymphominzidenz kommen.



**Abbildung 9: Defekte der Apoptose.** Beim Menschen führen Defekte des Fas-Rezeptors/-Liganden oder von Caspase-10 zu einem Krankheitsbild namens autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom (ALPS Typ Ia, Ib und II), welches in der Folge schwerwiegende gesundheitliche Folgen haben kann. Stattdessen führen Defekte von Caspase-8 zu einem weniger stark ausgeprägtem Krankheitsbild namens Caspase-8-Defizienz-State (CEDs).

Von den möglichen Typen des ALPS ist für die vorliegende Arbeit vor allem der ALPS Typ II entscheidend, verantwortlich für diese Art der Erkrankung sind verschiedene homo- oder heterozygote Mutationen der Caspase-10. Es kommt zu einer geringeren Zelltodrate über

Rezeptoren wie Fas oder TNF-R1 und so zu einer Funktionsstörung dendritischer Zellen und der Lymphozytenhomöostase aufgrund einer verminderten Aktivität der Caspase-10 (Wang et al. 1999; Bride und Teachey, 2017; Mazerolles et al. 2018).

Auch Caspase-8 scheint beim Menschen in gewissem Maße die Lymphozytenproliferation zu regulieren (Chun et al. 2002). Inaktivierende Mutationen führen zu einem Krankheitsbild, welches man als CEDs (Caspase-8-defizienter Status) bezeichnet (Su und Lenardo, 2008; Bride und Teachey, 2017). Auffallend ist hierbei vor Allem eine gewisse Einschränkung des Immunsystems durch eine gestörte Lymphozytenapoptose und -homöostase und Defekte bei der Aktivierung von T- und B-Lymphozyten und Natürlichen-Killerzellen (Chun et al. 2002; McIlwain et al. 2013; Zhou und Yuan, 2014). Die Folge sind wiederkehrende sinopulmonale Infekte und eine Hypogammaglobulinämie (Chun et al. 2002; Su und Lenardo, 2008). Ein ähnlicher Phänotyp, wie beim ALPS des Menschen, kann auch bei Mäusen beobachtet werden, wenn nach einer Deletion von Caspase-8 zusätzlich noch Nekroptose blockiert wird (Kaiser et al. 2011; Oberst et al. 2011; Rickard et al. 2014; Galluzzi et al. 2017). Schaltet man in den T- oder B-Zellen der Mäuse Caspase-8 aus, kommt es zu einer normalen Thymusentwicklung, aber auch zu einer reduzierten Anzahl peripherer T-Zellen, welche dazu ein vermindertes Ansprechen auf Stimuli zeigen (Salmena et al. 2003; Su und Lenardo, 2008; Shalini et al. 2015). Mit fortgeschrittenem Alter entwickeln diese Mäuse eine Lymphadenopathie, eine Splenomegalie, es kommt zur T-Zell-Infiltration verschiedenster Organe und zu Autoimmunreaktionen (Salmena und Hakem, 2005; Kaczmarek et al. 2013). Genau diese Phänomene charakterisieren auch das ALPS des Menschen. Bei Mäusen sind die endothelialen und hämatopoetischen Zellen am meisten von einer Caspase-8-Abwesenheit betroffen, beim ALPS des Menschen sieht man genau dieselbe Präferenz (Mocarski et al. 2011). Dadurch ergibt sich insgesamt die Überlegung, dass Caspase-10 beim Menschen den Verlust von Caspase-8 in gewissem Umfang kompensieren kann (Chun et al. 2002).

#### **4.6 Nekroptose als mögliche Alternative in der Tumortherapie**

Es ist als gesichert anzusehen, dass die Nekroptose in viele humane Pathologien involviert ist, wozu auch die Tumorgenese zu gehören scheint. Verschiedene Krebsarten scheinen in ihren Tumorzellen auch Komponenten des nekroptotischen Zelltods zu tragen und somit zum nekroptotischen Zelltod fähig zu sein (Su et al. 2016). Auch töten einige Chemotherapeutika,

wie z.B. Topoisomerase-Inhibitoren, Edelfosin oder Paclitaxel, Tumorzellen über eine Nekroptoseinduktion (Park et al. 2004; Koo et al. 2015; Chen et al. 2019).

Ein weiterer wichtiger Faktor, sowohl bei der Tumorentstehung, als auch im Sinne von möglichen therapeutischen Ansatzpunkten, scheint die Expression der Initiatorcaspasen zu sein. Mutationen von Caspase-8 hatte man bereits für verschiedene Tumore nachweisen können, was auch die Apoptose-Resistenz als globale Eigenschaft vieler Tumore erklären würde. Auch konnte für einige Caspase-8-Polymorphismen ein niedrigeres Risiko aufgezeigt werden, an bestimmten Tumorarten wie dem Mammakarzinom zu erkranken, sodass insgesamt von einer antitumoralen Eigenschaft dieser Caspase auszugehen ist (Shalini et al. 2015). Darüber hinaus scheint aber auch Caspase-10 eine entscheidende Funktion als Tumorsuppressor aufzuweisen. Sowohl bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen (Shin et al. 2002a; Rao und Straus, 2006), als auch bei Patienten mit soliden Tumoren, wie dem Kolon-, Bronchial-, Magen- und Mammakarzinom, konnten erworbene inaktivierende Mutationen von Caspase-10 nachgewiesen werden (Kischkel et al. 2001; Park et al. 2002; Shin et al. 2002b; Cisterne et al. 2014; Shalini et al. 2015). In Zellen von Bronchial- und Mammakarzinomen wird beispielsweise mRNA für sowohl Caspase-8, als auch Caspase-10 exprimiert, teilweise jedoch trotzdem kein Protein für Caspase-10 gebildet. Bei Abwesenheit des Caspase-8-Proteins war auch begleitend immer das Caspase-10-Protein abwesend. Die Herunterregulierung von Caspase-10 scheint hierbei also entscheidender zu sein, als jene von Caspase-8 (Kischkel et al. 2001).

Bisherige Strategien bezüglich bestehender Tumortherapien basieren oft auf einer Induktion von Apoptose in den Tumorzellen. Da viele Karzinome jedoch eine Resistenz gegenüber Apoptose entwickeln können, sind darauf basierende Therapiemöglichkeiten oft begrenzt. So bietet die Nekroptose wiederum eine alternative Zelltodform als Ziel einer Tumortherapie, wobei auch hier die unterschiedliche Beeinflussung von Caspase-8 und Caspase-10 als mögliche Therapieansätze in Frage kommen.

#### 4.7 Fazit und Ausblick

Fasst man nun all diese Ergebnisse zusammen, sieht man, dass, anders als bei den Mäusen beobachtet, in den menschlichen Zellen die Caspase-8-Defizienz zu einem Schutz vor Nekroptose führt, wohingegen die Caspase-10-Defizienz die Nekroptose fördert. Caspase-10 wird beim Menschen besonders in primären lymphatischen Zellen des Immunsystems exprimiert und ist auch für ihre Homöostase verantwortlich. Kommt es zu einer Transformation dieser Zellen, z.B. durch ein malignes oder ein virales Geschehen, ist Caspase-10 nur noch in deutlich reduzierter Zahl zu finden (Wang et al. 1999; Wang et al. 2001; Cisterne et al. 2014). Über einen Zelltod, der nur, oder vor allem auf Caspase-10 basiert, ist selten berichtet worden. Neuerdings gibt es dafür jedoch immer mehr Hinweise, besonders wenn es um die lymphatische Zellpopulation geht. So ist Caspase-10 hauptverantwortlich für die chemotherapeutische Wirkung von Etoposid in U-937-Zellen, genauso wie für die tödliche Wirkung des ubiquitären Umweltgiftes Tributylzinn (Filomenko et al. 2006; Krug, 2012; Cisterne et al. 2014). Es ist also für Caspase-10, besonders was die Apoptose betrifft, möglich, in bestimmten Situationen die Rolle von Caspase-8 einzunehmen. Die Mutationen beider Caspaseen beim Menschen offenbaren jedoch unterschiedliche Krankheitsbilder, sodass auch hierbei die Rollen der beiden Caspaseen nicht als redundant anzusehen sind.

Bezüglich der Nekroptose ließen sich zwischen Maus und Mensch bei Caspase-8-Defizienz deutlich gegenläufige Ergebnisse beobachten. Caspase-8 scheint beim Menschen sehr wichtig für die Stabilität des Nekrosoms zu sein. Ihre Abwesenheit sorgt für eine inadäquate Nekrosombildung und somit auch für Schutz vor Nekroptose. Wieso Caspase-8 jedoch so wichtig für das Nekrosom ist, bleibt weiter unklar.

Caspase-8 und Caspase-10 haben partiell überlappende Funktionen während der humanen Entwicklung (Mocarski et al. 2011). Die Möglichkeit, Caspase-8 durch Caspase-10 zu ersetzen, scheint abhängig von der jeweiligen Zellart zu sein (Kischkel et al. 2001). Beim Menschen ist definitiv von einem Spezies-spezifischen Einfluss von Caspase-8 und -10 in Bezug auf die Nekroptose auszugehen. Es konnten verschiedene Theorien erläutert werden, wie dieser Einfluss zu erklären ist, der genaue Mechanismus dahinter ist jedoch weiterhin nicht ausreichend untersucht. Weitere Forschungen zu diesem Thema werden nötig sein, um den gegensätzlichen Einfluss der Caspaseen beim Menschen und auch bei der Maus besser zu verstehen und die Erkenntnisse therapeutisch nutzen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass nicht nur Apoptose als genetisch regulierter Zelltod ablaufen kann, wurde 2005 die Nekroptose beschrieben, die heute als am besten untersuchte Form des programmierten, nicht apoptotischen, Zelltods gilt. Dabei laufen die initialen Schritte der Nekroptose Caspase-unabhängig ab, RIPK3 und MLKL stellen die zentralen Moleküle des Nekrosoms dar. Lange Zeit galt die Annahme, dass Caspase-8, als entscheidende Initiatorcaspase der Apoptose, vor Nekroptose schützt, da auch gezeigt werden konnte, dass Mäuseembryonen, bei denen Caspase-8 ausgeschaltet wurde, bereits vor der Geburt, aufgrund einer gesteigerten Nekroptose, verstarben. Daher wurde angenommen, dass dasselbe Prinzip auch für die menschliche Caspase-8 gilt. Im Gegensatz zu Mäusen, verfügen Menschen jedoch über eine weitere Initiatorcaspase, Caspase-10, welche in Mäusen evolutionär verloren ging. Anders als erwartet, hatte sich bereits in Pilotexperimenten gezeigt, dass in menschlichen Zellen nicht die Herunterregulierung von Caspase-8, sondern die von Caspase-10 zu einer gesteigerten Nekroptoserate führt. So galt ein großer Teil der vorliegenden Arbeit zunächst der Generierung von Zellen, in denen entweder Caspase-8 oder Caspase-10 deletiert war, was mit Hilfe des CRISPR/Cas Systems möglich gemacht wurde. Als Modelzelllinie fungierte dabei die humane Lymphomzelllinie U-937.

In dieser Arbeit konnte eine deutliche Spezies-spezifische Rolle der Caspase in Bezug auf die Nekroptose zwischen Mensch und Maus gezeigt werden. Zellen, in denen Caspase-8 deletiert war, waren vor Nekroptose geschützt, während ein Knockout von Caspase-10 zu einem gesteigerten Zelltod führte. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass beide Zelllinien gleichermaßen, sowohl zur Nekroptose, als auch zur Apoptose, fähig waren.

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass Caspase-10 das menschliche Korrelat der murinen Caspase-8 darstellen könnte. Wiederum konnte jedoch auch aufgezeigt werden, dass Caspase-10 nicht die Funktion von Caspase-8 übernehmen kann, sodass diese beiden Caspase keinesfalls als redundant anzusehen sind.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bezog sich auf den Vergleich des Nekrosoms der beiden Knockout-Zelllinien untereinander und mit dem Wildtypen während der Nekroptose. Dabei ergaben sich eindeutige Hinweise darauf, dass Caspase-8 für die Stabilität des Nekrosoms in menschlichen Zellen wichtig ist, was wiederum die reduzierte Nekroptoserate in den humanen U-937-Zellen nach der Deletion von Caspase-8 erklärt. Darüber hinaus konnte

ebenfalls gezeigt werden, dass die einzelnen Proteine, welche an der Nekroptose beteiligt sind, ihre Funktionen ihren Einfluss auf das Zelltodgeschehen beibehalten, unabhängig davon, ob Caspase-8 oder -10 zusätzlich ausgeschaltet wurden.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit Belege für Spezies-spezifische Unterschiede von Caspase-8 in Bezug auf die Nekroptose bei Maus und Mensch und die Rolle von Caspase-10 für die Regulation der Nekroptose im Menschen. Ein genaues Verständnis dieser Zusammenhänge wird in Zukunft immer wichtiger werden, um gezielt z.B. Nekroptose-assoziierte Erkrankungen behandeln zu können.

## 6. Summary

Breaking the dogma that apoptosis is the only highly regulated form of cell death, necroptosis was described in 2005 and is today considered as the best studied form of regulated non-apoptotic cell death. The initial steps of necroptosis take place independently of the caspases. The proteins RIPK3 and MLKL are core components of a highly regulated complex termed the “necrosome”. For a long time, it was assumed that caspase-8, the decisive apoptotic initiator caspase, protects against necroptosis, which was impressively shown in murine knockout models. Therefore, it was assumed that the same principle applies to human caspase-8.

In contrast to mice, humans express a further initiator caspase, caspase-10, which was lost in mice in the course of evolution.

Our own laboratory unexpectedly found in pilot experiments that in human cells, not the downregulation of caspase-8, but downregulation of caspase-10 exacerbates necroptosis. Thus, much of the present work was initially devoted to the generation of cells in which either caspase-8 or caspase-10 was genetically deleted by employing the CRISPR/Cas technology. For these experiments, human histiocytic lymphoma U-937 cells acted as a model cell line.

In the presented dissertation it was demonstrated that there is a species-specific impact of caspases with regard to necroptosis in human and mouse cells. In human cells, caspase-8 knockout protects from necroptosis, while the caspase-10 knockout enhances cell death. It could also be shown that both cell lines were equally capable of both necroptosis and apoptosis.

The results presented here support the hypothesis that caspase-10 can represent the human counterpart of murine caspase-8 in necroptosis under certain circumstances. On the other hand, it could be shown that caspase-10 cannot entirely substitute for caspase-8, so that these caspases should by no means be considered redundant.

An additional aim of this thesis was the examination of the components of the necrosome by comparing both knockout cell lines and wildtype U-937 cells during necroptosis. There were clear indications that caspase-8 is important for the stability of the necrosome, which in turn explains the reduced rate of necroptosis in human U-937 cells after the deletion of caspase-8. In addition, it could also be shown that the individual components of the necrosome act independently of each other, regardless of whether Caspase-8 or -10 were additionally knocked out.

In summary, the present work provides evidence for species-specific differences of caspase-8 with regard to necroptosis in mice and humans and for the role of caspase-10 in the regulation of necroptosis in humans.

In the future, a detailed understanding of these relationships will become increasingly important for the targeted treatment of, e.g., necroptosis-associated diseases.

## 7. Literaturverzeichnis

**Aggarwal, B.B., Natarajan, K.** (1996): Tumor necrosis factors: Developments during the last decade. *Eur. Cytokine Netw.* 7, 93-124

**Aggarwal, B.B., Gupta, S.C., Kim, J.H.** (2012): Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 119, 651-665

**Ashkenazi, A., Dixit, V.M.** (1999): Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11(2), 255-260

**Bertrand, M.J.M., Milutinovic, S., Dickson, K.M., Ho, W.C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J.W., Jaquith, J.B., Morris, S.J., Barker, P.A.** (2008): cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol. Cell* 30, 689-700

**Boatright, K.M., Deis, C., Denault, J.B., Sutherlin, D.P., Salvesen, G.S.** (2004): Activation of caspases-8 and -10 by FLIP<sub>L</sub>. *Biochem. J.* 382(2), 651-657

**Bratton, S.B., Salvesen, G.S.** (2010): Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J. Cell Sci.* 123(19), 3209-3214

**Brenner, D., Blaser, H., Mak, T.W.** (2015): Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat. Rev. Immunol.* 15(6), 362-374

**Bride, K., Teachey, D.** (2017): Autoimmune lymphoproliferative syndrome: more than a FAScinating disease. *F1000Res* 6, 1928

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

**Cauwels, A., Janssen, B., Waeytens, A., Cuvelier, C., Brouckaert, P.** (2003): Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2. *Nat. Immunol.* 4(4), 387-393

**Chaitanya, G.V., Steven, A. J., Babu, P. P.** (2010): PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun. Signal.* 8 (31)

**Chen, Z.J.** (2012): Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunol. Rev.* 246, 95-106

**Chen, W., Zhou, Z., Li, L., Zhong, C.Q., Zheng, X., Wu, X., Zhang, Y., Ma, H., Huang, D., Li, W., Xia, Z., Han, J.** (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

**Chen, X., Li, W., Ren, J., Huang, D., He, W.T., Song, Y., Yang, C., Li, W., Zheng, X., Chen, P., Han, J.** (2014): Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res.* 24, 105-121

**Chen, J., Kos., R., Garssen, J., Redegeld, F.** (2019): Molecular insights into the mechanism of necroptosis: The necrosome as a potential therapeutic target. *Cells*. 8(21), 1486

**Chi, H., Chang, H.Y., Sang, T.K.** (2018): Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 19:pii: E3082.

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

**Chun, H.J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C.K., Siegel, R.M., Dale, J.K., Puck, J., Davis, J., Hall, C.G., Skoda-Smith, S., Atkinson, T.P., Straus, S.E., Lenardo, M.J.** (2002): Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419(6905), 395–399

**Cisterne, A., Baraz, R., Khan, N.I., Welschinger, R., Basnett, J., Fung C., Rizos, H., Bradstock, K. F., Bendall, L.J.** (2014): Silencer of Death Domains controls cell death through Tumour Necrosis Factor-Receptor 1 and Caspase-10 in Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS One* 9, e103383

**Cuda, C.M., Misharin, A.V., Khare, S., Saber, R., Tsai, F., Archer, A.M, Homan, P.J., G. Haines III G.K., Hutcheson, J., Dorfleutner, A., Budinger, G.R.S., Stehlik, C., Perlman, H.** (2015): Conditional deletion of caspase-8 in macrophages alters macrophage activation in a RIPK-dependent manner. *Arthritis Res. Ther.* 17(1), 291.

**De Almagro, M.C., Vucic D.** (2015): Necroptosis: Pathway diversity and characteristics. *Semin. Cell Dev. Biol.* 39, 56-62

**Degterev, A., Yuan, J.** (2008): Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(5), 378-390

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

**Degterev, A., Hitomi, J., Germscheid, M., Ch'en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., Hedrick, S.M., Gerber, S.A., Lugovskoy, A., Yuan, J.** (2008): Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat. Chem. Biol.* 4, 313-321

**Dillon, C.P., Oberst, A., Weinlich, R., Janke, L.J., Kang, T.B., Ben-Moshe, T., Mak, T.W., Wallach, D., Green, D.R.** (2012): Survival function of the FADD-CASPASE-8-cFLIP<sub>L</sub> complex. *Cell Rep.* 1, 401-407

**Doerfler, P., Forbush, K.A., Perlmutter, R.M.** (2000): Caspase enzyme activity is not essential for apoptosis during thymocyte development. *J. Immunol.* 164(8), 4071-4079

**Dondelinger, Y., Declercq, W., Montessuit, S., Roelandt, R., Goncalves, A., Bruggeman, I., Hulpiau, P., Weber, K., Sehon, C.A., Marquis, R.W., Bertin, J., Gough, P.J.,**

**Savvides, S., Martinou, J.C., Bertrand, M.J.M., Vandenabeele, P.** (2014): MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell Rep.* 7, 971-981

**Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X.** (2000): Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42

**Duclos, C., Lavoie, C., Denault, J.B.** (2017): Caspases rule the intracellular trafficking cartel. *FEBS J* 284 (10), 1394-1420

**Dynek, J.N., Goncharov, T., Dueber, E.C., Fedorova, A.V., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Helgason, E., Fairbrother, W.J., Deshayes, K., Kirkpatrick, D.S., Vucic, D.** (2010): c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *EMBO J.* 29, 4198-4209

**Ekchariyawat, P., Thitithanyanont, A., Sirisinha, S., Utaisincharoe, P.** (2011): Apoptosis induced by avian H5N1 virus in human monocyte-derived macrophages involves TRAIL-inducing caspase-10 activation. *Innate Immunity* 18(3), 390-397

**Ellis, H.M., Horvitz, H.R.** (1986): Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44(6), 817-829

**Faustman, D., Davis, M.** (2010): TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nature Rev. Drug. Discov.* 9, 482-493

**Feltham, R., Vince, J.E., Lawlor, K.E.** (2017): Caspase-8: not so silently deadly. *Clin. Transl. Immunol.* 6, 1- 13

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

**Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D.P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Häcker, G., Leverkus, M.** (2011): cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol. Cell* 43, 449-463

**Feoktistova, M., Geserick, P., Panayotova-Dimitrova, D., Leverkus, M.** (2012): Pick your poison: The Ripoptosome, a cell death platform regulating apoptosis and necroptosis. *Cell Cycle* 11, 460-467

**Feoktistova, M., Makarov, R., Brenji, S., Schneider, A.T., Hooiveld, G.J., Luedde, T., Leverkus, M., Yazdi, A.S., Panayotova-Dimitrova, D.** (2020): A20 promotes ripoptosome formation and TNF-induced apoptosis via cIAPs regulation and NIK stabilization in keratinocytes. *Cells* 9(2), 351

**Festjens, N., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P.** (2006) Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta.* 1757(9-10), 1371–1387

**Filomenko, R., Prevotat, L., Rebe, C., Cortier, M., Jeannin, J.F., Solary, E., Bettaieb, A.** (2006): Caspase-10 involvement in cytotoxic drug-induced apoptosis of tumor cells. *Oncogene* 25, 7635–7645

**Fischer, U., Jänicke, R.U., Schulze-Osthoff, K.** (2003): Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 10, 76-100

**Fischer, U., Stroh, C., Schulze-Osthoff, K.** (2006): Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene* 25, 152-159

**Fricker, M., Vilalta, A., Tolkovsky, A.M., Brown, G.C.** (2013): Caspase inhibitors protect neurons by enabling selective necroptosis of inflamed microglia. *J. Biol. Chem.* 288, 9145-9152

**Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nunez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G.** (2012a): Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19, 107-120

**Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., Kroemer, G.** (2012b): Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ. Res.* 111(9), 1198-1207

**Galluzzi, L., López-Soto, A. , Kumar, S., Kroemer, G.** (2016): Caspases connect cell-death signaling to organismal homeostasis. *Immunity* 44(2), 221-231

**Galluzzi, L., Kepp, O., Chan, F.K., Kroemer, G.** (2017): Necroptosis: Mechanisms and relevance to disease. *Annu. Rev. Pathol.* 12, 103–130

**Galluzzi L, Vitale I et al.** (2018): Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death Differ.* 25, 486–541

**Günther, C., Martini, E., Wittkopf, N., Amann, K., Weigmann, B., Neumann, H., Waldner, M.J., Hedrick, S.M., Tenzer, S., Neurath, M.F., Becker, C.** (2011): Caspase-8 regulates TNF-alpha induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature* 477(7364), 335-339

**Haas, T.L., Emmerich, C.H., Gerlach, B., Schmukle, A.C., Cordier, S.M., Rieser, E., Feltham, R., Vince, J., Warnken, U., Wenger, T., Koschny, R., Komander, D., Silke, J., Walczak, H.** (2009): Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol. Cell* 36, 831-844

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

**Hedrick, S.M., Ch'en, I.L., Alves, B.N.** (2010): Intertwined pathways of programmed cell death in immunity. *Immunol. Rev.* 236, 41–53

**Hitomi, J., Christofferson, D.E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R.J., Yuan, J.** (2008): Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 135, 1311-1323

**Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., Tschoopp, J.** (2000): Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 1, 489-495

**Horn, S., Hughes, M.A., Schilling, R., Sticht, C., Tenev, T., Ploesser, M., Meier, P., Sprick, M.R., MacFarlane, M., Leverkus, M.** (2017): Caspase-10 negatively regulates caspase-8-mediated cell death, switching the response to CD95L in favor of NF $\kappa$ B activation and cell survival. *Cell Rep.* 19, 785-797

**Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D.V.** (1995): The TNF receptor I-associated Protein TRADD signals Cell death and NF-KB activation. *Cell* 81, 495-504

**Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G., Goeddel, D.V.** (1996a): TRADD–TRAF2 and TRADD–FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299–308

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

**Huang, Z., Wu, S.Q., Liang, Y., Zhou, X., Chen, W., Li, L., Wu, J., Zhuang, Q., Chen, C., Li, J., Zhong, C.Q., Xia, W., Zhou, R., Zheng, C., Han, J.** (2015): RIP1/RIP3 binding to HSV-1 ICP6 initiates necroptosis to restrict virus propagation in mice. *Cell Host Microbe* 17(2), 229-242

**Jiang, Y., Woronicz, J.D., Liu, W., Goeddel, D.V.** (1999): Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283(5401), 543-546

**Johnston, A., Wang, Z.** (2018): Necroptosis: MLKL polymerization. *J. Nat. Sci.* 4, e513

**Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., Krysko, D.V.** (2013): Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 38, 209–223

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

**Kaiser, W.J., Upton, J.W., Mocarski, E.S.** (2013): Viral modulation of programmed necrosis. *Curr. Opin. Virol.* 3, 296–306.

**Kearney, C.J., Cullen, S.P., Clancy, D., Martin, S.J.** (2014): RIPK1 can function as an inhibitor rather than an initiator of RIPK3-dependent necroptosis. *FEBS J.* 281(21), 4921-4934

**Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B.Z., und Leder, P.** (1998): The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- $\kappa$ B signal. *Immunity* 8, 297–303.

**Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Curriet, A.R.** (1972): Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257

**Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinell, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., Ashkenazi, A.** (2001): Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 276, 46639-46646

**Koo, G.B., Morgan, M.J., Lee, D.G., Kim, W.J., Yoon, J.H., Koo, J.S., Kim, S. I., Kim, S.J., Son, M.K., Hong, S.S., Levy, J.M.M., Pollyea, D.A., Jordan, C.T., Yan, P., Frankhouser, D., Nicolet, D., Maharry, K., Marcucci, G., Choi, K.S., Cho, H., Thorburn, A., und Kim, Y.S.** (2015): Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. *Cell Res.* 25, 707–725

**Krug, H.F.** (2012): Caspase-10 is the key initiator caspase involved in tributyltin-mediated apoptosis in human immune cells. *J. Toxicol.* 2012, 395482

**Laemmli, U.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685

**Lalaoui, N., Lindqvist, L.M., Sandow, J.J., Ekert, P.G.** (2015): The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 39, 63-69

**Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X., Vandenabeele, P.** (2002): Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* 9, 358–361

**Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P.** (2007): Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ.* 14, 44-55

**Lavrik, I., Golks, A., Krammer, P.H.** (2005): Death receptor signaling. *J. Cell Sci.* 118, 265-267

**Lee, T.H., Shank, J., Cusson, N., Kelliher, M.A.** (2004): The kinase activity of Rip1 is not required for tumor necrosis factor-alpha-induced IkappaB kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of Rip1 by Traf2. *J. Biol. Chem.* 279, 33185-33191

**Lee, S.H., Kwon, J.Y., Kim, S.Y., Jung, K., Cho, M.L.** (2017): Interferon-gamma regulates inflammatory cell death by targeting necroptosis in experimental autoimmune arthritis. *Sci. Rep.* 7, 10133

**Li, J., McQuade, T., Siemer, A.B., Napetschnig J., Moriwaki, K., Hsiao, Y., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., Chan, F.K., und Wu, H.** (2012): The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell* 150, 339–350

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

**Lin, J., Li, H., Yang, M., Ren, J., Huang, Z., Han, F., Huang, J., Ma, J., Zhang, D., Zhang, Z., Wu, J., Huang, D., Qiao, M., Jin, G., Wu, Q., Huang, Y., Du, J., Han, J.** (2013): A role of RIP3-mediated macrophage necrosis in atherosclerosis development. *Cell Rep.* 3, 200-210

**Linkermann, A., Bräsen, J.H., Himmerkus, N., Liu, S., Huber, T.B., Kunzendorf, U., Krautwald, S.** (2012): Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 81, 751–761.

**Liu, W., Chen, B., Wang, Y., Meng, C., Huang, H., Huang, X.R., Qin, J., Mulay, S.R., Anders, H.J., Qiu, A., Yang, B., Freeman, G.J., Lu, H.J., Lin, H.Y., Zheng, Z.H., Lan, H.Y., Huang, Y., Xia, Y.** (2018): RGMB protects against acute kidney injury by inhibiting tubular cell necroptosis via an MLKL-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, e1475–1484

**Lockshin, R.A., Williams, C.M.** (1964): Programmed cell death-II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J. Insect. Physiol.* 10, 643-649

**Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J.** (2001): The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487–501

**Los, M., Mozoluk, M., Ferrari, D., Stepczynska, A., Stroh, C., Renz, A., Herceg, Z., Wang, Z.Q., Schulze Osthoff, K.** (2002): Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol. Biol. Cell* 13, 978-988

**MacEwen, D.J.** (2002): TNF ligands and receptors- a matter of life and death. *Br. J. Pharmacol.* 135, 855-875

**Mazerolles, F., Stolzenberg, M.C., Pelle, O., Picard, C., Neven, B., Fischer, A., Magerus-Chatinet, A., Rieux-Lauzier, F.** (2018): Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome-FAS patients have an abnormal regulatory T cell (Treg) phenotype but display normal natural Treg-suppressive function on T cell proliferation. *Front Immunol.* 9, 718

**McIlwain, D. R., Berger, T., Mak, T. W.** (2013): Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (4), a008656

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

**Milhas, D., Cuvillier, O., Therville, N., Clave', P., Thomsen, M., Levade, T., Benoist, H., Segui, B.** (2005): Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280 (20), 19836-19842

**Mocarski, E.S., Upton, J.W., Kaiser, W.J.** (2011): Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nat. Rev. Immunol.* 12(2), 79-88

**Moquin, D., McQuade, T., Chan, F.** (2013): CYLD deubiquitinates RIP1 in the TNF $\alpha$ -induced necrosome to facilitate kinase activation and programmed necrosis. *PLoS ONE* 8, e76841

**Moriwaki, K., Chan, F.K.** (2013): RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev.* 27(15), 1640-1649

**Moujalled, D.M., Cook, W.D., Okamoto, T., Murphy, J., Lawlor, K.E., Vince, J.E., Vaux, D.L.** (2013): TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death Dis.* 4, e465

**Mühlethaler-Mottet, A., Flahaut, M., Balmas Bourloude, K., Nardou, K., Coulon, A., J Liberman, J., Thome, M., Gross, N.** (2011): Individual caspase-10 isoforms play distinct and opposing roles in the initiation of death receptor-mediated tumour cell apoptosis. *Cell Death Dis.* 2, e125

**Murakami, Y., Matsumoto, H., Roh, M., Suzuki, J., Hisatomi, T., Ikeda, Y., Miller, J.W., Vavvas, D.G.** (2012): Receptor interacting protein kinase mediates necrotic cone but not rod cell death in a mouse model of inherited degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 14598-14603

**Murphy, J.M., Czabotar, P.E., Hildebrand, J.M., Lucet, I.S., Zhang, J.G., Alvarez-Diaz, S., Lewis, R., Lalaoui, N., Metcalf, D., Webb, A.I., Young, S.N., Varghese, L.N., Tannahill, G.M., Hatchell, E.C., Majewski, I.J., Okamoto, T., Dobson, R.C.J., Hilton, D.J., Babon, J.J., Nicola, N.A., Strasser, A., Silke, J., und Alexander, W.S.** (2013): The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity* 39, 443–453.

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

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

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

**O'Donnell, M.A., Perez-Jimenez, E., Oberst, A., Ng, A., Massoumi, R., Xavier, R., Green, D.R., Ting, A.T.** (2011): Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nat. Cell Biol.* 13, 1437-1442

- Oerlemans, M.I.F.J., Liu J., Arslan, F., Den Ouden, K., Van Middelaar, B.J., Doevendans, P.A., Sluijter, J.P.G.** (2012): Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo. *Basic Res. Cardiol.* 107, 270
- Omoto, S., Guo, H., Talekar, G.R., Roback, L., Kaiser, W.J., Mocarski, E.S.** (2015): Suppression of RIP3-dependent necroptosis by human cytomegalovirus. *J. Biol. Chem.* 290, 11635-11648
- Orozco, S., Yatim, N., Werner, M.R., Tran, H., Gunja, S.Y., Tait, S.W., Albert, M.L., Green, D.R., Oberst, A.** (2014): RIPK1 both positively and negatively regulates RIPK3 oligomerization and necroptosis. *Cell Death Differ.* 21, 1511-1521
- Pan, T., Wu, S., He, X., Luo, H., Zhang, Y., Fan, M., Geng, G., Ruiz, V.C., Zhang, J., Mills, L., Bai, C., Zhang, H.** (2014): Necroptosis takes place in human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)-infected CD4+ T lymphocytes. *PLoS One* 9 (4), e93944
- Park, W.S., Lee, J.H., Shin, M.S., Park, J.Y., Kim, H.S., Lee, J.H., Kim, Y.S., Lee, S.N., Xiao, W., Park, C.H., Lee, S.H., Yoo, N.J., Lee, J.Y.** (2002): Inactivating mutations of the caspase-10 gene in gastric cancer. *Oncogene* 21, 2919-2925
- Park, S.J., Wu, C.H., Gordon, J.D., Zhong, X., Emami, A., Safa, A.R.** (2004): Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279(49), 51057-51067
- Polykratis, A., Hermance, N., Zelic, M., Roderick, J., Kim, C., Van, T.M., Lee, T.H., Chan, F.K.M., Pasparakis, M., Kelliher, M.A.** (2014): RIPK1 kinase inactive mice are viable and protected from TNF induced necroptosis in vivo. *J. Immunol.* 193, 1539–1543
- Pop, C., Oberst, A., Drag, M., Van Raam, B.J., Riedl, S.J., Green, D.R., Salvesen, G.S.** (2011): FLIP<sub>L</sub> induces caspase-8 activity in the absence of interdomain caspase-8 cleavage and alters substrate specificity. *Biochem. J.* 433, 447-457
- Ramachandran, A., McGill, M.R., Xie, Y., Ni, H.M., Ding, W.X., Jaeschke, H.** (2013): Receptor interacting protein kinase 3 is a critical early mediator of acetaminophen-induced hepatocyte necrosis in mice. *Hepatology* 58, 2099-2108
- Rao, V.K., Straus, S.E.** (2006): Causes and consequences of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Hematology* 11, 15-23
- Rickard, J.A., O'Donnell, J.A., Evans, J.M., Lalaoui, N., Poh, A.R., Rogers, T.W., Vince, J.E., Lawlor, K.E., Ninnis, R.L., Anderton, H., Hall, C., Spall, S.K., Phesse, T.J., Abud, H.E., Cengia, L.H., Corbin, J., Mifsud, S., Rago, L.D., Metcalf, D., Ernst, M., Dewson, G., Roberts, A.W., Alexander, W.S., Murphy, J.M., Ekert, P.G., Masters, S.L., Vaux, D.L., Croker, B.A., Gerlic, M., Silke, J.** (2014): RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis. *Cell* 157, 1175-1188
- Safa, A.R.** (2013): Roles of c-FLIP in apoptosis, necroptosis, and autophagy. *J. Carcinog. Mutagen* 6, 3

**Sakamaki, K., Inoue, T., Asano, M., Sudo, K., Kazama, H., Sakagami, J., Sakata, S., Ozaki, M., Nakamura, S., Toyokuni, S., Osumi, N., Iwakura, Y., Yonehara, S.** (2002): Ex vivo whole-embryo culture of caspase-8-deficient embryos normalize their aberrant phenotypes in the developing neural tube and heart. *Cell Death Differ.* 9, 1196-1206

**Sakamaki, K., Satou, Y.** (2009): Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *J. Fish. Biol.* 74, 727-753

**Sakamaki, K., Imai, K., Tomii, K., Miller, D.J.** (2015): Evolutionary analyses of caspase-8 and its paralogs: Deep origins of the apoptotic signaling pathways. *Bioessays* 37, 767-776

**Sakon, S., Xue, X., Takekawa, M., Sasazuki, T., Okazaki, T., Kojima, Y., Piao, J.H., Yagita, H., Okumura, K., Doi, T., Nakano, H.** (2003): NF- $\kappa$ B inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J.* 22 (15), 3898-3909

**Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P.Y., Berry, D.M., Tamblyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., Wakeham, A., Bouchard, D., Chen Yeh W., McGlade, J.C., Ohashi, P. S., Hakem, R.** (2003): Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev.* 17(7), 883-895

**Salmena, L., Hakem, R.** (2005): Caspase-8 deficiency in T cells leads to a lethal lymphoinfiltrative immune disorder. *J. Exp. Med.* 202(6), 727-732

**Salvesen, G.S., Walsh, C.M.** (2014): Functions of caspase 8: the identified and the mysterious. *Semin. Immunol.* 26, 246-252

**Scheidereit, C.** (2006): IkappaB kinase complexes: gateways to NF- $\kappa$ B activation and transcription. *Oncogene* 25, 6685-6705

**Shah, S., Wu, E., Rao, V.K., Tarrant, T.K.** (2014): Autoimmune lymphoproliferative syndrome: an update and review of the literature. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 14(9), 462

**Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S.** (2015): Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 22, 526-539

**Shim, J.H., Xiao, C., Paschal, A.E., Bailey, S.T., Rao, P., Hayden, M.S., Lee, K.Y., Bussey, C., Steckel, M., Tanaka, N., Yamada, G., Akira, S., Matsumoto, K., Ghosh, S.** (2005): TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev.* 19, 2668-2681

**Shin, M.S., Kim, H.S., Kang, C.S., Park, W.S., Kim, S.Y., Lee, S.N., Lee, J.H., Park, J.Y., Jang, J.J., Kim, C.W., Kim, S.H., Lee, J.Y., Yoo, N.J., Lee, S.H.** (2002a): Inactivating mutations of CASP10 gene in non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 99(11), 4094-4099

**Shin, M.S., Kim, H.S., Lee, S.H., Lee, J.W., Song, Y.H., Kim, Y.S., Park, W.S., Kim, S.Y., Lee, S.N., Park, J.Y., Lee, J.H., Xiao, W., Jo, K.H., Wang, Y.P., Lee, K.Y., Park, Y.G., Kim, S.H., Lee, J.Y., Yoo, N.J.** (2002b): Alterations of Fas-pathway genes associated with nodal metastasis in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 21, 4129-4136

- Silke, J., Brink, R.** (2010): Regulation of TNFRSF and innate immune signaling complexes by TRAFs and cIAPs. *Cell Death Differ.* 17, 35-45
- Silke, J., Rickard, J.A., Gerlic, M.** (2015): The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation. *Nat. Immunol.* 16, 689-697
- Snow, A.L., Pandiyan, P., Zheng, L., Krummey, S.M., Lenardo, M.J.** (2010): The power and the promise of restimulation-induced cell death in human immune diseases. *Immunol. Rev.* 236, 68-82
- Sosna, J., Voigt, S., Mathieu, S., Kabelitz, D., Trad, A., Janssen, O., Meyer-Schvesinger, C., Schütze, S. Adam, D.** (2013): The proteases HtrA2/Omi and UCH-L1 regulate TNF- induced necroptosis. *Cell Commun. Signal* 11, 76
- Sprick, M.R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M.A., Walczak, H.** (2002): Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signaling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J.* 21(17), 4520-4530
- Strasser, A., Jost, P.J., Nagata, S.** (2009): The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30(2), 180-192
- Straus, S.E., Sneller, M., Lenardo, M.J., Puck, J.M., Strober, W.** (1999): An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann. Intern. Med.* 130, 591-601
- Su, H.C., Lenardo, M.J.** (2008): Genetic defects of apoptosis and primary immunodeficiency. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 28(2), 329-351
- Su, Z., Yang, Z., Xie, L., DeWitt, J.P., Chen, Y.** (2016): Cancer therapy in the necroptosis era. *Cell Death Differ.* 23, 748-756
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., Wang, X.** (2012): Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* 148, 213-227
- Sun, L., Wang, X.** (2014): A new kind of cell suicide: mechanisms and functions of programmed necrosis. *Trends Biochem. Sci.* 39, 587-593
- Takahashi, N., Duprez, L., Grootjans, S., Cauwels, A., Nerinckx, W., DuHadaway, J.B., Goossens, V., Roelandt, R., Van Hauwermeiren, F., Libert, C., Declercq, W., Callewaert, N., Prendergast, G.C., Degterev, A., Yuan, J., Vandenabeele, P.** (2012): Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell Death Dis.* 3, e437
- Tanzer, M.C., Khan, N., Rickard, J.A., Etemadi, N., Lalaoui, N., Spall, S.K., Hildebrand, J.M., Segal, D., Miasari, M., Chau, D., Wong, W.W.L., McKinlay, M., Chunduru, S.K., Benetatos, C.A., Condon, S.M., Vince, J.E., Herold, M.J., Silke, J.** (2017): Combination of IAP antagonist and IFNy activates novel caspase-10- and RIPK1-dependent cell death pathways. *Cell Death Differ.* 24(3), 481-491

**Tummers, B., Green, D.R.** (2017): Caspase-8; regulating life and death. *Immunol. Rev.* 277(1), 76–89

**Upton, J.W., Kaiser, W.J., Mocarski, E.S.** (2010): Pathogen subversion of RIP3-dependent necrosis. *Cell Host Microbe* 7, 302-313

**Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., Kroemer, G.** (2010): Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 11, 700–714

**Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., Vandenabeele, P.** (2014): Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 135–147.

**Vanden Berghe, T., Hassannia, B., Vandenabeele, P.** (2016): An outline of necrosome triggers. *Cell Mol. Life Sci.* 73, 2137-2152

**Vanlangenakker, N., Bertrand, M.J., Bogaert, P., Vandenabeele, P., Vanden Berghe, T.** (2011): TNF-induced necroptosis in L929 cells is tightly regulated by multiple TNFR1 complex I and II members. *Cell Death Dis.* 2, e230

**Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannilkulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K.B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P., Wallach, D.** (1998): Targeted disruption of the mouse caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9, 267–276

**Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A.V., Dynek, J.N., Zobel, K., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., Vucic, D.** (2008): c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-induced NF- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.* 283, 24295-24299

**Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., Vandenabeele, P.** (1998): Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 187, 1477-1485

**Vogt, C.** (1842): Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). *Solothurn: Jent und Gassmann*, 281-284

**Voigt, S., Philipp, S., Davarnia, P., Winoto-Morbach, S., Röder, C., Arenz, C., Trauzold, A., Kabelitz, D., Schütze, S., Kalthoff, H., Adam, D.** (2014): TRAIL-induced programmed necrosis as a novel approach to eliminate tumor cells. *BMC Cancer* 14, 74

**Wachmann, K., Pop, C., van Raam, B.J., Drag, M., Mace, P.D., Snipas, S.J., Zmasek, C., Schwarzenbacher, R., Salvesen, G.S., Riedl, S.J.** (2010): Activation and specificity of human caspase-10. *Biochemistry* 49(38), 8307–8315

- Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F.K., Dale, J., Sneller, M., Yao, X., Puck, J.M., Straus, S.E., Lenardo, M.J.** (1999): Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 98, 47-58
- Wang, J., Chun, H.J., Wong, W., Spencer, D.M., Lenardo, M.J.** (2001): Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(24), 13884–13888
- Wang, L., Du, F., und Wang, X.** (2008): TNF- $\alpha$  induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133, 693–703
- Wang, Z., Jiang, H., Chen, S., Du, F., Wang, X.** (2012): The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell* 148, 228-243
- Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L.F., Wang, F.S., Wang, X.** (2014): Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol. Cell* 54, 133-146
- Wang, T., Jin, Y., Yang, W., Zhang, L., Jin, X., Liu, X., He, Y., Li, X.** (2017): Necroptosis in cancer: an angel or a demon? *Tumour Biol.* 39
- Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., Ma, A., Koonin, E.V., Dixit, V.M.** (2004): De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- $\kappa$ B signalling. *Nature* 430, 694-699
- Wu, J., Huang, Z., Ren, J., Zhang, Z., He, P., Li Y., Ma, J., Chen, W., Zhang, Y., Zhou, X., Yang, Z., Wu, S.Q., Chen, L., Han, J.** (2013): Mlkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mlkl in necroptosis. *Cell Res.* 23, 994-1006
- Xia, B., Fang, S., Chen, X., Hu, H., Chen, P. Wang, H., Gao, Z.** (2016): MLKL forms cation channels. *Cell Res.* 26, 517-528
- Zhang, D.W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B.J., Lin, S.C., Dong, M.Q., Han, J.** (2009): RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325, 332–336
- Zhao, J., Jitkaew, S., Cai, Z., Choksi, S., Li, Q., Luo, J., Liu, Z.G.** (2012): Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 5322–5327
- Zhou, W., Yuan, J.** (2014): Necroptosis in health and diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 35, 14–23

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Jaqueline Klausewitz, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meinen akademischen Betreuer, selbstständig und nur mit den von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Die Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln zur guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Ich habe zu dem Thema noch keine Zulassung zur Promotion an anderer Stelle beantragt und in noch keiner anderen Universität eine Dissertation zur Begutachtung im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Des Weiteren habe ich an keiner anderen Hochschule oder keiner anderen Fakultät dieser Hochschule ein Promotionsvorhaben endgültig nicht bestanden und mir wurde noch kein akademischer Grad entzogen.

Teile dieser Arbeit wurden im November 2018 auf der Tagung der Gesellschaft für Signaltransduktion in Weimar als Poster (PB9) vorgestellt:

22<sup>nd</sup> Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS) Rezeptors, Mediators and Genes  
Weimar, Germany, November 5-7, 2018.

Kiel, den 20.05.2021

Jaqueline Klausewitz

## Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. rer. nat. Dieter Adam für die Bereitstellung meines interessanten Dissertationsthemas, die intensive Betreuung und vor allem die sowohl kritischen wie auch unterstützenden und motivierenden Ratschläge und wissenschaftlichen Diskussionen, die maßgeblich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Karina Reiß danke ich für seine Bereitschaft, die Begutachtung dieser Arbeit zu übernehmen.

Des Weiteren danke ich den Direktoren des Institutes für Immunologie Prof. Dr. med. Dieter Kabelitz und Prof. Dr. rer. nat. Alexander Scheffold für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit anzufertigen.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Immunologie für ein freundschaftliches Arbeitsklima. Ich habe mich immer sehr gut aufgehoben gefühlt. Ein besonderer Dank geht in diesem Zusammenhang auch an die jetzigen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Dieter Adam für die gute Zusammenarbeit und die wertvolle Unterstützung im Laboralltag (vor allem Parvin Davarnia, Sabine Mathieu-Grützmacher, Johaiber Fuchslocher Chico, Justus Hoyer und ganz besonders Carina Saggau, für ihre mehr als großartige Unterstützung und Einführung in den Laboralltag).

Mein tiefer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern Holger und Andrea, für ihre Liebe, ihr Vertrauen und ihre unermüdliche Unterstützung. Dieser Dank gilt ebenso meinen ganzen Freunden, sowohl aus Witten, als auch aus Kiel und ganz besonders Lea, die einen sehr großen Teil dazu beigetragen hat, dass ich niemals aufgegeben habe