

Proteolyse in der Regulation des nicht-apoptotischen Zelltodweges Nekroptose

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Michelle Heib

Kiel
2023

Erster Gutachter: Prof. Dr. Dieter Adam

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C.G. Bosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis.....	XIII
1. Einleitung	1
1.1. Zelltod.....	1
1.2. Nekroptose	5
Nekroptotischer Signalweg	6
1.3. Apoptose	13
Intrinsischer apoptotischer Signalweg.....	14
Extrinsischer apoptotischer Signalweg	15
1.4. Pyroptose.....	17
Kanonischer pyroptotischer Signalweg.....	18
Nicht-kanonischer pyroptotischer Signalweg	19
1.5. Verlinkung der Apoptose, Nekroptose und Pyroptose	21
1.6. Caspase-8 und Caspase-10.....	23
Die Rolle der Caspase-8 und der Caspase-10 im regulierten Zelltod	25
1.7. <i>High temperature requirement protein A2</i>.....	27
Die Rolle von HtrA2/OMI im regulierten Zelltod	28
1.8. <i>A disintegrin and metalloproteinase 17</i>	31
Die Rolle von ADAM17 im regulierten Zelltod	34
1.9. Saure Sphingomyelinase	37
Die Rolle der A-SMase im regulierten Zelltod	38
2. Zielsetzung	41

3. Material und Methoden	43
3.1. Material	43
Allgemeiner Laborbedarf und -zubehör sowie Analysegeräte	43
Chemikalien und Reagenzien	46
Primäre und sekundäre Antikörper	50
Zellen und Plasmide	51
3.2. Methoden	55
Zellkultivierung	55
Zellzählung und Zellaussaat	56
Induktion des nekroptotischen und/oder apoptotischen Signalweges	56
Durchflusszytometrie	56
Herstellung von Protein-Zelllysaten	57
Proteinkonzentrationsbestimmung	58
Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	58
Western Blot	59
Stabile Transfektion von Zellen	60
Lentivirale Transduktion von Zellen	62
Caspase-Aktivitätsassay	63
Messung der intrazellulären ATP-Spiegel	64
Mitochondrienisolierung	64
Immunfluoreszenzanalysen	65
Agarose-Gelelektrophore	66
Gendeletion mittels CRISPR/Cas9	67
Genotypisierung der ADAM17 ^{ex/ex} - und ADAM17 ^{ex/ex} /RIPK3 ^{-/-} -Mäuse	70
Isolierung von primären Lungenfibroblasten aus Mäusen	71
Kartierung der Spaltstelle der A-SMase, über die diese in der Nekroptose proteolytisch aktiviert wird	72
Verwendete Software	77

4. Ergebnisse	79
4.1. Die Spezies-spezifische Rolle der Caspase-8 sowie die Rolle der Caspase-10 in der Nekroptose	79
Analysen in den murinen Caspase-8-defizienten Modellzellen L929Ts/C8/B3	80
Analysen in den humanen Caspase-8-defizienten Modellzellen HT-29/C8/F11	89
Analysen in den humanen Caspase-10-defizienten Modellzellen HT-29/C10/G14.....	97
Herstellung der Caspase-8- und -10-defizienten Modellzellen HT-29/C8/C10.....	107
Zusammenfassung der Analyse der Spezies-spezifischen Rolle der Caspase-8, sowie der Caspase-10 im nekroptotischen Signalweg	111
4.2. Der Wirkmechanismus der Serinprotease HtrA2/OMI in der Nekroptose.....	115
Funktion der Protease-Aktivität von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg	115
Intrazelluläre Lokalisation von HtrA2/OMI während der Nekroptose	121
Untersuchung von neuen Mediatoren von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg	122
Zusammenfassung der Analyse des Wirkmechanismus von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg.....	127
4.3. Die Funktion von ADAM17 im nekroptotischen Signalweg	129
ADAM17 ^{ex/ex} -Lungenfibroblasten als Zellmodell zur Analyse der Funktion von ADAM17 in der Nekroptose	129
ADAM17-defiziente MEF und HT-29-Zellen als Zellmodelle zur Analyse der Bedeutung von ADAM17 in der Nekroptose.....	134
Zusammenfassung der Funktion von ADAM17 im nekroptotischen Signalweg	139
4.4. Die Kartierung der Spaltstellen der A-SMase, über die diese in der Nekroptose proteolytisch aktiviert wird.....	141
Zusammenfassung der Analyse der nekroptotischen Spaltstellen der A-SMase	147

5. Diskussion und Ausblick	149
5.1. Die Spezies-spezifische Rolle der Caspase-8 und die Rolle der Caspase-10 in der Nekroptose.....	149
5.2. Der Wirkmechanismus der Serinprotease HtrA2/OMI in der Nekroptose.....	159
5.3. Die Funktion von ADAM17 im nekroptotischen Signalweg.....	165
5.4. Die Kartierung der Spaltstellen der A-SMase, über die diese in der Nekroptose proteolytisch aktiviert wird.....	169
6. Zusammenfassung	171
7. Summary	175
8. Literaturverzeichnis	179
9. Anhang.....	199
Publikationsliste	207
Eidesstaatliche Erklärung	209
Danksagung	211

Abkürzungsverzeichnis

ADAM, A	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
AIM2	<i>Absent in melanoma 2</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein</i>
A-SMase	<i>Acid sphingomyelinase, saure Sphingomyelinase</i>
BAK	<i>BCL-2 antagonist/killer</i>
BAX	<i>BCL-2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bp	Basenpaar
BP	Birinapant
BSA	Bovines Serumalbumin
C10	Caspase-10
CANDIS	<i>Conserved adamseventeen dynamic interaction sequence</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
c-FLIP	<i>Cellular FADD-like interleukin-1β-converting enzyme-like inhibitory protein</i>
c-FLIP _L	<i>Long c-FLIP</i>
c-FLIP _S	<i>Short c-FLIP</i>
CHX, C	Cycloheximid
cIAP	<i>Cellular inhibitors of apoptosis</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure</i>
Dox, D	Doxycyclinhyclat
DSS	<i>Dextran sulfate sodium, Dextransulfat-Natrium</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EV	Extrazelluläre Vesikel
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie</i>
FADD	<i>Fas-associated death-domain protein</i>
Fas	<i>FS-7-associated surface antigen</i>
FasL	Fas-Ligand
FBS	<i>Fetal bovine serum, fötales Kälberserum,</i>
GSDMD	Gasdermin-D
GSDMD-N	N-terminales GSDMD-Fragment
GP	Gen-Plasmid
hC8	Humane Caspase-8
HEK293T	<i>Human embryonic kidney 293T</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HtrA	<i>High temperature requirement protein A</i>
IF	Immunfluoreszenz
IL-18	Interleukin-18
IL-1 β	Interleukin-1 β

L929Ts	L929-TRAIL-sensitiv
L-A-SMase	Lysosomale A-SMase
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LUBAC	<i>Linear ubiquitin chain assembly complex</i>
LV	Leervektor
LPS	Lipopolysaccharid
MLKL	<i>Mixed lineage kinase domain like pseudokinase</i>
mC8	Murine Caspase-8
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MLF	Murine Lungenfibroblasten
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i> , Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran
mpc	Moleküle pro Zelle
mut	Mutante
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NLR	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor</i>
NLRP	<i>NLR family pyrin domain-containing</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PARP1	<i>Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	<i>Post-synaptic density protein 95-Discs large-Zona occludens 1</i>
PI	Propidiumiodid
PP	Produktprimer
PRR	<i>Cytoplasmic pattern recognition receptor</i>
PS	Phosphatidylserin
RCD	<i>Regulated cell death</i> , regulierter Zelltod
RHIM	<i>RIP homotypic interaction motif</i>
RIPK	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S-A-SMase	Sekretorische A-SMase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEP	Selektions-Plasmid
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SMAC/DIABLO, SMAC	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct inhibitor of apoptosis protein binding protein with low pI</i>
SP	Sequenzierprimer
tBID	<i>Truncated form of BH3-interacting domain death agonist</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFα	<i>Transforming growth factor α</i>
TNF, T	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TRADD	<i>TNF receptor type 1-associated death domain protein</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>

TRIF	<i>Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adaptor inducing interferon-β</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WB	Western Blot
wt	<i>wild type</i> , Wildtyp
X	XB2d89
ZBP1	<i>Z-DNA-binding protein 1</i>
zVAD, z	N-Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me)-Fluoromethylketon

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Auflistung des allgemeinen Laborbedarfs und Laborzubehörs.....	43
Tabelle 3.2:	Auflistung der verwendeten Analysegeräte.....	46
Tabelle 3.3:	Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.	46
Tabelle 3.4:	Auflistung der in Western Blot und Immunfluoreszenz verwendeten primären Antikörper.	50
Tabelle 3.5:	Auflistung der in Western Blot und Immunfluoreszenz verwendeten sekundären Antikörper.	51
Tabelle 3.6:	Auflistung der verwendeten Zellen inklusive Merkmale und Herkunft.....	52
Tabelle 3.7:	Auflistung der verwendeten Plasmide inklusive Merkmale und Herkunft.....	53
Tabelle 3.8:	Zusammenfassung des Lysepuffers, bestehend aus TNE-Puffer, supplementiert mit für das nachzuweisende Protein spezifischen Inhibitoren oder Chelatoren.....	58
Tabelle 3.9:	SDS-PAGE: Zusammensetzung eines 5 %igen Sammel- und 10 oder 15 %igen Trenngels.....	59
Tabelle 3.10:	Auflistung der in dieser Arbeit mittels stabiler Transfektion hergestellten Zellen. GP: Gen-Plasmid und SEP: Selektions-Plasmid.	61
Tabelle 3.11:	Auflistung der in dieser Arbeit via lentiviraler Transduktion hergestellten Zellen. GP: Gen-Plasmid.	63
Tabelle 3.12:	Caspase-Aktivitätsassay: Zusammensetzung des Co-IP-Lysepuffers.	64
Tabelle 3.13:	Caspase-Aktivitätsassay: Zusammensetzung des Caspase-Puffers.....	64
Tabelle 3.14:	Ansatz des Ribonukleoproteins zur Generierung der Gendeletion mittels der CRISPR/Cas9-Methode.....	67

Tabelle 3.15:	Liste der sgRNAs zur Generierung der Gendeletion mittels der CRISPR/Cas9-Methode.....	67
Tabelle 3.16:	PCR-Ansatz zur Analyse der <i>Caspase-10</i> -, <i>HtrA2/OMI</i> -, <i>ADAM17</i> (murin)- und <i>ADAM17</i> (human)-Gendeletionen.	68
Tabelle 3.17:	PCR-Zyklus zur Analyse der <i>Caspase-10</i> -, <i>HtrA2/OMI</i> -, <i>ADAM17</i> (murin)- und <i>ADAM17</i> (human)-Gendeletionen.	68
Tabelle 3.18:	Auflistung der Primersequenzen, Annealingtemperatur, Größe des PCR-Produktes sowie Elongationszeit für die Sequenzierung der <i>Caspase-10</i> -, <i>HtrA2/OMI</i> -, <i>ADAM17</i> (murin)- und <i>ADAM17</i> (human)-Gendeletionen. PP: Produktprimer, SP: Sequenzierprimer, T: Annealingtemperatur.....	69
Tabelle 3.19:	Primersequenzen für die Genotypisierung der <i>ADAM17^{ex/ex}</i> - und <i>ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}</i> -Mäuse.....	70
Tabelle 3.20:	PCR-Ansatz für die Genotypisierung der <i>ADAM17^{ex/ex}</i> - und <i>ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}</i> -Mäuse.....	70
Tabelle 3.21:	<i>ADAM17</i> : PCR-Zyklus für die Genotypisierung der <i>ADAM17^{ex/ex}</i> - und <i>ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}</i> -Mäuse.....	70
Tabelle 3.22:	<i>RIPK3</i> : PCR-Zyklus für die Genotypisierung der <i>ADAM17^{ex/ex}</i> - und <i>ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}</i> -Mäuse.....	71
Tabelle 3.23:	Restriktionsansatz zur Herstellung des pEF6.V5/His.aSMase ^{wt} -FLAG-TEV-Plasmids.	73
Tabelle 3.24:	Ligationsansatz zur Herstellung des pEF6.V5/His.aSMase ^{wt} -FLAG-TEV-Plasmids.....	74
Tabelle 3.25:	Primersequenzen für die Sequenzierung des pEF6.V5/His.aSMase ^{wt} -FLAG-TEV-Plasmids.	74
Tabelle 9.1:	Massenspektrometrische Analyse der Mitochondrien nekroptotischer parentaler MEF und <i>HtrA2/OMI^{-/-}</i> -MEF zur Identifizierung neuer Mediatoren von <i>HtrA2/OMI</i> im nekroptotischen Signalweg: Liste der in den parentalen MEF oder <i>HtrA2/OMI^{-/-}</i> -MEF hochregulierten Proteine.....	200

Tabelle 9.2:	Massenspektrometrische Analyse der Mitochondrien nekroptotischer parentaler MEF und HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF zur Identifizierung neuer Mediatoren von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg mittels N-terminaler Anreicherung der Peptide: Liste der in den parentalen MEF oder HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF vermehrt gespaltenen Proteine.	201
---------------------	---	-----

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Auflistung der Zelltodarten.	3
Abbildung 1.2: Vereinfachte, schematische Darstellung des TNF-induzierten nekroptotischen Signalweges.	11
Abbildung 1.3: Vereinfachte, schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen apoptotischen Signalweges.....	16
Abbildung 1.4: Vereinfachte schematische Darstellung des pyroptotischen Zelltodweges.....	19
Abbildung 4.1: Lentivirale Rekonstitution der murinen Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Caspase-Expression.	81
Abbildung 4.2: Lentivirale Rekonstitution der murinen Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Nekroptose-Sensitivität via FACS und Western Blot.	82
Abbildung 4.3: Lentivirale Rekonstitution der murinen Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität via FACS.	87
Abbildung 4.4: Lentivirale Rekonstitution der murinen Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität via Western Blot.	89

Abbildung 4.5: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Caspase-Expression.	90
Abbildung 4.6: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität via FACS.	93
Abbildung 4.7: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität via Western Blot.	94
Abbildung 4.8: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse des nekroptotischen Zelltodes nach Zugabe des RIPK3-Inhibitors GSK´872 (G).	96
Abbildung 4.9: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Caspase-Expression.	97
Abbildung 4.10: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität via FACS.	101
Abbildung 4.11: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität via Western Blot.	103

- Abbildung 4.12:** Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse des nekroptotischen Zelltodes nach Zugabe des RIPK3-Inhibitors GSK'872 (G). 103
- Abbildung 4.13:** Lentivirale Rekonstitution der murinen Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Aktivität der rekonstituierten Caspasen. 105
- Abbildung 4.14:** Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Aktivität der rekonstituierten Caspasen. 106
- Abbildung 4.15:** Generierung von Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefizienten HT-29-Zellen: Analyse des Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefizienten HT-29/C8/C10-Einzelklons 18 mittels spezifischem Caspase-10-Antikörpernachweis und Sequenzierung der genomischen *Caspase-10*-Region, in welcher die sgRNAs binden. 108
- Abbildung 4.16:** Generierung von Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefizienten HT-29-Zellen: Analyse der Nekroptose-Sensitivität des Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefizienten HT-29/C8/C10-Einzelklons 18 via FACS und Western Blot. 109
- Abbildung 4.17:** Stabile Rekonstitution der HtrA2/OMI^{-/-}-MEF und L929Ts HtrA2/OMI^{-/-}-Zellen mit der Protease-aktiven (Wildtyp) und -inaktiven (S306A) Form von HtrA2/OMI: Analyse der HtrA2/OMI-Expression. 116
- Abbildung 4.18:** Stabile Rekonstitution der HtrA2/OMI^{-/-}-MEF und L929Ts HtrA2/OMI^{-/-}-Zellen mit der Protease-aktiven (Wildtyp) und -inaktiven (S306A) Form von HtrA2/OMI: Analyse der Nekroptose-Sensitivität. 117

Abbildung 4.19: Generierung von HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Zellen: Analyse der HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Einzelklone 4 und 42 mittels spezifischem HtrA2/OMI-Antikörpernachweis und Sequenzierung der genomischen <i>HTRA2/OMI</i> -Region, in welcher die sgRNAs binden.	119
Abbildung 4.20: Generierung von HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Zellen: Analyse der Nekroptose-Sensitivität der HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Einzelklone 4 und 42 via FACS und Western Blot.	120
Abbildung 4.21: Analyse der Lokalisation von HtrA2/OMI im zeitlichen Verlauf der Nekroptose.	122
Abbildung 4.22: Analyse von Stathmin1 als nachgeschaltetem Mediator von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg.	124
Abbildung 4.23: Analyse der Rolle von XIAP als Mediator von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg.	125
Abbildung 4.24: Immortalisierte ADAM17 ^{ex/ex} - und ADAM17 ^{ex/ex} /RIPK3 ^{-/-} -Lungenfibroblasten: Darstellung der verwendeten Passagen und Analyse des Genotyps und der Expression des RIPK3-Proteins.	130
Abbildung 4.25: Immortalisierte ADAM17 ^{ex/ex} - und ADAM17 ^{ex/ex} /RIPK3 ^{-/-} -Lungenfibroblasten: Analyse des Verlustes der Membranintegrität und des Auftretens der nekroptotischen Marker pRIPK3 und pMLKL nach Induktion von Nekroptose.	132
Abbildung 4.26: Generierung von ADAM17-defizienten MEF: Analyse des ADAM17-defizienten MEF-Klons 40 mittels spezifischem ADAM17-Antikörpernachweis und Sequenzierung der genomischen <i>ADAM17</i> -Region, in welcher die sgRNAs binden.	135
Abbildung 4.27: Generierung von ADAM17-defizienten MEF: Analyse der Nekroptose-Sensitivität des ADAM17-defizienten MEF-Klons 40 via FACS und Western Blot.	136
Abbildung 4.28: Generierung von ADAM17-defizienten HT-29-Zellen: Analyse des ADAM17-defizienten HT-29-Klons 31 mittels spezifischem ADAM17-Antikörpernachweis und Sequenzierung der genomischen <i>ADAM17</i> -Region, in welcher die sgRNAs binden.	137

Abbildung 4.29: Generierung von ADAM17-defizienten HT-29-Zellen: Analyse der Nekroptose-Sensitivität des ADAM17-defizienten HT-29-Klons 31 via FACS und Western Blot.....	138
Abbildung 4.30: Schematische Darstellung der FLAG-TEV-A-SMase.	142
Abbildung 4.31: Kartierung der Spaltstellen der FLAG-TEV-A-SMase: Kontrolle der basalen Spaltung der FLAG-TEV-A-SMase mittels V5- und FLAG-Antikörper.....	142
Abbildung 4.32: Kartierung der Spaltstellen der A-SMase: Kontrolle der Spaltung der FLAG-TEV-A-SMase durch die TEV-Protease.	143
Abbildung 4.33: Kartierung der Spaltstellen der A-SMase: Anreicherung der FLAG-TEV-A-SMase mittels V5- und FLAG-IP.	144
Abbildung 4.34: Kartierung der Spaltstellen der A-SMase _{D220-L259} ^{deletiert} und A-SMase _{P221-R230} ^{randomisiert} : Kontrolle der nekroptotischen Spaltung der A-SMase _{D220-L259} ^{deletiert} und A-SMase _{P221-R230} ^{randomisiert} im zeitlichen Verlauf.....	146
Abbildung 4.35: Kartierung der Spaltstellen der A-SMase: Schematische Darstellung der identifizierten nekroptotischen Spaltstellen der A-SMase.	147
Abbildung 5.1: Gegenüberstellung der Spezies-spezifischen Rolle der Caspase-8 im murinen und humanen Zellmodell.....	153
Abbildung 9.1: Lentivirale Rekonstitution der murinen Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-, der humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11- und der humanen Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse des pyroptotischen Zelltodes nach der Induktion der Apoptose oder Nekroptose.....	199
Abbildung 9.2: Zweite Passage der ADAM17 ^{ex/ex} - und ADAM17 ^{ex/ex} /RIPK3 ^{-/-} -Lungenfibroblasten: Messung des Verlustes der Membranintegrität und Analyse der intrazellulären ATP-Spiegel nach der Induktion der Nekroptose.....	202

Abbildung 9.3: Kartierung der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der nekroptotischen Spaltstelle der FLAG-TEV-A-SMase.....	203
Abbildung 9.4: Kartierung der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase_D220-L259 _{deletiert} und A-SMase_P221-R230 _{randomisiert} : Darstellung der randomisierten und deletierten Aminosäuresequenz der A-SMase.....	204
Abbildung 9.5: Kartierung der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase_P221-R230 _{randomisiert} : Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase_P221-R230 _{randomisiert}	205
Abbildung 9.6: Kartierung der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase_D220-L259 _{deletiert} : Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase_D220-L259 _{deletiert}	206

1. Einleitung

Die Entwicklung der Zelle sowie der Lebenszyklus des vielzelligen Organismus hängt von der fein abgestimmten Balance zwischen Zellüberleben und Zellsterben ab (Radosevich 2018). Diese Homöostase wird durch Wachstum, Teilung und Tod der Zelle aufrechterhalten. Neben der Aufrechterhaltung der Homöostase hat der Zelltod zudem eine zentrale Funktion in der Embryonalentwicklung sowie in der Eliminierung von Zellschäden inne. Früher wurde der Zelltod in drei Typen eingeteilt: Typ-I (Apoptose), Typ-II (Autophagie) und Typ-III (Nekrose). Heutzutage sind über zehn verschiedene Zelltodwege bekannt (Yan et al. 2020), doch die Anfänge, welche zur heutigen Erkenntnis über die zentrale Bedeutung des Zelltodes führten, reichen dabei über 2000 Jahre zurück.

1.1. Zelltod

Geschichtlich betrachtet, beschreibt das griechische Wort „ἀπόπτωσις“ (*apoptosis* – *apo* – weg und *ptosis* - Fall) im übertragenen Sinne das Fallen der Blätter der Bäume im Herbst und wurde erstmals im medizinischen Kontext im vierten Jahrhundert vor Christus von Hippokrates von Kos im Zusammenhang von Gangrän in Folge von Bandagieren einer Fraktur beschrieben (Diamantis et al. 2008; Esposti 1998). Über zwei Jahrtausende später, nach der fundamentalen Erkenntnis der Zelltheorie im Jahre 1838 von Schleiden und Schwann (Schwann 1839; Schleiden 1838), war es Vogt im Jahre 1842, der erstmals physiologischen Zelltod während der Wirbeltierentwicklung beobachtete (Vogt et al. 1842). Nach dieser Beobachtung dauerte es weitere 16 Jahre, bis der deutsche Arzt und Pathologe Virchow zwei Zelltodarten beschrieb: Die Nekrose und Nekrobiose (Virchow 1989). Die für die Nekrobiose beschriebene Morphologie glich dabei der heutigen apoptotischen Morphologie. Im 19. Jahrhundert trieben die Arbeiten an Kaulquappen, Insekten und Embryogenese-Studien anhand des Modells *Chorda dorsalis* die Erforschung des Zelltodes voran. Besonders hervorzuheben ist dabei die Arbeit von Walther Flemming, ein Pionier in der mikroskopischen Zytologie. Er beschrieb zuerst den Zerfall des Chromatins in sterbenden Zellen (Flemming 1885). Im 20. Jahrhundert wurden die Forschungen hinsichtlich des Zelltodes derart vorangetrieben, dass im Jahre 1951 Glucksmann eine Veröffentlichung mit einer Liste aller bisher bekannten Zelltodformen herausbrachte, darunter unter anderem Karyorrhesis (Kernfragmentierung) und Karyopyknose (Zellkondensation) (Glucksmann 1951). Im Jahre 1965 war der Erkenntnisstand so weit,

dass zum ersten Mal die Bezeichnung „programmierter Zelltod“ fiel (Lockshin et al. 1964), das heißt, dass dem Zelltod eine genetisch kontrollierte Abfolge zugesprochen wurde. Kerr, Wyllie, und Currie, basierend auf der Beobachtung der „Schrumpf-Nekrose“ von Kerr wenige Jahre zuvor, konnten schließlich im Jahre 1972 den programmierten Zelltod, welchem sie den Namen Apoptose gaben, mittels histologischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen klar von der Nekrose (altgriechisch *nékrosis* „das Töten“), dem unkontrollierten Zelltod, abgrenzen (Kerr et al. 1972). Die Morphologie der Apoptose wurde dabei in zwei Stadien aufgeteilt: Im ersten Stadium erfolgt die Kondensation des Kerns und des Zytoplasmas, sowie das Aufbrechen der Zelle in membrangebundene Fragmente, auch bekannt als „apoptotische Körperchen“. In der zweiten Stufe werden die apoptotischen Körperchen von der Zelloberfläche freigesetzt und von anderen Zellen aufgenommen und dort mittels Lyse weiterverarbeitet. Zu dieser Zeit war neben Apoptose und Nekrose auch der Zelltod via Autophagie bekannt (Yan et al. 2020). Ein Meilenstein in der Geschichte der Autophagie oder generell des intrazellulären Proteinabbaus war die Entdeckung des Lysosoms im Jahre 1955 (De Duve et al. 1955), jedoch stellte die Erforschung der Abbauprozesse intrazellulärer Komponenten die Forscher zur damaligen Zeit vor eine große Herausforderung. In den Folgejahren konnten zahlreiche Wissenschaftler wie Novikoff (Novikoff et al. 1956), Ashford oder Porter (Ashford et al. 1962) membrangebundene Strukturen nachweisen, welche Teile des Zytoplasmas und der Organellen enthielten. Basierend auf diesen Beobachtungen, benannte im Jahr 1963 De Duve den Prozess, bei dem zytoplasmatisches Material zum Lysosom zur Degradierung transportiert wird, als „Autophagie“ (altgriechisch für „sich selbst verzehrend“) (De Duve et al. 1963; Ohsumi 2014). Abgegrenzt von Apoptose und Autophagie wurde die Nekrose. Die Nekrose unterscheidet sich von der Apoptose nicht nur durch ihre Morphologie, sondern auch dadurch, dass es sich um einen unkontrollierten Vorgang in Folge von pathologischen Prozessen handelt. Nekrotische Zellen sind dabei gekennzeichnet durch Anschwellen der Organellen, Zerstörung der Zellmembran, gefolgt von der eventuellen Lyse und Ausschüttung des Zellinhaltes in das umgebende Gewebe (Khalid et al. 2022). Nach der anfänglichen Kategorisierung des Zelltodes in drei Typen (Typ-I: Apoptose, Typ-II: Autophagie und Typ-III: Nekrose) (Schweichel et al. 1973) und der Annahme, dass es sich bei der Apoptose um den einzig regulierten Zelltod handele, konnten in den letzten 50 Jahren aufgrund neuer und verbesserter Technologien und Methoden zahlreiche neue programmierte Zelltodwege identifiziert werden. Einen großen Beitrag zur Erforschung des Zelltodes leisteten dabei Brenner, Sulston und Horvitz, welche 2002 mit dem Nobelpreis für

Medizin ausgezeichnet wurden. Sie etablierten den Nematoden *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus, anhand dessen sie die Prozesse der Zellteilung und des Zellsterbens von der befruchteten Eizelle bis zum erwachsenen Individuum untersuchen konnten und eine genetische Regulierung der Organentwicklung des programmierten Zelltodes manifestierten (Knapp 2002). Aufgrund aktueller Erkenntnisse wird der Zelltod in der heutigen Zeit in zwei Gruppen aufgeteilt - in akzidentellen Zelltod und in regulierten Zelltod (*regulated cell death*, RCD) (Hu et al. 2021). In 2018 wurden durch das „*Nomenclature Committee on Cell Death*“ die bis dahin bekannten Zelltodtypen hinsichtlich ihrer Morphologie und ihrer chemischen und funktionellen Eigenschaften beschrieben (Galluzzi et al. 2018), darunter Anoikis (Frisch et al. 1994), Pyroptose (Cookson et al. 2001), NETose (Brinkmann et al. 2004), Nekroptose (Degterev et al. 2005), Entose (Overholtzer et al. 2007), Parthanatos (David et al. 2009), Ferroptose (Dixon et al. 2012), Autose (Liu et al. 2013). Zusätzlich sind weitere Formen des Zelltodes wie Methuose (Chi et al. 1999), Mitoptose (Skulachev 1999), Paraptose (Castro-Obrigón et al. 2004), Oxeiptose (Scaturro et al. 2018), Alkaliptose (Song et al. 2018) oder PANoptose (Nguyen et al. 2022) bekannt. In der Abbildung 1.1 ist eine Auflistung der Zelltodarten zu finden (Yan et al. 2020; Hu et al. 2021).

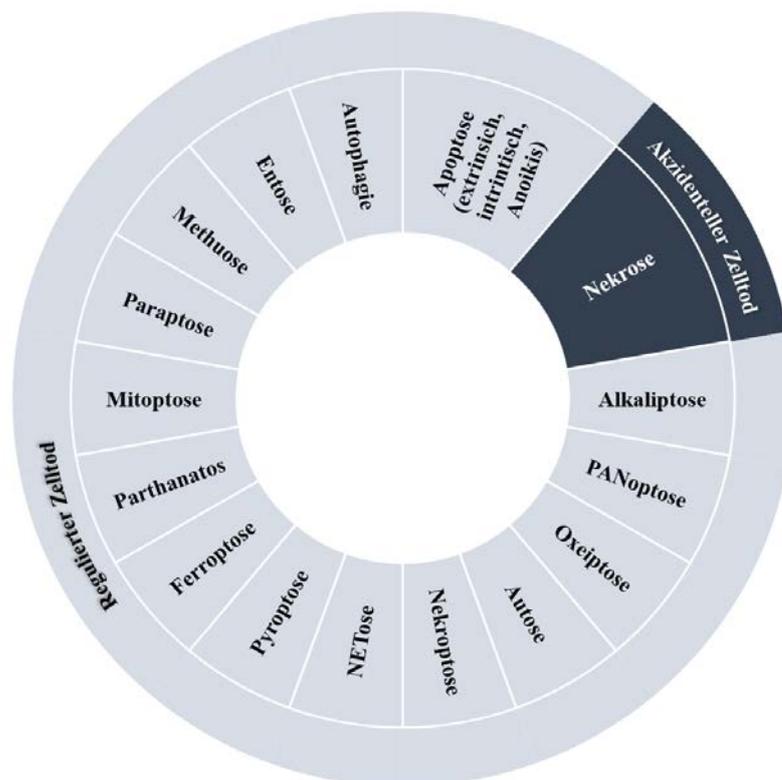


Abbildung 1.1: Auflistung der Zelltodarten.

Eingruppierung der Zelltodarten nach akzidentellem und reguliertem Zelltod. Darstellung nach Yan et al. 2020 und Hu et al. 2021.

Aufgrund ihrer überlebenswichtigen Funktion ist die Notwendigkeit des Vorhandenseins zahlreicher Zelltodwege gegeben. Wie in den Folgekapiteln über Nekroptose, Apoptose, Pyroptose und PANoptose zu lesen ist, können sich die Enzyme der Zelltodwege gegenseitig inhibieren, aktivieren oder zusammen einen „Master-Todeskomplex“ bilden

1.2. Nekroptose

Die Nekroptose stellt einen regulierten, Caspase-unabhängigen Zelltod dar, welcher erstmals 1988 beschrieben wurde (Laster et al. 1988). Laster beobachtete, dass der Tumornekrosefaktor (TNF, T) in F17-Zellen Apoptose, in L-M-Zellen hingegen Nekrose auslöste. Dieses damalige Phänomen wurde zudem im Jahre 1998 im *FS-7-associated surface antigen* (Fas)-abhängigen Kontext beobachtet. L929-Zellen, transfiziert mit dem Fas-Molekül, starben via Apoptose. Nachdem die Apoptose mittels Caspase-Inhibitoren geblockt wurde, konnten nekrotische Zellen beobachtet werden (Vercammen et al. 1998a). Aufwind in den Paradigmenwechsel, dass neben der Apoptose weitere regulierte nicht-apoptotische Zelltodwege existieren, brachte die Studie von Holler et al., welche zeigten, dass die Todesliganden TNF, *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) und Fas-Ligand (FasL) Zelltod durch zwei unabhängige Signalwege induzieren – den Caspase-8-abhängigen Weg und den *serine-threonine kinase receptor-interacting protein kinase 1* (RIPK1)-abhängigen Weg (Holler et al. 2000). Im Jahre 2006 waren es schließlich Degterev et al., die ein kleines Molekül namens Necrostatin-1 synthetisierten, welches den zuvor beschriebenen nekrotischen Zelltod blockierte. Sie benannten den Zelltod darauf basierend „Nekroptose“ (Degterev et al. 2005; Liu et al. 2021b). Das „*Nomenclature Committee on Cell Death*“ definierte Nekroptose 2018 als regulierten Zelltod, welcher durch Störungen der extrazellulären oder intrazellulären Homöostase ausgelöst wird und dabei von *mixed lineage kinase domain like pseudokinase* (MLKL) und RIPK3, sowie (in der Regel) von der Kinaseaktivität von RIPK1 bestimmt wird (Galluzzi et al. 2018). Morphologisch betrachtet, zeigt eine nekroptotische Zelle folgende Charakteristika: Anschwellen der Zellen, gefolgt vom Verlust der Membranintegrität, welcher zur Freisetzung des gesamten Zellinhaltes, darunter unter anderem *damage-associated molecular patterns* (DAMP), inflammatorische Zytokine und Chemokine, führt. Diese lösen wiederum im umgebenden Gewebe eine Immunantwort aus (Seo et al. 2021). Neben ihrer pro-inflammatorischen Eigenschaft, ist die Nekroptose stark immunogen, wodurch sie ein Instrument gegen Infektionen und in der Anti-Tumor-Antwort darstellt (Amarante-Mendes et al. 2018). Die Rolle der Nekroptose in der Entstehung und Behandlung von Krebs stellt jedoch ein zweiseitiges Schwert dar (Philipp et al. 2016). So ist die Herunterregulierung der nekroptotischen Schlüsselenzyme RIPK3 und MLKL mit einer schlechten Prognose in zahlreichen Krebsarten wie Brust- oder Darmkrebs verbunden. Im Gegensatz dazu steht eine Überexpression von RIPK3 und MLKL mit der Entstehung von unter anderem Lungen- oder Bauchspeicheldrüsenkrebs sowie der

Bildung von Metastasen in Verbindung (Liu et al. 2021b). Darüber hinaus ist die Regulierung der Nekroptose essenziell für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase und Verhinderung von Entzündungen. Die Dysregulation der Nekroptose ist mit einer Vielzahl von Krankheiten verknüpft, darunter neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer-Demenz, Amyotrophe Lateralsklerose oder Multiple Sklerose, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Lungenerkrankungen, Lebererkrankungen, akute Pankreatitis, Nierenerkrankungen, Gelenkerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, Krebs, Augenkrankheiten oder Hautkrankheiten (Liu et al. 2021a). Aufgrund der wichtigen physiologischen und pathophysiologischen Rolle des nekroptotischen Zelltodweges ist die Untersuchung des Signalweges zum Finden möglicher Verstärker und Inhibitoren von großer Bedeutung.

Nekroptotischer Signalweg

Der nekroptotische Signalweg kann neben den bereits beschriebenen Todesrezeptoren TNF-Rezeptor 1 (TNFR1), TRAIL-Rezeptor 1 und 2 und Fas durch eine Vielzahl weiterer Rezeptoren ausgelöst werden. Hierzu zählen unter anderem der T-Zell-Rezeptor, *Toll-like receptor* 3 und 4 oder *Z-desoxyribonucleic acid (DNA)-binding protein 1/DNA-dependent activator of IFN regulatory factors* (Heib et al. 2020; Meng et al. 2021), welche durch diverse Pathogene wie Viren oder Bakterien stimuliert werden (Seo et al. 2021). Darüber hinaus können weitere Stimuli wie Inhibierung des Proteasoms, Krebstherapeutika wie Obatoclax (Vanden Berghe et al. 2016) und Stressfaktoren wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder ionisierende Strahlung zur Induktion der Nekroptose führen (Heib et al. 2020).

Bildung des Überlebenssignal-vermittelnden Komplexes I

Der am besten studierte nekroptotische Signalweg wird durch TNF ausgelöst (Abbildung 1.2). Nach der Bindung von TNF an seinen Rezeptor TNFR1 führt dessen Aktivierung zur Bildung des sogenannten „Komplex I“ (Micheau et al. 2003). Komplex I besteht aus *TNF receptor type 1-associated death domain protein* (TRADD), *TNF receptor associated factor 2/5* (TRAF2/5) (Roberts et al. 2022), RIPK1, *cellular inhibitors of apoptosis* (cIAP) 1 und 2 und dem *linear ubiquitin chain assembly complex* (LUBAC) (Chen et al. 2019). Innerhalb des „Komplexes I“ wird RIPK1 an K63 von cIAP1/2 mit linearen und verzweigten Ketten und von LUBAC an M1 mit linearen Ketten polyubiquityliert, was zur Stabilisierung des Komplex I (Seo et al. 2021; Wang et al. 2021b; Roberts et al. 2022) und zur Rekrutierung von *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*

(*NF-κB*) *essential modulator* und dem *transforming growth factor-β-activated kinase*-Komplex führt. *NF-κB essential modulator* wiederum rekrutiert den *IκB kinase*-Komplex (Annibaldi et al. 2018; Seo et al. 2021; Chen et al. 2019). Die rekrutierten Komplexe bewirken die Aktivierung des *mitogen-activated protein kinase*- sowie des pro-inflammatorischen und Überlebens-Transkriptionsfaktor *NF-κB*-vermittelten Signalwegs, wodurch Apoptose und Nekroptose inhibiert werden (Seo et al. 2021; Khan et al. 2021; Heib et al. 2020). Darüber hinaus wird die Kinase-Aktivität von RIPK1 mittels Phosphorylierung von S25, katalysiert durch den *IκB kinase*-Komplex, inhibiert, was zusätzlich das Überleben der Zelle begünstigt (Dondelinger et al. 2019).

Bildung des Zelltod-induzierenden Komplexes II

Die Inhibierung der cIAPs, zum Beispiel durch *second mitochondria-derived activator of caspase* (SMAC)/*direct IAP-binding protein with low pI* (DIABLO) (kurz SMAC) (Varfolomeev et al. 2007), SMAC-Mimetika (zum Beispiel Birinapant (BP) (Safferthal et al. 2017)) oder Deubiquitylierung von RIPK1 mittels *cylindromatosis* (Amin et al. 2018) führt zur Blockierung des *NF-κB*-Signalweges und zur Dissoziation von RIPK1 vom plasmamembranassoziierten-Komplex ins Zytosol. Im Zytosol bildet RIPK1 den sogenannten „Komplex II“ (Micheau et al. 2003). Komplex II existiert in zwei Formen – Komplex IIa besteht neben RIPK1 aus TRADD, *Fas-associated death-domain protein* (FADD), *cellular FADD-like interleukin-1β-converting enzyme-like inhibitory protein* (c-FLIP) und Pro-Caspase-8, wohingegen Komplex IIb, auch bekannt als „Ripoptosom“, aus RIPK1, RIPK3, FADD, c-FLIP und Pro-Caspase-8 besteht (Heib et al. 2022). Beide Komplexe führen bei einem geringen c-FLIP-Spiegel zur autokatalytischen Aktivierung der Pro-Caspase-8, welche daraufhin ins Zytosol freigesetzt wird und Apoptose induziert. c-FLIP selbst existiert in zwei Formen: *Long* c-FLIP (c-FLIP_L) und *short* c-FLIP (c-FLIP_S), welche unterschiedliche Funktionen in der Regulation des Zelltodes innehaben. So führen hohe Spiegel an c-FLIP_L zur Bildung von Heterodimeren mit der Pro-Caspase-8, was wiederum deren Aktivierung und somit die Induktion der Apoptose inhibiert. Die c-FLIP_L-Pro-Caspase-8-Heterodimere sind jedoch noch in der Lage, RIPK1 und RIPK3 zu spalten, wodurch ebenfalls Nekroptose verhindert wird. Im Gegensatz dazu führt die Bildung von c-FLIP_S-Pro-Caspase-8-Heterodimeren zur vollständigen Inhibierung der Caspase-8-Aktivierung, und damit auch der Spaltung von RIPK1 und RIPK3, weswegen hohe c-FLIP_S-Spiegel den nekroptotischen Signalweg begünstigen (Heib et al. 2022; Roberts et al. 2022). Zudem wurde gezeigt, dass die Pro-Caspase-8 durch Phosphorylierung an T265, katalysiert

durch die *p90 ribosomal S6*, inaktiviert werden kann (Yang et al. 2020). Insgesamt führt eine hohe Caspase-8-Aktivität innerhalb des Komplexes II zur Spaltung von *cylindromatosis*, c-FLIP, RIPK1 und RIPK3 (Li et al. 2022), wodurch die Entstehung des Nekrosoms inhibiert wird und die Zellen via Apoptose sterben.

Bildung des kanonischen Nekrosoms

Im Fall, dass die Aktivität der Caspase-8 inhibiert ist, wird die Bildung des Nekrosoms begünstigt. Das Nekrosom besteht aus RIPK1 und RIPK3, welche mit Hilfe ihres *RIP homotypic interaction motifs* (RHIM) interagieren und einen hoch-molekularen amyloiden Komplex bilden. Chen et al. beschrieben die Bildung und Zusammensetzung des Nekrosoms folgendermaßen: Die Autophosphorylierung (S161 (Meng et al. 2021; Seo et al. 2021)) von RIPK1 bewirkt eine geordnete Struktur der oligomerisierten RIPK1-Monomere, welche wiederum zur initialen Oligomerisierung und Anlagerung von RIPK3 benötigt wird. Die zusammengelagerten RIPK1-RIPK3-Oligomer-Mosaik bilden zunächst eine runde Struktur, welche hauptsächlich durch die Anlagerung von RIPK3-Oligomeren zu einer stabförmigen, helikalen Struktur verlängert wird. Nach der Bildung des Nekrosoms wird RIPK3 durch Autophosphorylierung aktiviert, wobei die Phosphorylierungen an S227 (human) bzw. T231/S232 (murin) entscheidend für die Rekrutierung von MLKL zum Nekrosom sind (Meng et al. 2021; Chen et al. 2019). Dort aktiviert pRIPK3 MLKL ebenfalls via Phosphorylierung, was zur Veränderung der MLKL-Konformation führt. Aktiviertes pMLKL polymerisiert daraufhin zu einer tetrameren Struktur, welche wiederum mittels Disulfidbrücken Oktamere (Huang et al. 2017) und/oder Amyloid-ähnliche Fasern bildet (Liu et al. 2017), zur Plasmamembran transloziert und den Verlust der Membranintegrität induziert (Chen et al. 2022). Entscheidend für die Oligomerisierung und Translokation von pMLKL sind dabei die Phosphorylierungsstellen T357/S358 (human) und S345 (murin) (Meng et al. 2021)). Der genaue Mechanismus der Translokation sowie des Verlustes der Membranintegrität ist bislang nicht vollends geklärt. Eine Studie, in welcher *monobodies* gegen die N-terminale *four-helix bundle* "killer"-pMLKL-Domäne gerichtet waren, zeigte, dass trotz Phosphorylierung und pMLKL-Oligomerisierung keine Translokation von pMLKL zur Plasmamembran und aufgrund dessen keine Nekroptose stattfand. Somit stellt die Translokation von pMLKL zur Plasmamembran einen entscheidenden Kontrollpunkt dar (Petrie et al. 2020). Bezüglich der Translokation von pMLKL wurde ein Golgi-Mikrotubuli-Aktin-abhängiger Mechanismus, in welchem pMLKL zusammen mit *tight junction*-Proteinen zur Plasmamembran transportiert wird, beobachtet (Samson et al. 2020). An der

Plasmamembran angekommen, bindet pMLKL hauptsächlich an Phosphatidylinositolphosphat (McNamara et al. 2018). Eine mögliche Hypothese, warum die Translokation von pMLKL zur Plasmamembran zum Verlust der Membranintegrität führt, ist, dass pMLKL selbst nach der Bindung an die Membran Oktamer-förmige Poren bildet (Huang et al. 2017), welche als Ionen-Kanal mit hoher Permeabilität für Mg^{2+} in der Anwesenheit von Na^+ und K^+ fungieren und zur Membran-Depolarisation führen (Xia et al. 2016). Daneben wurde zudem über einen Nekroptose-bedingten Na^+ - und Ca^{2+} -Influx berichtet (Cai et al. 2014; Chen et al. 2014), sodass eine Aktivierung weiterer Ionen-Kanäle unterhalb der pMLKL-Ebene denkbar wäre, welche letztendlich zum Verlust der Membranintegrität und zur Freisetzung von DAMPs und extrazellulären Vesikeln, sogenannten „nekroptotischen Körperchen“, führen.

Für die Regulation der Nekrosombildung sowie der anschließenden Oligomerisierung und Translokation von pMLKL spielen neben der Caspase-8-Aktivität eine Reihe weiterer Proteine eine entscheidende Rolle. So wird zum Beispiel RIPK3 nach der Induktion des nekroptotischen Zelltodes an K5 ubiquitinyliert, weswegen das deubiquitinylierende Enzym A20 einen negativen Regulator in der Entstehung des Nekrosoms darstellt (Onizawa et al. 2015; Chen et al. 2019). Darüber hinaus vermittelt die E3-Ubiquitinligase *Pellino 1* die K63-Ubiquitinylierung an K115 von RIPK1, was die Bildung des Nekrosoms und den nekroptotischen Zelltod begünstigt (Wang et al. 2017). Dem gegenüber steht die Ubiquitinylierung von RIPK3 an K363, welche einen proteasomalen Abbau bewirkt, wodurch *Pellino 1* sowohl als negativer als auch als positiver Regulator fungieren kann. Neben *Pellino 1* wird RIPK3 zudem von *chaperone-assisted E3 ligase C-terminus of Hsp70-interacting protein* an K66 und an K363 zur Degradierung ubiquitinyliert. Einen weiteren Regulationspunkt stellt das Proteasom dar. Eine Blockade des Proteasoms durch Inhibitoren (MG132 oder Bortezomib) führt zur Induktion der RIPK3-abhängigen Nekroptose, ohne die Notwendigkeit einer Caspase-8-Aktivitäts-Blockade (Moriwaki et al. 2016). MLKL selbst kann neben RIPK3 von weiteren Kinasen aktiviert werden – von der *inositol kinases inositol polyphosphate multikinase*, *inositol-tetrakisphosphate 1-kinase* oder der *inositol-pentakisphosphate 2-kinase*, welche Inositolhexaphosphat produziert, das wiederum als Aktivator von MLKL fungiert (McNamara et al. 2019). Eine weitere Studie zeigte, dass darüber hinaus das *heat-shock protein 90* für die Anlagerung von pMLKL zu hochmolekularen Komplexen und anschließender Translokation zur Plasmamembran notwendig ist (Jacobsen et al. 2016). Als negativer Regulator wurde eine Flotillin-1- und

Flotillin-2-vermittelte Endozytose, gefolgt vom lysosomalen Abbau oder eine ALIX-Synthin-1-vermittelte Exozytose, welche zum Abbau von pMLKL und somit zum verspäteten Zelltod führen, beschrieben (Fan et al. 2019). Die Analyse des Proteoms von extrazellulären Vesikeln (EV), isoliert aus nekroptotischen Zellen, ergab folgendes Modell für die Freisetzung, Aufnahme und die Wirkung der in der Nekroptose entstehenden EVs: In der Anfangsphase der Nekroptose werden Phosphatidylserine (PS) an die Außenseite der Plasmamembran exponiert und EVs werden durch den pMLKL-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom, *endosomal sorting complexes required for transport III*, *Ras-related in brain*-Proteine, *soluble NSF attachment receptor*-Proteine, *exocyst complex* und *lipid rafts* freigesetzt. Im Anschluss werden die EVs mittels Phagozytose, Membranfusion oder Bindung an PS und Annexin von anderen Zellen aufgenommen, wodurch eine Entzündung, Chemotaxis oder Präsentation von Antigenen an T-Zellen hervorgerufen wird (Shlomovitz et al. 2021).

Bildung nicht-kanonischer Nekrosome

Neben dem beschriebenen kanonischen Nekrosom, in welchem RIPK1 und RIPK3 über ihre RHIM-Domänen interagieren, ist RIPK3 ebenfalls in der Lage, mit weiteren RHIM-Domänen-haltigen Proteinen nicht-kanonische Nekrosome zu bilden. So rekrutieren *Toll-like receptor 3* und *4* nach der Bindung von doppelsträngiger Ribonukleinsäure (RNA) oder von Lipopolysaccharid (LPS) das RHIM-haltige Protein *Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adaptor inducing interferon- β* (TRIF). Ebenso wie RIPK1 aktiviert TRIF RIPK3, wodurch unabhängig von RIPK1 Nekroptose ausgelöst wird. Neben TRIF kann das Protein *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors* ebenfalls über seine RHIM-Domäne einen Komplex mit RIPK3 bilden, welcher zur Aktivierung von RIPK3 und MLKL führt. Der *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors*-Signalweg wird durch Virus-DNA ausgelöst. In der Bildung von nicht-kanonischen Nekrosomen kommt RIPK1 eine inhibierende Rolle zu. So kann RIPK1 mit TRIF und *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors* um die RHIM-abhängige Bindung zu RIPK3 konkurrieren und dadurch die RIPK1-unabhängige Nekroptose inhibieren. Zudem wurde gezeigt, dass RIPK1 in der Lage ist, die Oligomerisierung von RIPK3 zu kontrollieren und dadurch seine spontane Aktivierung im Zytosol zu unterdrücken (Vanden Berghe et al. 2016; Heib et al. 2020).

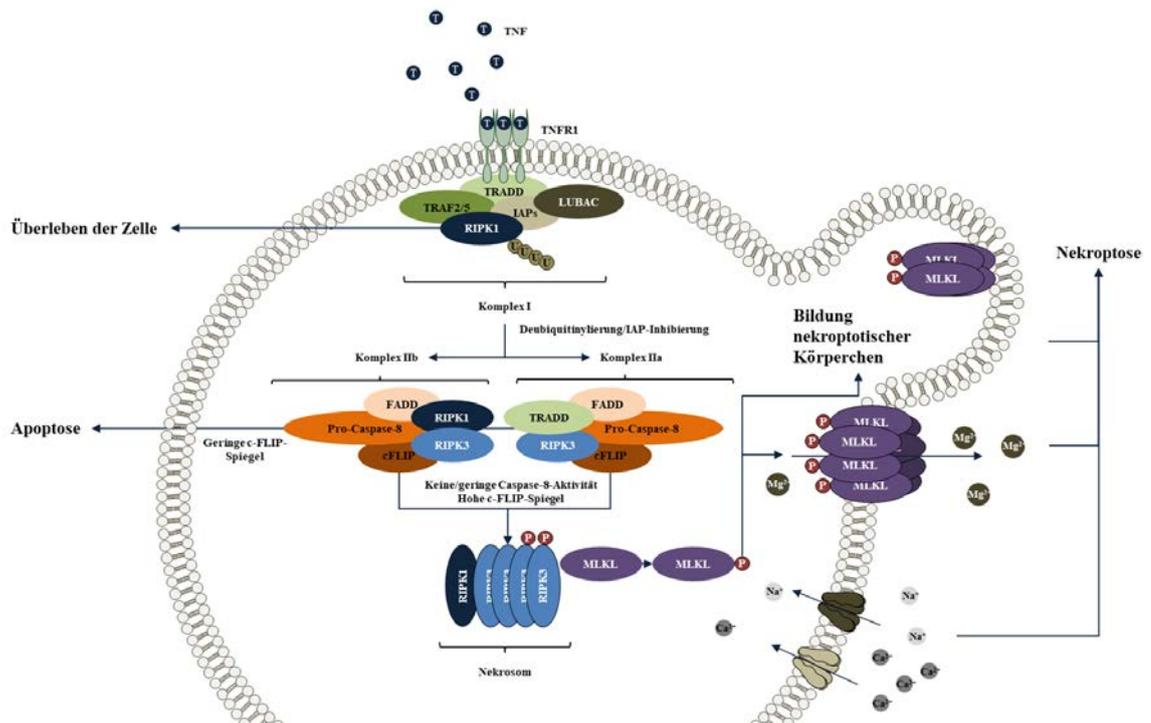


Abbildung 1.2: Vereinfachte, schematische Darstellung des TNF-induzierten nekroptotischen Signalweges.

Nach der Bindung von TNF an TNFR1 wird der sogenannte „Komplex I“ gebildet, bestehend aus TRADD, TRAF2/5, IAPs, RIPK1 und LUBAC. Die Bildung des Komplex I führt zur Ubiquitinylierung von RIPK1 und zum NF- κ B-vermittelten Überleben der Zelle. Die Deubiquitinylierung von RIPK1 oder die Inhibierung der IAPs führt zur Bildung von „Komplex IIa“ und „IIb“. Komplex IIa besteht aus FADD, TRADD, Pro-Caspase-8, RIPK1 und c-FLIP, wohingegen Komplex IIb aus FADD, RIPK1, RIPK3, Pro-Caspase-8 und c-FLIP besteht. Beide Komplexe führen bei geringen c-FLIP-Spiegeln zur Aktivierung der Caspase-8 und zur Auslösung des apoptotischen Signalweges. Hohe c-FLIP-Spiegel sowie das Fehlen der Caspase-8-Aktivität durch Inhibitoren oder Deletion führen zur Bildung des Nekrosoms. Im Nekrosom interagieren RIPK1 und RIPK3 über ihre RHIM-Domänen, wodurch RIPK3 mittels Phosphorylierung aktiviert wird. Aktiviertes pRIPK3 rekrutiert daraufhin MLKL, welches ebenfalls via Phosphorylierung aktiviert wird. pMLKL oligomerisiert und transloziert zur Plasmamembran, was zum Verlust der Membranintegrität führt. Der genaue Mechanismus ist bislang unbekannt. Als Möglichkeiten werden die Bildung von oktamerischen pMLKL-Poren mit großer Permeabilität für Mg^{2+} oder ein Nekroptose-bedingter Ca^{2+} - und Na^{+} -Einstrom diskutiert. Darüber hinaus wird die Bildung sogenannter „nekroptotischer Körperchen“ beobachtet. Darstellung nach Heib et al. 2020.



1.3. Apoptose

Bei der Apoptose handelt es sich nicht nur um den zuerst entdeckten, sondern auch um den am besten untersuchten regulierten Zelltodtyp, welcher in einen extrinsischen und einen intrinsischen Zelltodweg aufgeteilt ist. Dabei definiert das „*Nomenclature Committee on Cell Death*“ die intrinsische Apoptose folgendermaßen: Regulierter Zelltod, welcher durch die Störung der extrazellulären oder intrazellulären Mikroumgebung ausgelöst, durch Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) charakterisiert und durch Effektor-Caspasen, hauptsächlich durch Caspase-3, ausgeführt wird. Die extrinsische Apoptose wird ebenfalls nach Störungen der extrazellulären Mikroumgebung ausgelöst, welche von membrangebundenen Rezeptoren detektiert und über Caspase-8 an Effektor-Caspasen weitergegeben werden (Galluzzi et al. 2018). Morphologisch betrachtet, wird die Apoptose in drei Phasen unterteilt: In der Phase I ist ein Zellschrumpfen sowie eine Verdichtung des Zytoplasmas inklusive Verringerung des zellulären Wassergehaltes zu beobachten. Zudem findet eine Trennung der apoptotischen Zellen von den umgebenden normalen Zellpopulationen statt. Die Hauptmerkmale der Phase IIa stellen die Chromatinkondensation und die Fragmentierung des Kerns dar. In der letzten Phase IIb wird das Zytoskelett abgebaut, was zur Bildung von membranumhüllten Vesikeln führt (auch bekannt als „*membrane blebbing*“), welche Zytoplasma, Kerntrümmer und Organellen-Bestandteile enthalten. Diese werden als „apoptotische Körperchen“ bezeichnet. Da die Membranintegrität während der Apoptose intakt bleibt, kommt es zur keiner Freisetzung des Zellinhaltes, sondern zur Entfernung der apoptotischen Körperchen via Phagozytose (Guo et al. 2021). Aufgrund dessen handelt es sich bei der Apoptose anders als bei der Nekroptose um eine immunologisch „stumme“ Form des Zelltodes (Amarante-Mendes et al. 2018).

Physiologisch gesehen spielt die Apoptose eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Gewebshomöostase (Gudipaty et al. 2018) und in der Vorbeugung vor Krebs (Singh et al. 2019). Die Dysregulation der Apoptose wiederum, sei es durch eine eingeschränkte Beseitigung apoptotischer Zellen oder eine erhöhte bzw. erniedrigte apoptotische Aktivität, ist eng verknüpft mit Krankheiten, darunter Autoimmunkrankheiten, neurodegenerative Krankheiten, Herzkrankheiten, bakteriell und viral ausgelöste Krankheiten und Krebs (Xu et al. 2019).

Intrinsischer apoptotischer Signalweg

Der intrinsische apoptotische Signalweg wird beispielsweise durch Mikroumgebungsstörungen wie Entzug von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren, DNA-Schädigungen, Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER), ROS, Replikationsstress oder auch mitotische Defekte ausgelöst (Galluzzi et al. 2018; Singh et al. 2019). Die Schlüsselenzyme in der Regulierung und Ausführung der intrinsischen Apoptose sind die Mitglieder der *B-cell lymphoma 2* (BCL-2) Proteinfamilie, welche sowohl pro-apoptotische als auch anti-apoptotische Funktionen ausüben. So werden nach der Stimulation des intrinsischen apoptotischen Signalweges die pro-apoptotischen *BH3-only*-Proteine *BCL-2-interacting mediator of cell death*, *truncated form of BH3-interacting domain death agonist* (tBID) und *p53-upregulated modulator of apoptosis* aktiviert, welche wiederum *BCL-2-associated X protein* (BAX) und/oder *BCL-2 antagonist/killer* (BAK) binden und aktivieren (Bertheloot et al. 2021). Zudem werden *BCL-2-associated agonist of cell death*, *BCL-2-interacting killer*, *activator of apoptosis harakiri*, *BCL-2-modifying factor* und *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1* aktiviert. Diese fungieren als pro-apoptotische Sensibilisatoren, welche anti-apoptotische Faktoren und die zelluläre Lokalisation von BAX- und BAK-Monomeren kontrollieren (Bertheloot et al. 2021; Singh et al. 2019). Die Aktivierung von BAX und/oder BAK bewirkt eine Oligomerisierung beider Proteine sowie die Bildung von Poren in der Mitochondrienmembran, resultierend in einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran. MOMP führt wiederum zur Freisetzung mitochondrialer Proteine. Freigesetztes Cytochrom c bindet an den *apoptotic protease-activating factor 1*, welcher zusammen mit Cytochrom c einen dATP/ATP-abhängigen heptamerischen Komplex bildet, das sogenannte „Apoptosom“. Das Apoptosom rekrutiert und aktiviert die Initiator-Caspase Pro-Caspase-9, welche wiederum die Effektor-Caspasen Pro-Caspase-3, -6 und -7 aktiviert (Dorstyn et al. 2018; Heib et al. 2022). Neben Cytochrom c verlassen zudem SMAC/DIABLO und die Serinprotease *high temperature requirement protein A2* (HtrA2/OMI) die Mitochondrien. Im Zytoplasma binden und deaktivieren SMAC/DIABLO und HtrA2/OMI IAPs, wodurch die Aktivierung der Initiator-Caspase-9 und der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 verstärkt wird. Die Aktivierung der Effektor-Caspasen löst eine Kaskade aus, bei welcher hunderte von intrazellulären Proteinen gespalten werden, welche wiederum zum Auftreten der apoptotischen Morphologie führen (Bedoui et al. 2020; Heib et al. 2022).

Zwar ist die Aktivierung der Caspasen ein entscheidender Schritt im intrinsischen apoptotischen Signalweg, jedoch findet Apoptose nach MOMP auch unabhängig von der Caspase-Aktivität statt. Zudem stellt MOMP einen irreversiblen Vorgang dar und repräsentiert somit einen sogenannten zellulären „*point of no return*“ (Singh et al. 2019). Antagonisten von MOMP stellen die anti-apoptotischen Mitglieder der BCL-2-Familie *BCL-2*, *BCL2 like 1*, *myeloid cell leukaemia 1*, *BCL2 like 2* und *BCL-2-related isolated from fetal liver 1* dar (Galluzzi et al. 2018). Diese verhindern die Oligomerisierung und Porenbildung von BAX und BAK durch Sequestrierung von BCL-2-Aktivatoren und -Sensibilisatoren (Carrington et al. 2017; Singh et al. 2019; Bertheloot et al. 2021).

Extrinsischer apoptotischer Signalweg

Die Aktivierung des extrinsischen apoptotischen Signalweges erfolgt durch die Bindung von Todesliganden wie TNF, TRAIL oder FasL an ihren entsprechenden Rezeptor (Heib et al. 2022). Die Bindung der Liganden an ihre Rezeptoren führt zur Bildung des *death-inducing signaling complex* (DISC), bestehend aus TRADD (im Fall von TNFR1), FADD und Pro-Caspase-8 und -10, welcher zur Aktivierung der Caspase-8 und -10 führt (Bertheloot et al. 2021). Bezugnehmend auf den in Kapitel 1.2 beschriebenen nekroptotischen Signalweg stellt die Regulation und Aktivierung der Caspase-8 eine zentrale Schnittstelle zwischen den apoptotischen und nekroptotischen Zelltodwegen dar. Die Aktivierung der Caspase-8 und -10 führt gleich dem intrinsischen apoptotischen Signalweg zur Aktivierung der Pro-Caspasen-3, -6 und -7, welche wiederum Apoptose induzieren (Heib et al. 2022). Darüber hinaus ist die Caspase-8 in der Lage, BID zu tBID zu spalten, wodurch die intrinsische Apoptose verstärkt wird (Radosevich 2018). Eine Zusammenfassung des intrinsischen und extrinsischen apoptotischen Signalweges befindet sich in der Abbildung 1.3.

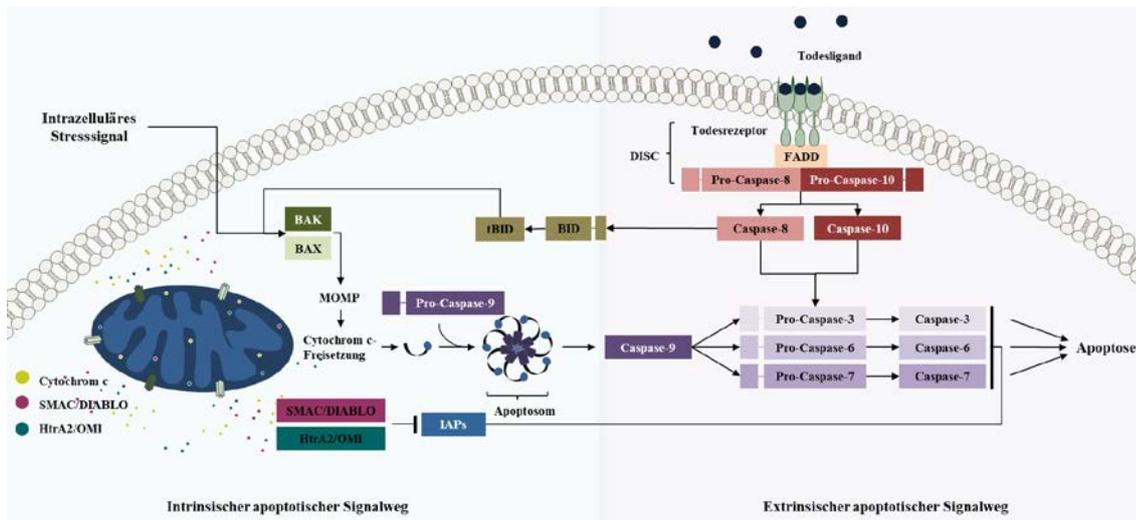


Abbildung 1.3: Vereinfachte, schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen apoptotischen Signalweges.

Im intrinsischen apoptotischen Signalweg führen intrazelluläre Stresssignale zur Aktivierung von BAK und BAX, welche daraufhin Poren in der mitochondrialen Membran bilden. MOMP führt zur Freisetzung der apoptotischen Faktoren Cytochrom c, SMAC/DIABLO und HtrA2/OMI. Cytochrom c initiiert die Bildung des „Apoptosoms“, was zur Aktivierung der Pro-Caspase-9 führt. SMAC/DIABLO und HtrA2/OMI wiederum inaktivieren die anti-apoptotischen IAPs. Der extrinsische apoptotische Signalweg wird durch die Aktivierung von Todesrezeptoren mittels Todesliganden aktiviert. Daraufhin werden FADD und die Pro-Caspasen-8 und -10 rekrutiert. Die Bildung des DISC-Komplexes führt zu Aktivierung der Caspase-8 und -10. Caspase-8 und -10 und die im intrinsischen Weg aktivierte Caspase-9 aktivieren final die Pro-Caspasen-3, -6 und -7, welche letztendlich zum apoptotischen Zelltod führen. Neben der direkten Aktivierung der Effektor-Caspasen durch die Caspase-8, ist diese auch in der Lage, BID zu tBID zu spalten, wodurch ebenfalls MOMP ausgelöst und der intrinsische apoptotische Weg initiiert wird. Darstellung nach Heib et al. 2022.

1.4. Pyroptose

Im Jahre 1992 wurde der pyroptotische Zelltod erstmals von Zychlinsky beschrieben, welcher Suizid bei Makrophagen, die mit dem gramnegativen Bakterium *Shigella flexneri* infiziert waren, detektierte (Zychlinsky et al. 1992). Vier Jahre später wurde beobachtet, dass das *invasion plasmid antigen B* von *Shigella flexneri* in infizierten Makrophagen an Caspase-1 bindet und diese aktiviert (Chen et al. 1996). Aufgrund der Ähnlichkeiten zum apoptotischen Signalweg wie eines Caspase-abhängigen Mechanismus, Schädigung der DNA und Kondensation des Kerns, wurde die Pyroptose erst im Jahre 2001 klar von der Apoptose abgetrennt. Die Bezeichnung Pyroptose stammt dabei vom griechischen Wort *pyroptosis* (*pyroptosis* – *pyro* – Feuer und *ptosis* – Fall) ab und beschreibt einen pro-inflammatorischen regulierten Zelltodweg (Cookson et al. 2001; Yu et al. 2021). Das „*Nomenclature Committee on Cell Death*“ beschreibt den pyroptotischen Zelltodweg wie folgt: Ein regulierter Zelltodweg, welcher von der Bildung von Poren in der Plasmamembran, vermittelt durch Mitglieder der Gasdermin-Proteinfamilie, abhängig ist. Diese wiederum führen in vielen Fällen, jedoch nicht notwendigerweise, zur Aktivierung inflammatorischer Caspasen (Galluzzi et al. 2018). Morphologisch betrachtet, zeigt die Pyroptose sowohl apoptotische als auch nekroptotische Charakteristika. Wie in der Apoptose können Kernkondensation und Spaltung der chromosomalen DNA beobachtet werden. Gemein mit der Nekroptose sind das Anschwellen der Zelle und der Verlust der Membranintegrität durch Porenbildung, welche letztendlich zur Freisetzung des gesamten Zellinhaltes (inklusive pro-inflammatorischer Zytokine und DAMPs) und einer inflammatorischen Antwort führt (Gong et al. 2020). Ähnlich wie in der Apoptose und Nekroptose kommt es ebenfalls zur Bildung sogenannter „pyroptotischer Körperchen“ (Zhang et al. 2018). Aufgrund der starken inflammatorischen Antwort hat die Pyroptose eine wichtige Funktion in der Verteidigung gegen Infektionen, hervorgerufen durch Mikroben, inne. Darüber hinaus spielt die Pyroptose, insbesondere deren Dysregulierung, eine wichtige Rolle in Entzündungskrankheiten, Krebs oder Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Hu et al. 2022). Es sind zwei pyroptotische Zelltodwege beschrieben – der Caspase-1-abhängige kanonische und der Caspase-1-unabhängige nicht-kanonische pyroptotische Signalweg.

Kanonischer pyroptotischer Signalweg

Auslöser für den kanonischen pyroptotischen Signalweg sind neben DAMPs auch *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). DAMPs und PAMPs werden dabei intrazellulär über *cytoplasmic pattern recognition receptors* (PRRs) erkannt (Burdette et al. 2021; Miguel et al. 2021). Säugetierzellen weisen eine Vielzahl von PRRs auf, wodurch ein breites Spektrum an Pathogenen erkannt und eine schnelle Immunantwort ausgelöst werden kann (Tsuchiya 2020). Dazu zählen Mitglieder der *nucleotide-binding oligomerization domain like receptor* (NLR) oder *absent in melanoma 2* (AIM2) *like receptor*-Familie, welche eine Pyrin-Domäne oder *caspase recruitment domain* (CARD)-Domäne besitzen. Nach der Aktivierung der PRRs (AIM2, *NLR family pyrin domain-containing* (NLRP) 1 und 3, *NLR family CARD domain containing protein 4* und Pyrin (Kist et al. 2021)) erfolgt eine Oligomerisierung dieser. Neben der Aktivierung der PRRs durch Detektion von DAMPs und PAMPs, können NLRP3 und Pyrin darüber hinaus Störungen der zytoplasmatischen Homöostase, sogenannte *homeostasis-altering molecular processes*, erkennen und durch diese aktiviert werden (Sun et al. 2022). Falls der PRR eine Pyrin-Domäne enthält (AIM2, Pyrin, NLRP1, NLRP3) wird im nächsten Schritt das Adapterprotein *apoptosis-associated speck-like protein* (ASC) rekrutiert, welches mit einer Pyrin- und CARD-Domäne ausgestattet ist. Der PRR-ASC-Komplex bzw. das CARD-haltige PRR-Oligomer (*NLR family CARD domain containing protein 4*), bildet das sogenannte „Inflammasom“, welches der Rekrutierung der inflammatorischen Pro-Caspase-1 dient. Die Pro-Caspase-1 enthält ebenfalls eine CARD-Domäne, worüber sie entweder an das ASC-Protein und an das CARD-haltige PRR-Inflammasom binden kann. Die Rekrutierung der Pro-Caspase-1 bewirkt deren Aktivierung durch Dimerisierung. Darüber hinaus ist ASC in der Lage, nach der Bildung der Inflammasomen, zytosolische makromolekulare Komplexe zu bilden, sogenannte „ASC-specks“. Diese können wiederum die Pro-Caspase-1 rekrutieren, welche durch ihre räumliche Nähe daraufhin mittels Autoproteolyse aktiviert wird (Tsuchiya 2020). In beiden Fällen spaltet die aktivierte inflammatorische Caspase-1 daraufhin zum einen Pro-Interleukin-18 (IL-18) und Pro-Interleukin-1 β (IL-1 β) und zum anderen Gasdermin D (GSDMD). Das N-terminale GSDMD-Fragment (GSDMD-N) bindet Phosphatidylinositolphosphat und PS der Plasmamembran und formt mittels Oligomerisierung Poren in diese (Kist et al. 2021). Die entstanden Poren bewirken einen Einstrom von Wasser, Anschwellen und letztendlich die

Lyse der Zelle, welche zur Freisetzung von DAMPs und aktiviertem IL-18 und IL-1 β führt. Final werden Immunzellen rekrutiert und eine inflammatorische Antwort ausgelöst.

Nicht-kanonischer pyroptotischer Signalweg

Im nicht-kanonischen, Caspase-1-unabhängigen Signalweg aktivieren gramnegative Bakterien den TRIF-Signalweg, wodurch LPS freigesetzt wird (Miguel et al. 2021). LPS bewirkt wiederum die Aktivierung der Pro-Caspasen-4, -5 (human) und -11 (murin) durch Autoproteolyse (Chen et al. 2020; Liu et al. 2021a). Die Aktivierung der inflammatorischen Caspasen-4, -5 und -11 führt gemäß dem kanonischen pyroptotischen Weg zur Spaltung von GSDMD sowie zur Porenbildung. Caspase-4, -5 und -11 spalten Pro-IL-18 und Pro-IL-1 β zwar nicht selbst, jedoch induziert der durch die Porenbildung auftretende K⁺-Ausstrom die Bildung des NLRP3-Inflammasoms, wodurch ebenfalls aktives IL-18 und IL-1 β sowie DAMPs aus der Zelle hinausströmen und Pyroptose in benachbarten Zellen auslösen (Fang et al. 2020; Tsuchiya 2020). Der kanonische und nicht-kanonische pyroptotische Signalweg ist in der Abbildung 1.4 dargestellt.

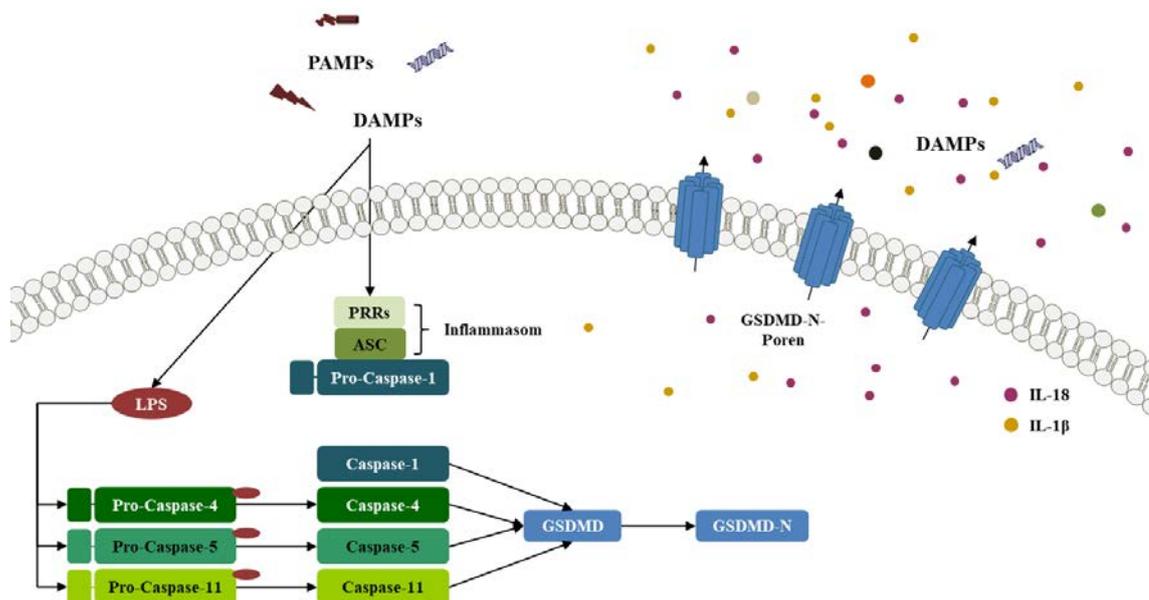


Abbildung 1.4: Vereinfachte schematische Darstellung des pyroptotischen Zelltodweges.

DAMPs und PAMPs initiieren die Bildung kanonischer Inflammasomen, bestehend aus PRRs und ASC. Daraufhin wird die Pro-Caspase-1 zum Inflammasom rekrutiert und autokatalytisch aktiviert. Nicht-kanonische Inflammasomen werden durch die Bindung von LPS an die Pro-Caspasen-4, -5 und -11 gebildet, was wiederum deren proteolytische Aktivierung zur Folge hat. Sowohl die Aktivierung der Caspase-1 als auch der Caspasen-4, -5 und -11 bewirkt die Spaltung von GSDMD. Das freigesetzte GSDMD-N wiederum transloziert zur Zellmembran und bildet dort Poren aus. Diese resultieren in der Freisetzung von DAMPs, IL-18 und IL-1 β , sowie in der Ruptur der Zellmembran, was zum pyroptotischen Zelltod führt. Darstellung nach Heib et al. 2022.



1.5. Verlinkung der Apoptose, Nekroptose und Pyroptose

Apoptose, Nekroptose und Pyroptose stellen die genetisch am besten definierten Formen von RCD dar. Anfänglich wurde angenommen, dass es sich um getrennte Zelltodwege handelte, jedoch konnte in den letzten Jahren eine komplexe Interkonnektivität gefunden werden – bis hin zur Entwicklung des Konzeptes der PANoptose (Malireddi et al. 2020).

Molekulare Interkonnektivitäten zwischen dem pyroptischen und apoptotischen Signalweg sind zum Beispiel, dass Caspase-1 den apoptotischen Zelltodweg in der Abwesenheit von GSDMD induzieren kann (Tsuchiya et al. 2019). Darüber hinaus führt die Inhibierung der *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7*, welche durch den *Yersinien*-Virulenzfaktor YopJ verursacht werden kann, zur Caspase-8 vermittelten Spaltung von GSDMD, wodurch, wie bei der Spaltung durch Caspase-1, NLRP3-Inflammasombildung und die Produktion von IL-1 β ausgelöst wird (Orning et al. 2018). Die Aktivierung der Caspase-8 kann darüber hinaus an NLRP3/ASC/Caspase-8-*specks* nach der Stimulation von Zellen mit TNF und Cycloheximid (CHX, C) erfolgen (Chung et al. 2016). Auch kann eine Caspase-8-Mutante ohne katalytische Aktivität (C362S) die Bildung von ASC-*specks* fördern, wodurch die Caspase-1 aktiviert und IL-1 β sekretiert wird (Fritsch et al. 2019). Zudem fungiert die Effektor-Caspase-3 als positiver und negativer Regulator der Pyroptose. So ist sie auf der einen Seite in der Lage, Gasdermin E zu spalten und Pyroptose auszulösen. Auf der anderen Seite spaltet Caspase-3 GSDMD im zytotoxischen N-Terminus, wodurch inaktives GSDMD generiert wird. (Wang et al. 2021a).

Die Verbindung zwischen dem apoptotischen und nekroptischen Signalweg wird hauptsächlich durch RIPK1 und Caspase-8 vermittelt. Beide Enzyme sind maßgebend für die Entscheidung der Zelle, einen apoptotischen oder nekroptischen Zelltod zu sterben. So führt eine hohe Aktivität der Caspase-8 zur Spaltung von RIPK1 und RIPK3, was die Apoptose fördert sowie die Nekroptose inhibiert. Eine Deletion oder Inhibierung der Caspase-8 hingegen bewirkt nach der Induktion der Nekroptose einen erhöhten nekroptischen Zelltod. RIPK1 kann sowohl als Aktivator als auch Inhibitor des nekroptischen und apoptotischen Signalweges fungieren. RIPK1-defiziente-Mäuse sterben beispielsweise nach der Geburt aufgrund von massivem nekroptischen Zelltod epidermaler Zellen und massivem apoptotischen Zelltod im Darm (Takahashi et al. 2014), sodass RIPK1 die FADD/Caspase-8-abhängige Apoptose und RIPK3-abhängige

Nekroptose inhibieren kann (Dillon et al. 2014). Im Gegensatz dazu ist das Vorhandensein von RIPK1 essenziell für die RIPK1-RIPK3-abhängige Nekroptose. Li et al. analysierten, dass die Menge an RIPK1 in der Zelle entscheidend für die Induktion der Apoptose oder Nekroptose, ausgelöst durch TNF, ist. So führen ungefähr 1000 Moleküle pro Zelle (mpc) zur TRADD-abhängigen Apoptose, über 1000 mpc bewirken die TRADD- und/oder TRADD/RIPK1-abhängige Apoptose und die RIPK1/RIPK3-abhängige Nekroptose. Eine Konzentration von über 46000 mpc führt zur Suppression der Apoptose und zum alleinigen nekroptotischen Zelltod (Li et al. 2021).

Die Interkonnektivität der Nekroptose und Pyroptose beruht auf MLKL. MLKL ist zum einen in der *Toll-like receptor 3*-vermittelten NLRP3-Inflammasom-Aktivierung involviert und zum anderen kann der durch die MLKL-Poren induzierte K^+ -Ausstrom zur Aktivierung der NLRP3-Inflammasomen führen (Wang et al. 2021a).

Eine Konnektivität der Apoptose, Nekroptose und Pyroptose wird von Nguyen et al. während einer Influenzavirus A-Infektion beschrieben. Dabei wird die Influenzavirus A-Z-RNA über das *Z-DNA-binding protein 1* (ZBP1) erkannt und aktiviert Proteine des nekroptotischen, apoptotischen und pyroptotischen Signalwegs, welche das sogenannte „ZBP1-PANoptosom“ bilden. Im ZBP1-PANoptosom fördert die Caspase-6 die Interaktion zwischen ZBP1 und RIPK3. RIPK3 interagiert mit RIPK1, welches wiederum mit FADD und Caspase-8 assoziieren kann. Caspase-8 selbst kann über ASC NLRP3 und Caspase-1 rekrutieren. Die Bildung des PANoptosoms führt somit zur gleichzeitigen Aktivierung von GSDMD, Caspase-3 und -7 und MLKL. Die darauf basierende Zelltodart „PANoptose“ stellt jedoch einen für die Influenzavirus A-Infektion beschriebenen Spezialfall dar und bedarf weiterer Studien (Nguyen et al. 2022).

1.6. Caspase-8 und Caspase-10

Caspasen stellen eine evolutionär konservierte Proteinfamilie dar, welche zu den Cystein-abhängigen Proteasen gehört (van Opdenbosch et al. 2019). Caspasen besitzen untereinander einzigartige Spezifitäten, allen gemein ist jedoch, dass sie ihre Substrate nach einem Aspartat-Rest spalten. Diesen Charakteristika haben sie auch ihren Namen „Caspase“ zu verdanken - „C“ für Cystein-abhängige Katalyse und „aspase“ für Aspartat (Alnemri et al. 1996). Im Menschen sind elf Caspasen bekannt (Caspase-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10 und -14), wohingegen in der Maus nur zehn Mitglieder existieren (Caspase-1, -2, -3, -6, -7, -8, -9, -11, -12 und -14) (Heib et al. 2022). Strukturell betrachtet bestehen Caspasen aus einer N-terminalen Pro-Domäne und einer C-terminalen Protease-Domäne. Die C-terminale Protease-Domäne besteht dabei aus einer 17 bis 20 kDa großen und 10 bis 12 kDa kleinen Untereinheit, welche mit einem Linker verknüpft sind. Die Pro-Domänen der Caspasen üben eine Vielzahl von Funktionen aus, angefangen bei der Dimerisierung, Unterstützung der Proteinfaltung, Sequestration des Proteins im Zytoplasma bis hin zum Stilllegen des Zymogens (MacKenzie et al. 2012). Darüber hinaus sind die Pro-Domänen der Caspasen maßgebend für die Eingruppierung in Initiator- und Effektor-Caspasen. Initiator-Caspasen (Caspase-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11 und -12) bestehen aus einer langen N-terminalen Pro-Domäne, wohingegen Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7, und -14) eine kurze Pro-Domäne besitzen. Die Pro-Domäne der Initiator-Caspasen-1, -2, -4, -5, -9, -11 und -12 enthält eine CARD-Domäne, wohingegen die Pro-Domäne der Initiator-Caspasen-8 und -10 zwei Todeseffektor-Domänen beinhaltet. Caspasen sind klassifiziert als Zymogene, welche entweder nach einer allosterischen Konformationsänderung, Spaltung an einem Aspartat-Rest oder einer Kombination beider in ihre aktive Form übergehen (Heib et al. 2022). So dienen die CARD- und Todeseffektor-Domänen der Rekrutierung der Caspasen in Signalkomplexe (zum Beispiel Apoptosom, DISC oder Inflammasom), in welchen die Pro-Caspasen zur reifen, aktiven Form gespalten werden. Die Pro-Caspasen liegen dabei als Monomer (zum Beispiel Pro-Caspase-1, -8 und -9) oder Dimer vor (zum Beispiel Pro-Caspase-3, -6, und -7) und werden entweder durch Dimerisierung, katalysiert durch Nähe-gesteuerte Autoprozessierung (Salvesen et al. 1999), im Fall der monomeren Caspasen (Han et al. 2021), oder durch Spaltung der Linker-Region, katalysiert durch Initiator-Caspasen, im Fall der dimeren Pro-Caspasen, aktiviert (van Opdenbosch et al. 2019), sodass die aktive Caspase als *head-to-tail*-Dimer vorliegt (Julien et al. 2017). Im Fall des Pro-Caspase-8-Homodimers erfolgt nach dessen Bildung die

Spaltung zwischen der großen und kleinen katalytischen Untereinheit an D373 und D387 (murine Caspase-8), resultierend in p10 und p41/43-Fragmenten. Das p41/p43-Fragment wird wiederum an D212 und D218 gespalten, was zur Freisetzung der Pro-Domäne und einer großen p18-katalytischen Untereinheit führt, sodass die aktive Caspase-8 final aus zwei p10 und zwei p18 Untereinheiten besteht (Orning et al. 2021). Im Fall der Caspase-10 wurde eine einzige Spaltstelle an D297 detektiert (Wachmann et al. 2010). Caspasen zeigen eine hohe Substratspezifität, wobei ein Aspartat-Rest sowie eine Erkennungssequenz vorhanden sein müssen. Basierend auf der Konsensus-Sequenz der Erkennungssequenz lassen sich Caspasen in drei Gruppen aufteilen: Gruppe I (Caspase -1, -4, -5, und -14) erkennt Trp-Glu-His-Asp, Gruppe II (Caspase-2, -3, und -7) Asp-Glu-X-Asp, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt, und Gruppe III (Caspase-6,-8, -9 und -10) Leu/Val-Glu-X-Asp (MacKenzie et al. 2012). Heutzutage sind hunderte Substrate der Caspasen bekannt, sodass die Regulation der Aktivität der Caspasen für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase von großer Bedeutung ist. Insofern ist es nicht verwunderlich, dass die Dysregulierung der Caspase-Aktivitäten mit der Aktivierung krankhafter Mechanismen in der Tumorentstehung, Autoimmunität, Autoinflammation und infektiösen Pathologie in Verbindung steht (van Opdenbosch et al. 2019).

Die Caspase-8 hat, wie bereits in den Kapiteln 1.2 und 1.3 beschrieben, eine zentrale Funktion in der Aktivierung des apoptotischen Signalweges und in der Inhibierung des nekroptotischen Signalweges inne. Aufgrund dessen ist die Regulation der Caspase-8 von entscheidender Bedeutung. Dabei stellen posttranslationale Modifikationen, insbesondere Phosphorylierungen, einen entscheidenden Mechanismus dar. Einer Vielzahl von Serin/Threonin-Kinasen wird eine Rolle in der Phosphorylierung der Caspase-8 zugesprochen, darunter *cyclin dependent kinase 1*, welche die Caspase-8 an S387 phosphoryliert und dadurch die Spaltung und Aktivität der Caspase inhibiert (Matthess et al. 2010). Darüber hinaus wird die Caspase-8 an S364 durch die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase, an T263 durch die *ribosomal S6 kinase 2*, sowie an T380 durch die Tyrosinkinase Src und Lyn und an T465 durch Lyn phosphoryliert, wobei in allen Fällen die Aktivität der Caspase-8 inhibiert und im Fall der pT263-posttranslationalen Modifikation die Degradierung des Proteins gefördert wird (Parrish et al. 2013). Neben der Phosphorylierung spielen auch Ubiquitylierung und Nitrosylierung eine Rolle. Nach der Aktivierung von Todesrezeptoren und der Bildung des DISC-Komplexes interagiert der DISC mit *cullin3 based E3 ligase*, welche wiederum die Caspase-8 polyubiquityliert

(antagonisiert durch A20). Die Polyubiquitylierung bewirkt eine p62-vermittelte Aggregation der Caspase-8, wodurch die Aktivität der Caspase-8 verstärkt wird (Jin et al. 2009).

Die Caspase-10 ist ein Paralog der Caspase-8, und weist eine überlappende Substratspezifität mit der Caspase-8 auf (Fischer et al. 2006). Im Gegensatz zur Caspase-8 ist die Caspase-10 jedoch weit weniger gut charakterisiert und ihre Funktionen sind weitestgehend unbekannt. Die Untersuchung der Funktionen der Caspase-10 stellt dabei eine große Herausforderung dar, da die Caspase-10 im Menschen vorhanden, im Laufe der Evolution in Mäusen und Ratten (und auch weiteren Nagetieren) jedoch verloren gegangen ist. Dies führt dazu, dass *in vivo*-Studien auf Überexpressions-Studien limitiert sind (Eckhart et al. 2008; Sakamaki et al. 2015). Mutationen der Caspase-10 stehen in der Verbindung mit dem Autoimmun-Lymphoproliferativen Syndrom (Matas Pérez et al. 2021) und mit verschiedenen Krebsarten, einschließlich des Non-Hodgkin-Lymphoms, Magenkarzinoms und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (Kumari et al. 2019).

Die Rolle der Caspase-8 und der Caspase-10 im regulierten Zelltod

Die Schlüsselrolle der Caspase-8 als molekularer Schalter zwischen dem apoptotischen, nekroptotischen und pyroptotischen Signalweg ist ausführlich in den Kapiteln „Nekroptose“, „Apoptose“ und „Verlinkung der Apoptose, Nekroptose und Pyroptose“ erläutert und wird darüber hinaus in einem Review von Jiang et al. detailliert erklärt (Jiang et al. 2021). Über die Rolle der Caspase-10 im regulierten Zelltod ist hingegen wenig bekannt. Wie bereits im Kapitel „Apoptose“ beschrieben, wird die Caspase-10 zusammen mit der Caspase-8 in den DISC-Komplex rekrutiert, jedoch kann die Caspase-10 selbst die funktionelle Rolle der Caspase-8 in der TRAIL und Fas-induzierten Apoptose nicht übernehmen (Sprick et al. 2002). Darüber hinaus wurde die Caspase-10 als negativer Regulator der Fas-DISC-induzierten Aktivierung der Caspase-8 und als Aktivator des NF- κ B-Überlebenssignalweges identifiziert. In dieser Studie wurde die Caspase-8, jedoch nicht die Caspase-10, als essenziell für die Bildung des DISC-Komplexes identifiziert, wobei die *scaffolding*-Funktion der Caspase-8, jedoch nicht ihre katalytische Aktivität, entscheidend war (Horn et al. 2017). In der FasL-induzierten Apoptose wurden hohe Spiegel der Caspase-10 in Verbindung mit einer starken Caspase-Aktivierung, Spaltung von BID und DNA-Fragmentierung gemessen (Milhas et al. 2005). Mohr et al. zeigten, dass nach der Behandlung mit 5-Fluorouracil, einem Krebstherapeutikum, eine *Ataxia telangiectasia and*

Rad3 related-abhängige Hochregulierung der Caspase-10 stattfindet, welche zur „FADDosom“-induzierten Apoptose führt. Das FADDosom besteht dabei aus Caspase-8 und -10, RIPK1, c-FLIP_L, und TRAF2, wobei c-FLIP_L durch TRAF2 ubiquitinyliert und zur Degradierung markiert wird. Dies bewirkt wiederum die Aktivierung der Caspase-8. Krebszellen, welche eine Deletion von Caspase-10, TRAF2 oder *Ataxia telangiectasia and Rad3 related* aufweisen, sterben hingegen über einen effektiveren apoptotischen Signalweg, ausgelöst durch das „FLIPosom“, bestehend aus c-FLIP_L und Caspase-8. Die Bildung des FLIPosoms bewirkt die Caspase-8-vermittelte Spaltung von c-FLIP_L zu c-FLIP_{p43} und führt zur Aktivierung von NF-κB, Hochregulierung der TNF-Produktion und zur p53-unabhängigen Apoptose (Mohr et al. 2018). Tanzer et al. beobachteten in HT-29-Zellen, dass nach der Stimulation mit IFN γ und SMAC-Mimetika und unter der Blockierung von Caspase-8-vermittelter Apoptose und Nekroptose, ein Caspase-10/RIPK1-abhängiger Zelltod stattfindet, wobei RIPK1 eine Caspase-10-aktivierende Rolle zugeschrieben wird (Tanzer et al. 2017). Neben der Rolle der Caspase-10 im apoptotischen Signalweg wurde zudem eine Assoziation der Caspase-10 mit einem basalen Grad an Autophagie in akuten myeloischen Leukämiezellen, jedoch nicht in akuten lymphatischen Leukämiezellen, beobachtet (Guo et al. 2016).

Eine Spezies-spezifische Rolle der Caspase-8 im nekroptotischen Signalweg wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam identifiziert. Die Basis für die Entdeckung war ein *small interfering RNA* (siRNA)-Screen, in welchem die Herunterregulierung der murinen Caspase-8 zu einem erhöhten nekroptotischen Zelltod führte. Diese Beobachtung stand im Einklang mit dem in Kapitel 1.2 beschriebenen nekroptotischen Signalweg. Im Gegensatz dazu zeigte die Herunterregulierung der humanen Caspase-8 einen Schutz gegenüber der Induktion der Nekroptose (Voigt 2014). Anzumerken ist, dass Studien zur Rolle der Caspase-8 in der Nekroptose vorwiegend in murinen Modellen durchgeführt worden waren. In Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam untersuchte Frau Dr. Saggau die Spezies-spezifische Rolle der Caspase-8, sowie eine mögliche komplementäre Funktion der murinen Caspase-8 und humanen Caspase-10, eingehender und zeigte, dass die Deletion der murinen Caspase-8 zum verstärkten nekroptotischen Tod führt, wohingegen die Deletion der humanen Caspase-8 einen Schutz gegenüber der Induktion der Nekroptose ausübt. Ein verstärkter nekroptotischer Zelltod wurde ebenfalls nach der Deletion der Caspase-10 detektiert. Darüber hinaus zeigten die murine und humane Caspase-8 keine komplementären Funktionen (Saggau 2018).

1.7. *High temperature requirement protein A2*

Die Anreicherung von fragmentierten, fehlerhaft gefalteten oder fehlerhaft lokalisierten Proteinen behindert wichtige biologische Prozesse und führt zu zellulären Fehlfunktionen. Zur Verhinderung der Produktion von potenziell toxischen Proteinaggregaten besitzt die Zelle Proteasen und Chaperone, welche die Neufaltungs-, Lokalisations- oder Abbaupfade der Proteine dirigieren. Die *high temperature requirement protein A* (HtrA)-Serinprotease-Familie, welche vom Prokaryonten zum Eukaryonten evolutionär konserviert ist, kontrolliert dabei nicht nur die Qualität der Proteine über ihre Protease-Funktion, sondern einige Mitglieder können auch mittels ihrer Chaperon-Funktion Proteinstrukturen stabilisieren (Toyama et al. 2021). Darüber hinaus fungieren sie durch Spaltung oder Sequestration von regulatorischen Proteinen als Auslöser oder Modulatoren verschiedener Signalwege. Zusammenfassend haben HtrA-Proteine somit eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen, darunter bakterielle Virulenz, Aufrechterhalten des Photosynthese-Apparats, Proliferation und Zell-Migration inne (Clausen et al. 2011).

Zu den am besten studierten HtrA-Familienmitgliedern gehört die mitochondriale Serinprotease HtrA2/OMI, das humane Homolog des bakteriellen HtrA/DegP-Proteins, welches Bakterien vor erhöhten Temperaturen durch gezielte Erkennung und Degradierung denaturierter Proteine schützt (Chung et al. 2020). Unter physiologischen Bedingungen fungiert HtrA2/OMI als Marker für die Proteinqualitätskontrolle in den Mitochondrien. So führt der Verlust von HtrA2/OMI zur Akkumulation von ungefalteten Proteinen im Mitochondrium, zur Dysfunktion der mitochondrialen Atmungskette und zur Generierung von ROS (Zurawa-Janicka et al. 2013). Zudem wurde HtrA2/OMI eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Cristae-Struktur zugesprochen (Botham et al. 2019). Neben der Funktion in der Qualitätskontrolle von Proteinen besitzt HtrA2/OMI auch eine Rolle im regulierten Zelltod. Aufgrund der zentralen Funktion von HtrA2/OMI in der Proteinqualitätskontrolle sowie im regulierten Zelltod steht eine Dysregulierung von HtrA2/OMI in Verbindung mit der Onkogenese und neurodegenerativen Krankheiten wie der Parkinson- oder Alzheimer-Krankheit (Gieldon et al. 2016). Strukturell betrachtet handelt es bei HtrA2/OMI um ein 49 kDa großes mitochondriales Pro-Enzym, bestehend aus einer kurzen N-terminalen Region (zusammengesetzt aus einem mitochondrialen Lokalisationssignal und einer Transmembran-Domäne), einer *chymotrypsin-like*-Proteasedomäne (Zurawa-Janicka et al. 2013; Chaganti et al. 2019) und einer C-terminalen

Post-synaptic density protein 95-Discs large-Zona occludens 1 (PDZ)-Domäne (Merski et al. 2017; Heib et al. 2022). Die PDZ-Domäne fungiert dabei als regulatorische Domäne, welche für die Substratbindung sowie die HtrA2/OMI-Aktivität verantwortlich ist. Die Protease- und PDZ-Domäne sind mittels eines flexiblen Linkers verknüpft und bilden eine pyramidenförmige homotrimere Kristallstruktur (Gieldon et al. 2016; Toyama et al. 2021). Neben der trimeren Struktur wurde zudem eine hexamere Struktur beobachtet, welche jedoch im Vergleich eine geringere Substrataffinität aufweist, sodass die Enzymaktivität von HtrA2/OMI über den Grad seiner Oligomerisierung gesteuert wird. Zusätzlich zur Oligomerisierung wurde eine Neuorientierung des trimeren Komplexes, welche die Freilegung des katalytischen Zentrums bewirkt, nach der Aktivierung von HtrA2/OMI aufgezeigt (Toyama et al. 2021). Neben der Struktur als entscheidender Faktor der HtrA2/OMI-Aktivität (Seong et al. 2004; Merski et al. 2017), können darüber hinaus p53 (Marabese et al. 2008), ROS, Presenilin-1 (Gupta et al. 2004) und *phosphatase and tensin homologue-induced putative kinase 1* die Hydrolyse-Aktivität von HtrA2/OMI modulieren (Su et al. 2019). Die inaktive Pro-Form von HtrA2/OMI ist vorwiegend im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert, wurde jedoch auch im ER und im Kern nachgewiesen (Heib et al. 2022). Durch die autoproteolytische Spaltung (Seong et al. 2004; Su et al. 2019) der N-terminalen 133 Aminosäuren (inklusive Transmembrandomäne und mitochondrialem Lokalisationssignal) und Exposition eines tetrapeptidischen Motivs (AVPS) reift HtrA2/OMI zu einer 36 kDa großen, löslichen Form heran (Seong et al. 2004; Toyama et al. 2021), in welcher es seiner Funktion der Proteinqualitätskontrolle nachkommt. Wie bereits beschrieben hat HtrA2/OMI zudem eine wichtige Rolle in der Regulation des Zelltodes inne.

Die Rolle von HtrA2/OMI im regulierten Zelltod

Die Rolle von HtrA2/OMI in der Apoptose - Im intrinsischen apoptotischen Zelltodweg wird die Serinprotease nach apoptotischen Stress aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma entlassen, wo es die IAPs XIAP, cIAP1, cIAP2 und BRUCE/Apollon bindet und spaltet (Heib et al. 2022) und die Apoptose verstärkt. Darüber hinaus übt HtrA2/OMI seine pro-apoptotische Wirkung durch Spaltung der anti-apoptotischen Enzyme *hematopoietic cell-specific protein 1-associated protein X-1* und *phosphoprotein enriched in astrocytes 15* aus. Die Interaktion von HtrA2/OMI und *hematopoietic cell-specific protein 1-associated protein X-1* bewirkt eine Steigerung der HtrA2/OMI-Aktivität (Chaganti et al. 2019). Neben den pro-apoptotischen Enzymen spaltet HtrA2/OMI auch wichtige Transkriptionsfaktoren der Apoptose, darunter den *Wilms tumor 1*, zu dessen Zielproteinen BAK oder Bcl-2

gehören (Hartkamp et al. 2010) und p73, dessen Spaltung zur Erhöhung der Produktion von BAX mRNA führt (Marabese et al. 2008; Heib et al. 2022). Darüber hinaus wurde das humane Gegenstück der Serin/Threonin-Kinase *Drosophila tumor suppressor Wts*, WARTS, als direkter Interaktionspartner von HtrA2/OMI im zVAD/Staurosporin- und Staurosporin-vermittelten Zelltod identifiziert. In der Apoptose bindet WARTS an den C-Terminus der HtrA2/OMI PDZ-Domäne im Zytoplasma, wonach eine erhöhte Aktivität von HtrA2/OMI detektiert wurde. Die Herunterregulierung von WARTS ging hingegen mit einem reduzierten Zelltod sowie einer erhöhten IAP-Konzentration einher (Kuninaka et al. 2005).

Die Rolle von HtrA2/OMI in der Pyroptose - Neben einem direkten Einfluss von HtrA2/OMI in der Apoptose wurde zudem ein indirekter Einfluss von HtrA2/OMI auf Inflammasomen beobachtet. So wurde gezeigt, dass die Störung der HtrA2/OMI-Protease-Aktivität zur Beeinträchtigung der Autophagie führt, welche wiederum eine anhaltende Akkumulation von ASC-Oligomeren und eine Erhöhung der NLRP3- und AIM2-vermittelten inflammatorischen Antwort bewirkt (Rodrigue-Gervais et al. 2018).

Die Rolle von HtrA2/OMI in der Nekroptose - Die Entdeckung der Rolle von HtrA2/OMI in der Nekroptose beruhte auf der Beobachtung, dass Serinprotease-Inhibitoren wie Tosylphenylalanylchloromethylketon sowohl Nekroptose als auch Apoptose inhibieren können. Auf der Suche nach Tosylphenylalanylchloromethylketon-sensitiven Proteasen im nekroptotischen Zelltodweg wurde HtrA2/OMI entdeckt (Sosna et al. 2013). Sosna et al. zeigten, dass die Inhibierung der Serinprotease im murinen und humanen Zellmodell vor der TNF- und TRAIL-induzierten Nekroptose schützte. Dies konnte ebenfalls in einem murinen Zellmodell nach Deletion von HtrA2/OMI detektiert werden (Sosna et al. 2016). Bezüglich der genauen Rolle von HtrA2/OMI im nekroptotischen Zelltodweg ist bislang jedoch wenig bekannt. So wurde für die TNF-induzierte Nekroptose *ubiquitin C-terminal hydrolase* als nachgeschalteter Mediator beschrieben (Sosna et al. 2013). Darüber hinaus existieren kontroverse Berichte über die Lokalisation von HtrA2/OMI während der Nekroptose. So zeigte eine Studie, dass im Dextransulfat-Natrium (*dextran sulfate sodium*, DSS)-induzierten Colitis-Modell HtrA2/OMI während der Nekroptose aus den Mitochondrien in das Zytoplasma transloziert und dort mit RIPK1 interagiert, was zu dessen Spaltung und zum Schutz gegenüber der Nekroptoseinduktion führt (Zhang et al. 2019). Im Gegensatz

dazu wurde in einer Studie von Blink et al. ein Verweilen von HtrA2/OMI in den Mitochondrien während der Nekroptose detektiert (Blink et al. 2004).

1.8. *A disintegrin and metalloproteinase 17*

Die *a disintegrin and metalloproteinase* (ADAM, A)-Proteinfamilie gehört zu den Typ-I-Transmembran- und sekretierten Proteinen (Seegar et al. 2019). ADAM-Proteasen üben dabei eine große Vielzahl an biologischen Funktionen aus, so in der Fertilisation, Zelldifferenzierung, Immunität, Angiogenese und der Entwicklung von Epithel- und Nervengewebe. Dementsprechend ist die Dysfunktion der ADAM-Proteasen-Aktivität mit einer Fülle von pathophysiologischen Zuständen wie Krebs, Infertilität, chronische Immunität, Alzheimer-Krankheit, Asthma oder Epilepsie verknüpft. Von den rund 30 bekannten ADAM-Proteasen gelten nur die Hälfte als katalytisch aktiv, darunter ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30, 33 und DEC1 (Calligaris et al. 2021). Die Aufgabe der katalytisch aktiven, typischerweise membrangebundenen ADAM-Proteasen ist dabei die proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne (Ektodomäne) (auch bekannt als „*ectodomain shedding*“) ihrer Substratproteine, welche daraufhin in den extrazellulären oder luminalen Raum freigesetzt wird. Proteinspaltung an der Zelloberfläche kann dabei mehreren Zwecken dienen. Auf der einen Seite behalten die löslichen Ektodomänen oft ihre Bindestellen für Liganden oder Interaktionsproteine, wodurch sie selbst biologisch aktiv sind. Aufgrund dessen können die Ektodomänen als Antagonist zur membrangebundenen Domäne fungieren, welche entweder nur eine Köderfunktion ausüben oder durch die Bindung an den Liganden dessen biologische Funktion erweitern. Somit dient die Spaltung der Ektodomäne als regulatorischer Schritt, der die Menge des löslichen Transmembranproteins und somit seine biologische Funktion kontrolliert. Auf der anderen Seite bewirkt die proteolytische Spaltung eine Reduzierung der Substratmenge an der Zelloberfläche, wodurch eine Reduzierung der biologischen Aktivität zustande kommt. Somit reguliert die proteolytische Spaltung membrangebundener Proteine auch die Reaktionsfähigkeit der Zelle auf extrazelluläre Reize (Düsterhöft et al. 2019).

ADAM17 gehört neben ADAM10 zu den am besten studierten ADAM-Familienmitgliedern und ist zudem aufgrund seiner Eigenschaft, TNF, ein Transmembranständiges pro-inflammatorisches Zytokin, welches wie bereits beschrieben eine entscheidende Funktion in der Regulation der Immunantwort innehat, in seine lösliche Form zu spalten, unter dem Namen *TNF-alpha-converting enzyme* bekannt. Strukturell gesehen besteht ADAM17 aus einer N-terminalen Signalsequenz, gefolgt von einer Pro-Domäne, einer Metalloprotease-Domäne, einer Disintegrin-Domäne, einer Cystein-reichen

membrannahen Domäne, einer *conserved adamseventeen dynamic interaction sequence* (CANDIS)-Domäne, einer Transmembran-Domäne und einem zytoplasmatischen Teil (Sisto et al. 2021), wobei jeder Domäne spezifische Funktionen zugewiesen werden. Die Pro-Domäne fungiert als Chaperon (Zunke et al. 2017; Düsterhöft et al. 2019) und inhibiert die katalytische Aktivität der Protease durch Bindung von Zn^{2+} mittels eines Cystein-Restes des *consensus cysteine switch*-Motivs. Die Pro-Protein Konvertase Furin wurde als das für die Spaltung der Pro-Domäne verantwortliche Enzym entdeckt (Wong et al. 2015), jedoch sind heute weitere Pro-Protein-Konvertase-Spaltstellen bekannt (Düsterhöft et al. 2019). Neben der Pro-Domäne ist ein weiterer endogener Inhibitor der katalytischen Aktivität bekannt: *Tissue inhibitor of metalloproteinases-3*. Dieser bindet mit hoher Affinität mittels seines N-Terminus in das katalytische Zentrum (Grötzinger et al. 2017). In der katalytischen Domäne, eingruppiert in die Familie der Metzinkine, wird Zn^{2+} über drei Histidine des konservierten HEXXHXXGXXH-Bindemotivs koordiniert, welches daraufhin zusammen mit einem konservierten Glutamat-Rest Wasser aktiviert und die Spaltung des Proteins bewirkt (Elsässer et al. 2021). Die physiologischen Funktionen der weiteren Domänen von ADAM17 sind weitestgehend unbekannt. Die Disintegrin-Domäne übt molekulare Interaktionen mit anderen Transmembranproteinen aus, darunter Integrine. Der membrannahen- und CANDIS-Domäne werden Funktionen in der Substrat-Erkennung und Aktivierung von ADAM17 zugeschrieben. Die Transmembran-Domäne dient neben der Verankerung des Proteins in der Membran auch der Interaktion mit den Proteinen iRHOM1 und iRHOM2 (Calligaris et al. 2021). Die Funktion der intrazellulären Domäne ist bislang unbekannt (Düsterhöft et al. 2019).

Die unreife Form von ADAM17 ist hauptsächlich im ER lokalisiert, wohingegen die Reifung im Golgi-Apparat stattfindet. iRHOM1 und iRHOM2 bilden dabei einen Komplex mit ADAM17 aus und navigieren ADAM17 zum Golgi-Apparat (Calligaris et al. 2021). Im nächsten Schritt wird ein kleiner Teil der intrazellulär aufbewahrten reifen ADAM17-Form an die Zelloberfläche transportiert, wo zum einen die proteolytische Spaltung der ADAM17-Substrate und zum anderen die Clathrin-abhängige Internalisierung, gefolgt vom Recycling oder Degradierung von ADAM17, stattfindet (Lorenzen et al. 2016). Neben der Lokalisation von ADAM17 und der Abspaltung der Pro-Domäne als wichtige Regulationspunkte der Aktivität der Protease existieren weitere Regulatoren. So kann ADAM17 von einer inaktiven „off“-Form zu einer aktiven „on“-Form transformiert werden. Wichtige Modulatoren sind dabei Membraninteraktionen zu PS, vermittelt durch die Cystein-reiche membrannahe

Domäne und die CANDIS-Domäne sowie die Proteindisulfid-Isomerase, welche mittels Isomerisierung zweier Disulfidbrücken die Umwandlung in die inaktive Form von ADAM17 katalysiert (Calligaris et al. 2021). Ein hoher Cholesterolgehalt in der Zelle unterbricht die Interaktion der amphipathischen Helix der CANDIS-Region mit der Zellmembran, wobei insgesamt die Zusammensetzung der Membran ein wichtiger Regulator der ADAM17-Aktivität zu sein scheint (Al-Salihi et al. 2021; Fritsch et al. 2021). Die Aktivität von ADAM17 ist in ruhenden Zellen, unter normalen Zellkulturbedingungen, gering (Groth et al. 2016), kann aber über Aktivatoren wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und die Proteinkinase C gesteigert werden. Die Proteinkinase C wird dabei nach Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat phosphoryliert und aktiviert (Calligaris et al. 2021), was zur Phosphorylierung von ADAM17 und so zur Dysregulierung der Lokalisation der reifen ADAM17-Form führt. Als Folge kann ein schneller und drastischer Anstieg von ADAM17 an der Zelloberfläche beobachtet werden. Für die Entfernung von ADAM17 von der Zelloberfläche wurden zwei Prozesse beschrieben. So zum einen die Internalisierung von ADAM17, gefolgt von dessen Abbau oder Recycling (Lorenzen et al. 2016) und zum anderen die exosomale Freisetzung von ADAM17 (Groth et al. 2016). ADAM17 besitzt eine weitreichende somatische Verteilung, wobei ein hoher Expressionsgrad im Gehirn, Herz, Niere, Speicheldrüse und Skelettmuskel detektiert wurde (Sisto et al. 2021).

Heutzutage sind über 80 ADAM17-Substrate bekannt, darunter Zytokine, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle. Zu den bekanntesten zählen TNF, *transforming growth factor α* (TGF α), *epidermal growth factor*, TNF-Rezeptoren, IL-6-Rezeptor und *Angiotensin-converting enzyme 2*, welches im Zuge der Coronapandemie an Bekanntheit gewann. So gelangt das *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* nach der Bindung an *Angiotensin-converting enzyme 2* in die Zelle. *Angiotensin-converting enzyme* selbst wird von ADAM17 gespalten und wies nach einer Infektion mit *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* eine erhöhte Spaltung auf. Eine Herunterregulierung von ADAM17 führte hingegen zum Schutz gegenüber dem Eindringen des Virus (Sharma et al. 2021). Hinweise, dass es sich bei TGF α um ein mögliches Substrat von ADAM17 handelt, gab es bereits vor über 20 Jahren, (Peschon et al. 1998), da Mäuse, welche eine Deletion von ADAM17 aufwiesen, zum einen nicht lebensfähig waren und zum anderen einen mit TGF α -defizienten Mäusen verwandten Phänotyp zeigten – offene Augen und welliges Haar bei der Geburt (Yang et al. 2021). Im Gegensatz dazu ist die Deletion von ADAM17 in Menschen nicht tödlich. Zwillinge, welche

eine homozygote *loss-of-function*-Mutation in *ADAM17* aufwiesen, zeigten ein stark unterschiedliches Verhalten. So verstarb einer der Zwillinge bereits im Alter von 12 Jahren, wohingegen der andere im Erwachsenenalter „lediglich“ wiederkehrende Hautinfektionen aufwies (Bandsma et al. 2015). Aufgrund der Vielzahl an Substraten ist *ADAM17* in diverse Signalwege involviert, welche physiologische und pathophysiologische Prozesse wie Entwicklung, Regenerierung, Immunität, Inflammation und Tumorentstehung steuern (Lorenzen et al. 2016).

Die Rolle von ADAM17 im regulierten Zelltod

Die Rolle von ADAM17 in der Apoptose – Da sowohl TNF als auch TNFR1 Substrate von *ADAM17* darstellen, ist die Balance der Spaltprodukte in der Apoptose entscheidend. So verringert das *ADAM17*-vermittelte *shedding* von TNFR1 von der Zelloberfläche die Sensitivität von Zellen für apoptotische Signale über den TNFR1-Signalweg, und zudem kann der extrazelluläre, lösliche TNFR1 an gespaltenes und ungespaltenes TNF binden und dessen biologische Aktivität reduzieren (Sakimoto et al. 2009; Al-Salihi et al. 2021).

Die Rolle von ADAM17 in der Nekroptose – Eine Aktivierung von ADAM-Proteasen während der Nekroptose und das damit verbundene *ectodomain shedding* wurde in Cai et al. beschrieben. Dort konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulierung von *ADAM10* und *ADAM17* zum verminderten nekroptotischen Zelltod in murinen Embryonalfibroblasten (MEF) und L929-Zellen führt. In HT-29-Zellen wurden hingegen *ADAM9* und *ADAM10* als Hauptproteasen verantwortlich für die Spaltung von Ektodomänen identifiziert. Als möglicher Aktivierungsmechanismus wurde eine Komplexbildung von pMLKL und der ADAM-Proteasen angedacht (Cai et al. 2016). Rövekamp detektierte in der Nekroptose eine Verlagerung der *ADAM17*-vermittelten Spaltung des IL-6-Rezeptors und TGF α zu einer *ADAM10*-vermittelten Spaltung dieser Substrate in HT-29-Zellen (Rövekamp 2019). Eine entscheidende Rolle von *ADAM17* im nekroptotischen Signalweg wurde ebenfalls in Fuchslocher Chico et al. beschrieben. Ausgangslage der Studie war es, die Rolle der Nekroptose in Darmentzündungen *in vivo* zu untersuchen. Dazu wurden *ADAM17^{ex/ex}*-Mäuse herangezogen, welche eine hohe Anfälligkeit für DSS-induzierte entzündliche Darmerkrankung zeigten. Die Besonderheit der *ADAM17^{ex/ex}*-Mäuse ist, dass sie noch etwa 5 % der ursprünglichen *ADAM17*-Menge exprimieren, wodurch sie im Gegensatz zur *ADAM17*-defizienten-Maus lebensfähig sind, jedoch gleich der *ADAM17*-defizienten-Maus eine starke Reduktion von gespaltenen *ADAM17*-Substraten sowie Gewebsschäden

aufweisen (Chalaris et al. 2010). Überraschenderweise zeigten ADAM17^{ex/ex}- und ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-Mäuse keine Unterschiede im akuten und chronischen Kolitis-Modell hinsichtlich des Gewichtsverlustes, *disease activity*-Indexes, Kolitis-assoziiierter Organveränderungen, Gewebszerstörungen, Infiltration von Immunzellen, Verlust der Membranintegrität oder intestinalen Zelltodes. Zudem zeigten ADAM17^{ex/ex}-Mäuse ebenso wie die ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-Mäuse keine nekroptotischen Marker. MEF, isoliert aus ADAM17^{ex/ex}-Mäusen, zeigten ebenso einen Schutz gegenüber der Induktion der Nekroptose (Fuchslocher Chico et al. 2018). Dass ADAM17 entscheidend für die Induktion des TNFR1-vermittelten nekroptotischen Zelltodes in MEF ist, wurde ebenfalls in Bolik et al. gezeigt (Bolik et al. 2022). Im Gegensatz dazu konnten Fritsch et al. weder in ADAM17^{ex/ex}- noch in parentalen MEF einen nekroptotischen Zelltod induzieren (Fritsch et al. 2021). Bolik et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen ADAM17 und der Extravasation zirkulierender Tumorzellen und Metastasenbildung verursacht durch den TNF/TNFR-Signalweg und stellten basierend auf ihren Ergebnissen folgende Theorie auf: Im ersten Schritt interagiert die Tumorzelle mit der Endothelzelle, wodurch die Sekretion von endothelalem TNF (katalysiert durch ADAM17) induziert wird. Darüber hinaus kann lösliches TNF auch von Immunzellen geliefert werden. Im zweiten Schritt wird TNFR1 auf der Endothelzelle aktiviert, gefolgt von einer ADAM17-vermittelten Ektodomänen-Spaltung von TNFR1 und Prozessierung des in der Zellmembran verbleibenden Restes von TNFR1 mittels der γ -Sekretase. Die proteolytische Spaltung des TNFR1 ermöglicht die Dissoziation des Komplex I, wodurch die Bildung des Komplex II und die Nekroptose in Endothelzellen begünstigt wird. Im Gegensatz dazu führt eine Deletion von ADAM17 sowie dessen Inhibierung in Endothelzellen ausschließlich zur Bildung von Komplex I und zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges (Bolik et al. 2022). Fritsch et al. untersuchten die Rolle von ADAM17 im TNFR1- und TRAIL-vermittelten Zelltod in hämatopoetischen (U937- und Jurkat-Zellen), MEF, *human embryonic kidney 293T* (HEK293T)- und humanen Brustadenokarzinom-Zellen und detektierten dabei eine Zelltyp-spezifische apoptotische und nekroptotische Zelltodantwort. Insgesamt zeigte sich ADAM17 als *fine-tuning*-Enzym im apoptotischen und nekroptotischen Signalweg, dessen Aktivität möglicherweise von der Membranzusammensetzung abhängig ist (Fritsch et al. 2021).



1.9. Saure Sphingomyelinase

Sphingomyelinasen katalysieren die hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindung von Sphingomyelin, resultierend in Ceramid und Phosphocholin (Gulbins et al. 2002; Li et al. 2019a). Die Sphingomyelinasen werden basierend auf dem optimalen pH-Wert ihrer Aktivität, in saure, neutrale und basische Sphingomyelinasen aufgeteilt. Unter ihnen gehört die saure Sphingomyelinase (A-SMase) zu den am besten charakterisiertesten Sphingomyelinasen, welche erstmals 1963 als Hydrolase, die Sphingomyelin bei saurem pH-Wert spaltet, beschrieben wurde (Gatt 1963). Heute ist die A-SMase für ihre zentrale Rolle bei der Reorganisation von Molekülen innerhalb der Zelle in Antwort auf verschiedene Stimuli und nach Induktion von Apoptose sowie während der Zelldifferenzierung, Proliferation, Tumorpräsentation, bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen und bakteriellen Infektionen bekannt. Das Fehlen der A-SMase bzw. ihres Genes *SMPD1* verursacht eine Ceramid-Akkumulation, welche lysosomale Speicherkrankheiten wie die Niemann-Pick-Krankheit Typ A und B verursacht (Perrotta et al. 2015). Strukturell betrachtet besteht die A-SMase aus drei Domänen: Einer N-terminalen Saposin-Domäne, einem Prolin-reichen-Verbindungsstück und einer katalytischen Domäne (Li et al. 2019a; Pinto et al. 2021). Von der katalytisch aktiven A-SMase existieren zwei Formen - die lysosomale A-SMase (L-A-SMase) und die sekretorische A-SMase (S-A-SMase) (Schissel et al. 1996), deren Entstehung von differentieller Prozessierung und Transport der Vorläufer-A-SMase abhängig ist. Im ersten Schritt wird das entstehende Vorläuferpolypeptid der A-SMase, welches ein N-terminales Signalpeptid für die Lokalisation zum ER besitzt, mittels kotranslationalem Proteintransport in das ER transportiert (Jenkins et al. 2009). Vor dem Eintritt in das ER wird das Signalpeptid proteolytisch gespalten und eine 75 kDa große Prä-Pro-Form entsteht. Die Reifung der Prä-Pro-Form zur Pro-Form erfolgt im Golgi-Apparat, resultierend in einer 72-75 kDa großen Pro-Form (proteolytische Spaltung an H60 im Fall der S-A-SMase und an G68 im Fall der L-A-SMase) (Kornhuber et al. 2015). Die Pro-L-A-SMase wird mittels des Mannose-6-phosphat-Systems zu den endolysosomalen Kompartimenten transportiert (Ni et al. 2006). Dort wird die Pro-L-A-SMase proteolytisch am C-Terminus in eine 57 kDa große Form prozessiert, wodurch die L-A-SMase zur aktiven Form heranreift (Jenkins et al. 2011). Die S-A-SMase hingegen wird über den sekretorischen Golgi-Signalweg aus der Zelle in den extrazellulären Raum ausgeschieden. Dort wird die S-A-SMase nicht weiter gespalten und ist als 75-80 kDa großes Protein zu detektieren (Kornhuber et al. 2015).

Die Aktivierung der A-SMase wird durch eine Vielzahl Rezeptor- und nicht-Rezeptor-vermittelter Formen von zellulärem Stress ausgelöst. Dazu gehören Todesliganden (TNF, TRAIL, FasL), Zytokine, ROS, Bestrahlung, zytotoxische Reagenzien oder bakterielle Infektionen (Li et al. 2019a). Die nach der Aktivierung der A-SMase entstehenden Ceramide fungieren als *second messenger*, deren Funktion in der Zelle abhängig von ihrer subzellulären Lokalisation ist. So zum Beispiel ist die Bildung von Ceramiden in der Plasmamembran an der Wachstumsinhibierung, an durch oxidativen Stress ausgelösten Zelltod oder in den Funktionen der *lipid rafts* involviert. Im Gegensatz dazu spielen lysosomal lokalisierte Ceramide in Ceramid-vermittelten Zellstress-Antworten wie Apoptose und Zellalterung eine Rolle (Bataller et al. 2021). Insgesamt wurden für Ceramide sowie für deren Metabolite Funktionen in zahlreichen zellulären Prozessen, darunter Differenzierung, Proteintransport, Zelltod, Angiogenese, Infektionen und Inflammation nachgewiesen (Li et al. 2019a).

Die Rolle der A-SMase im regulierten Zelltod

Die Rolle der A-SMase im apoptotischen Signalweg – Nach Stimulation der Todesrezeptoren Fas, TNFR und TRAIL-Rezeptor 2 wird die A-SMase aktiviert (Carpinteiro et al. 2008). Im Fall der TNF-vermittelten Aktivierung der A-SMase erfolgt nach der Bindung von TNF an den TNFR1 dessen Clathrin-abhängige Endozytose in Vesikel, die als TNF-Rezeptosomen bezeichnet werden, und die Bildung des DISC mit aktivierter Caspase-8. Die TNF-Rezeptosomen fusionieren daraufhin mit trans-Golgi-Vesikeln, welche neben der Pro-A-SMase auch Prä-Pro-Cathepsin D beinhalten. In den entstandenen multivesikulären Organellen aktiviert die Caspase-8 die Pro-Caspase-7, welche daraufhin die A-SMase durch Spaltung aktiviert (Edelmann et al. 2011). Edelmann et al. zeigten dabei, dass die 72-kDa große Pro-A-SMase nach D253 gespalten wird, wodurch die 57 kDa große, aktive Form generiert wird. Im nächsten Schritt aktivieren die von der A-SMase erzeugten Ceramide Cathepsin D, welches daraufhin vom späten Endosom zum Zytosol transloziert. Im Zytosol selbst spaltet Cathepsin D BID und aktiviert damit den intrinsischen apoptotischen Signalweg (Heinrich et al. 2004).

Die Rolle der A-SMase im pyroptischen Signalweg – Für eine mögliche Verbindung der A-SMase mit dem Inflammasom-Signalweg (siehe Kapitel 1.4) wurde postuliert, dass zum einen die durch die aktivierte A-SMase entstandenen Ceramide direkt mit den Inflammasomen assoziieren könnten und zum anderen eine indirekte Interaktion der

Ceramide mit NLRP3 durch die Regulierung der lysosomalen Aktivierung durch Cathepsin B oder D denkbar sein könnte (Li et al. 2019b).

Die Rolle der A-SMase im nekroptotischen Signalweg - Ceramiden wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam bereits im Jahre 2005 eine Rolle im später als Nekroptose identifizierten Caspase-unabhängigen regulierten Zelltod zugesprochen. So wurde gezeigt, dass unter Konditionen, in denen Apoptose entweder nicht aktiviert oder inhibiert wurde, mittels TNF Caspase-unabhängiger RCD in TRAIL-sensitiven L929-Fibrosarkomzellen (L929Ts), NIH3T3-Fibroblasten, humanen leukämischen Jurkat-T-Zellen und Lungenfibroblasten induziert wurde, welcher mit einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Ceramid-Spiegel lange vor dem Eintreten des Zelltodes verbunden war. Dieser Zelltod konnte durch Inhibitoren der A-SMase oder durch Deletion der A-SMase verhindert werden, und eine Rekonstitution der A-SMase-defizienten-Zellen mit rekombinanter A-SMase stellte die Sensitivität dieser Zellen für den Caspase-unabhängigen RCD wieder her. Darüber hinaus wurde in Fibroblasten sowohl durch die Deletion der A-SMase, als auch durch Deletion von RIPK1 die Ceramid-Akkumulation verhindert, was die A-SMase im nekroptotischen Signalweg unterhalb von RIPK1 platziert (Thon et al. 2005). Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam verfolgte die Rolle der A-SMase in dem nekroptotischen Signalweg weiter und fand heraus, dass die Prozessierung der überexprimierten 75 kDa großen A-SMase zur 57 kDa aktiven Form nach der Induktion der Nekroptose zeitabhängig und korrespondierend zur Aktivität der A-SMase verläuft mit einem Maximum nach 30 min, sodass insgesamt die Induktion der Nekroptose zur Spaltung der A-SMase und zur Aktivierung dieser führte. Darüber hinaus konnte mit Nec-1, Arc39 (spezifischer A-SMase-Inhibitor), N-Tosyl-L-phenylalanin-chloromethylketon (irreversibler Inhibitor von Chymotrypsin, Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen und einigen Cystein-Proteasen) und Dynasore (Internalisierungsinhibitor) die Prozessierung und Aktivität der A-SMase blockiert werden. Folglich läuft die Aktivierung der A-SMase unterhalb der RIPK1-RIPK3-MLKL-Ebene ab. Der Einfluss der Caspase-7, welche in der Apoptose für die Spaltung der A-SMase verantwortlich ist, wurde anhand von Caspase-7-defizienten MEF untersucht. Diese zeigten einen verstärkten Zelltod, jedoch keine erhöhte A-SMase-Aktivität und nur eine geringfügige Spaltung, sodass der Zelltod unabhängig von der A-SMase katalysiert wird, jedoch insgesamt eine Regulation dieser durch die Caspase-7 möglich ist. Zur Ermittlung der Protease, welche die Spaltung der A-SMase katalysiert, wurde das 57 kDa große Spaltprodukt massenspektrometrisch charakterisiert. Zum einen

wurden Peptide N-terminal der Spaltstelle detektiert, die für Apoptose beschrieben war (Edelmann et al. 2011), ein Beweis dafür, dass die apoptotische Spaltstelle der A-SMase nicht identisch mit der nekroptotischen Spaltstelle ist (Voigt 2014). Weitere Deletions- und Mutagenese-Analysen der Spaltstelle grenzten diese auf eine 30 Aminosäuren große Region ein (V198 bis C227), in welcher sich mindestens zwei unabhängige Spaltstellen befinden (Fuchslocher Chico 2017).

2. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation der Proteasen Caspase-8 und der Caspase-10, HtrA2/OMI, ADAM17 und die proteolytische Spaltung der A-SMase im regulierten, Caspase-unabhängigen nekroptotischen Zelltod zu untersuchen.

Zur Analyse der Spezies-spezifischen Rolle der Caspase-8 sowie der Rolle der Caspase-10, welche im Menschen, jedoch nicht in Nagetieren vorkommt, sollten Rekonstitutionsstudien durchgeführt werden. Dazu sollten murine und humane Caspase-8- und Caspase-10-defiziente-Zellen mit der murinen und humanen Caspase-8 und mit der Caspase-10 unter der Verwendung eines induzierbaren Expressionssystems lentiviral rekonstituiert und hinsichtlich des Verlustes der Membranintegrität und nekroptotischer Marker untersucht werden. Um zu klären, ob die Protease-Aktivität der Caspasen für deren Funktion im nekroptotischen Signalweg entscheidend ist oder ob sie auch als *scaffold*-Proteine wirken können, sollten neben den Protease-aktiven Formen der Caspasen auch mutierte Caspasen ohne katalytische Aktivität in den Zellen rekonstituiert werden. Darüber hinaus sollten Caspase-8- und Caspase-10-doppelfdefiziente Zellen generiert werden.

Bezüglich der Serin-Protease HtrA2/OMI, deren Deletion einen Schutz gegenüber der Induktion der Nekroptose gezeigt hatte, galt es, den Wirkmechanismus zu untersuchen. Dabei sollten die Fragen nach der Bedeutung der katalytischen Aktivität von HtrA2/OMI sowie nach der intrazellulären Lokalisation von HtrA2/OMI während des nekroptotischen Zelltodes adressiert werden. Dazu sollten zum einen murine HtrA2/OMI-defiziente-Zellen mit der Protease-aktiven oder Protease-inaktiven Form von HtrA2/OMI stabil transfiziert und die Auswirkungen auf den Verlust der Membranintegrität und nekroptotischer Marker untersucht werden. Neben der Analyse im murinen Zellmodell sollte darüber hinaus eine Deletion der Protease in humanen Zellen generiert und untersucht werden. Ein weiteres Ziel war es, die Lokalisation von HtrA2/OMI mittels Kolokalisationsstudien der Protease und der Mitochondrien mikroskopisch zu untersuchen. Zur Identifizierung neuer intramitochondrialer Mediatoren der Protease im nekroptotischen Signalweg sollten zusätzlich nach der Induktion der Nekroptose Mitochondrien isoliert und massenspektrometrisch untersucht werden.

ADAM17^{ex/ex}-Mäuse sowie MEF von ADAM17^{ex/ex}-Mäusen wiesen in früheren Untersuchungen im Vergleich zu den parentalen Wildtyp-Mäusen einen Schutz gegenüber dem nekroptotischen Zelltod auf. Zur Analyse der Wirkweise von ADAM17 in der Nekroptose bedarf es sowohl neuer muriner als auch humaner Zellmodelle. Aufgrund dessen sollten zum einen Lungenfibroblasten aus ADAM17^{ex/ex}-Mäusen isoliert und zum anderen murine und humane ADAM17-defiziente-Zellen generiert werden.

Die A-SMase wird während des nekroptotischen Signalweges durch Spaltung aktiviert. Im apoptotischen Signalweg, welcher zur hydrolytischen Spaltung der A-SMase durch die Caspase-7 führt, wurde die Spaltstelle D253 identifiziert. Im Gegensatz dazu wurden in der Nekroptose Peptide N-terminal der apoptotischen Spaltstelle detektiert. Weitere Mutagenese- und Deletions-Analysen grenzten die nekroptotische Spaltstelle auf eine 30 Aminosäuren große Region ein, in welcher sich mindestens zwei unabhängige Spaltstellen befinden müssen. Ziel war es daher, die nekroptotische Spaltstelle der A-SMase zu identifizieren und es so zu ermöglichen, in späteren Arbeiten die Protease, welche für die Aktivierung der A-SMase im nekroptotischen Signalweg verantwortlich ist, zu identifizieren.

3. Material und Methoden

In den folgenden Abschnitten sind die Geräte und Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Reagenzien, Antikörper, Zellen und Plasmide sowie die in dieser Arbeit verwendeten Methoden beschrieben.

3.1. Material

Im Abschnitt 3.1 sind der allgemeine Laborbedarf/Laborzubehör, Analysegeräte, Chemikalien/Reagenzien, primäre/sekundäre Antikörper und die verwendeten Zellen und Plasmide tabellarisch aufgelistet.

Allgemeiner Laborbedarf und -zubehör sowie Analysegeräte

In der Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 ist eine Auflistung des verwendeten Laborbedarfs sowie der Analysegeräte mit entsprechendem Hersteller zu finden.

Tabelle 3.1: Auflistung des allgemeinen Laborbedarfs und Laborzubehörs.

	Bezeichnung	Hersteller
Aufbewahrungs- gefäße	<i>CryoPure</i> -Gefäß, 1,0 mL, weiß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	Eppendorf-Gefäße 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	<i>Falcon</i> TM konische Zentrifugenröhrchen: 15 und 50 mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
	<i>Falcon</i> [®] 5 mL Round Bottom <i>Polystyrene Test Tube</i>	Corning, Arizona, Vereinigte Staaten
	Autoradiographie -Kassetten	<i>Amersham Hypercassette</i>
Blotkammer	<i>Mini Trans-Blot Cell</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Deckgläser	Deckgläser für Mikroskopie, Durchmesser 18 mm	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk, Braunschweig, Deutschland
Elektrophorese- kammer	<i>Mini-PROTEAN Tetra Cell</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
	<i>Wide Mini-Sub Cell GT Cell</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten

	Bezeichnung	Hersteller
Nukleofektions- gerät	<i>Nucleofector II</i>	Lonza Group, Basel, Schweiz
	<i>4D-Nucleofector® X Unit</i>	Lonza Group, Basel, Schweiz
Entwickler- maschine	<i>AGFA CP1000</i>	AGFA, Düsseldorf, Deutschland
Rotator	<i>Cole-Parmer™ Stuart™</i> Rotatorscheibe	Stuart, Stone, Vereinigtes Königreich
Filterzubehör	<i>Filtropur S 0,2</i>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	<i>Miniport N79KN.18</i>	KNF Neuberger, Freiburg im Breisgau, Deutschland
	<i>Millipore Express PLUS:</i> 0,22 µm Membranfilter	Merck, Darmstadt, Deutschland
Inkubatoren	<i>HERAcell® 150i/ 240i</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
	GFL Schüttelinkubator 3033	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Kühl- und Gefrierschrank	Gefrierschrank (-20 °C) Typ GNP3376-20	Liebherr, Kirchdorf an der Iller, Deutschland
	<i>Kryotec Gefriertruhe (-80 °C)</i>	Hans-S. Schröder, Hamburg, Deutschland
	Bosch Kühlschrank Typ KGE39DL40/07	Robert Bosch, Stuttgart, Deutschland
Kulturflaschen	<i>Cryotherm BIOSAFE-Control</i> Filter Top Zellkulturflaschen: 75, 250 und 650 mL	Cryotherm, Kirchen, Deutschland Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
	Küvetten Polystyrolküvetten: 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Multiwell-Platten	Zellkulturplatte: 6-, 12-, 24- und 48-well-Platte	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Multiwell-Platten	Zellkulturplatte: 96 wells <i>Nuclon® Delta Surface Flat</i> <i>Bottom</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
	<i>Corning® 96-well Flat Clear</i> <i>Bottom Black Polystyrene</i> <i>TC-treated Microplates</i>	Corning, Arizona, Vereinigte Staaten
	Spannungsquelle <i>Power Pac 300</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Nitrozellulose- membran	<i>Amersham Protran Premium</i> 0,2 µm NC	GE Healthcare, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten
Objektträger	<i>SuperFrost</i> Objektträger: 76 x 26 mm	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk Braunschweig, Deutschland
Parafilm	Parafilm	Bemis, Neenah, Wisconsin, Vereinigte Staaten

	Bezeichnung	Hersteller
Pipetten und Pipettenzubehör	<i>Accu-jet[®] pro</i>	BRANDTECH, Essex, Connecticut, Vereinigte Staaten
	<i>Eppendorf Research[®] plus G:</i> 0,1-2,5, 0,5-10, 2-20, 10-100, 20-200 und 100-1000 µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	<i>Gel - Saver - Tip II 200 µl</i>	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
	<i>Greiner CELLSTAR[®] serological pipette:</i> 1, 5, 10, 25 und 50 mL	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
	Pipettenspitzen: 0,1-10, 10-200 und 100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	<i>Multipette[®] M4</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	<i>Ritips[®]: 1,25 und 5,0 mL</i>	Ritter, Schwabmünchen, Deutschland
	Roller	<i>Roller mixer SRT9D</i>
Röntgenfilm	<i>Amersham Hyperfilm ECL</i>	GE Healthcare, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten
Rühr- und Heizplatte	<i>RCT basic</i>	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Sterilbank	<i>Heracell LaminAir HA2472GS</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Thermoschüttler	<i>Thermomixer Compact</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wasserbad	Wasserbad Typ 1003	LAUDA-GFL, Burgwedel, Deutschland
Whatman-Papier	<i>Whatman Grade 3 Qualitative Filter Papers</i>	GE Healthcare, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten
Zählkammer	Zählkammer: <i>Neubauer improved</i>	Paul Marienfeld, Lauda- Königshofen, Deutschland
Zellschaber Zentrifugen	Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	<i>Avanti J-25 Centrifuge</i>	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
	<i>Eppendorf Centrifuge 5417R</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	<i>Heraeus Megafuge 1.0 R</i>	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 3.2: Auflistung der verwendeten Analysegeräte.

	Bezeichnung	Hersteller
Durchfluss- zytometer	<i>MACSQuant[®] X Flow Cytometer</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
	<i>FACS Calibur Flow Cytometer</i>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
	<i>BD FACSAriaTM Fusion Flow Cytometer</i>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Mikroskop	<i>Axiovert 100 Phase Contrast Microscope</i>	Zeiss, Göttingen, Deutschland
	<i>Laser Scanning Microscope 510</i>	Zeiss, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	<i>SI Analytics Labor-pH-Meter Lab 850</i>	SI Analytics, Mainz, Deutschland
Spektrophotometer	<i>Infinite M200 ELISA Microplate Reader Software: i-Control 1.3</i>	Tecan Group, Männedorf, Deutschland
	<i>NanoDrop 3300</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
	<i>SmartSpec 3000</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Waage	KERN 440-47N	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
	<i>Sartorius Analytic A120s</i>	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Chemikalien und Reagenzien

Die Tabelle 3.3 zeigt eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits inklusive Hersteller.

Tabelle 3.3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>20X LumiGLO[®] Reagent and 20X Peroxide</i>	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>4X Laemmli Sample Buffer</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
<i>5X SDS-PAGE sample loading buffer</i>	NZYTEch, Lissabon, Portugal
96 % (w/v) Ethanol, vergällt	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, Deutschland

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
<i>Accutase</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
<i>AcTEV™ Protease</i>	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
<i>Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V</i>	Lonza, Basel, Schweiz
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	GE Healthcare, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
<i>Basic Nucleofector™ Kit for Primary Mammalian Fibroblasts</i>	Lonza, Basel, Schweiz
Birinapant	ChemieTek, Indianapolis, Indiana, Vereinigte Staaten
Bovines Serumalbumin (BSA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
<i>CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay</i>	Promega, Madison, Wisconsin, Vereinigte Staaten
CHX	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Click's/RPMI 1640	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
<i>Complete protease inhibitor cocktail</i>	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Coomassie G 250 Brillantblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Dharmacon trans lentiviral packaging kits</i>	Horizon Discovery Ltd, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Doxycyclinhyclat (Dox, D)	MP Biomedicals™, Santa Ana, Kalifornien, Vereinigte Staaten
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
<i>EZview™ Red ANTI-FLAG® M2-Affinitätsgel</i>	Millipore Sigma, Darmstadt, Deutschland
<i>FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
<i>FastDigest Green Buffer (10X)</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
<i>FastDigest™ BsmBI</i>	Fermentas, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Fetales Kälberserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
frema Reform Magermilchpulver	FREMA, Herbolzheim, Deutschland
<i>GammaBind™ Plus Sepharose™</i>	GE Healthcare, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten
<i>Gel Loading Dye, Purple (6X)</i>	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GSK '872	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Sparks Glencoe, Maryland, Vereinigte Staaten
Hoechst 33342	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
McCoy's 5A Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (with Dounce Homogenizer)</i>	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
<i>MitoTracker™ Orange CMTMRos</i>	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Mounting-Lösung	Dianova, Hamburg, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumfluorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
N-Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (O-Me)-Fluoromethylketon (zVAD, z)	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Nonoxinol 40	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
<i>PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10 bis 250 kDa)</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Paraformaldehyd	Morphisto, Frankfurt am Main, Deutschland
<i>Pefabloc® SC (AEBSF)</i>	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
<i>Phire Tissue Direct PCR Master Mix</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
<i>Phusion High-Fidelity PCR-Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
<i>Pierce Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Polybren	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
Ponceau S	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
<i>Prestained Protein Ladder – Broad molecular weight (10-245 kDa)</i>	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Propidiumiodid (PI)	ImmunoChemistry Technology, Bloomington, Minnesota, Vereinigte Staaten
<i>PshAI</i>	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Vereinigte Staaten
<i>Qiaprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Rapid DNA Ligation Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
<i>RedSafeTM Nucleic Acid Staining Solution 20.000X</i>	iNtRON Biotechnology, Inc., Seongnam, Südkorea
<i>RNase A LyseBlue[®]</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>RNeasy Mini Kit (50)</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>ROTIPHORESE[®] Gel 30 (37,5:1)</i>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>ROTI[®]Block</i>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>SF Cell Line 4D-NucleofectorTM X Kit S</i>	Lonza, Basel, Schweiz
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	GE Healthcare, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten
<i>TET-system approved FBS</i>	Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan
TNF	BASF BioResearch, Ludwigshafen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (TRIS-Base und TRIS-HCL)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Tween 20	Serva, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 % (w/v)	Th. Geyer, Renningen, Deutschland
XB2d89 (X)	Genentech, San Francisco, Vereinigte Staaten
zDEVD-afc	AAT Bioquest Inc., Sunnyvale, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Zeocin	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
zIETD-afc	AAT Bioquest Inc., Sunnyvale, Kalifornien, Vereinigte Staaten

Primäre und sekundäre Antikörper

Die Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5 zeigen eine Auflistung der für die Methoden Western Blot (WB) und Immunfluoreszenz (IF) verwendeten primären und sekundären Antikörper. Darüber hinaus sind der Hersteller sowie die angewandte Verdünnung angegeben.

Tabelle 3.4: Auflistung der in Western Blot und Immunfluoreszenz verwendeten primären Antikörper.

Zielprotein	Produkt-nummer	Hersteller	Verdünnung/ Konzentration
ADAM17	Ab39162	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	WB: 1:1000
Caspase-10	Ab177475	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	WB: 1:1000
Caspase-8 (human)	9746	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich	WB: 1:1000
Caspase-8 (murin)	4927	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich	WB: 1:1000
Cleaved Caspase-3	9661	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich	WB: 1:1000
FLAG	Ab205606	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	WB: 1:1000
FLAG	035K6196	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten	WB: 1:1000
Gasdermin D	39754	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich	WB: 1:1000
HA	2999	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich	WB: 1:1000
HtrA2/OMI	AF1458	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, Vereinigte Staaten	WB: 0,25 µg mL ⁻¹
HtrA2/OMI	sc-271528	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	WB: 1:1000
MLKL	Orb32399	Biorbyt, Cambridge, Vereinigtes Königreich	WB: 1:1000
PARP-1	9542	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich	WB: 1:2000
pMLKL	Ab196436	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	WB: 1:1000
pRIPK3	Ab222320	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	WB: 1:1000
RIPK3	PRS2283	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten	WB: 1:1000
Stathmin1	Ab52630	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	WB: 1:1000

Zielprotein	Produkt-nummer	Hersteller	Verdünnung/ Konzentration
V5	R960-25	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten	WB: 1:1000
β -Aktin	A1978	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten	WB: 1:10000

Tabelle 3.5: Auflistung der in Western Blot und Immunfluoreszenz verwendeten sekundären Antikörper.

Sekundärer Antikörper	Produkt-nummer	Hersteller	Verdünnung
<i>Goat Anti-Mouse light chain Antibody, HRP conjugate</i>	AP200P	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	WB: 1:10000
<i>Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488</i>	A-11008	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten	IF: 1:200
<i>Mouse TrueBlot[®] ULTRA</i>	18-8817-33	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland	WB: 1:1000
<i>Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)</i>	115-035-146	Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, Vereinigte Staaten	WB: 1:10000
<i>Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)</i>	111-035-144	Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, Vereinigte Staaten	WB: 1:10000

Zellen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen und Plasmide sind in der Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7 dargestellt. Sowohl die murinen TRAIL-sensitiven Fibrosarkom-L929Ts-Zellen als auch MEF gehören zu den in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam für die Untersuchung des nekroptotischen Signalweges etablierten Zellen (Voigt 2014; Saggau 2018). Zur Erforschung der Rolle der Proteolyse in der Nekroptose wurden als humane Zellen zusätzlich Dickdarmkrebs-HT-29-Zellen analysiert.

Tabelle 3.6: Auflistung der verwendeten Zellen inklusive Merkmale und Herkunft.

Verwendete Zellen	Merkmale und Herkunft
L929Ts	TRAIL-sensitive murine Fibrosarkom-Zellen, hergestellt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam und beschrieben in Thon et al. 2006
L929Ts pEF6.V5/His.aSMase ^{wt}	L929Ts-Zellen, welche die mit einem V5-Tag versehene A-SMase stabil exprimieren, hergestellt in Voigt 2014
L929Ts pEF6.V5/His.aSMase ^{wt} -FLAG-TEV	L929Ts-Zellen, welche die mit einem V5- und FLAG-Tag sowie einer Spaltstelle für die TEV-Protease versehene A-SMase stabil exprimieren, hergestellt in dieser Arbeit
L929Ts ASM ^{-/-} δ3	A-SMase-defiziente L929Ts-Zellen, hergestellt in Fuchslocher Chico 2017
L929Ts ASM ^{-/-} δ2	A-SMase-defiziente L929Ts-Zellen, hergestellt in Fuchslocher Chico 2017
L929Ts A-SMase ^{-/-} δ3 pEF6.V5/His.aSMase ^{P221-R230randomisiert}	A-SMase-defiziente L929Ts-Zellen, welche die mit einem V5-Tag versehene A-SMase _{P221-R230randomisiert} stabil exprimieren, hergestellt in dieser Arbeit
L929Ts A-SMase ^{-/-} δ2 pEF6.V5/His.aSMase ^{D220-L259deletiert}	A-SMase-defiziente L929Ts-Zellen, welche die mit einem V5-Tag versehene A-SMase _{D220-L259deletiert} stabil exprimieren, hergestellt in dieser Arbeit
L929Ts/C8/B3	Caspase-8-defiziente L929Ts-Zellen, hergestellt in Saggau 2018
L929Ts HtrA2/OMI ^{-/-}	HtrA2/OMI-defiziente L929Ts-Zellen, hergestellt in Fuchslocher Chico 2017
L929Ts HtrA2/OMI ^{-/-} , rekonstituiert mit HtrA2/OMI	HtrA2/OMI-defiziente L929Ts-Zellen, rekonstituiert mit der Protease-aktiven Form von HtrA2/OMI, hergestellt in Fuchslocher Chico 2017
MEF	Embryonale-Mausfibroblasten, beschrieben in Martins et al. 2004 und zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Thomas Langer, Köln, Deutschland
MEF HtrA2/OMI ^{-/-}	HtrA2/OMI-defiziente MEF, beschrieben in Martins et al. 2004 und zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Thomas Langer, Köln, Deutschland
ADAM17 ^{-/-} -MEF	ADAM17-defiziente MEF, hergestellt in dieser Arbeit

HT-29	Humane Dickdarmkrebs-Zellen, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Holger Kalthoff, Kiel, Deutschland
HT-29/C8/F11	Caspase-8-defiziente HT-29-Zellen, hergestellt in Saggau 2018
HT-29/C10/G14	Caspase-10-defiziente HT-29-Zellen, hergestellt in Saggau 2018
HT-29/C8/C10	Caspase-8 und Caspase-10-doppeldefiziente HT-29-Zellen, hergestellt in dieser Arbeit
HT-29 HtrA2/OMI ^{-/-}	HtrA2/OMI-defiziente HT-29-Zellen, hergestellt in dieser Arbeit
HT-29 ADAM17 ^{-/-}	ADAM17-defiziente HT-29-Zellen, hergestellt in dieser Arbeit
ADAM17 ^{ex/ex} und ADAM17 ^{ex/ex} /RIPK3 ^{-/-} Lungenfibroblasten	Isolierte Lungenfibroblasten aus ADAM17 ^{ex/ex} und ADAM17 ^{ex/ex} /RIPK3 ^{-/-} -Mäusen, hergestellt in dieser Arbeit
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen, deren Genom das große T-Antigen des Simian-Virus 40 enthält, erhalten von der <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC, Manassas, Virginia, Vereinigte Staaten).

Tabelle 3.7: Auflistung der verwendeten Plasmide inklusive Merkmale und Herkunft.

Bezeichnung	Gen	Vektor	Merkmale und Herkunft/Hersteller
pBMGneo	/	pBMGneo	Enthält G418-Resistenz, beschrieben in Karasuyama et al. 1988
pcDNA3.1/ Zeo	/	pcDNA3.1/Zeo	Enthält Zeocin-Resistenz, hergestellt von Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
pTRIPZ-N-HA	/	pTRIPZ-N-HA	Induzierbarer Expressionsvektor mit Dox, erhalten von Francis Chan, Worcester, Massachusetts, Vereinigte Staaten
pTRIPZ-N-HA_ hC8wt	<i>Humane Wildtyp-Caspase-8</i>	pTRIPZ-N-HA	Erworben von Geneart, Regensburg, Deutschland
pTRIPZ-N-HA_ hC8mut	<i>Humane mutierte Caspase-8</i>	pTRIPZ-N-HA	Protease-inaktive Form der humanen Caspase-8 (C419S), erworben von Geneart, Regensburg, Deutschland
pTRIPZ-N-HA_ mC8wt	<i>Murine Wildtyp-Caspase-8</i>	pTRIPZ-N-HA	Erworben von Geneart, Regensburg, Deutschland

Bezeichnung	Gen	Vektor	Merkmale und Herkunft/Hersteller
pTRIPZ-N-HA_mC8mut	<i>Murine mutierte Caspase-8</i>	pTRIPZ-N-HA	Protease-inaktive Form der murinen Caspase-8 (C362S), erworben von Geneart, Regensburg, Deutschland
pTRIPZ-N-HA_C10wt	<i>Wildtyp-Caspase-10</i>	pTRIPZ-N-HA	Erworben von Geneart, Regensburg, Deutschland
pTRIPZ-N-HA_C10mut	<i>Mutierte Caspase-10</i>	pTRIPZ-N-HA	Protease-inaktive Form der Caspase-10 (C401S), erworben von Geneart, Regensburg, Deutschland
pcDNA3.1_HtrA2/OMI	<i>HtrA2/OMI</i>	pcDNA3.1	Zur Verfügung gestellt von Edward Mocarski, Atlanta, Georgia, Vereinigte Staaten
pcDNA3.1_HtrA2/OMI-S306A	<i>HtrA2/OMI-S306A</i>	pcDNA3.1	S306A-HtrA2/OMI-Mutante ohne katalytische Aktivität, zur Verfügung gestellt von Edward Mocarski, Atlanta, Georgia, Vereinigte Staaten
pEF6.V5/His.aSMase ^{wt}	<i>SMPD1</i>	pEF6/V5-His-TOPO [®]	A-SMase, versehen mit einem V5- und His-Tag, erhalten von Yusuf A. Hannun, Charleston South Carolina, Vereinigte Staaten
pEF6.V5/His.aSMase ^{P221-R230randomisiert}	<i>SMPD1</i> ^{P221-R230randomisiert}	pEF6/V5-His-TOPO	A-SMase, deren Aminosäure-Sequenz im Abschnitt P221-R230 randomisiert wurde (PDCADPLCCR→ACCPLCPDDR), hergestellt in Fuchslocher Chico 2017
pEF6.V5/His.aSMase ^{D220-L259deletiert}	<i>SMPD1</i> ^{D220-L259deletiert}	pEF6/V5-His-TOPO	A-SMase, deren Aminosäure-Sequenz im Abschnitt D220-L259 deletiert wurde, hergestellt in Fuchslocher Chico 2017
19ACVQXC_SMPD1_FLAG_TEV_pMK_RQ	<i>SMPD1_FLAG_TEV</i>	pMK	Subregion der A-SMase, versehen mit einem FLAG-Tag und der Spaltsequenz der TEV-Protease, erworben von Geneart, Regensburg, Deutschland
pEF6.V5/His.aSMase ^{wt} -FLAG-TEV	<i>SMPD1_FLAG_TEV</i>	pEF6/V5-His-TOPO [®]	A-SMase, versehen mit einem FLAG-Tag und der Spaltsequenz der TEV-Protease, umkloniert in den pEF6/V5-His-Vektor, hergestellt in dieser Arbeit

3.2. Methoden

In den folgenden Kapiteln sind die in dieser Arbeit angewandten Methoden beschrieben.

Zellkultivierung

Die Kultivierung der adhärennten L929Ts- und HT-29-Zellen sowie der MEF erfolgte stets bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ unter der Verwendung folgender Medien: Click's/RPMI 1640 ((50:50) % (v/v)), supplementiert mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FBS, 50 µg mL⁻¹ Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 50 µM β-Mercaptoethanol (L929Ts-Zellen), DMEM, supplementiert mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FBS, 50 µg mL⁻¹ Penicillin/Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol (MEF und HEK-Zellen) und McCoy's 5A, supplementiert mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FBS, 50 µg mL⁻¹ Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat (HT-29-Zellen). Die Zellen wurden routinemäßig circa alle vier Tage, nachdem sie eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten, passagiert. Dafür wurde das Medium abgenommen und mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen durch die Zugabe von Trypsin-EDTA (0,5 % (v/v) Trypsin und 0,2 % (v/v) EDTA in PBS) und Inkubation bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ für wenige Minuten. Im nächsten Schritt wurde im Fall der L929Ts-Zellen und MEF 1/50 der Zellen und im Fall der HT-29- und HEK-Zellen 1/10 der Zellsuspension in eine neue Flasche gegeben und mit frischem Medium versetzt.

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden diese abgelöst, in Medium aufgenommen und für 10 min bei 561 rcf zentrifugiert. Nach Abnahme des Mediums wurde das Zellpellet in Einfriermedium (hitzeinaktiviertes FBS plus 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert, in Kryogefäße überführt und anschließend über Nacht bei -80 °C eingefroren. Eine längerfristige Lagerung erfolgte anschließend bei -145 °C. Zur Inkulturnahme der Kryokultur wurde diese für 2 min bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in 4 mL vorgewärmtes Medium gegeben. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 561 rcf wurde das Medium verworfen und das Pellet anschließend unter der Verwendung von frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

Zellzählung und Zellaussaat

Zum Erhalten vergleichbarer Ergebnisse war die Aussaat einer definierten Zellzahl nötig. So wurden für die Analyse von Zellen via Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) 10^5 Zellen und zur Herstellung von Protein-Zelllysaten $5 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät. Dazu wurden die Zellen im ersten Schritt wie bereits in Kapitel „Zellkultivierung“ beschrieben abgelöst und in Medium gesammelt. Zum Zählen der Zellen mittels einer Zählkammer nach Neubauer wurden $10 \mu\text{L}$ der Zellsuspension mit $10 \mu\text{L}$ 0,2 % (v/v) Eosin (in Milli-Q-Wasser) gemischt und anschließend in die Zellkammer nach Herstellerangaben gegeben und gezählt. Im letzten Schritt wurde die errechnete Zellsuspensionsmenge im Fall der 10^5 Zellen in eine 12-well-Platte und im Fall der $5 \cdot 10^5$ Zellen in eine 6-well-Platte pipettiert und entsprechend auf $500 \mu\text{L}$ oder $1000 \mu\text{L}$ mit frischem Medium aufgefüllt und über Nacht bei 37°C und 5 % (v/v) CO_2 inkubiert.

Induktion des nekroptotischen und/oder apoptotischen Signalweges

Zur Induktion des nekroptotischen und/oder apoptotischen Signalweges in L929Ts- und HT-29-Zellen und MEF wurde nach der Zellaussaat im ersten Schritt ein Mediumwechsel durchgeführt, gefolgt von einer Koprästimulation mit dem Pan-Caspase-Inhibitor zVAD ($20 \mu\text{M}$) und dem Translationsinhibitor CHX ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$ für L929Ts-, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ für MEF und 5 oder $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ für HT-29-Zellen) für 30 min. In einigen Versuchen wurde darüber hinaus gleichzeitig mit $1 \mu\text{M}$ BP (SMAC-Mimetikum), $10 \mu\text{M}$ GSK '872 (RIPK3-Inhibitor) oder $1 \mu\text{M}$ XB2d89 (XIAP-Inhibitor) koprästimuliert. Zuletzt erfolgte die Induktion des Zelltodes mittels 100 ng mL^{-1} TNF für 2, 5, (L929Ts-Zellen), 16 (MEF) oder 24 (HT-29-Zellen) Stunden. Die Analyse des Zelltodes erfolgte zum einen durch Messung des Verlustes der Membranintegrität mittels Durchflusszytometrie und zum anderen mittels des Nachweises von apoptotischen und/oder nekroptotischen Markern via Western Blot.

Durchflusszytometrie

Für die Messung des Verlustes der Membranintegrität unter der Verwendung der Durchflusszytometrie wurden 10^5 Zellen ausgesät und am nächsten Tag entsprechend dem Kapitel „Induktion des nekroptotischen und/oder apoptotischen Signalweges“ stimuliert. Anschließend wurde das Medium sowie der Waschschrift mit 1 mL PBS auf Eis in einem Falcon® 5 mL Round Bottom Polystyrene Test Tube gesammelt. Nach der Ablösung der Zellen mit $0,5 \text{ mL}$ Accutase bei 37°C , wurden diese, wie auch der letzte Waschschrift mit

1 mL PBS, ebenfalls im selben *Falcon*-Gefäß gesammelt. Nach der Zentrifugation bei 389 rcf für 5 min bei 4 °C wurde das Medium verworfen. Zur Messung des Verlustes der Membranintegrität wurden die Zellen mit 2 µg mL⁻¹ PI, welches lediglich durch nicht-intakte Plasmamembranen ins Zellinnere eindringen kann, in einem Gesamtvolumen von 200 µL PBS-EDTA (PBS mit 5 mM EDTA) gefärbt. Die Messung der PI-positiven Zellen erfolgte mit Hilfe zweier Durchflusszytometer – dem *BD FACSCalibur* und dem *MACSQuant X*. Im Fall des *FACSCalibur* wurden drei Messungen á 10.000 Zellen vorgenommen. Im Gegensatz dazu wurden beim *MACSQuant X* 10.000 Zellen aus dem stabilen Einspritzprofil zur Analyse herangezogen. Die Analyse der *BD FACSCalibur*-Daten erfolgte mittels der Software *BD CellQuest Pro V. 4.0.2*, wohingegen für die Daten des *MACSQuant X*-Durchflusszytometers die Software *FlowJo_v10.6.0* herangezogen wurde. Bei der Auswertung des Verlustes der Membranintegrität wurde zunächst das Zellebris ausgeschlossen und anschließend erfolgte eine Trennung der PI-positiven- (toten) und PI-negativen- (lebendigen) Zellen.

Herstellung von Protein-Zelllysaten

Zur Herstellung von Protein-Zelllysaten wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät und entsprechend dem Kapitel „Induktion des nekroptotischen und/oder apoptotischen Signalweges“ stimuliert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und auf Eis in einem 15 mL *Falcon*-Gefäß gesammelt, ebenso wie die Flüssigkeiten aller noch folgenden Schritte. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (0,5 % (v/v) Trypsin und 0,2 % (v/v) EDTA in PBS) bei 37 °C abgelöst. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS wurden das *Falcon*-Gefäß mit dem gesammelten Medium, der Zellsuspension und den Waschschriften für 10 min bei 2151 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 mL kaltem PBS gewaschen und in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Gefäß gegeben. Nach erneuter Zentrifugation bei 2151 rcf und 4 °C für 10 min, wurde das Pellet in 20 - 50 µL Lysepuffer (Tabelle 3.8), abhängig von der Pellet-Größe, resuspendiert. Nach 20-minütigem Stehenlassen der resuspendierten Zellen auf Eis wurden diese für 20 min bei 15294 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, in welchem sich die löslichen Proteine befinden, wurde in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Gefäß pipettiert und das Pellet wurde verworfen.

Tabelle 3.8: Zusammenfassung des Lysepuffers, bestehend aus TNE-Puffer, supplementiert mit für das nachzuweisende Protein spezifischen Inhibitoren oder Chelatoren.

Chemikalie	Konzentration
TRIS-HCl, pH = 8	50 mM
Nonoxinol 40	1 % (v/v)
NaCl	150 mM
EDTA	3 mM
<i>cOmplete protease inhibitor cocktail</i>	25X Stock
Zusätze zur Detektion phosphorylierter Proteine	
Natriumorthovanadat	1 mM
Natriumfluorid	5 mM
Zusatz zur Detektion von ADAM17	
1,10-Phenanthrolin	10 mM

Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mittels des *Pierce Coomassie (Bradford) Protein Assay Kits* nach Herstellerangaben unter Verwendung des *SmartSpec 3000* Spektrophotometers und einer Wellenlänge von 595 nm.

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine ihrer Größe nach erfolgte mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)-Methode unter der Verwendung eines diskontinuierlichen Gels. Die Zusammensetzungen des Trenn- und Sammelgels sind in der folgenden Tabelle 3.9 zusammengefasst. Nach dem Auspolymerisieren der Gele wurden diese nach Herstellerangaben in eine *Mini-PROTEAN Tetra Cell*-Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer wurde mit Elektrophoresepuffer (3 g L^{-1} TRIS-HCl, $14,4 \text{ g L}^{-1}$ Glycin und 1 g L^{-1} SDS) befüllt. In die Taschen des Sammelgels wurden $20 \mu\text{g}$ des Protein-Zelllysats geladen. Dafür wurde zunächst die entsprechende Menge an Protein-Zelllysat mit Milli-Q-Wasser auf $20 \mu\text{L}$ aufgefüllt und anschließend mit 5X SDS-PAGE Ladepuffer (10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 250 mM TRIS-HCl (pH = 6,8), 0,5 % (w/v) Bromphenolblau und 25 % (w/v) Mercaptoethanol) versetzt. Im letzten Schritt zur Denaturierung der Proteine und zur Anlagerung des SDS, wurde die Probe für 5 min bei $98 \text{ }^\circ\text{C}$ aufgeköcht und beladen. Die Proteinauftrennung erfolgte schließlich bei 25 mA pro Gel bis zum Hinauslaufen der Lauffront. Als Größenreferenz dienten folgende Marker: *PageRuler Plus Prestained Protein*

Ladder (10-250 kDa) und *Prestained Protein Ladder – Broad molecular weight (10-245 kDa)*.

Tabelle 3.9: SDS-PAGE: Zusammensetzung eines 5 %igen Sammel- und 10 oder 15 %igen Trenngels.

Chemikalie	Sammelgel	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %	Menge in
Milli-Q-Wasser	1,0	/	/	mL
0,5 M TRIS-HCl pH = 6,8	0,4	/	/	mL
20 % (w/v) Glycerin	/	2,4	2,1	mL
1,5 M TRIS-HCl pH = 8,8	/	1,3	1,3	mL
10 % (w/v) SDS	16,7	58,0	58,0	μL
ROTIPHORESE® Gel 30 (37,5:1)	208,0	1270,0	1600,0	μL
TEMED	1,7	5,0	5,0	μL
10 % (w/v) APS	16,7	25,0	25,0	μL

Western Blot

Nachdem die Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt worden waren, erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran zur anschließenden Detektion des gewünschten Proteins mittels Antikörpern. Dazu wurde sowohl das SDS-PAGE-Gel als auch die Nitrozellulosemembran nach Herstellerangaben in eine *MiniTrans-Blot Cell*-Blotkammer überführt, welche mit Transferpuffer (3 g L⁻¹ TRIS-HCl, 14,4 g L⁻¹ Glycin und 20 % (v/v) Methanol), einem Kühlakku und einem Rührfisch ausgestattet war. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine vom SDS-PAGE-Gel auf die Nitrozellulosemembran unter Rühren für 65 min und 100 V konstanter Spannung. Zum Blockieren unspezifischer Bindestellen wurde die Membran in Magermilch (5 % (w/v) Magermilchpulver angesetzt in PBST (PBS, versetzt mit 0,1 % (v/v) Tween 20)) oder im Fall des Nachweises von phosphorylierten Proteinen in 1X Roti®-Block-Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem *roller mixer SRT9D* bei 40 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C und bei 25 rpm in den primären Antikörper gelegt, welcher ebenfalls in Magermilch/1X Roti®-Block-Lösung entsprechend den Verdünnungen in der Tabelle 3.4 angesetzt wurde. Am Folgetag wurde dreimal für 10 min mit PBST gewaschen (40 rpm und Raumtemperatur) und anschließend wurde die Membran für 1 Stunde mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundäantikörper (Tabelle 3.5), welcher ebenfalls in Magermilch/1X Roti®-Block-Lösung angesetzt wurde, bei

Raumtemperatur auf dem Rollmischer (40 rpm) inkubiert. Im letzten Schritt wurde erneut dreimal mit PBST gewaschen. Als Chemilumineszenz-Substrat für die Peroxidase wurden sowohl *LumiGLO* als auch *Clarity Western ECL Substrate* verwendet, welche nach Herstellerangaben angewendet wurden. Im Anschluss daran wurde die benetzte Membran in einer Autoradiographiekassette im Dunkeln mit einem Röntgenfilm belegt und abhängig von der Intensität der Chemilumineszenz-Reaktion unterschiedlich lang aufgelegt. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte mit Hilfe der Entwicklermaschine *AGFA CP1000*. Zur Inaktivierung der Peroxidase nach erfolgreichem Nachweis des gewünschten Proteins wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einer Wasserstoffperoxid-Lösung (15 % (v/v)) behandelt (bei 40 rpm auf dem Rollmischer) und anschließend wie bereits beschrieben dreimal mit PBST gewaschen. Im letzten Schritt erfolgte die erneute Inkubation mit einem neuen Antikörper, welcher gegen das nächste nachzuweisende Protein gerichtet ist, und die Prozedur wurde wiederholt. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin.

Stabile Transfektion von Zellen

Für die Durchführung der stabilen Transfektionen in dieser Arbeit wurde die *Amaxa Nucleofector*[®]-Technologie angewendet. Die Transfektionen von L929Ts-Zellen erfolgten dabei mit Hilfe des *Amaxa*[®] *Cell Line Nucleofector*[®] *Kit V* und die der MEF mittels des *Amaxa Basic Nucleofector*[™] *Kit for Primary Mammalian Fibroblasts* nach Angaben des Herstellers. Im ersten Schritt wurden die Zellen geerntet und gezählt. Im Anschluss daran wurden sowohl für L929Ts-Zellen als auch für MEF $2 \cdot 10^6$ Zellen herunterzentrifugiert (561 rcf für 10 min) und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 100 μ L *Nucleofector*[™] *Solution V* (supplementiert) oder in *Nucleofector*[™] *Solution for Primary Mammalian Fibroblasts* (supplementiert) resuspendiert. In die vorgewärmte Küvette wurden zum einen 20 μ g des Gen-Plasmids (GP), welches das gewünschte Protein exprimiert, und zum anderen 2 oder 10 μ g eines Selektions-Plasmids (SEP) (Tabelle 3.10), welches eine Resistenz zur Selektion enthält, vorgelegt, gefolgt von der Zellsuspension. Für die anschließende Transfektion wurde im Fall der L929Ts-Zellen das Programm T-020 und für MEF das Programm A-023 des *Nucleofector*[™] *2b Device* verwendet. Nach der Transfektion wurden die Zellen in 6 mL vorgewärmtes Medium überführt, auf drei *wells* einer 6-*well*-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ inkubiert. Am zweiten Tag der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die entsprechenden Antibiotika zur Selektion der transfizierten Zellen hinzugegeben. Am dritten Tag wurde das

Medium entfernt, die Zellen mit 1 mL PBS gewaschen und durch die Zugabe von 0,5 mL *Accutase* abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden daraufhin auf drei 145 x 20 mm große Petrischalen vereinzelt und das Antibiotikum wurde ebenfalls erneut hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ bis sich resistente Einzelkolonien gebildet hatten. Die Einzelkolonien wurden folgendermaßen gepickt: Das Medium wurde abgenommen, gefolgt von einem Waschschrift mit PBS. Danach wurden die Einzelkolonien unter Zuhilfenahme einer sterilen Pinzette und sterilem *Whatman*-Papier, welches in Trypsin-EDTA getaucht worden war, von der Petrischale abgenommen. Das *Whatman*-Papier wurde in ein *well* einer 6-*well*-Platte, in welches 2 mL Medium inklusive Antibiotikum vorgelegt wurde, überführt und bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ kultiviert. Nach Anwachsen und Vermehrung der überführten Einzelkolonie, wurde diese mittels Western Blot auf eine erfolgreiche Transfektion hin analysiert. Eine Liste der in dieser Arbeit mittels stabiler Transfektion hergestellten Zellen, sowie die verwendeten Antibiotika-Konzentrationen, sind in der Tabelle 3.10 zu finden.

Tabelle 3.10: Auflistung der in dieser Arbeit mittels stabiler Transfektion hergestellten Zellen. GP: Gen-Plasmid und SEP: Selektions-Plasmid.

Zellen	GP und GP-Konzentration in µg	SEP und SEP-Konzentration in µg	Amaxa-KIT/ Programm	Antibiotika/Konzentration	
L929Ts HtrA2/OMI ^{-/-}	pcDNA3.1_ HtrA2/OMI	20 20	pcDNA3.1/ Zeo	2 2	V/T-020 Zeocin/ 250 µg mL ⁻¹
L929Ts HtrA2/OMI ^{-/-}	pcDNA3.1_ HtrA2/OMI- S306A	20 20	pcDNA3.1/ Zeo	2 2	V/T-020 Zeocin/ 250 µg mL ⁻¹
MEF HtrA2/OMI ^{-/-}	pcDNA3.1_ HtrA2/OMI	20 20	pcDNA3.1/ Zeo	2 2	Primary fibroblast/ A-023 Zeocin/ 250 µg mL ⁻¹
MEF HtrA2/OMI ^{-/-}	pcDNA3.1_ HtrA2/OMI- S306A	20 20	pcDNA3.1/ Zeo	2 2	Primary fibroblast/ A-023 Zeocin/ 250 µg mL ⁻¹
L929Ts	pEF6.V5/His/ SMPD1_ FLAG_TEV	20	pBMGneo	2	V/T-020 G418/ 1 mg mL ⁻¹
L929Ts ASM ^{-/-} δ3	pEF6.V5/His. aSMase ^{P221-} R230randomisiert	20	pBMGneo	10	V/T-020 G418/ 1 mg mL ⁻¹
L929Ts ASM ^{-/-} δ2	pEF6.V5/His. aSMase ^{D220-} L259deletiert	20	pBMGneo	1	V/T-020 G418/ 0,9 mg mL ⁻¹

Lentivirale Transduktion von Zellen

Im ersten Schritt der lentiviralen Transduktion wurden die lentiviralen Partikel in HEK293T-Zellen unter der Verwendung des *Dharmacon™ Trans-Lentiviral packaging kit* nach Angaben des Herstellers produziert. Dazu wurden zunächst $1,2 \cdot 10^6$ HEK293T-Zellen ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ inkubiert. Während der lentiviralen Transduktion wurde durchgehend *Tet System Approved FBS* anstelle des FBS für die Herstellung der Medien verwendet. Für die Transduktion der HEK293T-Zellen mit dem *Dharmacon Trans-Lentiviral Packaging Mix* und der entsprechenden Plasmid-DNA wurden 6 µg Plasmid-DNA und 4,3 µL *Dharmacon Trans-Lentiviral Packaging Mix* mit sterilem Milli-Q-Wasser auf 135 µL aufgefüllt. Anschließend wurden 15 µL CaCl₂ hinzugegeben und gevortext. Während des Vortexens wurde tropfenweise 150 µL 2X HBSS hinzu pipettiert. Nach einer dreiminütigen Inkubation wurde die Lösung kreis- und tropfenförmig auf die HEK293T-Zellen, welchen zuvor 2 mL frisches Medium gegeben wurde, pipettiert. Nach 16-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ wurde das Medium durch *reduced serum medium* (DMEM, supplementiert mit 5 % (v/v) *Tet System Approved FBS*, 50 µg mL⁻¹ Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin) ersetzt und die Zellen für weitere 48 Stunden bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ kultiviert. Im letzten Schritt der Herstellung der lentiviralen Partikel wurde das Medium abgenommen und bei 561 rcf für 10 min zentrifugiert, gefolgt von einer Filtration des Überstandes mit Sterilfiltern (0,2 µm Porengröße) und Lagerung bei -80 °C.

Im nächsten Schritt wurden die hergestellten lentiviralen Partikel zu den entsprechenden Zellen pipettiert. Dazu wurden zunächst $5 \cdot 10^5$ Zellen in einer 25 cm²-großen Zellkulturflasche ausgesät und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium entfernt und der virushaltige Überstand wurde nach dem Auftauen mit 5 µg mL⁻¹ Polybren supplementiert und auf die Zellen gegeben. Nach dreistündiger Inkubation (37 °C und 5 % (v/v) CO₂) erfolgte die Zugabe von 2 mL frischem Medium und eine weitere Inkubation für 24 Stunden. Am dritten Tag wurde das Medium abgenommen, mit PBS gewaschen und die Zellen wurden in frischem Medium für weitere 24 Stunden inkubiert. Zuletzt erfolgte die Zugabe des Antibiotikums Puromycin. Nach mehrwöchiger Kultivierung der Zellen wurden diese hinsichtlich erfolgreicher Transduktion mittels Western Blot untersucht. In der Tabelle 3.11 sind die in dieser Arbeit mittels lentiviraler Transduktion hergestellten Zellen inklusive der zur Selektion eingesetzten Antibiotika-Konzentrationen aufgelistet.

Tabelle 3.11: Auflistung der in dieser Arbeit via lentiviraler Transduktion hergestellten Zellen. GP: Gen-Plasmid.

Zellen	GP	Puromycin-Konzentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$
L929Ts/C8/B3	pTRIPZ-N-HA	10,0
L929Ts/C8/B3	pTRIPZ-N-HA_hC8wt	10,0
L929Ts/C8/B3	pTRIPZ-N-HA_hC8mut	10,0
L929Ts/C8/B3	pTRIPZ-N-HA_mC8wt	10,0
L929Ts/C8/B3	pTRIPZ-N-HA_mC8mut	10,0
L929Ts/C8/B3	pTRIPZ-N-HA_C10wt	10,0
L929Ts/C8/B3	pTRIPZ-N-HA_C10mut	10,0
HT-29/C8/F11	pTRIPZ-N-HA	0,8
HT-29/C8/F11	pTRIPZ-N-HA_hC8wt	0,8
HT-29/C8/F11	pTRIPZ-N-HA_hC8mut	0,8
HT-29/C8/F11	pTRIPZ-N-HA_mC8wt	0,8
HT-29/C8/F11	pTRIPZ-N-HA_mC8mut	0,8
HT-29/C8/F11	pTRIPZ-N-HA_C10wt	0,8
HT-29/C8/F11	pTRIPZ-N-HA_C10mut	0,8
HT-29/C10/G14	pTRIPZ-N-HA	0,9
HT-29/C10/G14	pTRIPZ-N-HA_hC8wt	0,9
HT-29/C10/G14	pTRIPZ-N-HA_hC8mut	0,9
HT-29/C10/G14	pTRIPZ-N-HA_mC8wt	0,9
HT-29/C10/G14	pTRIPZ-N-HA_mC8mut	0,9
HT-29/C10/G14	pTRIPZ-N-HA_C10wt	0,9
HT-29/C10/G14	pTRIPZ-N-HA_C10mut	0,9

Caspase-Aktivitätsassay

Zur Analyse der Caspase-Aktivität wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät und gemäß Kapitel „Induktion des nekroptotischen und/oder apoptotischen Signalweges“ stimuliert. Bei der anschließenden Herstellung der Zelllysate wurden die Zellen in Co-IP-Lysepuffer (Tabelle 3.12) lysiert. Dieser enthält lediglich einen Inhibitor für Serin-, jedoch nicht für Cystein-Proteasen. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei -80°C . Die Durchführung des Aktivitätsassays erfolgte stets auf Eis. Dazu wurden zunächst $20 \mu\text{g}$ des Protein-Zelllysats mit Caspase-Puffer (Tabelle 3.13) auf $20 \mu\text{L}$ aufgefüllt und in eine *Corning® 96-well Flat Clear Bottom Black*-Mikrotiterplatte überführt. Zu den Lysaten wurde das Substrat der Caspase-8 (zIETD-afc) oder Caspase-3 (zDEVD-afc) in einer Konzentration von 10 mM in $100 \mu\text{L}$ Caspase-Puffer gegeben. Die Spaltung der Substrate wurde für 75 Zyklen in einem Intervall von zwei min bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm unter der Verwendung des *Infinite M200 ELISA Microplate Readers* bei 37°C gemessen.

Tabelle 3.12: Caspase-Aktivitätsassay: Zusammensetzung des Co-IP-Lysepuffers.

Chemikalie	Konzentration
HEPES	10 mM
Kalziumchlorid	142 mM
Magnesiumchlorid	5 mM
EDTA	1 mM
Nonoxinol 40	0,2 % (v/v)

Eingestellt auf einen pH-Wert von 7,4
Vor der Benutzung supplementiert mit 1 mM DTT
und 2 mM *Pefabloc*[®] SC (AEBSF)

Tabelle 3.13: Caspase-Aktivitätsassay: Zusammensetzung des Caspase-Puffers.

Chemikalie	Konzentration
PIPES	20 mM
NaCl	100 mM
DTT	10 mM
EDTA	1 mM
CHAPS	0,1 % (w/v)
Saccharose	10 % (w/v)

Eingestellt auf einen pH-Wert von 7,2
Vor der Benutzung supplementiert mit 10 mM DTT

Messung der intrazellulären ATP-Spiegel

Die Messung der ATP-Konzentration, welche einen Marker für die Zellebensfähigkeit darstellt, erfolgte mit Hilfe des *CellTiter-Glo*[®] *Luminescent Cell Viability Assay* nach Angaben des Herstellers.

Mitochondrienisolierung

Zur Identifizierung neuer intramitochondrialer Mediatoren von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg wurden die Mitochondrien von nekroptotischen MEF und HtrA2/OMI^{-/-}-MEF isoliert. Dazu wurden zunächst 3·10⁶ MEF und HtrA2/OMI^{-/-}-MEF auf je zwei 650 mL Zellkulturflaschen ausgesät und für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ kultiviert. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen für 30 min mit 1 µg mL⁻¹ CHX und 20 µM zVAD prästimuliert und anschließend mit 100 ng mL⁻¹ TNF für 4 Stunden stimuliert. Nach der vierstündigen Induktion der Nekroptose wurde das Medium verworfen und die Zellen wurden nach einem Waschschrift mit PBS mit *Accutase* abgelöst.

Anschließend wurden die Zellsuspensionen zweier Flaschen gepoolt, gefolgt von einer Zentrifugation bei 179 rcf für 5 min. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Isolierung der Mitochondrien aus den Pellets unter Verwendung des *Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (with Dounce Homogenizer)*-Kits nach Herstellerangaben. Die Lagerung der mitochondrialen Fraktion erfolgte bei -80 °C. Die Aufarbeitung/Reinigung der Proben sowie die massenspektrometrische Analyse der mitochondrialen Fraktionen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Tholey freundlicherweise von Dr. Thomas Koudelka (Kiel, Deutschland) durchgeführt.

Immunfluoreszenzanalysen

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von HtrA2/OMI wurden in dieser Arbeit Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Die Herstellung der Immunfluoreszenz-Präparate erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Gökhan Alp. Im ersten Schritt der Herstellung der Immunfluoreszenz-Präparate wurden sterile Deckgläschen mit einem Durchmesser von 18 mm in eine 12-*well*-Platte vorgelegt und anschließend $2,8 \cdot 10^5$ Zellen pro *well* ausgesät. Am Folgetag wurde entsprechend Kapitel „Induktion des nekroptotischen und/oder apoptotischen Signalweges“ der nekroptotische Zelltod für 1, 3, 4, 5, 6, und 24 Stunden induziert. 15 min vor Ende der Stimulation wurde der *MitoTracker[®] Orange CMTMRos* in einer Konzentration von 300 nM zum Medium hinzugegeben. Anschließend wurde das Medium verworfen und zweimal vorsichtig mit kaltem TBS ($6,05 \text{ g L}^{-1}$ TRIS-HCl, $8,76 \text{ g L}^{-1}$ NaCl, eingestellt auf einen pH-Wert von 7,6) gewaschen. Die Fixierung der Zellen wurde mittels der Paraformaldehyd-Methode durchgeführt. Die Fixierungsschritte erfolgten dabei stets auf Eis und lichtgeschützt. Zunächst wurde 1 mL eisgekühltes 2,5 %iges (v/v) Paraformaldehyd für 10 min und 30 rpm (Horizontalschüttler) auf die Zellen pipettiert. Anschließend wurde zweimal mit kaltem TBS gewaschen. Im letzten Schritt der Fixierung wurde zu den Zellen 1 mL Methanol (-20 °C) für 10 min und 30 rpm gegeben. Nach der Fixierung der Zellen erfolgten alle Schritte bei Raumtemperatur und lichtgeschützt. Nach zwei Waschschritten mit kaltem TBS wurden unspezifische Bindestellen durch die Zugabe von 1 % (w/v) BSA in TBS für eine Stunde bei 30 rpm blockiert. In der Zwischenzeit wurde eine lichtundurchlässige Metallbox mit *Whatman*-Papier ausgekleidet, welches mit Milli-Q-Wasser befeuchtet wurde. Über das feuchte *Whatman*-Papier wurde Parafilm ausgelegt, auf das 50 µL des primären Antikörpers in 1 % (v/v) BSA-TBS entsprechend der Verdünnung in Tabelle 3.4 vorgelegt wurde. Nach der Blockierung von unspezifischen Bindestellen wurde das Deckgläschen mit der Zellseite auf den Antikörper

gelegt, gefolgt von einer Inkubation bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Zellen viermal für 8 min mit TBS bei 30 rpm gewaschen und es erfolgte die gleichzeitige Zugabe des sekundären Antikörpers und des Farbstoffes Hoechst 33342 für die Kernfärbung. Dazu wurden 50 µL der Antikörper/Hoechst 33342-Lösung (angesetzt in TBS/BSA in einer Verdünnung von 1:1000) tropfenweise auf einen neuen Parafilm pipettiert und das Deckgläschen wurde mit der Zellseite auf die Lösung gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation wurde erneut viermal für 8 min mit TBS bei 30 rpm gewaschen. Im vorletzten Schritt wurden 15 µL *Mounting*-Lösung auf einen Objektträger pipettiert und das Deckgläschen wurde blasenfrei mit der Zellseite auf die *Mounting*-Lösung gelegt und über Nacht bei 4 °C trocknen gelassen. Im letzten Schritt wurde das Deckgläschen mittels Klarlack auf dem Objektträger fixiert. Die Analyse der Immunfluoreszenz-Präparate erfolgte unter der Verwendung des *Laser Scanning Microscope 510*.

Agarose-Gelelektrophore

Die Analyse von DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Zur Herstellung eines 1 %igen (w/v) Agarosegels wurden 1 g Agarose in 100 mL 1X TAE-Puffer (50X TAE-Puffer: 242 g L⁻¹ TRIS-Base, 5,71 % (v/v) 100 % Essigsäure und 10 % (v/v) 0,5 M EDTA (pH-Wert = 8,0)) unter Erhitzen gelöst. Zur späteren Detektion der Nukleinsäuren wurden 5 µL *RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution 20.000X* zur Agaroselösung hinzugegeben und in eine *Wide Mini-Sub Cell GT Cell* gegossen. Nach der Polymerisation der Agarose wurde die Kammer mit 1X TAE Puffer gefüllt und die Proben in die Taschen des Agarosegels geladen. Im Fall der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)-Produkte (siehe Kapitel „Gendeletion mittels CRISPR/Cas9“ und “Genotypisierung der ADAM17^{ex/ex}- und ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-Mäuse“) wurden die Proben zuvor mit *Gel Loading Dye, Purple (6X)* versetzt. Die Restriktionsansätze zur Herstellung des pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-FLAG-TEV-Plasmids (siehe Methoden, Kapitel „Kartierung der Spaltstelle der A-SMase, über die diese in der Nekroptose proteolytisch aktiviert wird“) erhielten bereits durch die Zugabe des *FastDigest Green Buffer (10X)* einen Ladepuffer. Als Standard diente der Marker *Thermo Scientific™ O'GeneRuler Express DNA Ladder*. Nach einer Laufzeit von 60 min bei 100 V erfolgte die Visualisierung mittels des *Molecular Imager® Gel Doc™ XR Systems* unter der Verwendung des Protokolls *GelRed*.

Gendeletion mittels CRISPR/Cas9

Die Herstellung der Gendeletionen von *Caspase-10*, *HtrA2/OMI*, *ADAM17* (murin) und *ADAM17* (human) erfolgte mittels der CRISPR/Cas9-Methode. Die in dieser Arbeit verwendeten *single guide RNAs* (sgRNA) sowie das Enzym Cas9 wurden käuflich erworben von Synthego (Kalifornien, Vereinigte Staaten). Vor der Transfektion der MEF und HT-29-Zellen mit dem Ribonukleoprotein (RNP) wurden diese zwei Tage kultiviert. Die Transfektion selbst erfolgte unter der Verwendung des *SF Cell Line 4D-Nucleofector™ X Kit S*. Dazu wurde im ersten Schritt der RNP gemäß der Tabelle 3.14 angesetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die jeweiligen *Guide*-RNA-Sequenzen der sgRNAs sind in der Tabelle 3.15 zusammengefasst.

Tabelle 3.14: Ansatz des Ribonukleoproteins zur Generierung der Gendeletion mittels der CRISPR/Cas9-Methode.

Komponente	Menge in μL
<i>SF Cell Line Nucleofector® Solution</i> (supplementiert)	16,75
5 μM sgRNA	3,00
20 μM Cas9	0,25

Tabelle 3.15: Liste der *Guide*-RNA-Sequenzen der sgRNAs zur Generierung der Gendeletion mittels der CRISPR/Cas9-Methode.

Gen	sgRNA
<i>Caspase-10</i>	AGGCUGGCCAUGAAAUCUCA
	UCUGAUUAUUGAUUCAACC
<i>HtrA2/OMI</i>	CUUAUGGGACCCCGAGUCUC
	CAGCAGGGCCCGAGGUCAG
	CCAAAGCCCGCCAUGCCCGA
<i>ADAM17</i> (murin)	AGCAGCACUCCAUAAGGAAA
	GCUGAAUAUUAGCUAAGGAG
<i>ADAM17</i> (human)	UUUUUCUUACCGAAUGCUGC
	AUCUAAUAUCCAGCAGCAUU

Während der Anlagerung des RNP, wurden jeweils 10^5 Zellen geerntet und in 5 μL *SF Cell Line Nucleofector® Solution* (supplementiert) aufgenommen. Anschließend wurde das RNP zur Zellsuspension pipettiert, welche wiederum in die *Nucleocuvette® Strips* überführt wurden. Die Transfektion selbst erfolgte mithilfe der *4D-Nucleofector® X Unit* unter der Verwendung folgender Programme: EN-150 (MEF) und EN-50 (HT-29-Zellen). Im letzten Schritt wurden die transfizierten Zellen mit 75 μL vorgewärmten Medium versetzt und die Zellsuspension wurde in zwei *wells* einer 96-*well*-Platte überführt, welche für 24 Stunden

bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ kultiviert wurde. Die Einzelaussaat der Zellen erfolgte zum einen mittels des *BD FACSAria™ Fusion*-Durchflusszytometers und zum anderen per Zählung in je drei 96-well-Platten. Die Analyse der Einzelkolonien erfolgte mit drei verschiedenen Methoden: Western Blot (Kapitel „Western Blot“), Analyse der Sensitivität gegenüber der Induktion der Nekroptose (Kapitel „Durchflusszytometrie“) und Sequenzierung. Zur Validierung der Gendeletionen wurde das genomische Areal, in welchem sich die Deletion befinden könnte, sequenziert. Dazu wurde im ersten Schritt die genomische DNA der Einzelkolonien mit dem *Phire Tissue Direct PCR Master Mix*-Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Zudem wurden Produktprimer (PP) designt, die ungefähr 400 Basenpaare (Bp) (jedoch mindestens 150 Bp) vor und nach den sgRNA binden, eine Länge von 18 bis 22 Bp, einen GC-Gehalt zwischen 45 und 60 % und eine Schmelztemperatur (T_M) zwischen 55 und 65 °C besitzen. Mittels der isolierten DNA und den Primern (Tabelle 3.18) wurde eine PCR durchgeführt (Tabelle 3.16 und Tabelle 3.17).

Tabelle 3.16: PCR-Ansatz zur Analyse der *Caspase-10*-, *HtrA2/OMI*-, *ADAM17* (murin)- und *ADAM17* (human)-Gendeletionen.

Chemikalie	<i>Caspase-10, ADAM17</i>	<i>HtrA2/OMI</i>
	(murin), <i>ADAM17</i> (human)	
	Menge in µL	Menge in µL
5X <i>Phusion HF-Buffer</i>	4,0	4,0
dNTP-Gemisch (je 10 mM)	0,4	0,4
Vorwärtsprimer (50 µM)	0,2	0,2
Rückwärtsprimer (50 µM)	0,2	0,2
<i>Phusion DNA-Polymerase</i> (2 E/µl)	0,2	0,2
DMSO	/	0,6
DNA (100 ng)	x	x
Milli-Q-Wasser	15,0 - x	14,4 - x

Tabelle 3.17: PCR-Zyklus zur Analyse der *Caspase-10*-, *HtrA2/OMI*-, *ADAM17* (murin)- und *ADAM17* (human)-Gendeletionen.

Zyklusschritt	Temperatur in °C	Zykluslänge in sek
Initiale Denaturierung	98	240
Initiale Denaturierung	98	60
Annealing	siehe Tabelle 3.18	30
Elongation	72	siehe Tabelle 3.18
Finale Elongation	72	600

Tabelle 3.18: Auflistung der Primersequenzen, Annealingtemperatur, Größe des PCR-Produktes sowie Elongationszeit für die Sequenzierung der *Caspase-10*-, *HtrA2/OMI*-, *ADAM17* (murin)- und *ADAM17* (human)-Gendeletionen. PP: Produktprimer, SP: Sequenzierprimer, T: Annealingtemperatur

Gen	PP- und SP- Bezeichnung	Primersequenz	T	Produkt- größe in Bp	Elongation s-zeit in sek
<i>Caspase-10</i>	C10-for-P	ggCTCCAATCAgg CTACCAg	65,4	711	22
	C10-rev-P	ACAgACCCgTCC TCACCTAA			
	C10-for-S	gTgCTgTgTCCCT CCATCTTA	64,7	609	19
	C10-rev-S	TggTACAgTTgAgg TgCTgC			
<i>HtrA2/OMI</i>	HtrA2-for-P	CTCTTACCggTgC gAgTCAA	64,7	972	30
	HtrA2-rev-P	TTCAgTgCCTCCC ggTCTA			
	HtrA2-for-S	TTgggCCgTCTCA CAACTC	64,9	678	21
	HtrA2-rev-S	CTTCTCCACCAC ATCTgCgA			
<i>ADAM17</i> (murin)	adam17-for-P	CAGgACTgAgCAg CgAgT	61,5	541	15
	adam17-rev-P	ggCATTAAATgAT gTTACAATCACA			
	adam17-for-S	AATgCTCTTAAA TgACTgAgCTA	60,9	420	15
	adam17-rev-S	TTgCCAAAACAA AACCACC			
<i>ADAM17</i> (human)	ADAM17-for-P	AggCAgTggAgTTT CTgTTgATA	63,3	819	25
	ADAM17-rev-P	ACCATCATTAAC ACCTCTgCAATA			
	ADAM17-for-S	TATAgTTTgTgCT TggCACTTCC	62,9	353	11
	ADAM17-rev-S	CCCAAgATTTCa gTAgATACCCTT			

Das PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und die Bande mit der erwarteten Produktgröße wurde aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten und mittels des Kits *QIAquick Gel Extraction Kit* nach Herstelleranweisungen aufgereinigt. Zur Sequenzierung des PCR-Produktes wurden nach den oben genannten Kriterien sogenannte *Nested-Primer* (Tabelle 3.18) designt, welche im

Produkt selbst binden und somit als Sequenzierprimer (SP) dienen. Die Sequenzierung nach Sanger wurde vom Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB) (Kiel, Deutschland) durchgeführt.

Genotypisierung der ADAM17^{ex/ex}- und ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-Mäuse

Die Isolierung der DNA aus den Schwanzstücken von ADAM17^{ex/ex}- und ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-Mäusen erfolgte unter Verwendung des *Phire Tissue Direct PCR Master Mix*-Kits nach Angaben des Herstellers. Die Sequenzen der für die PCR verwendeten Primer sind in der Tabelle 3.19 zusammengefasst. Die Ansätze der PCR sowie die PCR-Zyklen für ADAM17 und RIPK3 sind in der Tabelle 3.20, Tabelle 3.21 und Tabelle 3.22 aufgeführt.

Tabelle 3.19: Primersequenzen für die Genotypisierung der ADAM17^{ex/ex}- und ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-Mäuse.

Gen	Primer	Primersequenz
ADAM17	1	CTTATTATTCTCgTggTC
	2	TATgTgATAggTgTAATg
RIPK3	1	CgCTTTAgAAgCCTTCaggTTgAC
	2	gCCTgCCCATCAgCAACTC
	3	CCAgAggCCACTTgTgTAgCg

Tabelle 3.20: PCR-Ansatz für die Genotypisierung der ADAM17^{ex/ex}- und ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-Mäuse.

Chemikalie	ADAM17	RIPK3
	Menge in μL	Menge in μL
Milli-Q-Wasser	7,5	6,5
<i>Phire Tissue Direct PCR Master Mix (2X)</i>	10,0	10,0
Primer 1	1,0	1,0
Primer 2	1,0	1,0
Primer 3	/	1,0
Isolierte DNA	0,5	0,5

Tabelle 3.21: ADAM17: PCR-Zyklus für die Genotypisierung der ADAM17^{ex/ex}- und ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-Mäuse.

Zyklusschritt	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zykluslänge in sek
Initiale Denaturierung	98	300
Initiale Denaturierung	98	5
Annealing	46	5
Elongation	72	20
Finale Elongation	72	60

x40

Tabelle 3.22: *RIPK3*: PCR-Zyklus für die Genotypisierung der ADAM17^{ex/ex}- und ADAM17^{ex/ex}/*RIPK3*^{-/-}-Mäuse.

Zyklusschritt	Temperatur in °C	Zykluslänge in sek	
Initiale Denaturierung	98	240	
Initiale Denaturierung	98	60	x30
Annealing	60	30	
Elongation	72	60	
Finale Elongation	72	600	

Das PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese auf einem zweiprozentigen Gel aufgetrennt. Im Fall von ADAM17 ist für eine Wildtyp-Maus eine 300 Bp große und für eine ADAM17^{ex/ex}-Maus eine 500 Bp große Bande zu erwarten. Für *RIPK3* erzeugt eine Wildtyp-Maus eine 320 Bp große und eine ADAM17^{ex/ex}/*RIPK3*^{-/-}-Maus eine 485 Bp große Bande.

Isolierung von primären Lungenfibroblasten aus Mäusen

Die sterile Entnahme der Lungen aus ADAM17^{ex/ex}- und ADAM17^{ex/ex}/*RIPK3*^{-/-}-Mäusen wurde freundlicherweise von Frau Dr. Charlotte Hauser übernommen. Nach der sterilen Entnahme wurden die Lungen mit Skalpell zerkleinert und in eine Zellkulturflasche überführt. Mit Hilfe von 5 mL DMEM-Medium, supplementiert mit 20 % FBS (v/v), 50 µg mL⁻¹ Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 50 µM β-Mercaptoethanol, wurden die Lungenstücke in der Zellkulturflasche gleichmäßig verteilt und für fünf Tage bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ inkubiert. Nach der fünftägigen Inkubation wurde das Medium inklusive der Gewebestücke entfernt und in einem 50 mL *Falcon*-Gefäß gesammelt. Zum Entfernen restlicher Lungenstücke wurde zweimal kräftig mit PBS gewaschen. Die Waschflüssigkeiten wurden anschließend ebenfalls in demselben 50 mL *Falcon*-Gefäß gesammelt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mittels 2 mL *Accutase* abgelöst und anschließend nach der Zugabe von 10 mL Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt. Zur alten Flasche wurden für den Fall, dass nicht alle Zellen abgelöst werden konnten, 12 mL frisches Medium hinzugegeben. Das *Falcon*-Gefäß mit den Lungengewebsstücken wurde für 10 min bei 153 rcf zentrifugiert und das Medium wurde entfernt. Nach einem Waschschrift der Lungenstücke mit 25 mL PBS und anschließender Zentrifugation (10 min bei 153 rcf) wurde der Überstand verworfen und das Pellet wurde mittels 5 mL Medium in eine neue Kulturflasche überführt. Von den primären Zellen, das heißt von den ersten und zweiten Passagen, wurden Kryostocks angefertigt. Zur spontanen Immortalisierung der Lungenfibroblasten wurden die Zellen für fünf Monate kultiviert. Immortalisierte

Lungenfibroblasten aus Wildtyp-Mäusen waren zuvor in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam hergestellt worden.

Kartierung der Spaltstelle der A-SMase, über die diese in der Nekroptose proteolytisch aktiviert wird

Klonierung der A-SMase FLAG-TEV-Sequenz in das pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-Plasmid

Das Plasmid 19ACVQXC_SMPD1_FLAG_TEV_pMK_RQ, welches mit einer Kanamycin-Resistenz ausgestattet ist und die N-terminale Subregion der A-SMase, versehen mit einem FLAG-Tag und der Spaltsequenz der TEV-Protease (nachfolgend als "*FLAG-TEV-Sequenz*" bezeichnet), enthält, wurde käuflich von der Firma Geneart erworben. Anschließend wurde es nach Herstellerangaben in Lösung genommen und in chemisch kompetente *Escherichia coli* XL Blue 1-Zellen (hergestellt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam) transformiert. Hierfür wurden zunächst 100 µL der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50 ng des 19ACVQXC_SMPD1_FLAG_TEV_pMK_RQ-Plasmids zu den Zellen pipettiert, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation auf Eis und einer Inkubation bei 42 °C für 30 Sekunden. Nach der Transformation des Plasmids wurden die Zellen in 1 mL vorgewärmtes *lysogeny broth*-Medium (LB-Medium) (10 g L⁻¹ Trypton, 5 g L⁻¹ Hefeextrakt und 10 g L⁻¹ NaCl, eingestellt auf einen pH-Wert von 7,4) aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Zellen herunterzentrifugiert (344 rcf für 10 min), das Medium abgenommen und das Pellet in 200 µL Medium resuspendiert. Nachfolgend wurden zum einem 20 µL und zum andern 180 µL der Zellsuspension auf zwei Agar-Platten (Zusammensetzung des LB-Agars: 10 g L⁻¹ Trypton, 5 g L⁻¹ Hefeextrakt, 10 g L⁻¹ NaCl und 15 g L⁻¹ Agar) der Größe 100 x 20 mm, welchen 50 µg mL⁻¹ Kanamycin zugesetzt wurden, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten das Picken und Kultivieren einzelner Kolonien. Dazu wurden mittels einer sterilen Spitze eine Einzelkolonie aufgepickt und in 1 mL vorgewärmtes LB-Medium, ebenfalls versetzt mit 50 µg mL⁻¹ Kanamycin, gegeben. Anschließend wurde die Einzelkolonie bis zu einer Trübung des Mediums bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Daraufhin wurden zweimal 5 mL LB-Medium (mit 50 µg mL⁻¹ Kanamycin) in einem Verhältnis von 1 zu 100 mit der trüben Kultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden am Folgetag ein Kryostock hergestellt (820 µL der Übernachtskultur plus 180 µL

87 %iges (v/v) steriles Glycerol, Lagerung bei -80 °C). Die Plasmidisolierung erfolgte unter der Zuhilfenahme des Kits *Qiaprep® Spin Miniprep Kit* nach Anweisungen des Herstellers.

Die Umklonierung der *FLAG-TEV*-Sequenz aus dem 19ACVQXC_SMPD1_FLAG_TEV_pMK_RQ-Plasmid in den pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-Vektor erfolgte im nächsten Schritt. Der verwendete Restriktionsansatz für das Insert und den Vektor ist in der Tabelle 3.23 aufgezeigt.

Tabelle 3.23: Restriktionsansatz zur Herstellung des pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-FLAG-TEV-Plasmids.

Komponente	Menge
DNA	1 µg
<i>FastDigest Green Buffer (10X)</i>	2 µL
<i>PshAI</i>	1 µL
<i>FastDigest™ BsmBI</i>	1 µL
Auffüllen mit Milli-Q-Wasser auf 20 µL und Inkubation für 2 Stunden bei 37 °C	
Zugabe von 1 µL <i>FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i> für 10 min und anschließende Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65 °C	

Die Aufreinigung des Restriktionsansatzes erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die entsprechenden Banden des Restriktionsverdaus wurden im nächsten Schritt aus dem Agarosegel ausgeschritten und mittels des Kits *QIAquick Gel Extraction Kit* nach Herstelleranweisungen aufgereinigt. Im letzten Schritt wurde das FLAG-TEV-Insert unter Verwendung des *Rapid DNA Ligation Kit* in den geschnittenen Vektor pEF6.V5/His.aSMase^{wt} ligiert. Der Ligationsansatz ist in der Tabelle 3.24 zusammengefasst. Zur Vervielfältigung des Ligationproduktes wurden 4 µL des Ligationansatzes in *Escherichia coli* XL Blue 1 transformiert und das Plasmid pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-FLAG-TEV unter der Zuhilfenahme des *Qiaprep® Spin Miniprep Kits* aus einer in 5 ml LB-Medium angeimpften Einzelkolonie isoliert. Das isolierte Plasmid wurde daraufhin mittels eines Restriktionsverdaus (Tabelle 3.23) und Sequenzierung hinsichtlich seiner Korrektheit überprüft. Die Sequenzierung nach Sanger wurde dabei vom Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB) (Kiel, Deutschland) unter Verwendung der in der Tabelle 3.25 aufgeführten Primer durchgeführt.

Tabelle 3.24: Ligationsansatz zur Herstellung des pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-FLAG-TEV-Plasmids.

Komponente	Menge
Vektor	100 ng
Insert	Molverhältnis von Insert und Vektor von 1 zu 3
<i>5X Rapid ligation buffer</i>	4 μ L
<i>T4 DNA Ligase</i>	1 μ L
Auffüllen mit Milli-Q-Wasser auf 20 μ L und Inkubation bei 22 °C für 5 min	

Tabelle 3.25: Primersequenzen für die Sequenzierung des pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-FLAG-TEV-Plasmids.

Gen	Primer	Primersequenz
<i>SMPD1</i>	1	gCTgAAgATAgCACCCACC
	2	gAgggAAgCTATTgACAgg

Analyse der nekroptotisch gespaltenen FLAG-TEV-A-SMase

Das pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-FLAG-TEV-Plasmid wurde gemäß Kapitel „Stabile Transfektion von Zellen“ stabil in L929Ts-Zellen transfiziert. Für die Herstellung der Protein-Zelllysate zur Analyse der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase wurden L929Ts pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-FLAG-TEV-Zellen in zwei 175 cm²-Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert. Anschließend wurde nach einem Mediumwechsel dem neu hinzugegebenen Medium 20 μ M zVAD zum Verhindern einer eventuellen apoptotischen Spaltung der A-SMase zugefügt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit *Accutase* abgelöst und in einem 50 mL *Falcon*-Gefäß gepoolt. Nach anschließender Zellzählung wurde das 50 mL *Falcon*-Gefäß für 10 min bei 561 rcf zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in Click's/RPMI 1640 ((50:50) % (v/v))-Medium ohne Supplementierungen in einer Konzentration von 10⁶ Zellen pro mL aufgenommen und in 1 mL-Portionen auf 1,5 mL Eppendorf-Gefäße verteilt. Danach wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 100 ng mL⁻¹ TNF und 20 μ M zVAD und einer weiteren einstündigen Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Invertieren der Eppendorf-Gefäße. Durch die einstündige Inkubation auf Eis sollte eine vollständige Anlagerung des zugegebenen TNF an alle auf den Zellen vorhandenen TNF-Rezeptoren ermöglicht und gleichzeitig die Aktivierung der Rezeptoren unterdrückt werden. Dies sollte wiederum im nachfolgenden Internalisierungsschritt (Inkubation für 20 min in einem 37 °C

warmen Wasserbad) zu einer synchronen Aktivierung aller TNF-Rezeptoren und zu einer ausgeprägteren Spaltungsinduktion führen (Tchikov et al. 2014). Nach dem Internalisierungsschritt wurden die Zellen zentrifugiert (561 rcf für 10 min bei 4 °C), die Pellets zweimal mit 1 mL kaltem PBS gewaschen und im letzten Schritt gepoolt. Zuletzt wurde das Pellet in TNE-Puffer (Tabelle 3.8), welcher zusätzlich mit 20 µM zVAD versetzt war, resuspendiert und die Protein-Zelllysate gemäß Kapitel „Herstellung von Protein-Zelllysaten“ fertiggestellt.

Im nächsten Schritt wurde die Anreicherung der FLAG-TEV-A-SMase über die FLAG- und V5-Tags mittels Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Alle Schritte der IPs wurden stets auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Im Fall der Anreicherung über das V5-Tag wurden 1000 µg des Zelllysats auf ein Gesamtvolumen von 500 µL mit TNE-Puffer (Tabelle 3.8) aufgefüllt. In dem darauffolgenden Vorreinigungsschritt wurden 20 µL *GammaBind™ Plus Sepharose™* zum Zelllysats gegeben und nach Vortexen der Lösung für eine Stunde bei 20 rpm bei 4 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (5 min bei 664 rcf und 4 °C), wurde der Überstand in neues 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und die *beads* wurden verworfen. Zum Überstand wurden 2 µg des V5-Antikörpers pipettiert und über Nacht bei 4 °C auf Eis inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Zugabe von 20 µL *GammaBind™ Plus Sepharose™* und Inkubation für eine Stunde bei 20 rpm bei 4 °C. Nach der Bindung des V5-Antikörpers inklusive der FLAG-TEV-A-SMase an die *GammaBind™ Plus Sepharose™*, erfolgten Zentrifugation (5 min bei 664 rcf und 4 °C), Verwerfen des Überstandes und Waschschrte. Zwischen den Waschrten wurde stets für 30 sek gevortext, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation auf Eis und einer Zentrifugation für 5 min bei 664 rcf und 4 °C. Die ersten drei Waschschrte erfolgten mit Waschpuffer (0,1 % (v/v) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH = 7,4), 300 mM NaCl, 5 mM EDTA und 0,02 % (w/v) NaN₃) gefolgt von einem Waschschritt mit Waschpuffer, dem 0,1 % (w/v) SDS und 0,1 % (w/v) Natriumdeoxycholat zugefügt worden waren. Der letzte Waschschritt erfolgte mit kaltem PBS zum Entfernen restlicher Salze. Nach dem letzten Waschschritt wurden mittels einer *Gel - Saver - Tip II* Pipettenspitze letzte Flüssigkeitsreste vom Pellet entfernt.

Für die IP mittels des FLAG-Tags wurden 1000 µg des Zelllysats (aufgenommen in einem Gesamtvolumen von 500 µL in TNE-Puffer) mit 40 µL *EZview™ Red ANTI-FLAG® M2*-Affinitätsgel, welches zuvor nach Herstellerangaben gewaschen wurde, gemischt und über Nacht bei 4 °C und 20 rpm inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 30 sek und 8200 rcf

wurde der Überstand verworfen und das *EZview™ Red ANTI-FLAG® M2*-Affinitätsgel wurde dreimal mit kaltem TBS-Puffer ($6,05 \text{ g L}^{-1}$ TRIS-HCl und $8,76 \text{ g L}^{-1}$ NaCl, eingestellt auf einen pH-Wert von 7,6) gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde ebenfalls für 30 sek gevortext, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation auf Eis. Zuletzt wurde das *EZview™ Red ANTI-FLAG® M2*-Affinitätsgel ebenfalls unter Zuhilfenahme einer *Gel - Saver - Tip II* Pipettenspitze von letzten Flüssigkeitsresten befreit.

Für die massenspektrometrische Analyse der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase wurden die Proben wie folgt vorbereitet: Die V5-IPs (5000 μg Zelllysate und 2 μg V5-Antikörper, je zwölf Replikate) wurden mit 20 μL 5X SDS-PAGE Ladebuffer für 5 min bei $98 \text{ }^\circ\text{C}$ aufgekocht und mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt. Zur Proteinfixierung und Proteinanfärbung wurden die SDS-PAGE-Gele anschließend für 30 min in eine Coomassie G 250 Brillantblau-Methanol-Essig-Lösung ($0,5 \text{ g L}^{-1}$ Coomassie G 250 Brillantblau, 50 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure) gelegt und über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit Milli-Q-Wasser entfärbt. Anhand von Kontrollen, in denen ein Western Blot mit V5-Antikörpern durchgeführt wurde, wurde am Folgetag die gewünschte Region im SDS-Gel lokalisiert, herausgeschnitten und massenspektrometrisch nach einem TEV-in-Gel-Verdau analysiert. Der *AcTEV™* Protease-Verdau erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers für 3 Stunden bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ unter gelegentlichem Schnippen gegen das Reaktionsgefäß. Im einem zweiten Ansatz wurden 24 Proben á 100 μg Protein-Zelllysate ebenfalls via SDS-PAGE aufgetrennt. Am Folgetag erfolgte identisch zum ersten Ansatz das Herausschneiden der gewünschten Region, welche nach einem TEV-in-Gel-Verdau massenspektrometrisch analysiert wurde. Die Aufarbeitung/Reinigung der Proben sowie die massenspektrometrische Analyse der A-SMase-Proben erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Tholey und wurde freundlicherweise von Dr. Thomas Koudelka (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland) durchgeführt.

Analyse der nekroptotisch gespaltenen A-SMase_{D220-L259}deletiert und A-SMase_{P221-R230}randomisiert

Die *pEF6.V5/His.aSMase^{D220-L259}deletiert* und *pEF6.V5/His.aSMase^{P221-R230}randomisiert* Plasmide wurden gemäß Kapitel „Stabile Transfektion von Zellen“ stabil in A-SMase-defiziente L929Ts-Zellen transfiziert. Die Herstellung der Protein-Zelllysate zur massenspektrometrischen Analyse der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase_{D220-L259}deletiert und A-SMase_{P221-R230}randomisiert erfolgte gemäß Kapitel „Analyse der

nekroptotisch gespaltenen FLAG-TEV-A-SMase“ unter der Verwendung von mit der A-SMase_D220-L259_{deletiert} oder mit der A-SMase_P221-R230_{randomisiert} rekonstituierten A-SMase-defizienten L929Ts-Zellen und einer 20 und 180 minutigen Induktion der Nekroptose. Die massenspektrometrische Analyse der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase_D220-L259_{deletiert} und A-SMase_P221-R230_{randomisiert} erfolgte analog der massenspektrometrischen Analyse der nekroptotisch gespaltenen FLAG-TEV-A-SMase (siehe Kapitel „Analyse der nekroptotisch gespaltenen FLAG-TEV-A-SMase“) mit der Ausnahme, dass aufgrund der fehlenden TEV-Spaltstelle kein TEV-Verdau durchgeführt wurde. Die Aufarbeitung/Reinigung der Proben sowie die massenspektrometrische Analyse der A-SMase_D220-L259_{deletiert}- und A-SMase_P221-R230_{randomisiert}-Proben erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Tholey und wurde freundlicherweise von Dr. Mohammad Abukhalaf (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland) durchgeführt.

Verwendete Software

Die Anfertigung die in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen erfolgte unter der Verwendung von Microsoft Word, PowerPoint, Excel 2021 und BioEdit.

4. Ergebnisse

Die Proteolyse hat eine essenzielle Rolle im nekroptotischen Zelltod inne. Hierbei hatte die Caspase-8 in früheren Arbeiten eine Spezies-spezifische regulatorische Funktion gezeigt (murin vs. human), wohingegen die Rolle der Caspase-10, welche im Menschen, jedoch nicht in der Maus exprimiert wird, nahezu unbekannt ist. Zudem hatte die Deletion der Proteasen HtrA2/OMI und ADAM17 einen Schutz gegenüber der Induktion des nekroptotischen Signalweges vermittelt. Bezüglich der A-SMase war bereits bekannt, dass eine proteolytische Aktivierung während der Nekroptose stattfindet, die nekroptotische Spaltstelle war jedoch nicht identifiziert. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Adressierung der Fragen nach der Spezies-spezifischen Aufgabe der Caspase-8 und der Caspase-10, dem Wirkmechanismus der Proteasen HtrA2/OMI und ADAM17, welcher zum Schutz vor Nekroptose führt, sowie nach der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase sind in diesem Kapitel dargestellt.

4.1. Die Spezies-spezifische Rolle der Caspase-8 sowie die Rolle der Caspase-10 in der Nekroptose

Ein siRNA-Screen zur Identifikation neuer Proteasen im nekroptotischen Signalweg hatte gezeigt, dass die Herunterregulierung der murinen Caspase-8 den nekroptotischen Zelltod verstärkt, wohingegen die Herunterregulierung der humanen Caspase-8 zum Schutz gegenüber der Induktion der Nekroptose führte (Voigt 2014). In ersten, vorläufigen Rekonstitutionsstudien von Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3 (murin)- und HT-29/C8/F11 (human)-Zellen mit den Protease-aktiven oder -inaktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 hatte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam Hinweise darauf erhalten, dass die murine Caspase-8 die Aufgaben der humanen Caspase-8 und umgekehrt nicht übernehmen kann. Zudem deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass die Protease-Aktivität im murinen Zellmodell notwendig für die Suppression des nekroptotischen Zelltodes sein könnte. Darüber hinaus führte eine Deletion der Caspase-10, welche im humanen Zellmodell exprimiert wird, in Nagetieren im Laufe der Evolution jedoch verloren ging, zu einem verstärkten nekroptotischen Zelltod (Saggau 2018). Die Funktion der Caspase-10 in der Nekroptose generell, sowie im Vergleich mit der Caspase-8, war jedoch noch nicht identifiziert.

Zur weiteren Analyse der Spezies-spezifischen Rolle der Caspase-8 und der Rolle der Caspase-10 im nekroptotischen Signalweg sollten daher die Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3- und HT-29/C8/F11-Zellen sowie die Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen (Saggau 2018) mit der Protease-aktiven (Wildtyp) und -inaktiven Form (Mutante) der humanen und murinen Caspase-8 und der Caspase-10 transfiziert und hinsichtlich zweier Fragen untersucht werden: Welchen Einfluss hat die Expression der Caspasen auf die Induktion der Nekroptose? Wird die Protease-Aktivität der Caspasen für ihre Funktion im nekroptotischen Signalweg benötigt?

Analysen in den murinen Caspase-8-defizienten Modellzellen L929Ts/C8/B3

Im ersten Schritt sollten die murinen Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 und der Caspase-10 lentiviral rekonstituiert werden. Zur Untersuchung einer möglichen *scaffold*-Funktion der Caspasen sollte jeweils die Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante) der jeweiligen Caspase transfiziert werden. Da sich die konstitutive Expression der Caspasen in früheren Experimenten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam als toxisch erwiesen hatte, wurde ein mit Doxycyclin (Dox) induzierbares pTRIPZ-HA-N-Expressions-System gewählt. Zudem wurden die Caspasen mit einem HA-Tag versehen, was einen direkten Vergleich der Expression der Caspasen im Western Blot ermöglichte.

Die Ergebnisse der Caspase-Expression nach der lentiviralen Transduktion und Induktion mit Dox sind in der Abbildung 4.1 dargestellt. Sie zeigen für die Expression der Protease-aktiven und -inaktiven Formen der murinen Caspase-8 und der Caspase-10 vergleichbare Intensitäten, für die humane Caspase-8 wurde eine etwas geringere Expression detektiert.

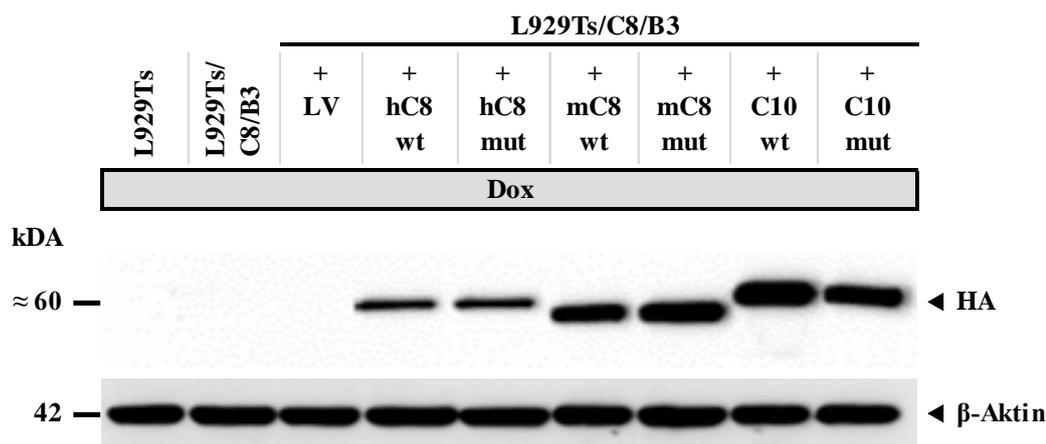
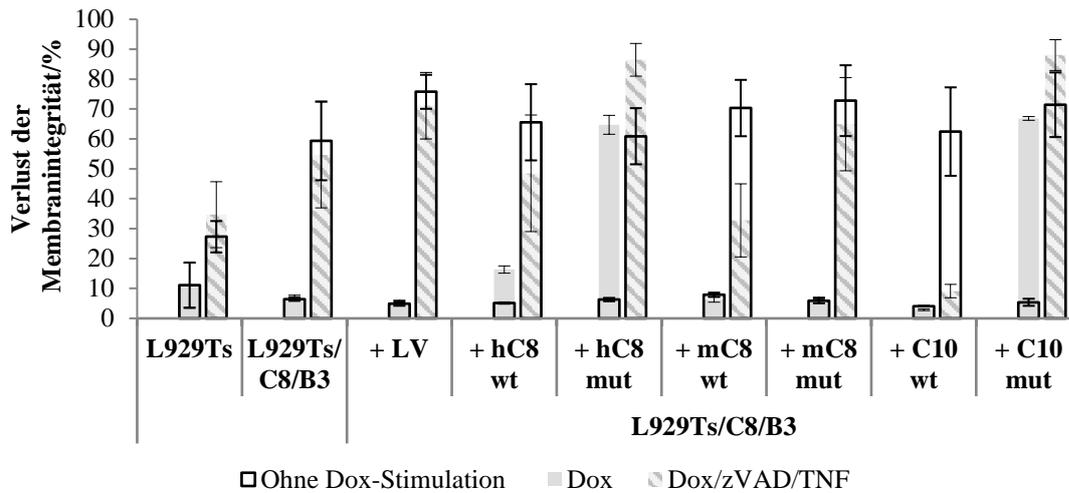


Abbildung 4.1: Lentivirale Rekonstitution der murinen Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Caspase-Expression.

Die Analyse der Caspase-Expression erfolgte in L929Ts-, L929Ts/C8/B3- und L929Ts/C8/B3-Zellen, welche stabil mit der humanen (hC8) und murinen Caspase-8 (mC8) und der Caspase-10 (C10) (Wildtyp (wt)- und mutierten (mut)-Form) rekonstituiert worden waren. Als Kontrolle dienten mit Leervektor (LV) rekonstituierte L929Ts/C8/B3-Zellen. Für die Induktion der Caspase-Expression wurden die Zellen mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Dox für 24 Stunden inkubiert. Der Nachweis der Expression der Caspasen erfolgte im Western Blot mittels spezifischem HA-Antikörper mit einer zu erwartenden Größe der Caspasen um 60 kDa. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β Aktin (42 kDa).

Die Ergebnisse der Nekroptose-Induktion sowie der dazugehörige Western Blot, in welchem auf nekroptotische Marker getestet wurde, sind in der Abbildung 4.2 dargestellt. Die Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen zeigten im Vergleich zu parentalen L929Ts-Zellen einen um 30 % erhöhten nekroptotischen Verlust der Membranintegrität. Nach Dox-induzierter Expression der Protease-aktiven-Formen der drei Caspasen in L929Ts/C8/B3-Zellen konnte in allen Fällen eine Reduktion des Zelltodes gemessen werden, am stärksten ausgeprägt für die Wildtyp-Caspase-10 (über 50 %), gefolgt von der murinen Wildtyp-Caspase-8 (40 %) und der humanen Wildtyp-Caspase-8 (20 %). Die Dox-induzierte Expression der katalytisch inaktiven Formen der Caspasen hatte hingegen keinen Einfluss auf den Verlust der Membranintegrität (Abbildung 4.2.a). Im Western Blot konnte entsprechend zum Toxizitätsassay in parentalen L929Ts- und in mit den Protease-aktiven Formen aller drei Caspasen rekonstituierten L929Ts/C8/B3-Zellen nach der Induktion von Nekroptose nur eine schwache bis keine pMLKL-Bande detektiert werden. Die Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen sowie die L929Ts/C8/B3-Zellen, welche die Protease-inaktiven Formen der Caspasen exprimierten, wiesen hingegen ausgeprägte pMLKL-Banden auf (Abbildung 4.2.b).

a)



b)

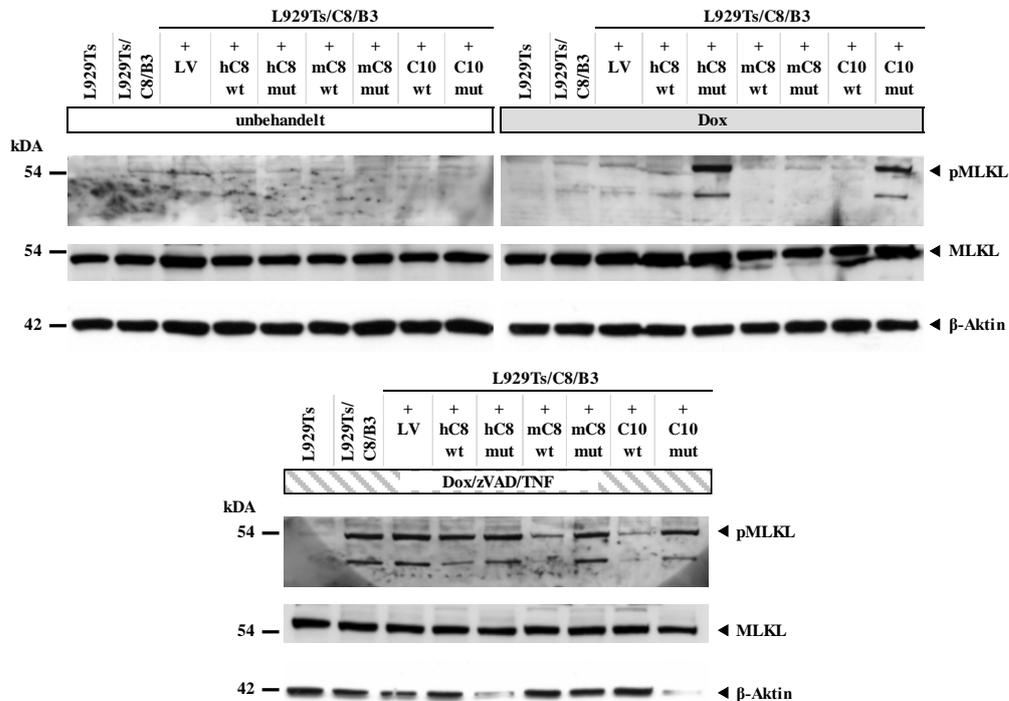


Abbildung 4.2: Lentivirale Rekonstitution der murinen Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Nekroptose-Sensitivität via FACS und Western Blot.

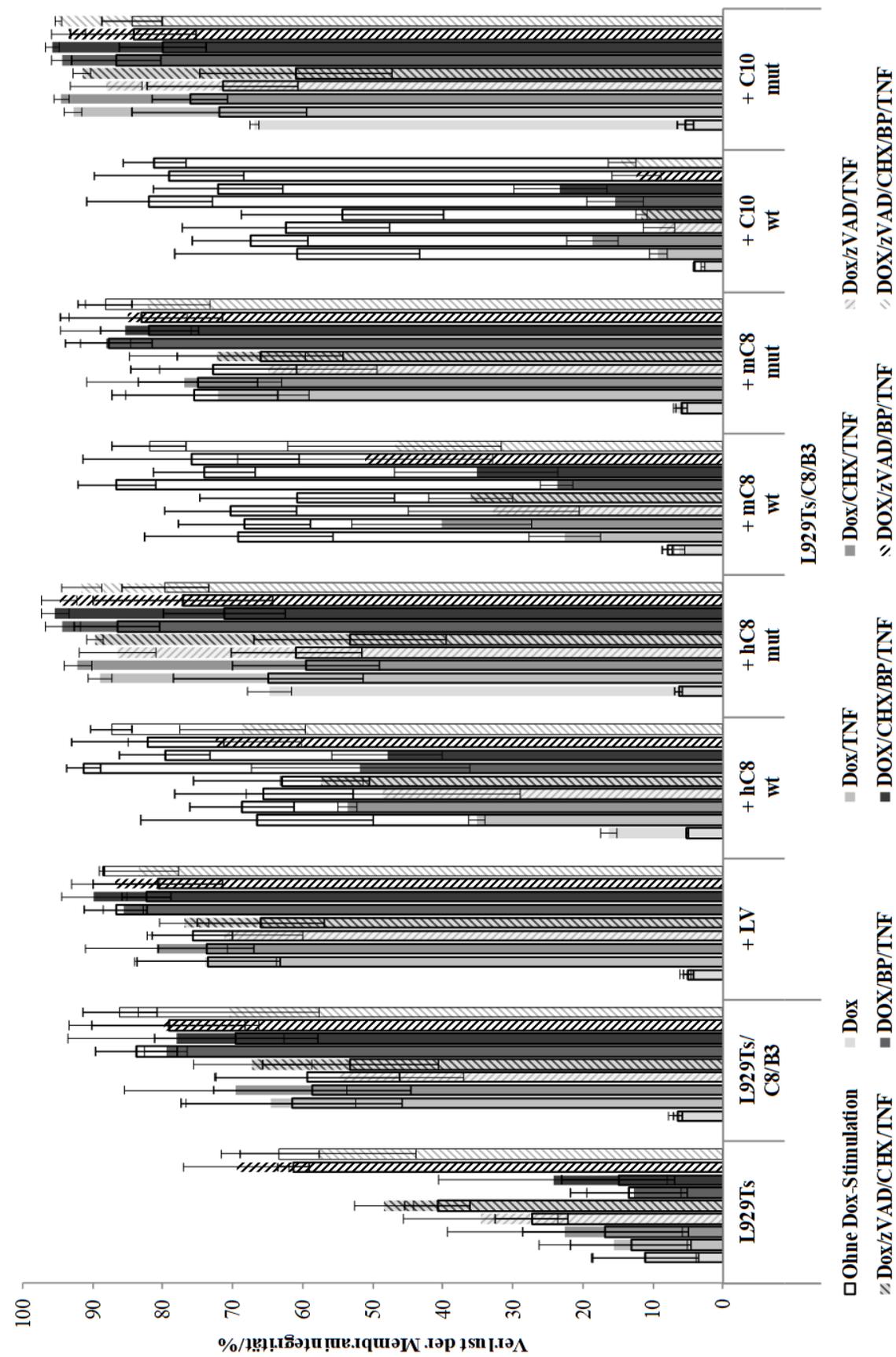
Die Analyse der Nekroptose-Sensitivität erfolgte in murinen L929Ts-, L929Ts/C8/B3- und L929Ts/C8/B3-Zellen, welche stabil mit der humanen (hC8) und murinen Caspase-8 (mC8) und der Caspase-10 (C10) (Wildtyp) (wt)- und mutierten (mut)-Form rekonstituiert worden waren. Als Kontrolle dienten mit Leervektor (LV) rekonstituierte L929Ts/C8/B3-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder zur Induktion der Caspase-Expression mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Dox für 24 Stunden inkubiert. Zur Induktion des nekroptotischen Zelltodes erfolgte eine Prästimulation mit $20 \mu\text{M}$ zVAD für 30 min, gefolgt von einer 2-stündigen Inkubation mit 100 ng mL^{-1} TNF. (a) Der Verlust der Membranintegrität wurde mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert des Verlustes der Membranintegrität, sowie dessen Standardfehler, ermittelt aus vier biologischen Replikaten á drei technischen Replikaten. (b) Der Nachweis des nekroptotischen Markers pMLKL erfolgte mittels spezifischem pMLKL/MLKL (54 kDa)-Antikörpernachweis. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa).

In L929-Zellen wird bereits allein durch die Zugabe von TNF nekrotischer Zelltod ausgelöst, welcher durch die Zugabe von Caspase-Inhibitoren weiter verstärkt wird (Vercammen et al. 1998b; Sawai 2016). Die in dieser Arbeit verwendeten MEF und HT-29-Zellen benötigen zur Induktion des nekroptotischen Signalweges darüber hinaus einen Sensibilisator wie CHX (Voigt 2014). In ersten Vorarbeiten in der Gruppe von Prof. Dr. Dieter Adam wurde beobachtet, dass das SMAC-Mimetikum BP in Kombination mit zVAD den in Caspase-8-defizienten humanen HT-29/C8/F11-Zellen vorhandenen Schutz vor Nekroptose überkommen kann (Saggau 2018). Da es sich bei der Caspase-8 zum einen um einen molekularen Schalter zwischen dem apoptotischen und nekroptotischen Zelltodweg handelt, und zum anderen die Induktion der Nekroptose in Tumorzellen einen wichtigen therapeutischen Ansatz darstellt, war es im nächsten Schritt von Interesse, folgende Fragen zu adressieren: Gibt es nach der Behandlung mit unterschiedlichen Apoptose- und Nekroptose-auslösenden Stimulationskombinationen Unterschiede im Hinblick auf Verlust der Membranintegrität und auf apoptotische und nekroptotische Marker, die durch die Rekonstitution von L929Ts/C8/B3-Zellen mit Protease-aktiven und -inaktiven Formen der humanen und murinen Caspase-8 und der Caspase-10 bedingt sind? Welchen Einfluss hat das SMAC-Mimetikum BP?

Zur Beantwortung der Fragen wurden folgende Stimulationen herangezogen: Unbehandelt, TNF (erwartet: Induktion von Nekroptose), CHX/TNF (erwartet: Induktion von Apoptose), zVAD/TNF (erwartet: Induktion von Nekroptose) und zVAD/CHX/TNF (erwartet: Induktion von Nekroptose), BP/TNF (erwartet: Induktion von Apoptose), CHX/BP/TNF (erwartet: Induktion von Apoptose), zVAD/BP/TNF (erwartet: Induktion von Nekroptose) und zVAD/CHX/BP/TNF (erwartet: Induktion von Nekroptose), jeweils ohne und mit vorheriger Inkubation mit Dox zur Induktion der Expression der Caspasen. Eine Übersicht der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen des Verlustes der Membranintegrität ist in der Abbildung 4.3.a dargestellt. Die Abbildung 4.3.b zeigt eine vereinfachte Darstellung der Dox-Stimulationen und die Abbildung 4.3.c dient dem Vergleich der Verluste der Membranintegritäten ohne und mit Induktion der Caspase-Expression. Die Ergebnisse der zugehörigen Western Blots, in denen die Proteine pMLKL, PARP-1 (gespalten) und Caspase-3 (gespalten) detektiert wurden, sind in der Abbildung 4.4 gezeigt.

Die parentalen L929Ts-, die Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3- sowie die mit der murinen und humanen Caspase-8 und der Caspase-10 (jeweils mit der Protease-aktiven (Wildtyp) oder -inaktiven (mutierten) Form) rekonstituierten L929Ts/C8/B3-Zellen zeigten eine Stimulations-abhängige Steigerung des Verlustes der Membranintegrität, welche wie folgt aussah: Dox < Dox/TNF < Dox/CHX/TNF < Dox/zVAD/TNF < Dox/zVAD/CHX/TNF und Dox/BP/TNF < Dox/CHX/BP/TNF < Dox/zVAD/BP/TNF < Dox/zVAD/CHX/BP/TNF (Abbildung 4.3.a und Abbildung 4.3.b). Die Zugabe von zVAD steigerte folglich den Verlust der Membranintegrität. Ohne die Zugabe von zVAD oder CHX löste BP in den parentalen L929Ts-Zellen keinen Zelltod aus, in Kombination mit zVAD oder CHX führte die Zugabe von BP hingegen zur Verstärkung des Zelltodes. Im Western Blot (Abbildung 4.4) wurden in allen Stimulationsansätzen ohne die Zugabe von zVAD in den parentalen L929Ts-Zellen, sowie in stabil mit der humanen und murinen Wildtyp-Caspase-8 und Wildtyp-Caspase-10 rekonstituierten L929Ts/C8/B3-Zellen gespaltenes PARP-1 und gesplattene Caspase-3 als Marker für Apoptose detektiert, am stärksten ausgeprägt für die humane Wildtyp-Caspase-8 und die Wildtyp-Caspase-10. In den parentalen L929Ts-Zellen waren die beiden Marker im Ansatz nach alleiniger Stimulation mit TNF allerdings nicht detektierbar, da TNF in diesen Zellen Nekroptose auslöst (Vercammen 1998b). In Übereinstimmung mit den Zytotoxizitätsassays waren nach alleiniger Stimulation mit BP ebenfalls keine apoptotischen Marker nachweisbar. Die Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen, sowie die L929Ts/C8/B3-Zellen, in welchen die Protease-inaktiven Formen der humanen und murinen Caspase-8 und der Caspase-10 exprimiert wurden, zeigten nach Stimulation ohne zVAD dagegen den nekroptotischen Marker pMLKL. Nach der Zugabe von zVAD zu den Stimulationen wurde ebenfalls in den parentalen L929Ts-Zellen (dort nur schwach), sowie in den L929Ts/C8/B3-Zellen, die die murine und humane Wildtyp-Caspase-8 und Wildtyp-Caspase-10 exprimieren, pMLKL detektiert. Mit Ausnahme von Wildtyp-Caspase-10 exprimierenden L929Ts/C8/B3-Zellen konnte nach der Zugabe von zVAD kein gespaltenes PARP-1 und keine gesplattene Caspase-3 detektiert werden. Im Einklang mit dem Verlust der Membranintegrität verstärkte die Zugabe von BP die apoptotischen Marker gespaltenes PARP-1 und gesplattene Caspase-3 bzw. den nekroptotischen Marker pMLKL, ausgeprägt jedoch nur nach Zugabe von CHX oder zVAD.

Zusammengefasst konnte durch die lentivirale Transduktion ein informatives murines Zellmodell zur Analyse der Spezies-spezifischen Rolle der Caspase-8 und der Caspase-10 in der Nekroptose generiert werden. So konnte die ursprüngliche Sensitivität der parentalen L929Ts-Zellen gegenüber der Induktion der Nekroptose in den deutlich sensitiveren Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen durch die Rekonstitution der L929Ts/C8/B3-Zellen mit der murinen Wildtyp-Caspase-8 wiederhergestellt werden. Die Rekonstitution von L929Ts/C8/B3-Zellen mit der humanen Wildtyp-Caspase-8 stellte den parental Phänotyp in geringerem Umfang wieder her, während die Rekonstitution mit der Wildtyp-Caspase-10 im Vergleich zur rekonstituierten murinen Wildtyp-Caspase-8 zu einem noch stärkeren Schutz gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes führte. Im Gegensatz zu den Protease-aktiven Caspasen führte die Expression der Protease-inaktiven Caspase-Formen in den murinen L929Ts/C8/B3-Modellzellen nicht zur Wiederherstellung des parental Phänotyps, d. h. es zeigte sich keine Verringerung der zellulären Sensitivität gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes. Im Hinblick auf die Art des induzierten Zelltodes starben die mit den Protease-aktiven Formen der Caspasen rekonstituierten L929Ts/C8/B3-Zellen nach der Zugabe von TNF ohne die Zugabe von zVAD durch Apoptose und nach der Zugabe von zVAD durch Nekroptose. Die Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen, sowie die mit Protease-inaktiven Formen der Caspasen rekonstituierten L929Ts/C8/B3-Zellen zeigten ausschließlich nekroptotischen Zelltod. BP selbst konnte keinen Zelltod auslösen, diesen in Kombination mit TNF, zVAD und/oder CHX jedoch verstärken. Insgesamt deuten die Ergebnisse im murinen Zellmodell auf eine unterschiedliche Funktion der murinen und humanen Wildtyp-Caspase-8 in der Nekroptose, sowie auf eine mögliche Übernahme von Funktionen der Wildtyp-Caspase-10 durch die murine Wildtyp-Caspase-8 nach Verlust der Wildtyp-Caspase-10 aus dem murinen Genom hin.



a)

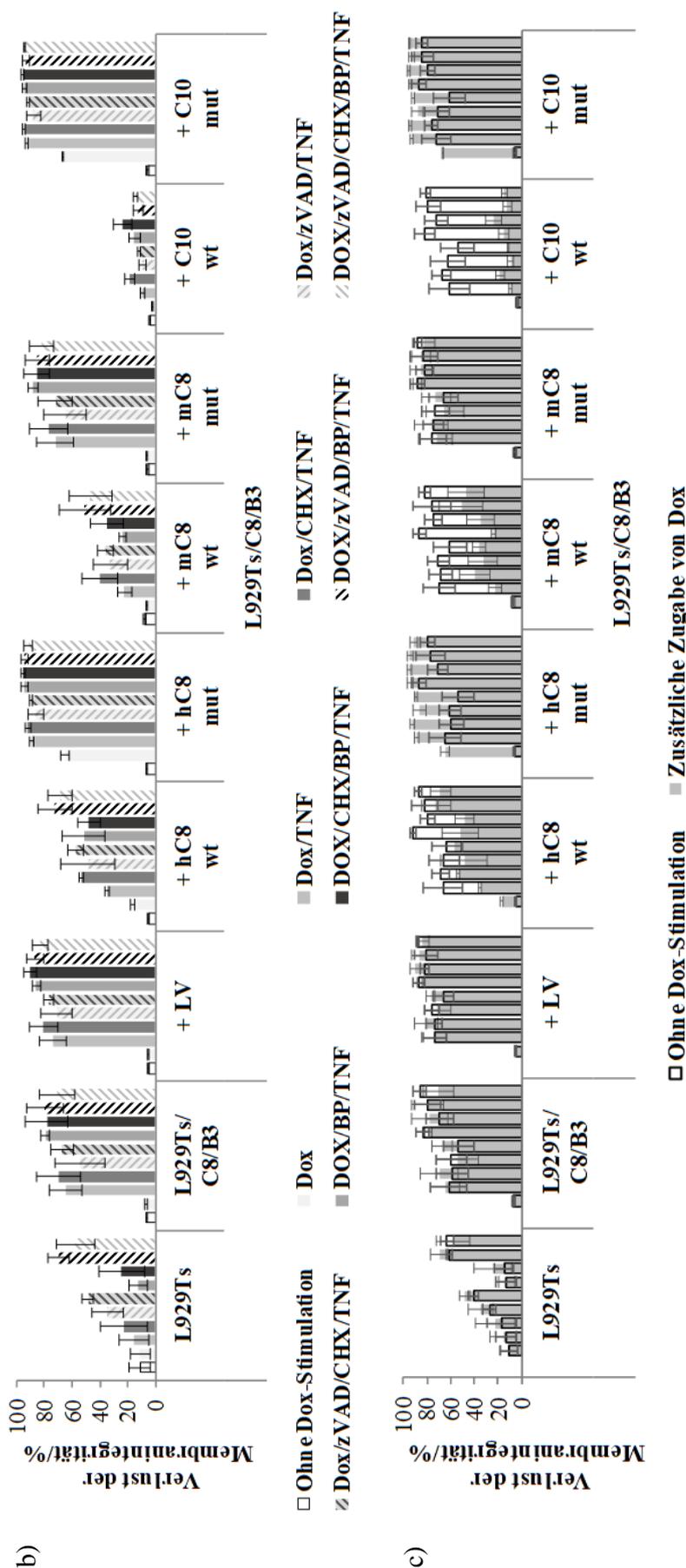
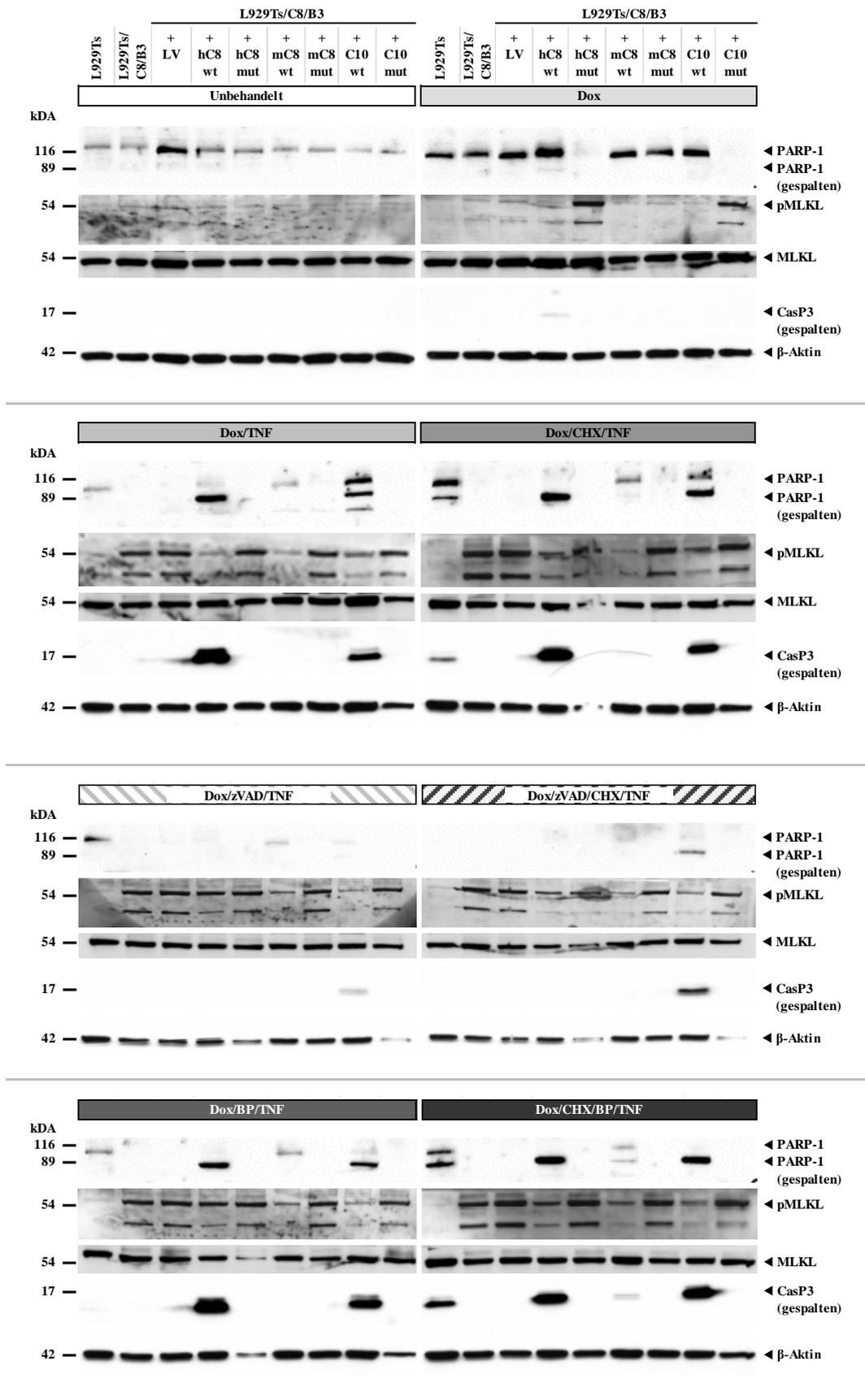


Abbildung 43: Lentivirale Rekonstitution der murinen Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität via FACS.

Die Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität erfolgte in murinen L929Ts-, L929Ts/C8/B3- und L929Ts/C8/B3-Zellen, welche stabil mit der humanen (hC8) und murinen Caspase-8 (mC8) und der Caspase-10 (C10) (Wildtyp (wt)- und mutierten (mut)-Form) rekonstituiert worden waren. Als Kontrolle dienten mit Leervektor (LV) rekonstituierte L929Ts/C8/B3-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder zur Induktion der Caspase-Expression mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Dox für 24 Stunden inkubiert. Zur Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität erfolgte eine 30-minütige Prästimulation mittels folgender Stimulationskombinationen: Unbehandelt, zVAD, CHX, zVAD/CHX, BP, CHX/BP, zVAD/BP oder zVAD/CHX/BP ($20 \mu\text{M}$ zVAD, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ CHX, $1 \mu\text{M}$ BP). Die Induktion des Zelltodes erfolgte durch die Zugabe von 100 ng mL^{-1} TNF für 2 Stunden. Der Verlust der Membrantintegrität wurde mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen bestimmt. **(a)** Übersicht der Ergebnisse. Aufgetragen ist der Mittelwert des Verlustes der Membrantintegrität, sowie dessen Standardfehler, ermittelt aus drei biologischen Replikaten à drei technischen Replikaten. **(b)** Vereinfachte Darstellung der Dox-Stimulationen. **(c)** Vereinfachte Darstellung der Caspase-Expression auf den Verlust der Membrantintegrität. Gezeigt ist dieselbe Stimulationsreihenfolge wie in **(a)** und **(b)**.



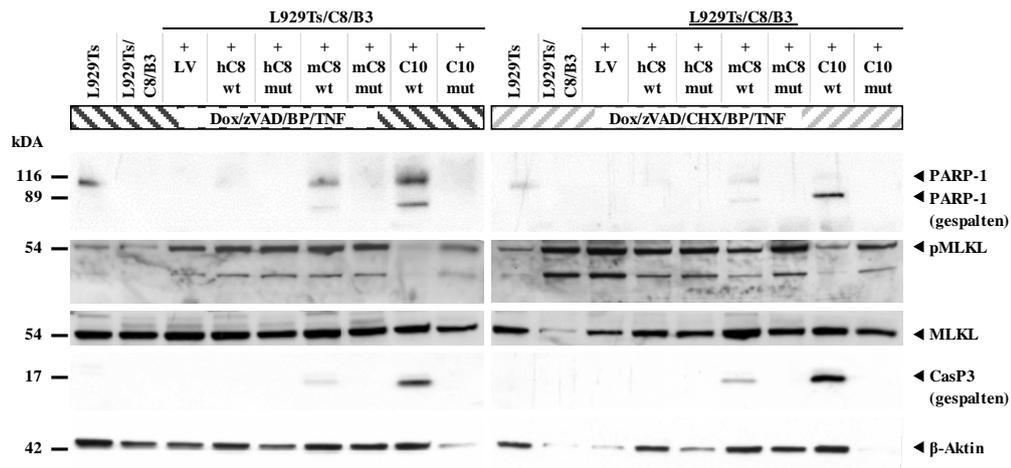


Abbildung 4.4: Lentivirale Rekonstitution der murinen Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität via Western Blot.

Die Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität erfolgte in murinen L929Ts-, L929Ts/C8/B3- und L929Ts/C8/B3-Zellen, welche stabil mit der humanen (hC8) und murinen Caspase-8 (mC8) und der Caspase-10 (C10) (Wildtyp (wt)- und mutierten (mut)-Form) rekonstituiert worden waren. Als Kontrolle dienten mit Leervektor (LV) rekonstituierte L929Ts/C8/B3-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder zur Induktion der Caspase-Expression mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Dox für 24 Stunden inkubiert. Zur Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität erfolgte eine 30-minütige Prästimulation mittels folgender Stimulationskombinationen: Unbehandelt, zVAD, CHX, zVAD/CHX, BP, CHX/BP, zVAD/BP oder zVAD/CHX/BP ($20 \mu\text{M}$ zVAD, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ CHX, $1 \mu\text{M}$ BP). Die Induktion des Zelltodes erfolgte durch die Zugabe von 100 ng mL^{-1} TNF für 2 Stunden. Der Nachweis der nekroptotischen (pMLKL) und apoptotischen Marker (gespaltenes PARP-1, gesplattene Caspase-3 (CasP3)) erfolgte mittels spezifischem pMLKL/MLKL (54 kDa)-, PARP-1 (116/89 (gespalten) kDa)- und Caspase-3 (17 (gespalten) kDa)-Antikörpernachweis. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa).

Analysen in den humanen Caspase-8-defizienten Modellzellen HT-29/C8/F11

Für die weitere Analyse der Spezies-spezifischen Rolle der Caspase-8 und der Funktion der Caspase-10 im nekroptotischen Signalweg wurden im nächsten Schritt humane Caspase-8-defiziente HT-29/C8/F11-Zellen untersucht. Die Rekonstitution der humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen mit den Protease-aktiven (Wildtyp) und -inaktiven (mutierten) Formen der murinen und humanen Caspase-8 und der Caspase-10 erfolgte ebenfalls durch lentivirale Transduktion. Im humanen Zellmodell konnte ebenso wie im murinen Zellmodell eine geringere Expression der humanen Caspase-8 im Vergleich zur murinen Caspase-8 und zur Caspase-10 beobachtet werden. Darüber hinaus zeigte die Caspase-10 bereits in Abwesenheit von Dox eine geringgradige „leaky“-Expression (Abbildung 4.5).

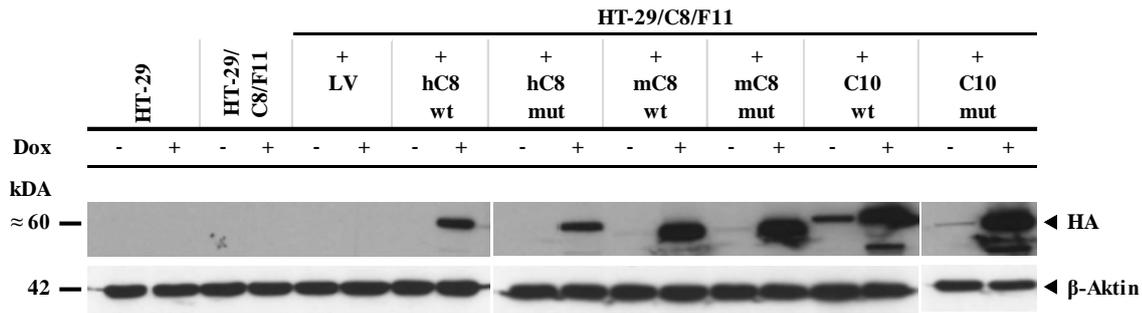
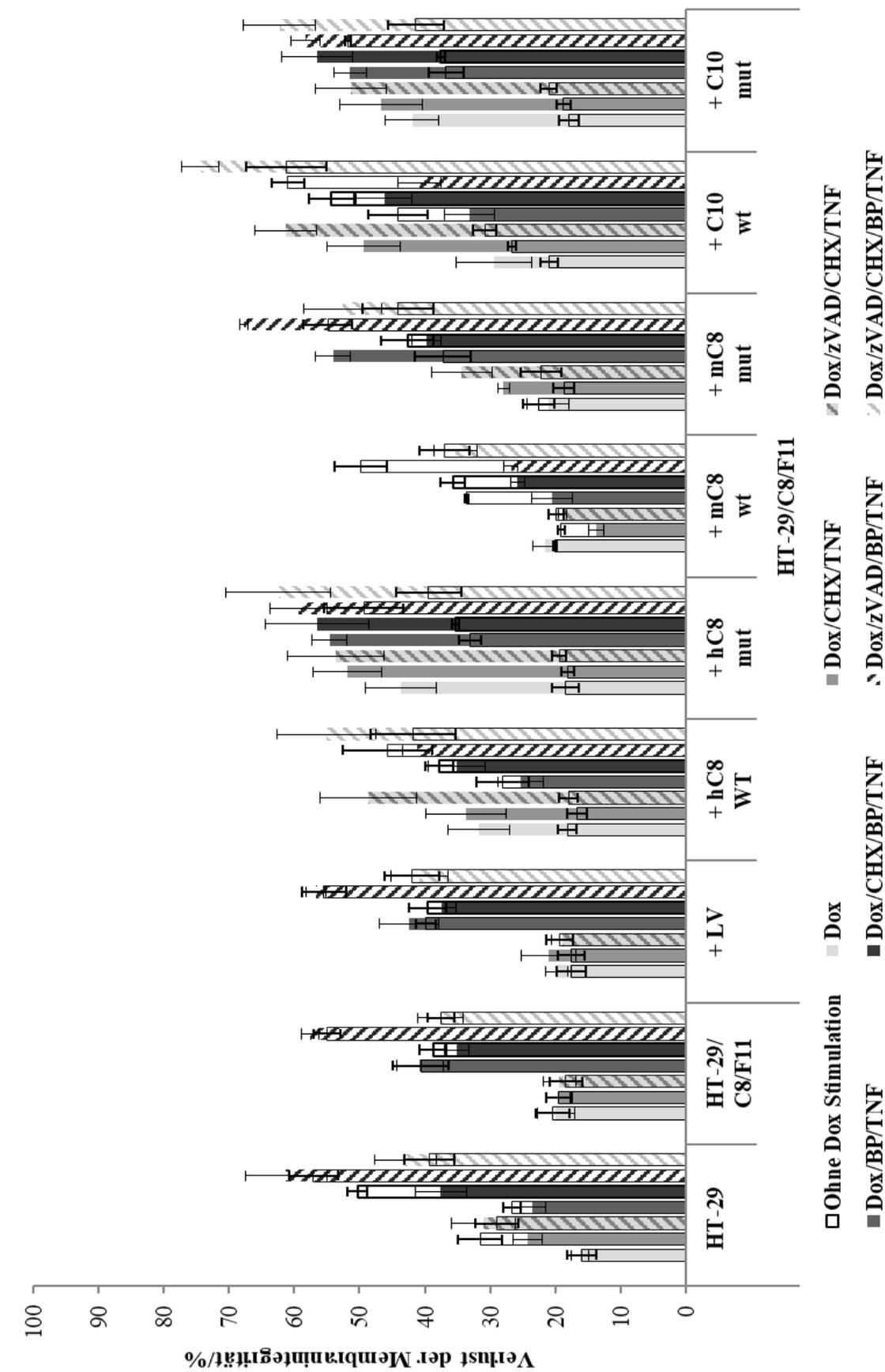


Abbildung 4.5: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Caspase-Expression.

Die Analyse der Caspase-Expression erfolgte in HT-29-, HT-29/C8/F11- und HT-29/C8/F11-Zellen, welche stabil mit der humanen (hC8) und murinen Caspase-8 (mC8) und der Caspase-10 (C10) (Wildtyp (wt)- und mutierten (mut)-Form) rekonstituiert worden waren. Als Kontrolle dienten mit Leervektor (LV) rekonstituierte HT-29/C8/F11-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen (-) oder zur Induktion der Caspase-Expression mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Dox (+) für 24 Stunden inkubiert. Der Nachweis der Expression der Caspasen erfolgte im Western Blot mittels spezifischem HA-Antikörper mit einer zu erwartenden Größe der Caspasen um 60 kDa. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa).

Zur Analyse der humanen HT-29-Zellen wurde dasselbe Stimulationsmuster wie in den murinen L929Ts-Zellen herangezogen. Da HT-29-Zellen im Gegensatz zu L929Ts-Zellen zur Induktion des Zelltodes sensitiviert werden müssen, wurden Stimulationen ohne Sensitivierung, d. h. nur mit TNF und zVAD/TNF, nicht durchgeführt. Die Abbildung 4.6.a zeigt eine Übersicht der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen des Verlustes der Membranintegrität. Eine vereinfachte Darstellung der Dox-Stimulationen ist in der Abbildung 4.6.b gezeigt. Die Abbildung 4.6.c gibt den Vergleich der Verluste der Membranintegritäten ohne und mit Induktion der Caspase-Expression wieder. Die Ergebnisse der zugehörigen Western Blots, in denen die Proteine pMLKL, PARP-1 (gespalten) und Caspase-3 (gespalten) detektiert wurden, sind in der Abbildung 4.7 dargestellt. Im Gegensatz zu den murinen L929Ts/C8/B3-Zellen, in denen die Deletion der Caspase-8 den nekroptotischen Zelltod verstärkte, führte die Deletion der Caspase-8 in den humanen HT-29-Zellen zu einem Schutz gegenüber der Nekroptose, im Einklang mit früheren Ergebnissen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam (Voigt 2014). So wurde, wie in der Abbildung 4.6.a gezeigt, für die parentalen HT-29-Zellen ein Verlust der Membranintegrität von 29 % nach der Stimulation mit zVAD/CHX/TNF, welcher durch die Zugabe von BP auf 43 % stieg, detektiert. Die Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen zeigten nach Stimulation mit zVAD/CHX/TNF hingegen lediglich einen Verlust der Membranintegrität von 19 %. Dieser Schutz wurde durch die Zugabe von BP mit einer Verdopplung des Verlustes der Membranintegrität (38 %) jedoch aufgehoben. Die Dox-induzierte Expression der humanen Wildtyp-Caspase-8 in den HT-29/C8/F11-Zellen konnte

den parentalen Phänotyp, d. h. die „normale“ Sensitivität gegen Induktion der Nekroptose, wiederherstellen, nicht jedoch die Dox-induzierte Expression der murinen Wildtyp-Caspase-8. Die mit der Wildtyp-Caspase-10 rekonstituierten HT-29/C8/F11-Zellen wiesen im Vergleich zu den parentalen HT-29-Zellen einen erhöhten Verlust der Membranintegrität auf. In diesen Zellen war der parentale Phänotyp also nicht nur wiederhergestellt, sondern die Zellen zeigten sogar eine höhere Sensitivität als die parentalen HT-29-Zellen. Nach der Rekonstitution von HT-29/C8/F11-Zellen mit den Protease-inaktiven Formen der humanen Caspase-8 und der Caspase-10 konnte in beiden Fällen ein Verlust der Membranintegrität von über 40 % bereits nach der alleinigen Zugabe von Dox, also eine hohe Toxizität nur durch die Expression der mutierten Caspasen ohne weitere Stimulation, gemessen werden. Die Dox-induzierte Expression der murinen mutierten Caspase-8 führte hingegen zu keiner deutlichen Veränderung der Nekroptose-Sensitivität. Ebenso wie in den parentalen HT-29- und Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen bewirkte die Stimulation mit Dox/zVAD/CHX/BP/TNF in mit den Protease-aktiven und -inaktiven Formen der humanen und murinen Caspase-8 und der Caspase-10 rekonstituierten HT-29/C8/F11-Zellen den höchsten Verlust der Membranintegrität. Im Hinblick auf die Analyse der nekroptotischen (pMLKL) und apoptotischen Marker (gespaltenes PARP-1 und gesplattene Caspase-3) im Western Blot (Abbildung 4.7), war der nach Stimulation induzierte Zelltod der parentalen HT-29-Zellen ohne zVAD apoptotisch (stark ausgeprägt) und mit zVAD nekroptotisch (schwach ausgeprägt). Für die Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen wurden bei keiner Stimulation apoptotische Marker detektiert und die Stimulationen mit Dox/BP/TNF und Dox/CHX/BP/TNF erzeugten in diesen Zellen deutliche pMLKL-Signale. Die mit der humanen Wildtyp-Caspase-8 und Wildtyp-Caspase-10 rekonstituierten HT-29/C8/F11-Zellen zeigten wie die parentalen HT-29-Zellen ohne die Zugabe von zVAD zu den Stimulationen apoptotische und nach der Zugabe von zVAD nekroptotische Marker, sodass der parentale Phänotyp nach der Rekonstitution der HT-29/C8/F11-Zellen mit den Protease-aktiven Formen der humanen Caspase-8 und der Caspase-10 wiederhergestellt wurde. In Übereinstimmung mit dem Toxizitätsassay zeigten mit der murinen Wildtyp-Caspase-8 rekonstituierte HT-29/C8/F11-Zellen weder apoptotische noch nekroptotische Marker. Die in HT-29/C8/F11-Zellen rekonstituierten Protease-inaktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 und der Caspase-10 wiesen wie die Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen bei keiner Stimulation apoptotische Marker auf, jedoch starke pMLKL-Signale nach Stimulation mit Dox/BP/TNF, Dox/CHX/TNF und Dox/CHX/BP/TNF.



a)

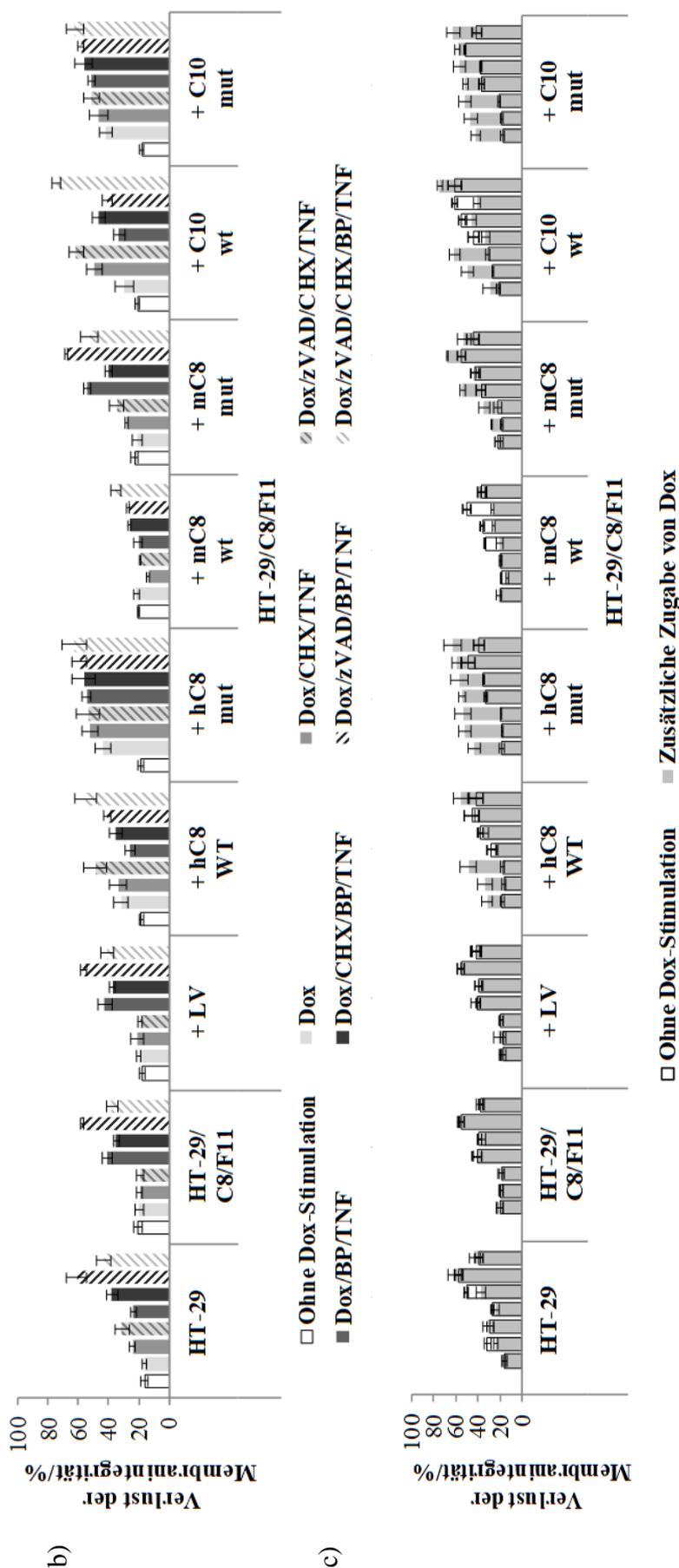


Abbildung 46: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität via FACS.

Die Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität erfolgte in humanen HT-29-, HT-29/C8/F11- und HT-29/C8/F11-Zellen, welche stabil mit der humanen (hC8) und murinen Caspase-8 (mC8) und der Caspase-10 (C10) (Wildtyp (wt)- und mutierten (mut)-Form) rekonstituiert worden waren. Als Kontrolle dienten mit Leervektor (LV) rekonstituierte HT-29/C8/F11-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder zur Induktion der Caspase-Expression mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Dox für 24 Stunden inkubiert. Zur Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität erfolgte eine 30-minütige Prästimulation mittels folgender Stimulationskombinationen: Unbehandelt, CHX, zVAD/CHX, BP, CHX/BP, zVAD/BP oder zVAD/CHX/BP ($20 \mu\text{M}$ zVAD, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ CHX, $1 \mu\text{M}$ BP). Die Induktion des Zelltodes erfolgte durch die Zugabe von 100 ng mL^{-1} TNF für 24 Stunden. Der Verlust der Membrantintegrität wurde mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen bestimmt. (a) Übersicht der Membrantintegrität. Aufgetragen ist der Mittelwert des Verlustes der Membrantintegrität, sowie dessen Standardfehler, ermittelt aus drei biologischen Replikaten. (b) Vereinfachte Darstellung der Dox-Stimulationen. (c) Vereinfachte Darstellung der Auswirkung der Caspase-Expression auf den Verlust der Membrantintegrität. Gezeigt ist dieselbe Stimulationsreihenfolge wie in (a) und (b).

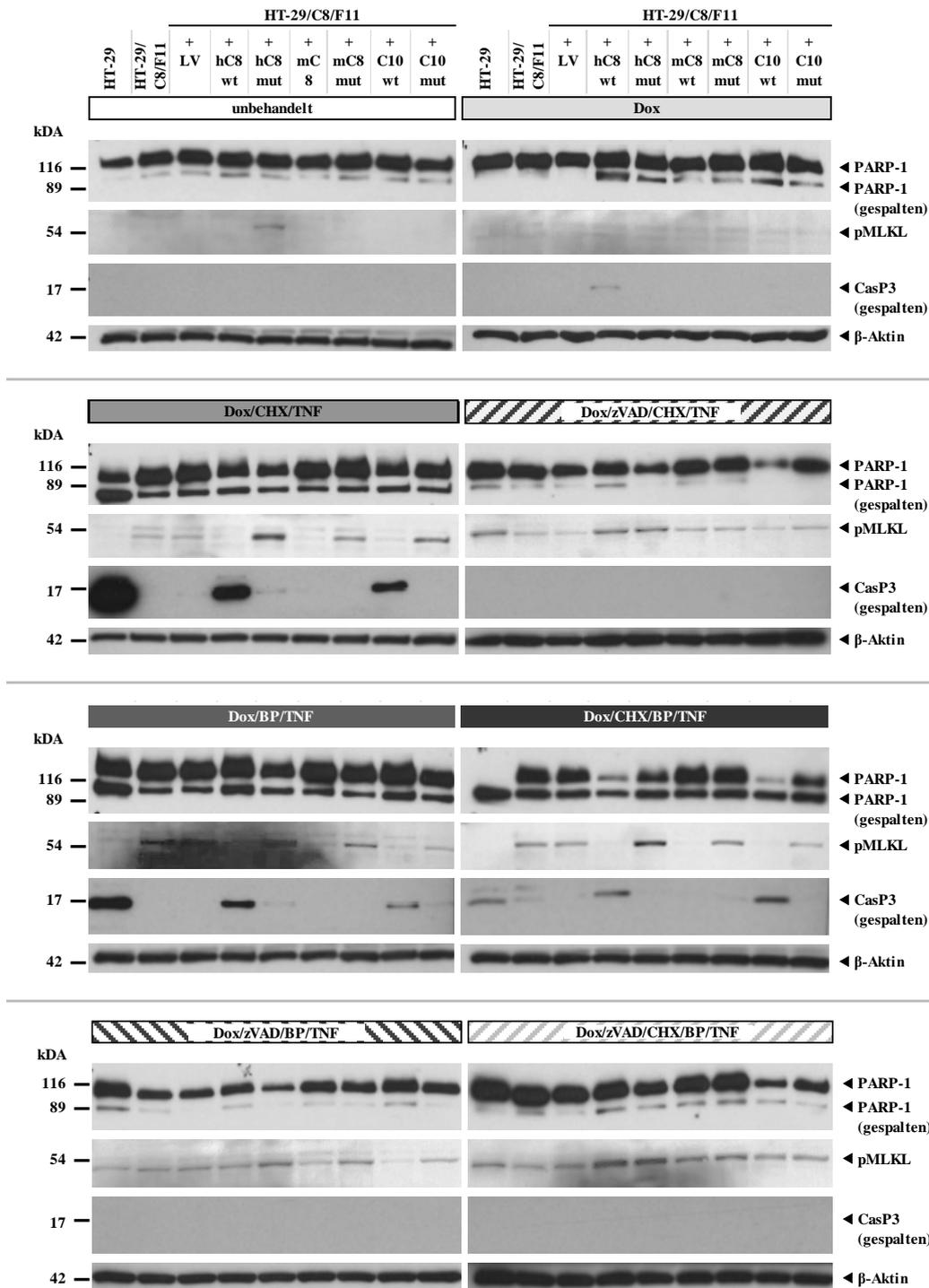


Abbildung 4.7: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität via Western Blot.

Die Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität erfolgte in humanen HT-29-, HT-29/C8/F11- und HT-29/C8/F11-Zellen, welche stabil mit der humanen (hC8) und murinen Caspase-8 (mC8) und der Caspase-10 (C10) (Wildtyp (wt)- und mutierten (mut)-Form) rekonstituiert worden waren. Als Kontrolle dienten mit Leervektor (LV) rekonstituierte HT-29/C8/F11-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder zur Induktion der Caspase-Expression mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Dox für 24 Stunden inkubiert. Zur Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität erfolgte eine 30-minütige Prästimulation mittels folgender Stimulationskombinationen: Unbehandelt, CHX, zVAD/CHX, BP, CHX/BP, zVAD/BP oder zVAD/CHX/BP ($20 \mu\text{M}$ zVAD, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ CHX, $1 \mu\text{M}$ BP). Die Induktion des Zelltodes erfolgte durch die Zugabe von 100 ng mL^{-1} TNF für 24 Stunden. Der Nachweis der nekroptotischen (pMLKL) und apoptotischen Marker (gespaltenes PARP-1, gesplattene Caspase-3 (CasP3)) erfolgte mittels spezifischem pMLKL (54 kDa)-, PARP-1 (116/89 (gespalten) kDa)- und Caspase-3 (17 (gespalten) kDa)-Antikörpernachweis. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa).

Zusätzlich zur Detektion des nekroptotischen Markers pMLKL im Western Blot wurde die Induktion des nekroptotischen Zelltodes validiert, indem GSK'872, ein spezifischer Inhibitor von RIPK3, zugegeben wurde. Hierfür wurden die parentalen HT-29-, die Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11- und die mit den Protease-aktiven und -inaktiven Formen der humanen und murinen Caspase-8 und der Caspase-10 rekonstituierten HT-29/C8/F11-Zellen unbehandelt belassen oder folgendermaßen stimuliert: Dox, Dox/CHX/BP/TNF oder Dox/zVAD/BP/TNF, jeweils ohne und mit Zugabe von GSK'872. Die Ergebnisse der Messungen des Verlustes der Membranintegrität sind in der Abbildung 4.8 dargestellt.

Wie dort gezeigt, reduzierte die Zugabe von GSK'872 den Verlust der Membranintegrität in allen Zellen, die mit Dox/zVAD/CHX/BP/TNF als Induktor von Nekroptose stimuliert worden waren. Bei Behandlung der Zellen mit Dox/CHX/BP/TNF (erwartet: Induktion von Apoptose) zeigte die Zugabe von GSK'872 in den parentalen HT-29-, sowie in den mit der Protease-aktiven Form der humanen Caspase-8 rekonstituierten Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen keine Wirkung. In den Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen, in denen Dox/CHX/BP/TNF keine Apoptose, sondern nur Nekroptose induzieren kann, führte die Zugabe von GSK'872 jedoch wieder zu einer deutlichen Reduzierung des Verlustes der Membranintegrität, ebenso wie in den Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen, die mit den Protease-inaktiven Formen der humanen und murinen Caspase-8 und der Caspase-10 rekonstituiert worden waren. In geringerem Maße war dies auch in den Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen der Fall, die mit den Protease-aktiven Formen der murinen Caspase-8 und der Caspase-10 rekonstituiert worden waren. Dies könnte darauf hindeuten, dass Dox/CHX/BP/TNF in diesen Zellen zwar hauptsächlich apoptotischen Zelltod induziert, zu einem geringen Grad jedoch auch Nekroptose stattfindet, möglicherweise, weil die rekonstituierten Protease-aktiven Formen der murinen Caspase-8 und der Caspase-10 die Funktion der humanen Caspase-8 in den Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen zwar teilweise, aber nicht vollständig ersetzen können.

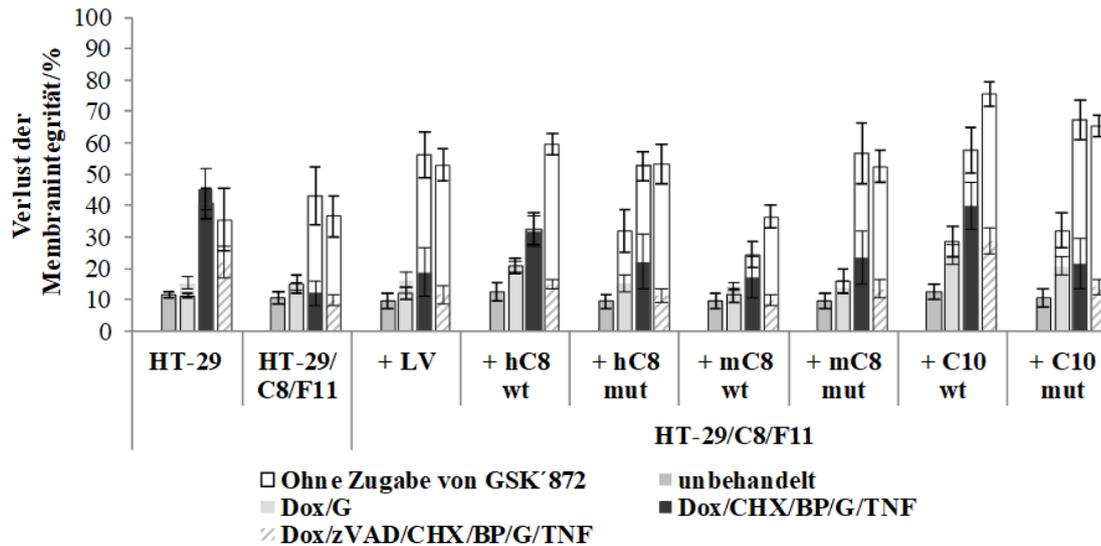


Abbildung 4.8: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse des nekroptotischen Zelltodes nach Zugabe des RIPK3-Inhibitors GSK´872 (G).

Die Analyse des nekroptotischen Zelltodes nach Zugabe des RIPK3-Inhibitors GSK´872 erfolgte in humanen HT-29-, HT-29/C8/F11- und HT-29/C8/F11-Zellen, welche stabil mit der humanen (hC8) und murinen Caspase-8 (mC8) und der Caspase-10 (C10) (Wildtyp (wt)- und mutierten (mut)-Form) rekonstituiert worden waren. Als Kontrolle dienten mit Leervektor (LV) rekonstituierte HT-29/C8/F11-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder zur Induktion der Caspase-Expression mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Dox für 24 Stunden inkubiert. Zur Analyse des nekroptotischen Zelltodes nach Zugabe von GSK´872 erfolgte eine 30-minütige Prästimulation mittels folgender Stimulationskombinationen: Unbehandelt, CHX/BP und zVAD/CHX/BP ($20 \mu\text{M}$ zVAD, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ CHX, $1 \mu\text{M}$ BP), jeweils ohne und mit der Zugabe von GSK´872 ($10 \mu\text{M}$). Die Induktion des Zelltodes erfolgte durch die Zugabe von 100 ng mL^{-1} TNF für 24 Stunden. Der Verlust der Membranintegrität wurde mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert des Verlustes der Membranintegrität, sowie dessen Standardfehler, ermittelt aus vier biologischen Replikaten.

Insgesamt konnte bestätigt werden, dass die Deletion der humanen Caspase-8 in HT-29-Zellen, im Gegensatz zur Deletion der Caspase-8 in murinen L929Ts-Zellen, zum Schutz gegenüber der Induktion der Nekroptose führt. Die mit der humanen Wildtyp-Caspase-8 und Wildtyp-Caspase-10 rekonstituierten HT-29/C8/F11-Zellen zeigten wie die parentalen HT-29-Zellen abhängig von der Zugabe von zVAD nach Stimulation nekroptotischen (mit zVAD-Zugabe) oder apoptotischen (ohne zVAD-Zugabe) Zelltod. Dies spricht zum einen dafür, dass mittels der Rekonstitution der Protease-aktiven Form der humanen Caspase-8 der parentale Phänotyp wiederhergestellt wurde und zum anderen, dass die Protease-aktive Form der Caspase-10 die Funktion der humanen Wildtyp-Caspase-8 übernehmen konnte. Dies ist für die murine Wildtyp-Caspase-8 offenbar nicht der Fall, da mit ihr rekonstituierte HT-29/C8/F11-Zellen unabhängig von der Induktion von Apoptose oder Nekroptose im Western Blot weder apoptotische noch nekroptotische Marker zeigten und auch im Toxizitätsassay kein wesentlicher Einfluss der Rekonstitution feststellbar war. Die Zugabe des RIPK3-Inhibitors GSK´872 nach Induktion des Zelltodes mit Dox/zVAD/CHX/BP/TNF führte in diesen Zellen zwar zu einer Reduktion des Zelltodes, diese war aber identisch auch

in nicht-rekonstituierten HT-29/C8/F11-Zellen sichtbar, und daher nicht auf die rekonstituierte murine Wildtyp-Caspase-8 zurückzuführen. Die humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11- sowie die mit den Protease-inaktiven Formen der humanen und murinen Caspase-8 und der Caspase-10 rekonstituierten HT-29/C8/F11-Zellen zeigten unabhängig von der Zugabe von zVAD nach Stimulation nekroptotischen Zelltod, der ebenfalls durch GSK'872 reduziert wurde.

Analysen in den humanen Caspase-10-defizienten Modellzellen HT-29/C10/G14

Für ein besseres Verständnis der Rolle der Caspase-10 im nekroptotischen Signalweg und für eine vertiefende Analyse der Spezies-spezifischen Rolle der Caspase-8 wurden im Folgenden Untersuchungen in humanen Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die HT-29/C10/G14-Zellen mit den Protease-aktiven (Wildtyp) und -inaktiven (mutierten) Formen der murinen und humane Caspase-8 und der Caspase-10 mittels lentiviraler Transduktion rekonstituiert. Die Ergebnisse der Caspase-Expression nach der lentiviralen Transduktion sind in der Abbildung 4.9 wiedergegeben und zeigen erneut eine im Vergleich zur murinen Caspase-8 und zur Caspase-10 verminderte Expression der humanen Caspase-8 (sowohl für die Protease-aktive und -inaktive Form). Darüber hinaus konnte wiederum eine „leaky“ Expression der Caspase-10 detektiert werden.

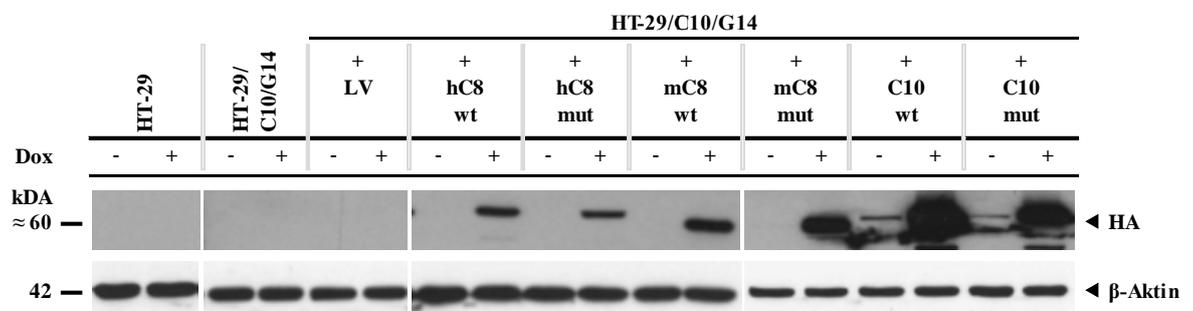


Abbildung 4.9: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Caspase-Expression.

Die Analyse der Caspase-Expression erfolgte in HT-29-, HT-29/C10/G14- und HT-29/C10/G14-Zellen, welche stabil mit der humanen (hC8) und murinen Caspase-8 (mC8) und der Caspase-10 (C10) (Wildtyp (wt)- und mutierten (mut)-Form) rekonstituiert worden waren. Als Kontrolle dienten mit Leervektor (LV) rekonstituierte HT-29/C10/G14-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen (-) oder zur Induktion der Caspase-Expression mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Dox (+) für 24 Stunden inkubiert. Der Nachweis der Expression der Caspasen erfolgte im Western Blot mittels spezifischem HA-Antikörper mit einer zu erwartenden Größe der Caspasen um 60 kDa. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa).

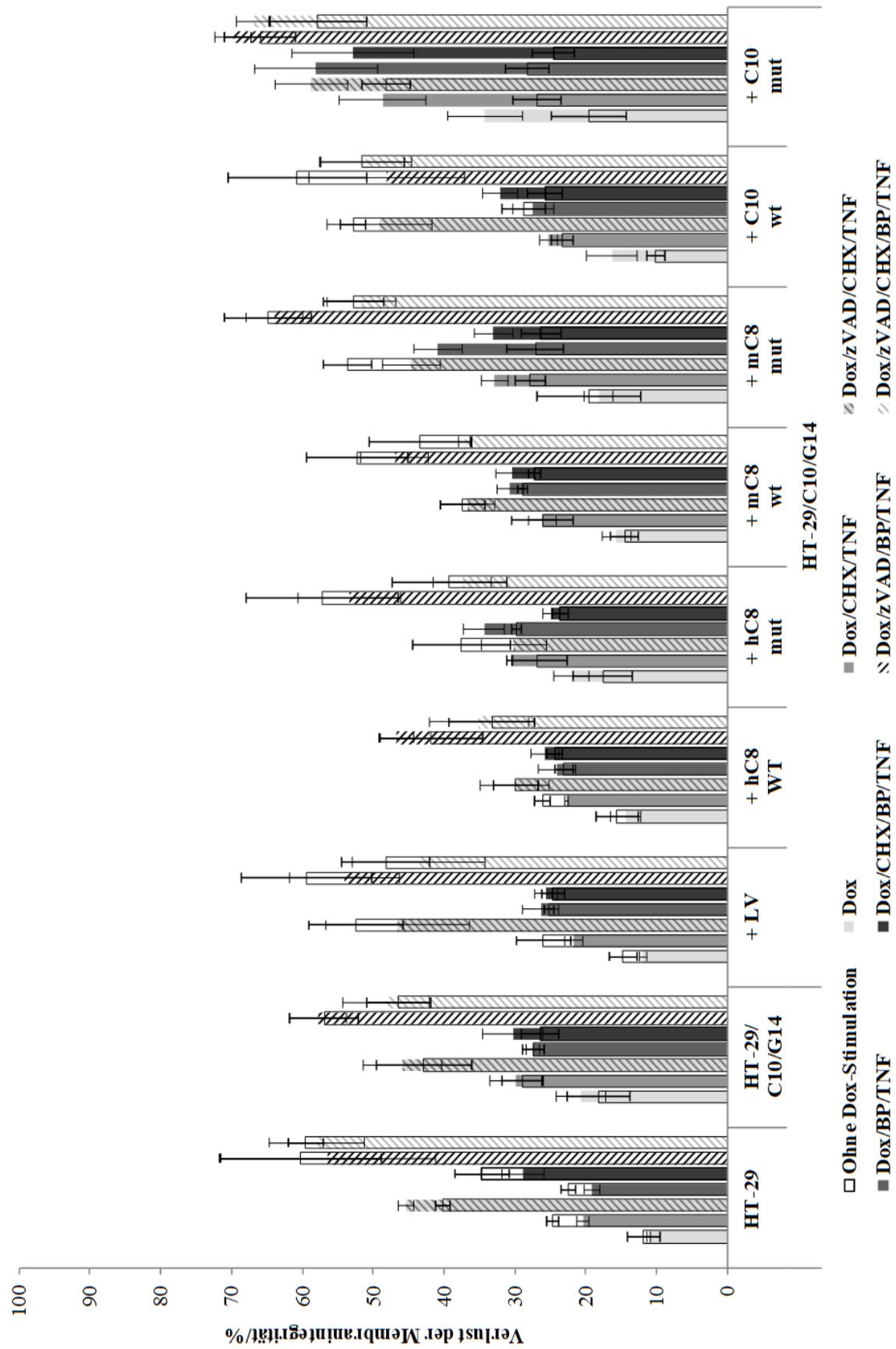
Die Untersuchung der Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen erfolgte unter Verwendung desselben Stimulationsmusters wie in den Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen. Eine Übersicht der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung des Verlustes der Membranintegrität ist in der Abbildung 4.10.a wiedergegeben. Eine vereinfachte Darstellung der Dox-Stimulationen findet sich in der Abbildung 4.10.b. Die Verluste der Membranintegritäten ohne und mit Induktion der Caspase-Expression sind vergleichend in der Abbildung 4.10.c gezeigt. Die Ergebnisse der zugehörigen Western Blots, in denen die Proteine pMLKL, PARP-1 (gespalten) und Caspase-3 (gespalten) detektiert wurden, sind in der Abbildung 4.11 dargestellt.

Die parentalen HT-29- und die Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen wiesen mit einem Verlust der Membranintegrität von 40 bzw. 43 % nach der Stimulation mit zVAD/CHX/TNF eine ähnliche Sensitivität gegenüber der Induktion des Zelltodes auf (Abbildung 4.10.a). Durch die Zugabe von BP konnte der Zelltod um 20 % im Fall der parentalen HT-29-Zellen und um 4 % im Fall der Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen erhöht werden. Nach Dox-induzierter Expression der rekonstituierten Protease-aktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 und der Caspase-10, sowie den Protease-inaktiven Formen der humanen und murinen Caspase-8 konnte unabhängig von der Art der Stimulation keine wesentliche Veränderung des Verlustes der Membranintegrität detektiert werden, einzig die Expression der Protease-inaktiven Form der Caspase-10 in den HT-29/C10/G14-Zellen führte zu einem erhöhten Zelltod. Die Analyse der nekroptotischen und apoptotischen Marker im Western Blot (Abbildung 4.11) zeigte, dass in den verschiedenen Stimulationsansätzen TNF ohne Zugabe von zVAD uniform in allen Zellen die apoptotische Spaltung von PARP-1 und Caspase-3 induzierte, am stärksten ausgeprägt für die kombinierte Prästimulation mit CHX und BP. Eine nekroptotische Phosphorylierung von MLKL war ohne Zugabe von zVAD in keinem der Ansätze zu beobachten. Nach der Zugabe von zVAD war jedoch in allen Dox/zVAD/CHX/TNF- und Dox/zVAD/CHX/BP/TNF-stimulierten Zellen pMLKL als Marker für Nekroptose detektierbar. In Dox/zVAD/BP/TNF-stimulierten Zellen waren nur sehr schwache pMLKL-Signale erkennbar, was möglicherweise auf technische Ursachen zurückzuführen ist und in zukünftigen Experimenten bestätigt werden muss. Im Einklang mit dem uniform nekroptotischen Tod der Zellen in den zVAD-behandelten Stimulationsansätzen konnte in keinem dieser Ansätze gesplattene Caspase-3 als Marker für Apoptose detektiert werden. Momentan im Widerspruch dazu zeigten alle Ansätze jedoch eine geringgradige Spaltung

des zweiten apoptotischen Markers PARP-1, was ebenfalls in weiteren Experimenten geklärt werden muss.

Die Induktion des nekroptotischen Zelltodes wurde unabhängig von der Analyse des nekroptotischen Markers pMLKL im Western Blot durch die Zugabe des spezifischen RIPK3-Inhibitors GSK'872 validiert (Abbildung 4.12). In den parental HT-29- und in mit den Protease-aktiven und -inaktiven Formen der Caspase-10 rekonstituierten Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen bewirkte die Zugabe von GSK'872 zu den mit Dox/zVAD/CHX/BP/TNF zur Induktion von Nekroptose stimulierten Zellen eine Reduktion des Zelltodes um 13 bzw. 15 bzw. 13 %, während in Caspase-10-defizienten und mit den Protease-aktiven und -inaktiven Formen der humanen und murinen Caspase-8 rekonstituierten Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen keine wesentlichen Veränderungen des Verlustes der Membranintegrität feststellbar waren. Nach Stimulation der Zellen mit Dox/CHX/BP/TNF zur Induktion von Apoptose blieb der Verlust der Membranintegrität nach Zugabe des Nekroptose-Inhibitors GSK'872 im wesentlichen unverändert, mit Ausnahme der mit der Protease-inaktiven Form der Caspase-10 rekonstituierten Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen. In diesen Zellen war jedoch bereits die Dox-induzierte Expression der Protease-inaktiven Caspase-10 ohne weitere Stimulation zytotoxisch, und die Zugabe von GSK'872 konnte auch hier den Verlust der Membranintegrität fast auf das Niveau der unbehandelten Zellen reduzieren. Dies spricht dafür, dass die Expression der Protease-inaktiven Form der Caspase-10 unabhängig von der Anwesenheit anderer Stimuli ausreicht, um Nekroptose zu induzieren.

Die Expression der Protease-inaktiven Form der humanen Caspase-8 verursachte sowohl in den murinen L929Ts/C8/B3- als auch in den humanen HT-29/C8/F11-Zellen einen hohen Verlust der Membranintegrität. Ein hoher Verlust der Membranintegrität war ebenfalls in den murinen L929Ts/C8/B3- und humanen HT-29/C8/F11- und HT-29/C10/G14-Zellen, welche die Protease-inaktive Form der Caspase-10 exprimieren, zu detektieren. Aufgrund dessen wurde untersucht, ob die Mutanten als *scaffold* möglicherweise den pyroptotischen Zelltod auslösen. In den drei untersuchten Zellmodellen wurde jedoch keine Pyroptose (Nachweis von GSDMD-N) detektiert (Anhang, Abbildung 9.1).



a)

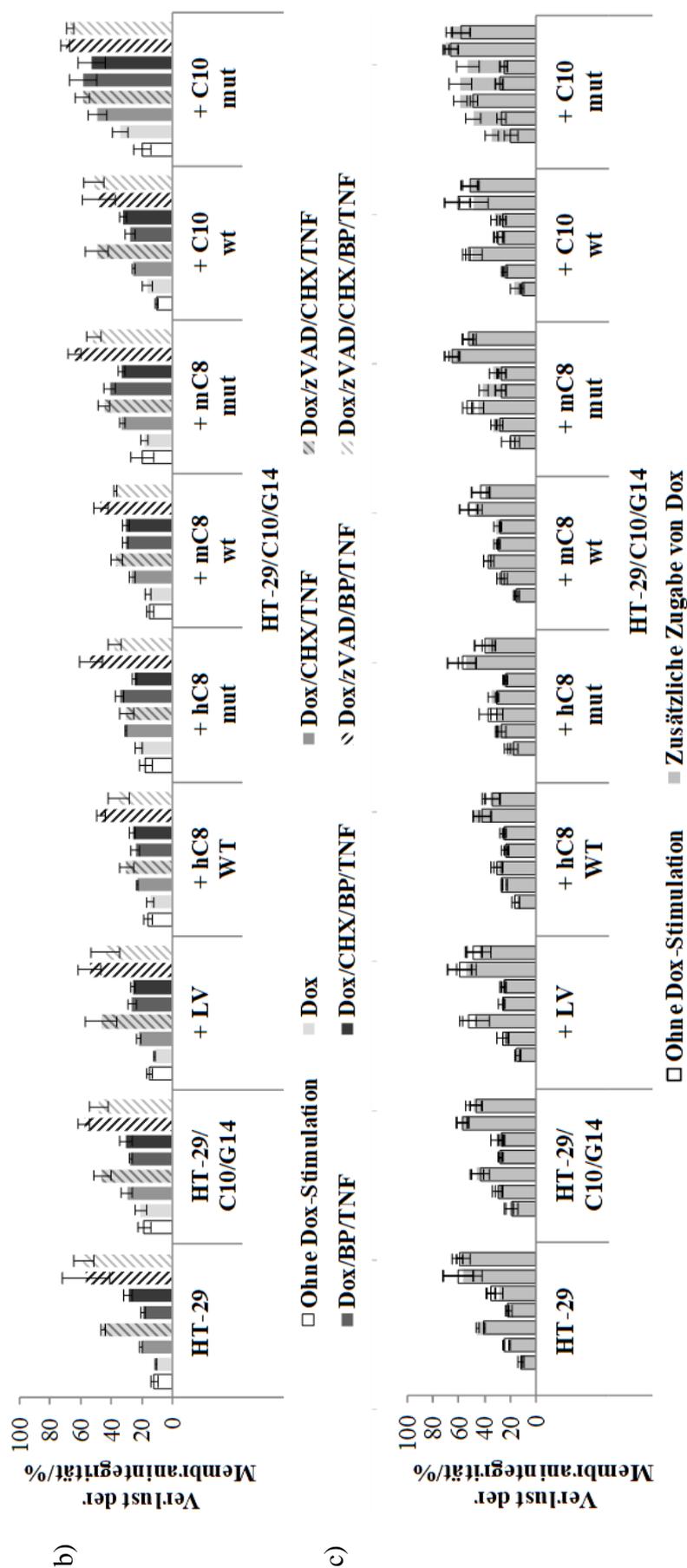


Abbildung 4.10: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität via FACS.

Die Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität erfolgte in humanen HT-29-, HT-29/C10/G14- und HT-29/C10/G14-Zellen, welche stabil mit der humanen (hC8) und murinen Caspase-8 (mC8) und der Caspase-10 (C10) (Wildtyp (wt)- und mutierten (mut)-Form) rekonstituiert worden waren. Als Kontrolle dienten mit Leervektor (LV) rekonstituierte HT-29/C10/G14-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder zur Induktion der Caspase-Expression mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Dox für 24 Stunden inkubiert. Zur Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität erfolgte eine 30-minütige Prästimulation mittels folgender Stimulationskombinationen: Unbehandelt, CHX, zVAD/CHX, BP, CHX/BP, zVAD/BP oder zVAD/CHX/BP ($20 \mu\text{M}$ zVAD, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ CHX, $1 \mu\text{M}$ BP). Die Induktion des Zelltodes erfolgte durch die Zugabe von 100 ng mL^{-1} TNF für 24 Stunden. Der Verlust der Membranintegrität wurde mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen bestimmt. (a) Übersicht der Membranintegrität wurde mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen bestimmt. (b) Vereinfachte Darstellung der Dox-Stimulationen. (c) Vereinfachte Darstellung der Auswirkung der Caspase-Expression auf den Verlust der Membranintegrität. Gezeigt ist dieselbe Stimulationsreihenfolge wie in (a) und (b).

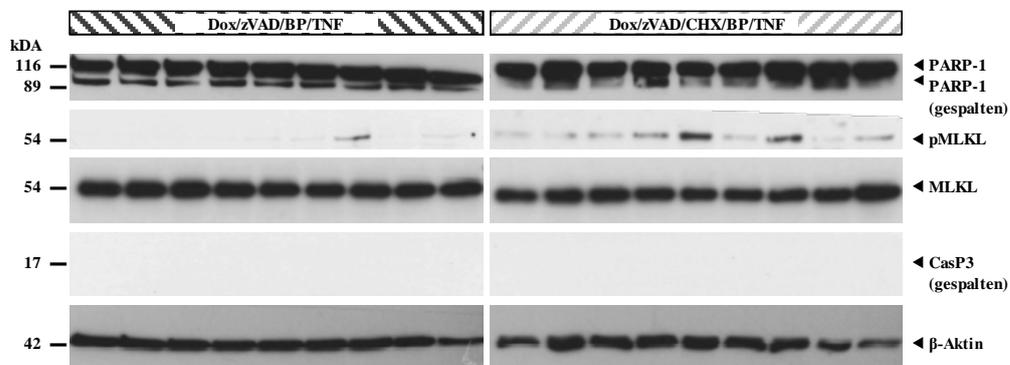
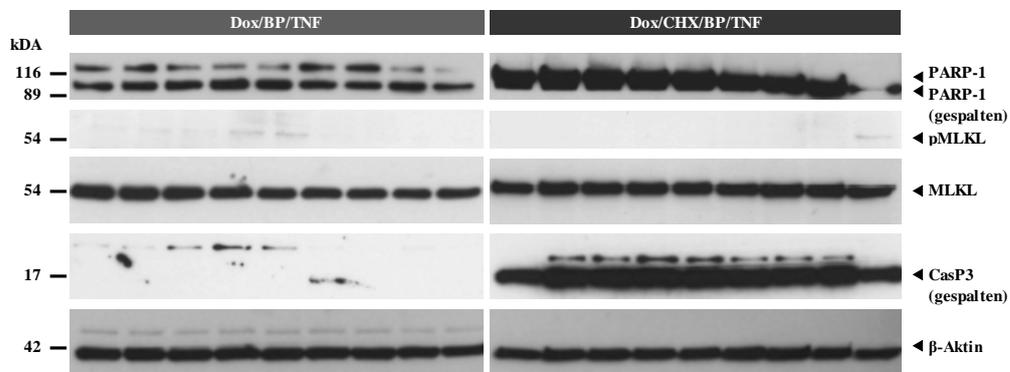
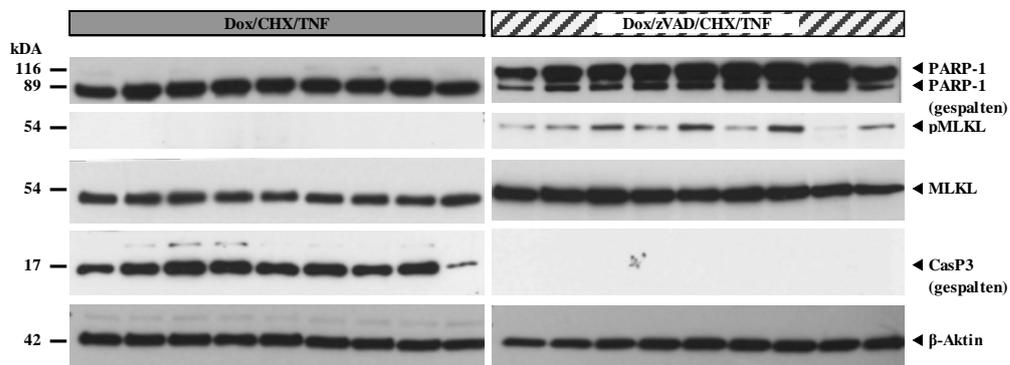
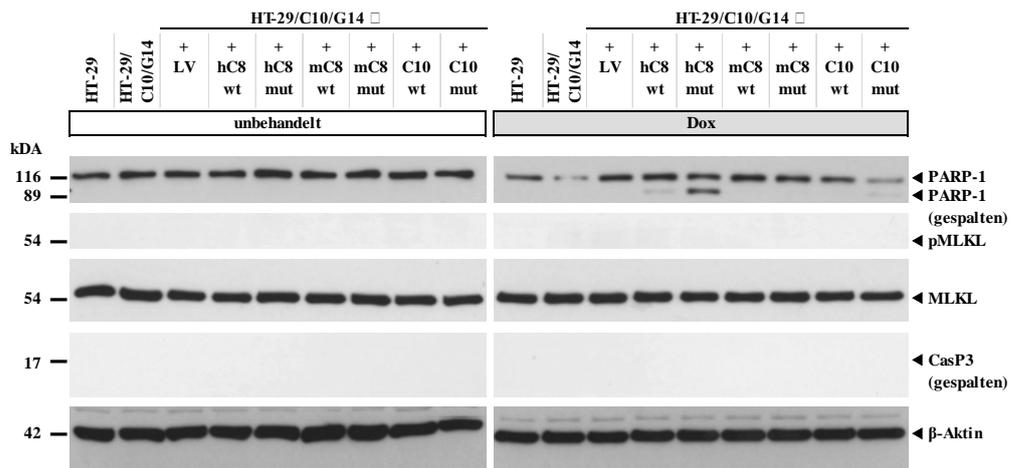


Abbildung 4.11: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität via Western Blot.

Die Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität erfolgte in humanen HT-29-, HT-29/C10/G14- und HT-29/C10/G14-Zellen, welche stabil mit der humanen (hC8) und murinen Caspase-8 (mC8) und der Caspase-10 (C10) (Wildtyp (wt)- und mutierten (mut)-Form) rekonstituiert worden waren. Als Kontrolle dienten mit Leervektor (LV) rekonstituierte HT-29/C10/G14-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder zur Induktion der Caspase-Expression mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Dox für 24 Stunden inkubiert. Zur Analyse der Nekroptose- und Apoptose-Sensitivität erfolgte eine 30-minütige Prästimulation mittels folgender Stimulationskombinationen: Unbehandelt, CHX, zVAD/CHX, BP, CHX/BP, zVAD/BP oder zVAD/CHX/BP ($20 \mu\text{M}$ zVAD, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ CHX, $1 \mu\text{M}$ BP). Die Induktion des Zelltodes erfolgte durch die Zugabe von 100 ng mL^{-1} TNF für 24 Stunden. Der Nachweis der nekroptotischen (pMLKL) und apoptotischen Marker (gespaltenes PARP-1, gesplattene Caspase-3 (CasP3)) erfolgte mittels spezifischem pMLKL/MLKL (54 kDa)-, PARP-1 (116/89 (gespalten) kDa)- und Caspase-3 (17 (gespalten) kDa)-Antikörpernachweis. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa).

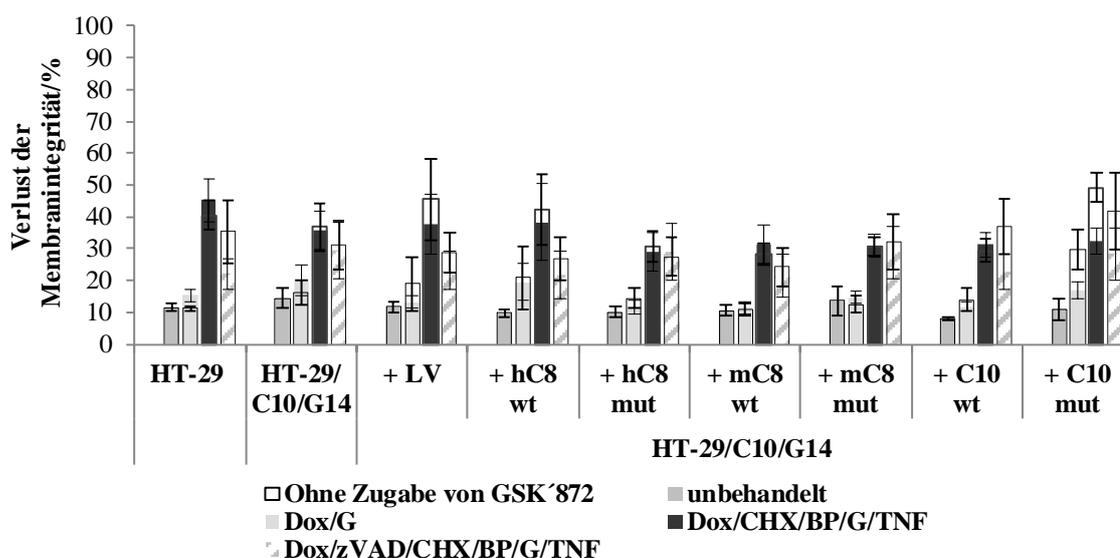


Abbildung 4.12: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse des nekroptotischen Zelltodes nach Zugabe des RIPK3-Inhibitors GSK'872 (G).

Die Analyse des nekroptotischen Zelltodes nach Zugabe des RIPK3-Inhibitors GSK'872 erfolgte in humanen HT-29-, HT-29/C10/G14- und HT-29/C10/G14-Zellen, welche stabil mit der humanen (hC8) und murinen Caspase-8 (mC8) und der Caspase-10 (C10) (Wildtyp (wt)- und mutierten (mut)-Form) rekonstituiert worden waren. Als Kontrolle dienten mit Leervektor (LV) rekonstituierte HT-29/C10/G14-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder zur Induktion der Caspase-Expression mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Dox für 24 Stunden inkubiert. Zur Analyse des nekroptotischen Zelltodes nach Zugabe von GSK'872 erfolgte eine 30-minütige Prästimulation mittels folgender Stimulationskombinationen: Unbehandelt, CHX/BP und zVAD/CHX/BP ($20 \mu\text{M}$ zVAD, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ CHX, $1 \mu\text{M}$ BP), jeweils ohne und mit der Zugabe von GSK'872 ($10 \mu\text{M}$). Die Induktion des Zelltodes erfolgte durch die Zugabe von 100 ng mL^{-1} TNF für 24 Stunden. Der Verlust der Membranintegrität wurde mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert des Verlustes der Membranintegrität, sowie dessen Standardfehler, ermittelt aus vier biologischen Replikaten.

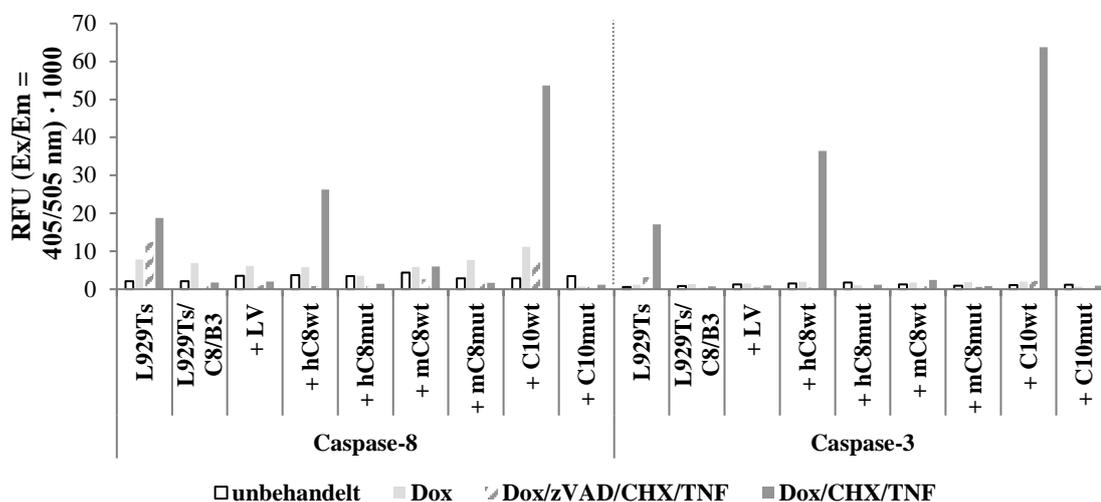
In der Zusammenfassung führte die Deletion der Caspase-10 im humanen HT-29/C10/G14-Zellmodell ebenso wie die Rekonstitution dieser Zellen mit den Protease-aktiven oder -inaktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 und der Caspase-10 zu keinen auffälligen Veränderungen in der Sensitivität für die Induktion des Zelltodes, weder bei Messung des Verlustes der Membranintegrität, noch bei Bestimmung von apoptotischen und nekroptotischen Markern im Western Blot. Eine Ausnahme stellt die Protease-inaktive Form der Caspase-10 dar, deren Rekonstitution auch ohne weitere

Stimulation offenbar bereits ausreicht, um Nekroptose zu induzieren (ein pyroptotischer Zelltod wurde ausgeschlossen). Nach Zugabe des Nekroptose-Inhibitors GSK'872 zeigten parentale HT-29- und mit den Protease-aktiven und -inaktiven Formen der Caspase-10 rekonstituierte Caspase-10-defiziente HT-29/C10/G14-Zellen eine Reduktion des Zelltodes, die in Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen nicht zu beobachten war, auch nicht nach Rekonstitution dieser Zellen mit den Protease-aktiven oder -inaktiven Formen der humanen und murinen Caspase-8. Daher ist insgesamt eine Beeinträchtigung der Nekroptose-Induktion durch die Deletion der Caspase-10 denkbar.

In einem Kontrollexperiment wurde die enzymatische Aktivität der in den Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3- und HT-29/C8/F11-Zellen exprimierten Protease-aktiven und -inaktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 und der Caspase-10 analysiert, indem die Spaltung von zIETD-afc (Caspase-8-Substrat) und zDEVD-afc (Caspase-3-Substrat, Caspase-3 ist der aktivierten Caspase-8 nachgeschaltet) gemessen wurde (Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14). Für die Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen und ihre rekonstituierten Transduktanten konnten die Ergebnisse nicht verlässlich ausgewertet werden, da die Caspase-8 und Caspase-10 überlappende Substratspezifitäten aufweisen (Poreba et al. 2013), und diese Zellen immer noch endogene kreuzreaktive Caspase-8 exprimieren. Eine Dox/CHX/TNF-Behandlung zur Induktion von Apoptose zeigte als Positiv-Kontrolle in den parentalen L929Ts- und HT-29-Zellen, sowie in den mit den Protease-aktiven Formen der humanen Caspase-8 und der Caspase-10 rekonstituierten Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3- und HT-29/C8/F11-Zellen einen deutlichen Anstieg der gemessenen relativen Fluoreszenz-Einheiten (RFU) als Maß für die Caspase-Aktivität, nicht aber in Zellen, die mit den Protease-inaktiven Formen der humanen Caspase-8 und der Caspase-10 rekonstituiert worden waren (Abbildung 4.13.a und Abbildung 4.14). Die in L929Ts/C8/B3- und HT-29/C8/F11-Zellen rekonstituierte Protease-aktive Form der murinen Caspase-8 zeigte hingegen trotz starker Expression im Western Blot (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.5) im direkten Vergleich mit den Protease-aktiven Formen der humanen Caspase-8 und der Caspase-10 nur eine geringe Aktivität (Abbildung 4.13.a und Abbildung 4.14). Im murinen Zellmodell war jedoch im Vergleich mit Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3, die mit der Protease-inaktiven Form der murinen Caspase-8 rekonstituiert worden waren, ein klarer Anstieg der gemessenen RFU detektierbar (Abbildung 4.13.b). Nach der Zugabe des Pan-Caspase-Inhibitors zVAD wurde die Aktivität

der Caspasen in allen untersuchten Zellen auf ein Basisniveau reduziert, was die Korrektheit der Messungen bestätigte (Abbildung 4.13.a und Abbildung 4.14).

a)



b)

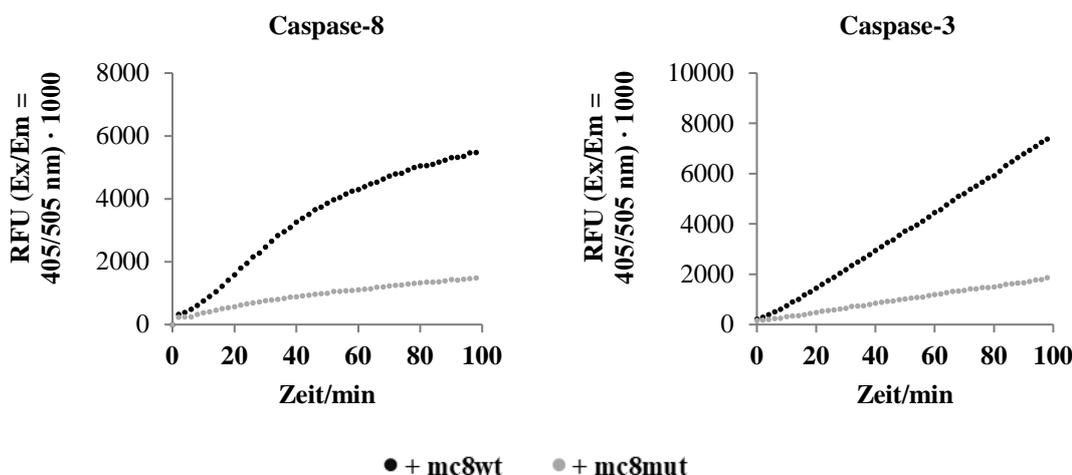


Abbildung 4.13: Lentivirale Rekonstitution der murinen Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Aktivität der rekonstituierten Caspasen.

Die Analyse der Aktivität der exprimierten Caspasen erfolgte in den parental murinen L929Ts-Zellen, sowie in den Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen, welche stabil mit der humanen (hC8) und murinen Caspase-8 (mC8) und der Caspase-10 (C10) (Wildtyp (wt)- und mutierten (mut)-Form) rekonstituiert worden waren. Als Kontrolle dienten mit Leervektor (LV) rekonstituierte L929Ts/C8/B3-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder zur Induktion der Caspase-Expression mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Dox für 24 Stunden inkubiert. Nach anschließender Prästimulation für 30 min mit zVAD/CHX (Nekroptose) oder CHX (Apoptose) ($20 \mu\text{M}$ zVAD und $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ CHX) erfolgte die Induktion des Zelltodes mittels der Zugabe von 100 ng mL^{-1} TNF. Nach 2 Stunden wurden Lysate der Zellen hergestellt, welche hinsichtlich der Spaltung des Caspase-8-Substrats zIETD-afc und des Caspase-3-Substrats zDEVD-afc bei einer Anregungswellenlänge (Ex) von 405 nm und einer Emissionswellenlänge (Em) von 505 nm analysiert wurden. (a) Dargestellt ist der Endwert der RFU nach 118 min (Caspase-8-Substrat) bzw. 32 min (Caspase-3-Substrat). (b) Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der RFU in mit der mC8wt oder mC8mut rekonstituierten L929Ts/C8/B3-Zellen, in welchen Apoptose induziert wurde.

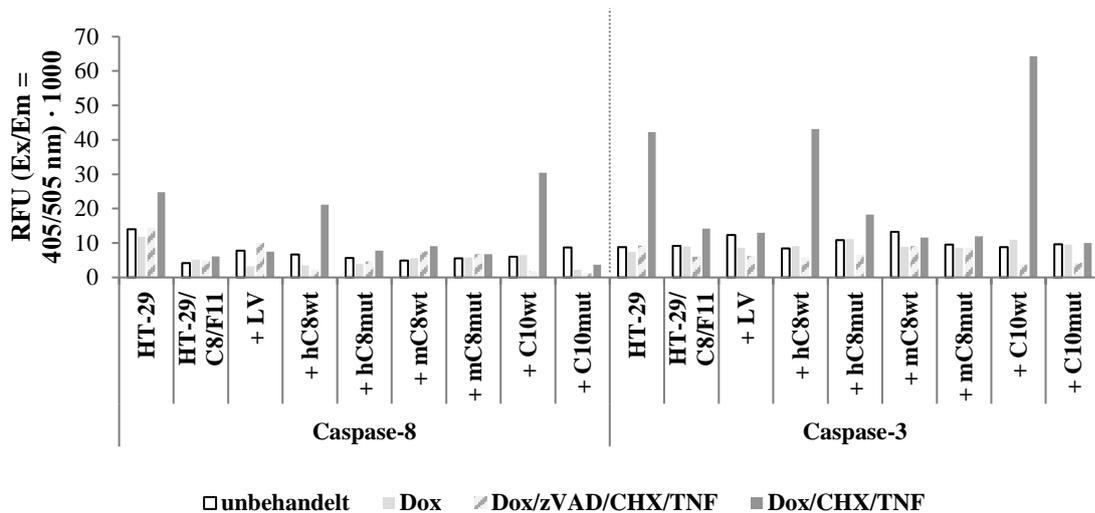


Abbildung 4.14: Lentivirale Rekonstitution der humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen mit der humanen und murinen Caspase-8 sowie Caspase-10 (Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante)): Analyse der Aktivität der rekonstituierten Caspasen.

Die Analyse der Aktivität der exprimierten Caspasen erfolgte in den parentalen humanen HT-29-Zellen, sowie in den Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen, welche stabil mit der humanen (hC8) und murinen Caspase-8 (mC8) und der Caspase-10 (C10) (Wildtyp (wt)- und mutierten (mut)-Form) rekonstituiert worden waren. Als Kontrolle dienten mit Leervektor (LV) rekonstituierte HT-29/C8/F11-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder zur Induktion der Caspase-Expression mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Dox für 24 Stunden inkubiert. Nach anschließender Prästimulation für 30 min mit zVAD/CHX (Nekroptose) oder CHX (Apoptose) ($20 \mu\text{M}$ zVAD und $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ CHX) erfolgte die Induktion des Zelltodes mittels der Zugabe von 100 ng mL^{-1} TNF. Nach 24 Stunden wurden Lysate der Zellen hergestellt, welche hinsichtlich der Spaltung des Caspase-8-Substrats zIETD-afc und des Caspase-3-Substrats zDEVD-afc bei einer Anregungswellenlänge (Ex) von 405 nm und einer Emissionswellenlänge (Em) von 505 nm analysiert wurden. Dargestellt ist der Endwert der RFU nach 177 min (Caspase-8-Substrat) bzw. 57 min (Caspase-3-Substrat).

Insgesamt konnte bestätigt werden, dass die in den Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3- und HT-29/C8/F11-Zellen rekonstituierten Protease-aktiven Formen der humanen Caspase-8 und der Caspase-10 im Gegensatz zu den Protease-inaktiven Formen enzymatisch aktiv sind. Für die im Western Blot stark exprimierte Protease-aktive Form der murinen Caspase-8 konnte sowohl in L929Ts/C8/B3- als auch in HT-29/C8/F11-Zellen eine im Vergleich zur humanen Caspase-8 und zur Caspase-10 geringe enzymatische Aktivität detektiert werden, die aber offenbar ausreicht, um im murinen Zellmodell die ursprüngliche Apoptose- und Nekroptose-Sensitivität der parentalen Zellen wiederherzustellen (was bei der Protease-inaktiven Form nicht der Fall ist).

Herstellung der Caspase-8- und -10-defizienten Modellzellen HT-29/C8/C10

In den bisherigen Analysen der humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen stellte die Rekonstitution mit der Wildtyp-Caspase-10 strenggenommen keine Rekonstitution, sondern eine Überexpression dar, da in diesen Zellen die Wildtyp-Caspase-10 bereits endogen exprimiert wird. Gleiches gilt für die Rekonstitution der Caspase-10-defizienten, aber endogen die humane Wildtyp-Caspase-8 exprimierenden, HT-29/C10/G14-Zellen mit der Wildtyp-Caspase-8.

Daher wurden für weitere Untersuchungen Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefiziente HT-29/C8/C10-Zellen generiert, indem die endogene Wildtyp-Caspase-10 in HT-29/C8/F11-Zellen mit Hilfe der CRISPR-Cas9-Methode deletiert wurde. Potenzielle Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefiziente HT-29/C8/C10-Einzelklone wurden mittels Western Blot auf die Abwesenheit von Caspase-10 untersucht und mittels nachfolgender PCR zur Amplifikation des *Caspase-10*-Bereiches, in dem die sgRNA binden, sowie Sequenzierung dieses Bereiches validiert. Validierte Klone wurden anschließend bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes und über den Nachweis von nekroptotischen und apoptotischen Markern analysiert. Der Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefiziente HT-29/C8/C10 Klon 18 zeigte auf Proteinebene im Vergleich zu den parental HT-29-Zellen keine Caspase-10-Bande (Abbildung 4.15.a). Auf genomischer Ebene zeigte sich zum einen, dass es sich um einen homozygoten Klon handelte (Abbildung 4.15.b) und zum anderen konnte die Sequenzierung des genomischen DNA-Abschnittes, in welchen die sgRNA binden, eine Deletion von 113 Bp an der Position 7633 der genomischen DNA detektieren (Abbildung 4.15.c). In der 113 Bp-großen Deletion ist das Startcodon des offenen Leserahmens der Caspase-10 inbegriffen, sodass das Protein nicht synthetisiert werden kann (Abbildung 4.15.d). Die Analyse der Sensitivität der parental HT-29-Zellen und des Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefizienten HT-29/C8/C10-Einzelklons 18 gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes zeigte gleiche Verluste der Membranintegritäten (Abbildung 4.16.a), im Fall des Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefizienten HT-29/C8/C10-Einzelklons 18 jedoch im Western Blot begleitet von einer erhöhten MLKL-Phosphorylierung (Abbildung 4.16.b). Somit ist eine Verstärkung des nekroptotischen Zelltodes durch die zusätzliche Deletion der Caspase-10 in den Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen nicht gänzlich auszuschließen.

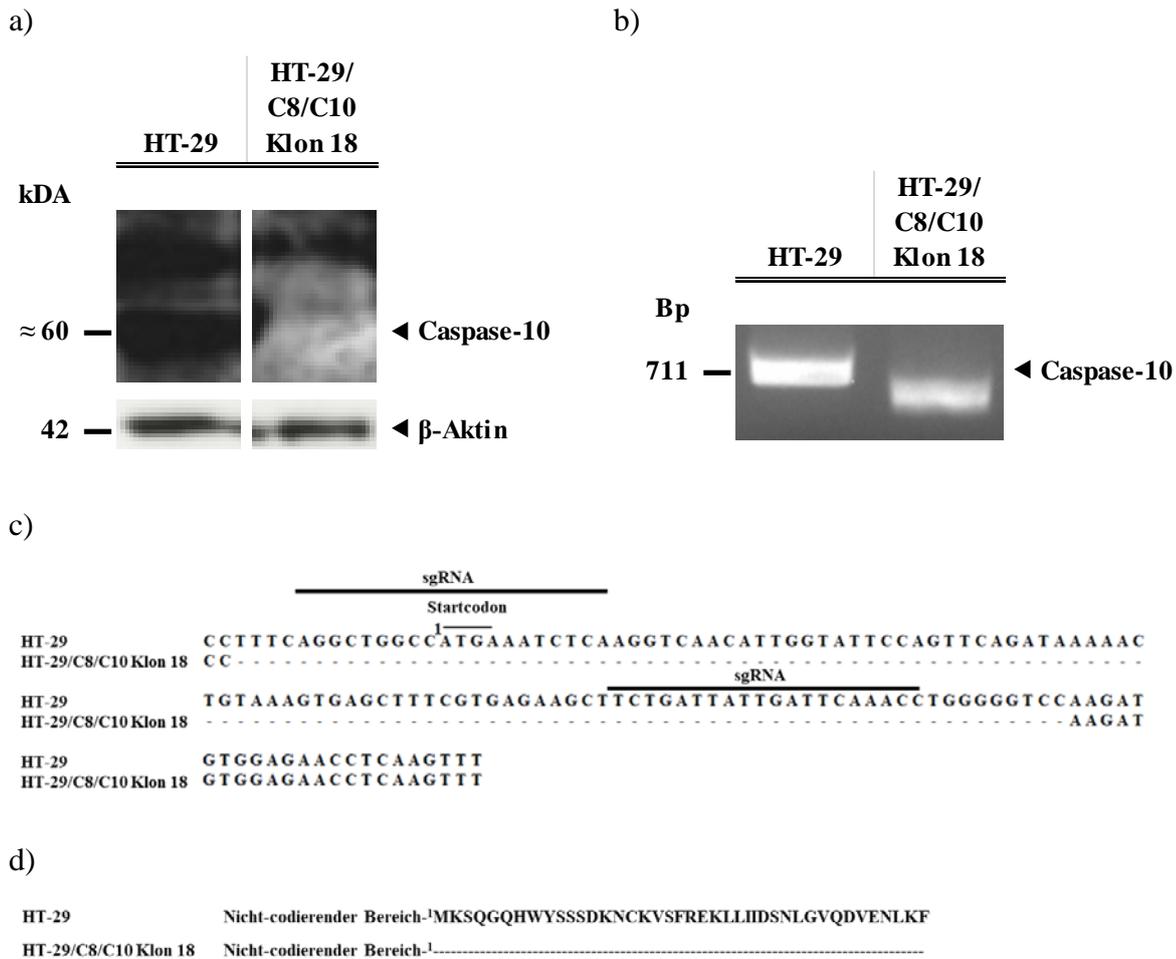


Abbildung 4.15: Generierung von Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefizienten HT-29-Zellen: Analyse des Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefizienten HT-29/C8/C10-Einzelklons 18 mittels spezifischem Caspase-10-Antikörpernachweis und Sequenzierung der genomischen *Caspase-10*-Region, in welcher die sgRNAs binden.

Zur Analyse der Deletion von Caspase-10 auf Protein- und genomischer Ebene wurde der Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefiziente HT-29-Klon 18 mit parental HT-29-Zellen verglichen. **(a)** Die Kontrolle der Deletion der Caspase-10 auf Proteinebene erfolgte mittels spezifischem Caspase-10-Antikörpernachweis (≈ 60 kDa). Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa). **(b)** Zum Nachweis der Deletion der *Caspase-10* auf genomischer Ebene wurde die genomische DNA isoliert und der DNA-Abschnitt, in dem die sgRNAs binden, durch PCR amplifiziert und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die errechnete Größe der amplifizierten DNA der parental HT-29-Zellen beträgt 711 Bp. Nach erfolgreicher Einführung einer Deletion in das *Caspase-10*-Gen ist eine geringere Größe der Bande zu erwarten. **(c)** Sequenzierung der Region, in der die sgRNAs binden. Gekennzeichnet sind die sgRNA-Sequenzen (—), das Startcodon (—) und die Deletion (--). Die Zahl 1 kennzeichnet den Beginn des codierenden Bereiches. **(d)** Dargestellt ist die zu der aus der Sequenzierung ermittelten DNA-Sequenz korrespondierende translatierte Proteinsequenz. Die Zahl 1 kennzeichnet die erste Aminosäure des Proteins und somit den Beginn des codierenden Bereiches und (--) gibt ein Fehlen der Aminosäure an.

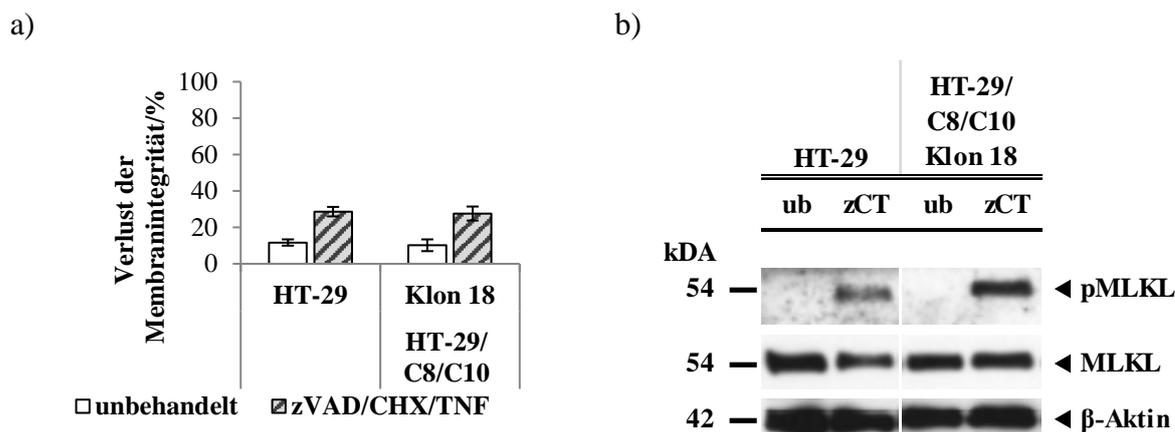


Abbildung 4.16: Generierung von Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefizienten HT-29-Zellen: Analyse der Nekroptose-Sensitivität des Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefizienten HT-29/C8/C10-Einzelklons 18 via FACS und Western Blot.

Die Analyse der Nekroptose-Sensitivität erfolgte in parentalen HT-29- und Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefizienten HT-29 (Klon 18)-Zellen. Die Zellen wurden entweder unbehandelt belassen (ub) oder nach einer Präinkubation für 30 min mit 20 μM zVAD (z) und 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CHX (C) zur Induktion des Zelltodes mit 100 ng mL^{-1} TNF (T) für 24 Stunden behandelt. Im Anschluss daran wurden die Zellen hinsichtlich des Verlustes der Membranintegrität sowie des nekroptotischen Markers pMLKL untersucht. (a) Die Bestimmung des Verlustes der Membranintegrität erfolgte mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert des Verlustes der Membranintegrität, sowie dessen Standardfehler, welche jeweils aus fünf biologischen Replikaten bestimmt wurden. (b) Der Nachweis des nekroptotischen Markers pMLKL erfolgte mittels spezifischem pMLKL/MLKL (54 kDa)-Antikörpernachweis. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa).

Insgesamt zeigen die Analysen des Klons 18, dass Caspase-8- und Caspase-10-doppeldefiziente HT-29/C8/C10-Zellen in dieser Arbeit erfolgreich hergestellt wurden. Die Auswirkung der Deletion der Caspase-8- und Caspase-10 in den HT-29/C8/C10-Zellen über die vorläufige Detektion eines verstärkten pMLKL-Signals hinaus soll in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Zusammenfassung der Analyse der Spezies-spezifischen Rolle der Caspase-8, sowie der Caspase-10 im nekroptotischen Signalweg

Im murinen L929Ts/C8/B3-Zellmodell führte die Deletion der Caspase-8 zu einem verstärkten nekroptotischen Zelltod. Dieser Effekt konnte durch die Rekonstitution der Zellen mit den Protease-aktiven Formen der murinen Caspase-8- bzw. der Caspase-10 vollständig und mittels der Protease-aktiven Form humanen Caspase-8 im geringeren Ausmaße aufgehoben werden, was auf komplementäre Funktionen der humanen und murinen Wildtyp-Caspase-8 und der Wildtyp-Caspase-10 im murinen nekroptotischen Signalweg hinweist, aber auch zeigt, dass die murine und humane Wildtyp-Caspase-8 im murinen L929Ts/C8/B3-Zellmodell trotzdem unterschiedlich effektiv wirken. Die Ergebnisse sprechen weiterhin dafür, dass Funktionen der Wildtyp-Caspase-10 nach deren Verlust aus dem murinen Genom durch die murine Wildtyp-Caspase-8 übernommen wurden. Die Rekonstitution mit den katalytisch inaktiven Formen der Caspasen hatte keinen Einfluss auf den nekroptotischen Zelltod. Darüber hinaus starben die parentalen L929Ts-Zellen sowie mit den Protease-aktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 und der Caspase-10 rekonstituierte L929Ts/C8/B3-Zellen ohne die Zugabe von zVAD durch Apoptose (Ausnahme: Nekroptose in nur mit TNF stimulierten parentale L929Ts-Zellen) und nach Zugabe von zVAD (Inhibierung der Caspase-Aktivität) durch Nekroptose, während die mit den Protease-inaktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 und der Caspase-10 rekonstituierten Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3- ebenso wie nicht rekonstituierte L929Ts/C8/B3-Zellen unabhängig von der Zugabe von zVAD immer den nekroptotischen Marker pMLKL zeigten, also durch Nekroptose starben. Dies deutet darauf hin, dass in den murinen L929Ts-Zellen zur Auslösung der Apoptose die Caspase-Aktivität benötigt wird, wohingegen die Deletion oder Inhibierung der Caspase-Aktivität (durch zVAD oder in Protease-inaktiven Mutanten der Caspasen) zur Nekroptose führt. Im Hinblick auf den Einfluss des SMAC-Mimetikums BP zeigen die Ergebnisse, dass BP im murinen Zellmodell den TNF-induzierten Zelltod in Kombination mit zVAD und/oder CHX verstärken, selbst aber keinen Zelltod auslösen konnte.

Im untersuchten humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellmodell zeigte die Deletion der Caspase-8 im Gegensatz zum murinen Zellmodell einen schützenden Effekt gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes. Die Rekonstitution der HT-29/C8/F11-Zellen mit den Protease-aktiven Formen der humanen Caspase-8 bzw. der Caspase-10, nicht jedoch der murinen Caspase-8, konnte den parentalen Phänotyp im

Hinblick auf den Zelltod wiederherstellen, welcher wie im murinen Zellmodell nach der Zugabe von zVAD nekroptotisch und ohne die Zugabe von zVAD apoptotisch ausfiel. Anders als im murinen Zellmodell bewirkte die Dox-induzierte Expression der Protease-inaktiven Formen der humanen Caspase-8 und der Caspase-10 in HT-29/C8/F11-Zellen bereits ohne weitere Stimulation eine hohe Toxizität. Für die mutierte murine Caspase-8 war dies wiederum nicht der Fall, was insgesamt auf Unterschiede der Funktion der humanen und murinen Wildtyp-Caspase-8 im nekroptotischen Zelltodweg humaner Zellen hinweist. Die Zugabe des RIPK3-/Nekroptose-Inhibitors GSK'872 inhibierte den Zelltod in allen Fällen, in denen Nekroptose erwartet wurde, und diente so zur zusätzlichen Validierung der Art des Zelltodes. Wie im murinen Zellmodell führte die Inhibierung der Caspase-Aktivität, sowie die Rekonstitution der Protease-inaktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 und der Caspase-10 zum nekroptotischen Zelltod. Bemerkenswerterweise konnte der Schutz der Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen vor Nekroptose durch die Zugabe des SMAC-Mimetikums BP aufgehoben werden, möglicherweise bedingt durch den BP-induzierten Abbau von Nekroptose-hemmenden IAP-Proteinen (Safferthal 2017, Abbildung 1.2).

Ein Vergleich der Ergebnisse der mit den Protease-aktiven und -inaktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 und der Caspase-10 rekonstituierten murinen und humanen Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3- und HT-29/C8/F11-Modellzellen zeigt für die Protease-aktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 sowie der Caspase-10 überlappende, wenn auch nicht identische Funktionen im humanen und murinen apoptotischen und nekroptotischen Signalweg. Beiden Zellmodellen ist gemein, dass die Protease-aktive Form der Caspase-8 zur Induktion der Apoptose notwendig war und eine Inhibierung der Aktivität zur Induktion der Nekroptose führte. Als wichtigsten Punkt zeigen die Ergebnisse, dass im murinen Zellmodell Nekroptose nach der Deletion der Caspase-8 oder der Inhibierung ihrer Aktivität ausgelöst wird, dass also ein Verlust der Aktivität oder des kompletten Caspase-8-Proteins für die Induktion der Nekroptose nötig ist. Im Gegensatz dazu führt die Deletion der Caspase-8 im humanen Zellmodell zum Schutz vor Induktion der Nekroptose. Hier ist zwar offenbar, wie im murinen Zellmodell, ebenfalls die Inhibierung der Caspase-8-Aktivität für eine effektive Induktion des nekroptotischen Zelltodes notwendig, gleichzeitig scheint aber, anders als im murinen System, immer noch die Präsenz des inaktiven Caspase-8-Proteins nötig zu sein, damit die Nekroptose korrekt und effektiv ablaufen kann.

Im Hinblick auf die Rolle der Caspase-10 im nekroptotischen Signalweg waren in Caspase-10-defizienten und mit Protease-aktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 und der Caspase-10, sowie mit Protease-inaktiven Formen der humanen und murinen Caspase-8 rekonstituierten HT-29/C10/G14-Zellen im Vergleich zu parentalen HT-Zellen bei allen verwendeten Stimulationen keine wesentlichen Unterschiede im apoptotischen wie nekroptotischen Zelltod zu beobachten. Als Ausnahme führte bereits die Expression der Protease-inaktiven Form der Caspase-10 in den HT-29/C10/G14-Zellen zu einem erhöhten nekroptotischen Zelltod, was mit dem Nekroptose-Inhibitor GSK`872 bestätigt werden konnte. Unabhängig von diesen Ergebnissen bewirkte die Zugabe von GSK`872 in parentalen HT-29- und mit den Protease-aktiven und -inaktiven Formen der Caspase-10 rekonstituierten Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen eine Reduktion des nekroptotischen Zelltodes. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Deletion der Caspase-10 die Induktion der Nekroptose doch zu einem gewissen Grad beeinträchtigt.

In weiteren Versuchen konnte Pyroptose als möglicherweise zusätzliche Form des Zelltodes in den untersuchten Zellmodellen ausgeschlossen werden, und es konnte bestätigt werden, dass die in den Caspase-8-defizienten Zellmodellen rekonstituierten Wildtyp-Formen der humanen Caspase-8 und Caspase-10 enzymatisch aktiv und die entsprechenden mutierten Formen enzymatisch inaktiv sind.

4.2. Der Wirkmechanismus der Serinprotease HtrA2/OMI in der Nekroptose

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam war HtrA2/OMI als Protease mit regulatorischer Funktion in der Nekroptose identifiziert worden. Über die mitochondriale Serin-Protease ist bekannt, dass sie während der Apoptose aus dem Mitochondrium ins Zytosol transloziert und mittels Bindung und Inhibierung von IAPs den Zelltod verstärkt. Im Gegensatz zur Apoptose ist der HtrA2/OMI-Wirkmechanismus in der Nekroptose nicht identifiziert. Studien in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam konnten zeigen, dass eine pharmakologische Inhibierung oder die Deletion von HtrA2/OMI vor der Induktion des nekroptotischen Zelltodes via TNF und TRAIL schützt (Sosna et al. 2013).

Funktion der Protease-Aktivität von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg

Zur weiteren Analyse des Wirkmechanismus von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg wurde untersucht, ob die Protease-Aktivität für die Funktion von HtrA2/OMI in der Nekroptose entscheidend ist oder ob HtrA2/OMI als *scaffold*-Protein wirksam wird.

Dazu wurden HtrA2/OMI-defiziente MEF mit der Protease-aktiven oder -inaktiven Form von HtrA2/OMI, und HtrA2/OMI-defiziente L929Ts-Zellen mit der Protease-inaktiven Form von HtrA2/OMI stabil transfiziert. Entsprechende, mit der Protease-aktiven Form von HtrA2/OMI rekonstituierte HtrA2/OMI-defiziente L929Ts-Zellen waren bereits zuvor in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam hergestellt worden (Fuchslocher Chico 2017). Der mit Wildtyp-HtrA2/OMI stabil transfizierte HtrA2/OMI^{-/-}-MEF-Einzelklon 2 wurde in Zusammenarbeit mit Frau Annika Fellermann im Zuge ihrer medizinischen Doktorarbeit isoliert. Die Analyse der Auswirkung der Expression der Protease-aktiven und -inaktiven Form von HtrA2/OMI auf die Sensitivität der Induktion des nekroptotischen Zelltodes erfolgte in Kooperation mit Frau Jingyu Li im Zuge ihrer Masterarbeit (Li 2022) und Frau Marion Mengel im Zuge ihres immunologischen Praktikums in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam. Die parentalen L929Ts-Zellen und MEF sowie mit Wildtyp-HtrA2/OMI rekonstituierte L929Ts HtrA2/OMI^{-/-}-Zellen und HtrA2/OMI^{-/-}-MEF wiesen im Western Blot gleiche HtrA2/OMI-Bandenintensitäten und damit Expressionsniveaus auf, wohingegen die Expression der rekonstituierten S306A-HtrA2/OMI-Protease geringer ausfiel (Abbildung 4.17).

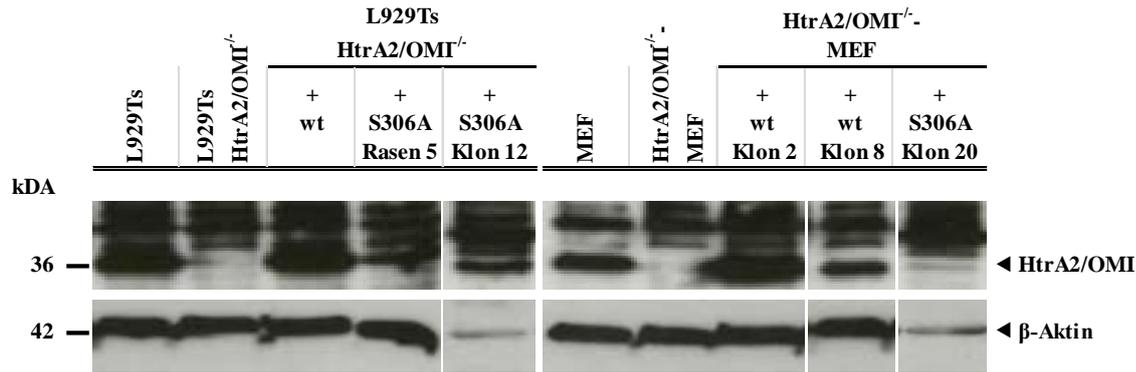
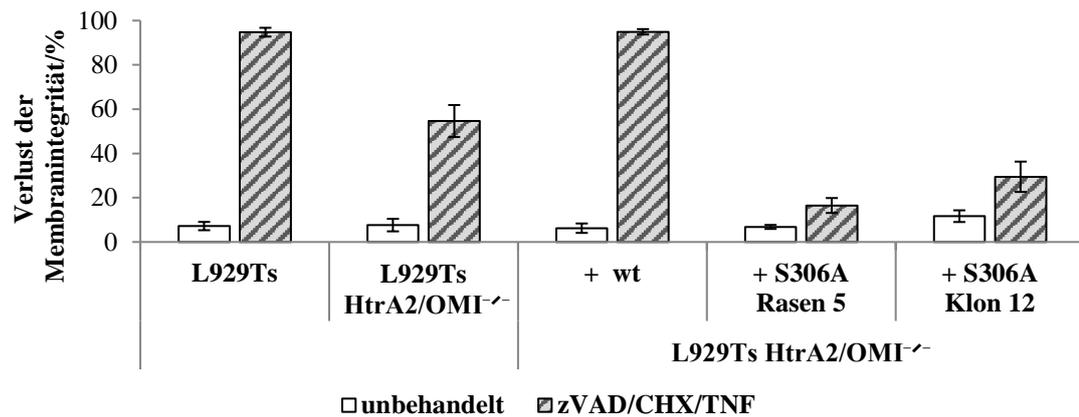


Abbildung 4.17: Stabile Rekonstitution der HtrA2/OMI^{-/-}-MEF und L929Ts HtrA2/OMI^{-/-}-Zellen mit der Protease-aktiven (Wildtyp) und -inaktiven (S306A) Form von HtrA2/OMI: Analyse der HtrA2/OMI-Expression.

Die Analyse der HtrA2/OMI-Expression erfolgte in parentalen und HtrA2/OMI^{-/-}-MEF und L929Ts-Zellen sowie in jeweils mit der Protease-aktiven (wt) oder -inaktiven (S306A) Form von HtrA2/OMI rekonstituierten HtrA2/OMI^{-/-}-MEF und L929Ts HtrA2/OMI^{-/-}-Zellen. Im Falle der mit der inaktiven Form von HtrA2/OMI rekonstituierten HtrA2/OMI-defizienten L929Ts-Zellen wurden neben dem generiertem Einzelklon die Zellen einer Petrischale zur Vermeidung von Einzelkolonie-Artefakten gepoolt, in der Abbildung bezeichnet als „Rasen“. Der Nachweis der Expression von HtrA2/OMI erfolgte im Western Blot mittels spezifischem HtrA2/OMI-Antikörper mit einer zu erwartenden Größe von HtrA2/OMI um 36 kDa. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa).

In der Analyse der Sensitivität gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes zeigten die HtrA2/OMI-defizienten L929Ts-Zellen im Vergleich zu den parentalen L929Ts-Zellen in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Sosna 2013) einen Schutz gegenüber der Induktion der Nekroptose. Nach der Rekonstitution der L929Ts HtrA2/OMI^{-/-}-Zellen mit der katalytisch aktiven Protease-Form von HtrA2/OMI wurde die Sensitivität der parentalen L929Ts-Zellen wiederhergestellt, nicht aber nach der Rekonstitution mit der katalytisch inaktiven Form von HtrA2/OMI (Abbildung 4.18.a). In MEF führte die Deletion von HtrA2/OMI ebenfalls zu einem Schutz gegenüber der Induktion der Nekroptose mit einer Reduktion des Verlustes der Membranintegrität um fast 30 %. Die Rekonstitution der HtrA2/OMI-defizienten MEF mit Wildtyp-HtrA2/OMI bewirkte in den zwei untersuchten Einzelklonen eine Wiederherstellung des Verlustes der Membranintegrität, am stärksten ausgeprägt für Klon 2 mit einer Erhöhung um 15 %. Insgesamt konnte der parentale Phänotyp jedoch nicht im vollen Maße wiedergewonnen werden. Im Fall der Rekonstitution der HtrA2/OMI^{-/-}-MEF mit der Protease-inaktiven Form von HtrA2/OMI wurde für den Klon 20 bereits ohne die Induktion des Zelltodes ein hoher Verlust der Membranintegrität von 40 % detektiert. Dieser wurde durch die Zugabe von zVAD/CHX/TNF um 15 % gesteigert und entsprach damit den HtrA2/OMI-defizienten MEF (Abbildung 4.18.b). Bei der Interpretation dieses Ergebnisses ist jedoch zu beachten, dass die Expression der Protease-inaktiven Form von HtrA2/OMI in den HtrA2/OMI^{-/-}-MEF sehr gering war (siehe Abbildung 4.17).

a)



b)

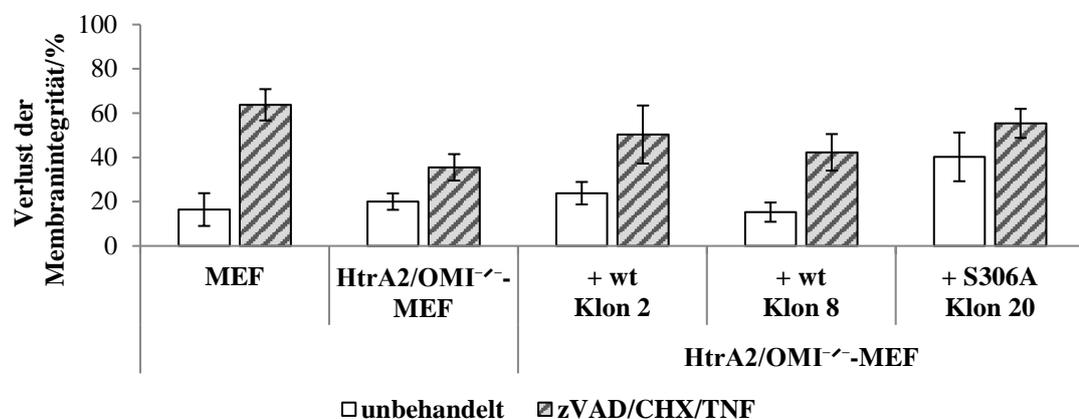


Abbildung 4.18: Stabile Rekonstitution der HtrA2/OMI^{-/-}-MEF und L929Ts HtrA2/OMI^{-/-}-Zellen mit der Protease-aktiven (Wildtyp) und -inaktiven (S306A) Form von HtrA2/OMI: Analyse der Nekroptose-Sensitivität.

Die Analyse der Nekroptose-Sensitivität erfolgte in parentalen und HtrA2/OMI^{-/-}-MEF und L929Ts-Zellen sowie in jeweils mit der Protease-aktiven (wt) oder -inaktiven (S306A) Form von HtrA2/OMI rekonstituierten HtrA2/OMI^{-/-}-MEF und L929Ts HtrA2/OMI^{-/-}-Zellen. **(a, b)** Zur Induktion des nekroptotischen Zelltodes erfolgte eine Prästimulation mit 20 μM zVAD und 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (L929Ts-Zellen (a)) bzw. 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MEF (b)) CHX für 30 min, gefolgt von einer 5-stündigen (L929Ts-Zellen) oder 16-stündigen (MEF) Inkubation mit 100 ng mL^{-1} TNF. Der Verlust der Membranintegrität wurde mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert des Verlustes der Membranintegrität, sowie dessen Standardfehler, ermittelt aus vier biologischen Replikaten.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse im L929Ts-Zellmodell dafür, dass die Protease-Aktivität entscheidend für die Funktion von HtrA2/OMI im nekroptotischen Zelltod ist. So konnte der Schutz gegenüber der Induktion der Nekroptose in den HtrA2/OMI-defizienten L929Ts-Zellen durch die Rekonstitution mit der Protease-aktiven Form, jedoch nicht mit der Protease-inaktiven S306A-Form von HtrA2/OMI aufgehoben werden. In den untersuchten MEF konnte die parentale Sensitivität gegenüber der Induktion der Nekroptose nach der Rekonstitution von HtrA2/OMI^{-/-}-MEF mit der katalytisch aktiven Form von HtrA2/OMI ebenfalls wiederhergestellt werden, wenn auch nicht im vollen Maße. Die Ergebnisse der Rekonstitution mit der katalytisch inaktiven S306A-Form von HtrA2/OMI erlauben in MEF

derzeit noch keine klare Aussage über die Bedeutung der Protease-Aktivität von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg, möglicherweise wegen der geringen Expression der S306A-Form. Daher wurde in einem zusätzlichen Ansatz die Bedeutung der Protease-Aktivität von HtrA2/OMI für die Nekroptose in humanen HT-29-Zellen analysiert. Die Herstellung von HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Zellen erfolgte unter der Verwendung der CRISPR/Cas9-Methode. Die potenziellen HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Einzelklone wurden mittels Western Blot auf die Abwesenheit von HtrA2/OMI untersucht und durch nachfolgende PCR zur Amplifikation des *HtrA2/OMI*-Bereiches, in dem die sgRNA binden, sowie Sequenzierung dieses Bereiches validiert. Die validierten Klone wurden anschließend auf ihre Nekroptose-Sensitivität und die Anwesenheit von nekroptotischen und apoptotischen Markern analysiert. Die HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Einzelklone 4 und 42 zeigten auf Proteinebene im Vergleich zu den parental HT-29-Zellen keine HtrA2/OMI-Bande (Abbildung 4.19.a). Auf genomischer Ebene bestätigte sich, dass es sich um homozygote Klone handelte (Abbildung 4.19.b). Die Sequenzierung des genomischen DNA-Abschnittes, in welchen die sgRNA binden, identifizierte für den Klon 4 eine Deletion von 421 Bp an Position 601 der genomischen DNA. In der 421 Bp-großen Deletion ist das Startcodon des offenen Leserahmens von *HtrA2/OMI* inbegriffen, sodass das Protein nicht synthetisiert werden kann. Für den HT-29-HtrA2/OMI^{-/-}-Einzelklon 42 wurde eine Deletion von 72 Bp an Position 705 der genomischen DNA detektiert. Dies verursacht einen Leserasterschub, was wegen eines vorzeitigen Stoppcodons den Abbruch der Proteinbiosynthese nach 41 Aminosäuren zur Folge hat (Abbildung 4.19.c und Abbildung 4.19.d). In der Analyse der Sensitivität gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes zeigte der HtrA2/OMI-defiziente HT-29-HtrA2/OMI^{-/-}-Einzelklon 4 mit einem Verlust der Membranintegrität von 70 % im Vergleich zu den parental HT-29-Zellen mit einem Verlust der Membranintegrität von 28 % eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes, wohingegen der Verlust der Membranintegrität des HtrA2/OMI-defizienten HT-29-HtrA2/OMI^{-/-}-Einzelklons 42 mit 29 % der Zelltodrate der parental HT-29-Zellen entsprach (Abbildung 4.20.a). Trotz der stark unterschiedlichen Verluste der Membranintegrität zeigten die parental HT-29-Zellen und die HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Einzelklone 4 und 42 nach der Induktion der Nekroptose gleiche pMLKL-Intensitäten. Auffällig war weiterhin, dass im unbehandelten HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Einzelklon 4 apoptotische Marker detektiert wurden (Abbildung 4.20.b).

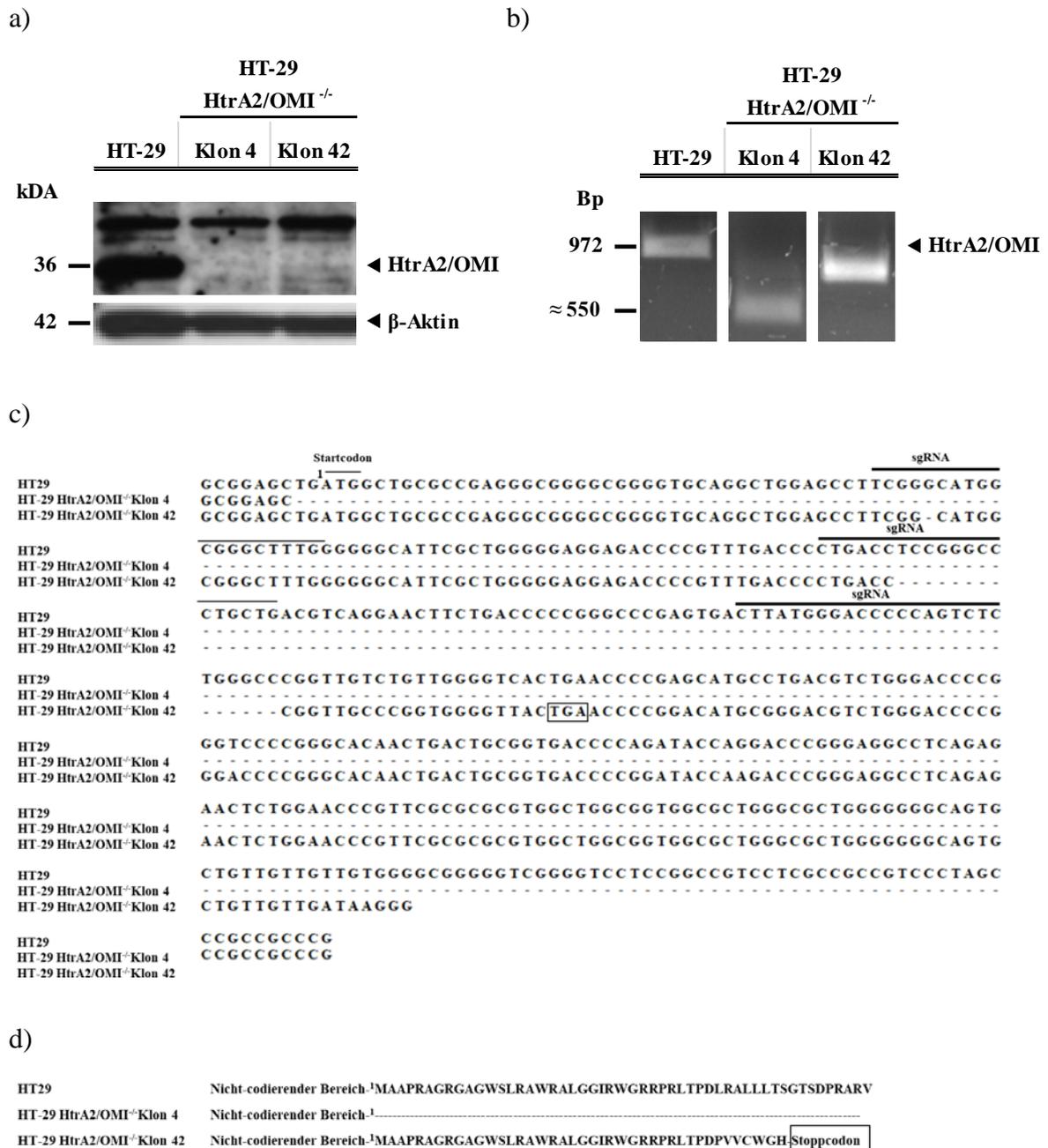


Abbildung 4.19: Generierung von HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Zellen: Analyse der HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Einzelklone 4 und 42 mittels spezifischem HtrA2/OMI-Antikörperrnachweis und Sequenzierung der genomischen *HTRA2/OMI*-Region, in welcher die sgRNAs binden.

Zur Analyse der Deletion von HtrA2/OMI auf Protein- und genomischer Ebene wurden die HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Klone 4 und 42 mit parental HT-29-Zellen verglichen. (a) Die Kontrolle der Deletion von HtrA2/OMI auf Proteinebene erfolgte mittels spezifischem HtrA2/OMI-Antikörperrnachweis (≈ 36 kDa). Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β-Aktin (42 kDa). (b) Zur Kontrolle der Deletion von *HtrA2/OMI* auf genomischer Ebene wurde genomische DNA isoliert und der DNA-Abschnitt, in dem die sgRNAs binden, durch PCR amplifiziert und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die errechnete Größe der amplifizierten DNA der parental HT-29-Zellen beträgt 972 Bp. Nach erfolgreicher Einführung einer Deletion in das *HtrA2/OMI*-Gen ist eine geringere Größe der Bande zu erwarten. (c) Sequenzierung der Region, in der die sgRNAs binden. Gekennzeichnet sind die sgRNA-Sequenzen (—), das Stoppcodon (□), das Startcodon (—) und die Deletion (—). Die Zahl 1 kennzeichnet den Beginn des codierenden Bereiches. (d) Dargestellt ist die zur aus der Sequenzierung ermittelten DNA-Sequenz korrespondierende translatierte Proteinsequenz. Die Zahl 1 kennzeichnet die erste Aminosäure des Proteins und somit den Beginn des codierenden Bereiches, (--) gibt ein Fehlen der Aminosäure und (□) das Stoppcodon an.

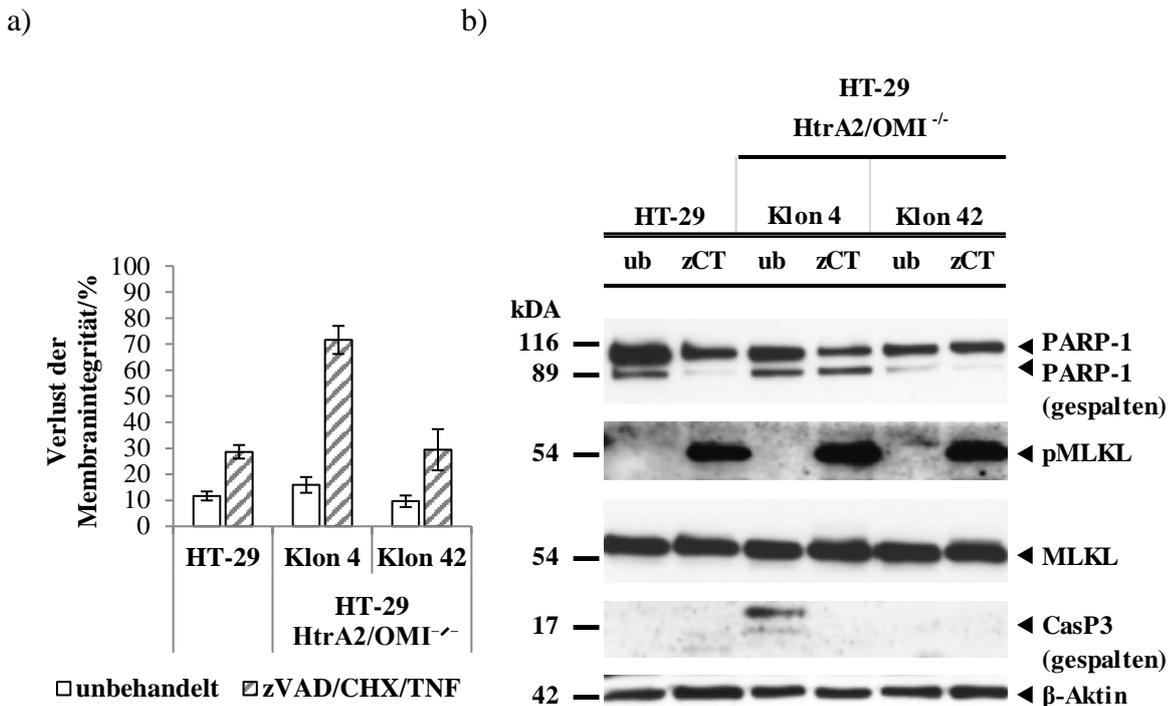


Abbildung 4.20: Generierung von HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Zellen: Analyse der Nekroptose-Sensitivität der HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Einzelklone 4 und 42 via FACS und Western Blot.

Die Analyse der Nekroptose-Sensitivität erfolgte in parental HT-29- und HtrA2/OMI-defizienten HT-29 (Klon 4 und 42)-Zellen. Zur Bestimmung der Nekroptose-Sensitivität wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen (ub) oder nach einer Präinkubation für 30 min mit 20 μM zVAD (z) und 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CHX (C) zur Induktion des Zelltodes mit 100 ng mL^{-1} TNF (T) für 24 Stunden behandelt. Im Anschluss daran wurden die Zellen hinsichtlich des Verlustes der Membranintegrität sowie des nekroptotischen Markers pMLKL untersucht. (a) Die Bestimmung des Verlustes der Membranintegrität erfolgte mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert des Verlustes der Membranintegrität, sowie dessen Standardfehler, welche jeweils aus fünf biologischen Replikaten bestimmt wurden. (b) Der Nachweis der nekroptotischen (pMLKL) und apoptotischen Marker (gespaltenes PARP-1, gesplante Caspase-3 (CasP3)) erfolgte mittels spezifischem pMLKL/MLKL (54 kDa)-, PARP-1 (116/89 (gespalten) kDa)- und Caspase-3 (17 (gespalten) kDa)-Antikörpernachweis. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa).

Da in den HtrA2/OMI-defizienten HT-29-HtrA2/OMI^{-/-}-Einzelklonen 4 und 42 eine Deletion von HtrA2/OMI detektiert und validiert wurde, die Klone sich in ihrer Sensitivität gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes jedoch stark unterschieden, kann anhand der bisherigen Ergebnisse noch keine Aussage über die Funktion von HtrA2/OMI im humanen nekroptotischen Zelltod getroffen werden. Hierfür bedarf es zukünftiger weiterer Untersuchungen, z. B. die Sequenzierung des Genoms zum Ausschluss möglicher zusätzlicher, durch die CRISPR-Cas9-Methode hervorgerufener Mutationen oder Deletionen, Rekonstitutionsstudien sowie die Analyse weiterer HtrA2/OMI-defizienter HT-29-Einzelklone.

Intrazelluläre Lokalisation von HtrA2/OMI während der Nekroptose

Im Hinblick auf den Wirkmechanismus von HtrA2/OMI in der Nekroptose hatten Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam Hinweise darauf ergeben, dass HtrA2/OMI während der Nekroptose, anders als in der Apoptose, in den Mitochondrien verbleibt (Fuchslocher Chico 2017). Das Verbleiben von HtrA2/OMI in den Mitochondrien wurde ebenfalls in Untersuchungen von Blink und Kollegen beschrieben (Blink et al. 2004). Im Gegensatz dazu berichtete eine Studie aus dem Jahr 2019, dass HtrA2/OMI nach der Induktion der Nekroptose in das Zytoplasma transloziert und dort mit RIPK1 interagiert (Zhang et al. 2019). Da die Lokalisation von HtrA2/OMI entscheidend für das Verständnis seiner Wirkmechanismen ist, die bisherigen Studien sich jedoch in ihrer Induktionszeit, Zellmodell und Analysemethoden unterschieden, wurde die Lokalisation von HtrA2/OMI in dieser Arbeit in zwei murinen Zellmodellen nach Induktion der Nekroptose im zeitlichen Verlauf von 0, 1, 3, 4, 5 und 6 Stunden in Immunfluoreszenzanalysen untersucht. Im Fall von L929Ts-Zellen repräsentieren die Stunden 0, 1 und 3 den Bereich, in dem noch kein nekroptotischer Zelltod eintritt, sodass Änderungen in der Verteilung von HtrA2/OMI nicht auf das Sterben der Zellen zurückzuführen sind. Die Stunden 0, 1, 3, 4, 5 und 6 entsprechen diesem Bereich in MEF (Li 2022). Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalysen sind in der Abbildung 4.21 dargestellt.

In L929Ts-Zellen war nach einer Stunde eine Translokation von HtrA2/OMI aus den Mitochondrien zu beobachten. Dieser Effekt nahm über den weiteren Zeitraum ab, sodass nach 6 Stunden erneut eine deutliche Lokalisation von HtrA2/OMI in den Mitochondrien zu detektieren war. Im Fall der untersuchten MEF nahm die Translokation von HtrA2/OMI aus den Mitochondrien in das Zytoplasma im zeitlichen Verlauf mit einem Maximum nach 5 Stunden zu. Anschließend konnte erneut eine Zunahme der Kollokalisierung von HtrA2/OMI und den Mitochondrien beobachtet werden. Dies spricht insgesamt für eine Translokation von HtrA2/OMI aus den Mitochondrien ins Zytoplasma, gefolgt von einer anschließenden Relokalisation in die Mitochondrien.

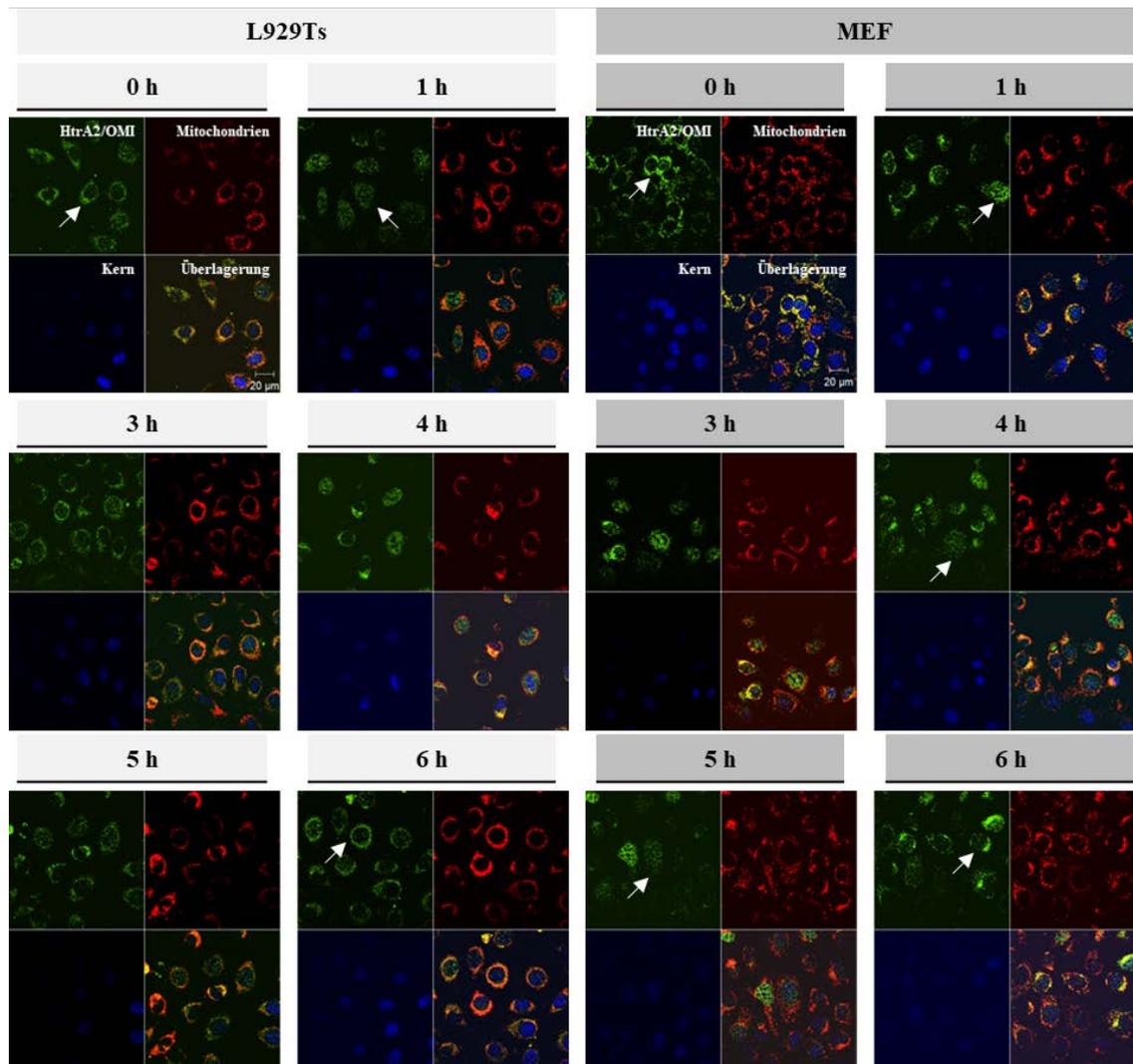


Abbildung 4.21: Analyse der Lokalisation von HtrA2/OMI im zeitlichen Verlauf der Nekroptose.

L929Ts-Zellen und MEF wurden für 30 min mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (L929Ts-Zellen) bzw. $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ CHX (MEF) und $20 \mu\text{M}$ zVAD prästimuliert und anschließend für 0, 1, 3, 4, 5 oder 6 Stunden mit 100 ng mL^{-1} TNF zur Induktion des Zelltodes versetzt und nachfolgend mittels konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Dargestellt ist die Färbung von HtrA2/OMI (grün), der Mitochondrien (rot), der Zellkerne (blau) und die Überlagerung aller drei Färbungen.

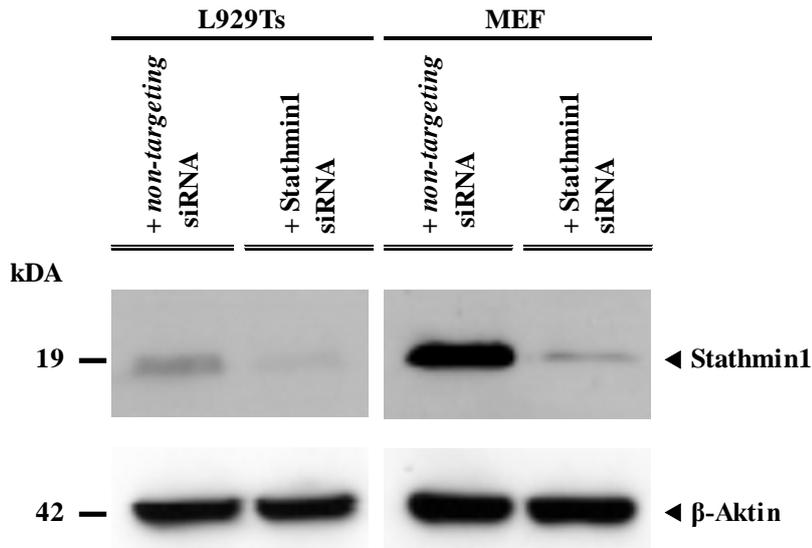
Untersuchung von neuen Mediatoren von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg

Ausgehend von einer Translokation von HtrA2/OMI aus den Mitochondrien in das Zytoplasma und einer anschließenden Relokalisation in die Mitochondrien in der Nekroptose, sind zytosolische und mitochondriale vor- und nachgeschaltete Mediatoren von HtrA2/OMI als weitere Komponenten der nekroptotischen Signalwege von HtrA2/OMI denkbar. Daher wurden zur Identifizierung neuer intramitochondrialer Mediatoren von HtrA2/OMI die Mitochondrien nekroptotischer parentaler und HtrA2/OMI-defizienter MEF isoliert und anschließend in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Tholey von Dr. Thomas Koudelka (Kiel, Deutschland) massenspektrometrisch untersucht. Die Analyse hochregulierter, sowie proteolytisch prozessierter Proteine zeigte zwei

interessante potenzielle Mediatoren von HtrA2/OMI in der Nekroptose auf - *Isoform 8 of Band 4.1-like protein 3* und *Interferon-activable protein 205-B*. Die vollständige Liste ist im Anhang zu finden (Tabelle 9.1 und Tabelle 9.2). *Isoform 8 of Band 4.1-like protein 3* zeigte eine Hochregulierung in den parentalen Zellen. Das *Isoform 8 of Band 4.1-like protein 3* hat in Verbindung mit der Aktivierung der Caspasen-2, -8 und -9 sowie des *Cyclin-dependent kinase 1/Cyclin B1 signaling* eine Rolle in der Induktion der Apoptose und dem G2/M-Zellzyklusarrest inne (Zeng et al. 2018). *Interferon-activable protein 205-B* wurde in den parentalen Zellen vermehrt gespalten. *Interferon-activable protein 205-B* ist in der Lage, das Zellwachstum mittels *p53/TP53* und *RBI*-abhängigen und -unabhängigen Signalwegen zu inhibieren (Asefa et al. 2006).

In einem unabhängigen Ansatz wurde die mögliche Rolle von Stathmin1 als HtrA2/OMI-nachgeschaltetem Mediator eingehender untersucht, da in Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam eine nekroptotische Spaltung von Stathmin1 in parentalen, jedoch nicht in HtrA2/OMI-defizienten MEF beobachtet worden war (Saggau 2018). Stathmin1 selbst reguliert als Mikrotubuli-destabilisierendes Protein deren Dynamik (Carney et al. 2010). Aufgrund dieser wichtigen Aufgabe handelt es sich bei Stathmin1 um ein Onkoprotein, dessen Überexpression mit einer schlechten Prognose bei einer Vielzahl von Krebsarten einhergeht, darunter Leukämie, Lymphom, orales Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom, Prostatakarzinom, Sarkome, Brustkrebs oder Eierstockkrebs (Carney et al. 2010; Lu et al. 2018). Zur Untersuchung der Rolle von Stathmin1 als nachgeschaltetem HtrA2/OMI-Mediator wurde Stathmin1 in L929Ts-Zellen und MEF via RNA-Interferenz herunterreguliert und der Einfluss auf den Nekroptose-abhängigen Verlust der zellulären Membranintegrität gemessen. Wie in der Abbildung 4.22.a gezeigt, konnte die Expression von Stathmin1 zwar herunterreguliert werden, jedoch zeigte dies keine Veränderung in der Sensitivität der Zellen gegenüber der Induktion der Nekroptose (Abbildung 4.22.b), sodass Stathmin1 keine Schlüsselrolle in der HtrA2/OMI-regulierten Nekroptose zugesprochen werden kann.

a)



b)

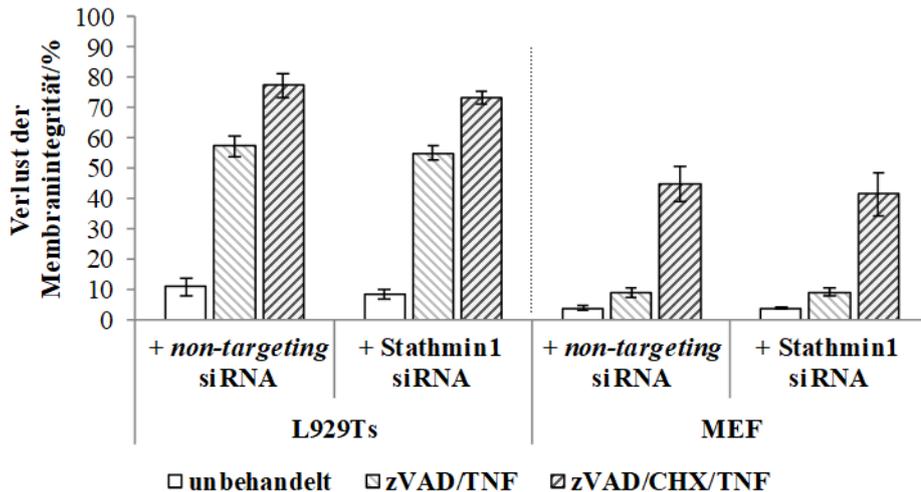


Abbildung 4.22: Analyse von Stathmin1 als nachgeschaltetem Mediator von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg.

Die Analyse von Stathmin1 als nachgeschaltetem Mediator von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg erfolgte in L929Ts-Zellen und MEF. L929Ts-Zellen und MEF wurden für 48 Stunden mit einer gegen Stathmin1 gerichteten siRNA (Stathmin1 siRNA) oder mit einer gegen keine zelluläre mRNA gerichtete siRNA (*non-targeting* siRNA) transfiziert. (a) Der Nachweis der Herunterregulierung von Stathmin1 erfolgte mittels spezifischem Stathmin1-Antikörper mit einer zu erwartenden Größe von Stathmin1 um 19 kDa. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa). (b) Für die Analyse der Auswirkung der Herunterregulierung von Stathmin1 auf die Sensitivität gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes wurden die Zellen unbehandelt belassen oder für 30 min mit 20 μ M zVAD oder 20 μ M zVAD plus 1 μ g mL⁻¹ (L929Ts-Zellen) bzw. 2 μ g mL⁻¹ CHX (MEF) prästimuliert. Die Induktion des Zelltodes erfolgte mit 100 ng mL⁻¹ TNF. Nach 5-stündiger (L929Ts-Zellen) oder 16-stündiger (MEF) Inkubation wurde der Verlust der Membranintegrität mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert des Verlustes der Membranintegrität, sowie dessen Standardfehler, ermittelt aus drei biologischen Replikaten, welche jeweils mittels drei technischen Replikaten gemessen wurden.

In der Apoptose ist bekannt, dass HtrA2/OMI aus den Mitochondrien in das Zytoplasma transloziert und dort IAPs spaltet, wodurch der apoptotische Signalweg verstärkt wird (van Loo et al. 2002). Im Menschen sind acht IAP-Familienmitglieder bekannt. Unter ihnen ist allein XIAP in der Lage, direkt mit den Caspasen-3, -7 und -9 zu interagieren und so deren Aktivität zu inhibieren, wodurch die Apoptose unterdrückt wird (Hanifeh et al. 2022). Zu den natürlich vorkommenden Antagonisten der IAPs gehört neben HtrA2/OMI auch SMAC/DIABLO. Da das Zusammenspiel von IAPs und HtrA2/OMI in der Apoptose entscheidend für die Verstärkung des Zelltodes ist, wurde nachfolgend der Zusammenhang von XIAP und HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg untersucht. Dazu wurde in L929Ts-Zellen und MEF sowie in L929Ts HtrA2/OMI^{-/-}-Zellen und HtrA2/OMI^{-/-}-MEF der nekroptotische Zelltod ohne oder nach der Zugabe des XIAP-Inhibitors XB2d89 (X) (Goncharov et al. 2018) ausgelöst. In den mit dem XIAP-Inhibitor behandelten nekroptotischen L929Ts- und L929Ts HtrA2/OMI^{-/-}-Zellen konnte eine geringe Erhöhung des Verlustes der Membranintegrität detektiert werden, die in den parentalen und HtrA2/OMI^{-/-}-MEF ausgeprägter zu beobachten war (Abbildung 4.23). Dies spricht insgesamt für eine mögliche Funktion von XIAP als Substrat von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg.

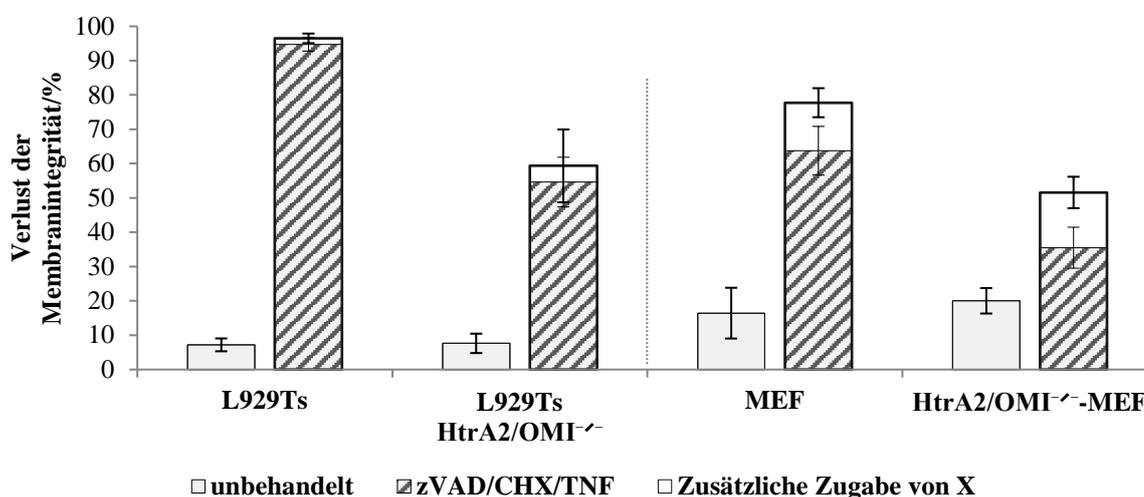


Abbildung 4.23: Analyse der Rolle von XIAP als Mediator von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg.

Die Analyse der Rolle von XIAP als Mediator von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg erfolgte in parentalen MEF und L929Ts-Zellen sowie in HtrA2/OMI-defizienten MEF und L929Ts-Zellen. Zur Induktion des nekroptotischen Zelltodes erfolgte eine Prästimulation mit 20 μM zVAD und 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (L929Ts-Zellen) bzw. 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MEF) CHX für 30 min, entweder ohne oder mit der Zugabe von 1 μM XB2d89 (X), gefolgt von einer 5-stündigen (L929Ts-Zellen) oder 16-stündigen (MEF) Inkubation mit 100 ng mL^{-1} TNF (T). Der Verlust der Membranintegrität wurde mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert des Verlustes der Membranintegrität, sowie dessen Standardfehler, ermittelt aus vier biologischen Replikaten.

Zusammenfassung der Analyse des Wirkmechanismus von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg

Insgesamt sprechen die in L929Ts-Zellen erhaltenen Ergebnisse für eine wichtige Funktion der Protease-Aktivität von HtrA2/OMI im nekroptotischen Zelltod, während in MEF noch weitere Untersuchungen für eine eindeutige Aussage nötig sind. Die Analyse der Lokalisation von HtrA2/OMI während der Nekroptose zeigte eine Translokation aus den Mitochondrien in das Zytosol, gefolgt von einer anschließenden Relokalisation. Daher sind mitochondriale und zytosolische Mediatoren als weitere Komponenten der nekroptotischen Signalwege von HtrA2/OMI denkbar. In dieser Arbeit konnten *Band 4.1-like protein 3* und *Interferon-activable protein 205-B* als mögliche intramitochondriale Mediatoren identifiziert werden. Dagegen sprechen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse gegen eine Funktion von Stathmin1 in der HtrA2/OMI-vermittelten Nekroptose. Eine mögliche Funktion von XIAP muss noch weiter validiert werden.



4.3. Die Funktion von ADAM17 im nekroptotischen Signalweg

Frühere Studien in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam hatten gezeigt, dass sowohl ADAM17^{ex/ex}- als auch ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-Mäuse gegenüber Nekroptose in einem DSS-induzierten Kolitis-Modell geschützt waren. Diese Ergebnisse waren ebenfalls in MEF, welche aus ADAM17^{ex/ex}-Mäusen isoliert worden waren, bestätigt worden (Fuchslocher Chico et al. 2018). Zur weiteren Analyse des Signalweges, welcher zum Schutz von ADAM17^{ex/ex}-Mäusen gegenüber der Induktion von Nekroptose führt, sollte in dieser Arbeit ein zusätzliches Zellmodell etabliert und der Schutz gegenüber der Induktion der Nekroptose in diesem Modell bestätigt werden.

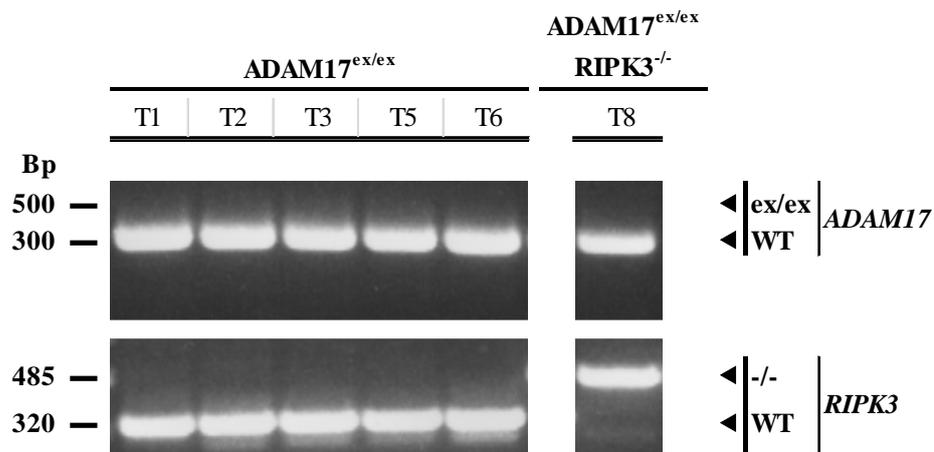
ADAM17^{ex/ex}-Lungenfibroblasten als Zellmodell zur Analyse der Funktion von ADAM17 in der Nekroptose

Als Zellmodell wurden murine Lungenfibroblasten (MLF) gewählt, da diese eine hohe Sensitivität gegenüber der Todesrezeptor/SMAC-Mimetika/zVAD-induzierten Nekroptose aufweisen (Hussain et al. 2018). In einem ersten Schritt wurden spontan immortalisierte ADAM17^{ex/ex}- und ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-MLF generiert, die für die weiteren Untersuchungen herangezogen wurden. Da sich die MLF der jeweiligen Kulturen in ihrem Proliferationsverhalten unterschieden, wurden die Versuche mit unterschiedlichen Passagen (Passage 11 bis 16) durchgeführt, welche in der Abbildung 4.24.a dargestellt sind. Zunächst wurden die MLF hinsichtlich des Vorhandenseins von RIPK3 untersucht. Dabei wies die Kultur ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-T8 wie erwartet eine Deletion von RIPK3 auf Gen- (Abbildung 4.24.b) und Protein-Ebene (Abbildung 4.24.c) auf. Für die ADAM17^{ex/ex}-MLF-Kulturen wurden auf Protein-Ebene unterschiedliche RIPK3-Spiegel detektiert. So zeigten die aus einer Wildtyp-Maus und aus den ADAM17^{ex/ex}-Mäusen 1, 3, 5 und 6 (T1, T3, T5 und T6) isolierten MLF im Vergleich zu den MLF, die aus den ADAM17^{ex/ex}-Mäusen 2, 4 und 7 (T2, T4 und T7) isoliert worden waren, eine geringere RIPK3-Expression.

a)

Genotyp	Tier	Passage
ADAM17 ^{ex/ex}	T1	16
ADAM17 ^{ex/ex}	T2	13
ADAM17 ^{ex/ex}	T3	11
ADAM17 ^{ex/ex}	T4	12
ADAM17 ^{ex/ex}	T5	16
ADAM17 ^{ex/ex}	T6	15
ADAM17 ^{ex/ex}	T7	12
ADAM17 ^{ex/ex/RIPK3} ^{-/-}	T8	14

b)



c)

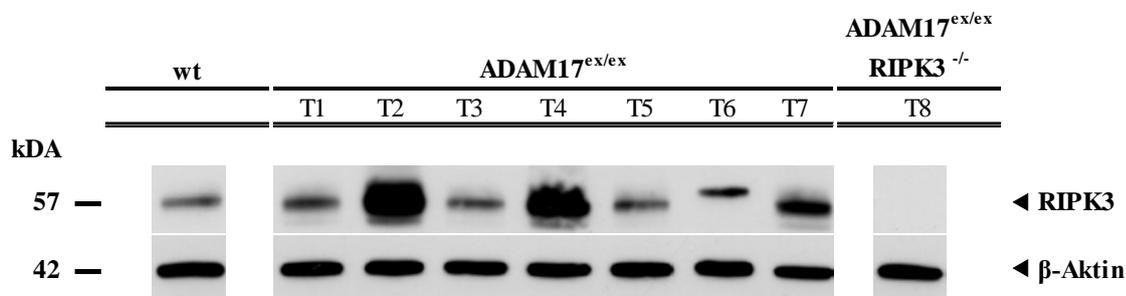


Abbildung 4.24: Immortalisierte ADAM17^{ex/ex}- und ADAM17^{ex/ex/RIPK3}^{-/-}-Lungenfibroblasten: Darstellung der verwendeten Passagen und Analyse des Genotyps und der Expression des RIPK3-Proteins.

(a) Zusammenfassung der für die Versuche verwendeten Passagen der spontan immortalisierten ADAM17^{ex/ex}- und ADAM17^{ex/ex/RIPK3}^{-/-}-MLF. (b) Überprüfung der MLF mittels Genotypisierung auf das Vorhandensein von ADAM17 und RIPK3. Im Fall von ADAM17 entspricht eine Bande von 500 Bp der ADAM17^{ex/ex}- und eine Bande von 300 Bp der Wildtyp-Form von ADAM17. Im Fall von RIPK3 zeigt eine 485 Bp große Bande eine Deletion von RIPK3 und eine Bande bei 320 die Wildtyp-Form von RIPK3. (c) Der Nachweis von RIPK3 auf Proteinebene erfolgte mittels spezifischem RIPK3 (57 kDa)-Antikörpernachweis. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β-Aktin (42 kDa). T: Tier.

Die Frage, ob ADAM17^{ex/ex}- ebenso wie ADAM17^{ex/ex}/RIPK3-MLF im direkten Vergleich mit MLF aus einer Wildtyp-Maus gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes geschützt sind und ob die unterschiedlichen Expressionsgrade von RIPK3 einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber der Induktion des nekroptotischen Signalweges haben, wurde im nächsten Schritt untersucht. Dazu wurde in den immortalisierten MLF der Wildtyp-, ADAM17^{ex/ex}- und ADAM17^{ex/ex}/RIPK3-Mäuse Nekroptose induziert, und die MLF im Hinblick auf Verlust der Membranintegrität und Auftreten der nekroptotischen Marker pMLKL und pRIPK3 untersucht (Abbildung 4.25). Nach Behandlung der MLF mit zVAD und TNF als alleinige Stimuli wurde in allen Ansätzen weder ein Erhöhung des Verlustes der Membranintegrität noch eine nekroptotische Phosphorylierung von RIPK3 oder MLKL detektiert. Die zusätzliche Sensitivierung der MLF mit CHX induzierte in ADAM17^{ex/ex}-T1-, -T2-, -T4- und -T7-MLF einen erhöhten Verlust der Membranintegrität (bis zu 77 % Verlust) im Vergleich zu MLF, die aus einer Wildtyp-Maus isoliert worden waren (40 % Verlust der Membranintegrität) (Abbildung 4.25.a). Entsprechend konnten in diesen MLF pRIPK3 und pMLKL nachwiesen werden (Abbildung 4.25.b). Im Gegensatz dazu zeigten ADAM17^{ex/ex}-T3- und -T5-MLF nur einen geringen Verlust der Membranintegrität und nur reduzierte Mengen an pRIPK3 und pMLKL. ADAM17^{ex/ex}-T6-MLF waren gänzlich geschützt gegenüber der Nekroptoseinduktion, ebenso wie die als Negativkontrolle für die Nekroptoseinduktion mitgeführten ADAM17^{ex/ex}/RIPK3-T8-MLF. Somit wiesen die aus sieben ADAM17^{ex/ex}-Mäusen isolierten immortalisierten MLF eine inkonsistente Sensitivität gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes auf, welche weder auf den jeweiligen Grad der RIPK3-Expression (Abbildung 4.24.c) noch auf die verwendeten Passagen zurückgeführt werden konnte.

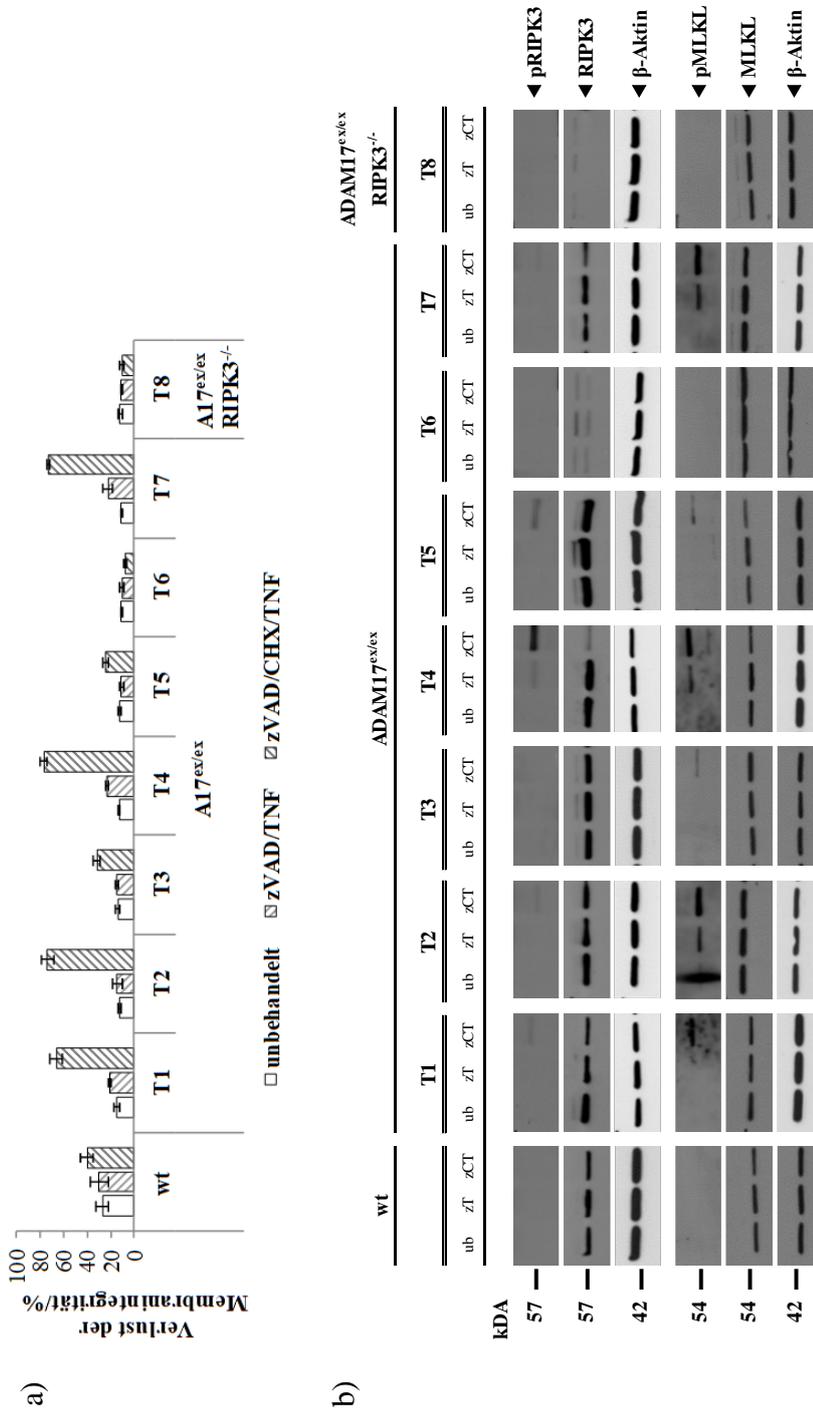


Abbildung 4.25: Immortalisierte ADAM17^{ex/ex}- und ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-Lungenfibroblasten: Analyse des Verlustes der Membranintegrität und des Auftretens der nekroptotischen Marker pRIPK3 und pMLKL nach Induktion von Nekroptose.

Die Analyse des Verlustes der Membranintegrität und des Auftretens der nekroptotischen Marker pRIPK3 und pMLKL nach der Induktion der Nekroptose erfolgte in immortalisierten Lungenfibroblasten einer Wildtyp-Maus (wt), sieben ADAM17^{ex/ex}-Mäusen (T1-T7), sowie einer ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-Maus (T8). Die Lungenfibroblasten wurden unbehandelt belassen (ub) oder für 30 min mit 20 µM zVAD plus 1 µg mL⁻¹ CHX (z) oder 20 µM zVAD plus 1 µg mL⁻¹ CHX (z) prästimuliert und anschließend für 16 Stunden mit 100 ng mL⁻¹ TNF (T) zur Induktion des Zelltodes inkubiert. (a) Der Verlust der Membranintegrität wurde mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszyto-metrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert des Verlustes der Membranintegrität, sowie dessen Standardfehler, ermittelt aus drei biologischen Replikaten à drei technischen Replikaten. (b) Der Nachweis der nekroptotischen Marker pMLKL und pRIPK3 erfolgte mittels spezifischem pMLKL/MLKL (54 kDa)- und pRIPK3/RIPK3 (57 kDa)-Antikörpern. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β-Aktin (42 kDa).

Da die Untersuchungen der immortalisierten ADAM17^{ex/ex}-MLF aufgrund ihrer inhomogenen Sensitivität gegenüber der Induktion von Nekroptose keine eindeutige Aussage zur Bedeutung von ADAM17 in der Nekroptose erlaubten, wurden im nächsten Schritt primäre ADAM17^{ex/ex}-MLF untersucht. Die Überlegung hierbei war, dass das differentielle Verhalten der immortalisierten MLF möglicherweise auf der für ihre Immortalisierung nötigen Langzeit-Kultivierung beruhte. Als primäre MLF wurde daher jeweils die zweite Passage der isolierten Zellen herangezogen. Anzumerken ist dabei, dass die jeweiligen Zellkulturen noch inhomogen waren, das bedeutet, dass sich neben den Lungenfibroblasten noch weitere Zelltypen in der Kultur befanden. Die Analyse der Sensitivität gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes der primären Lungenfibroblasten erfolgte zum einen via Detektion der PI-positiven und -negativen Zellen mittels FACS und zum anderen mittels der Messung der intrazellulären ATP-Konzentration. In der durchflusszytometrischen Messung der PI-positiven und -negativen Zellen zeigten bereits die unbehandelten primären ADAM17^{ex/ex}-MLF eine hohe Rate an Zelltod (Anhang, Abbildung 9.2.a), und die Messung der intrazellulären ATP-Spiegel ergab nach Induktion der Nekroptose mit zVAD/CHX/TNF uniform eine nur geringe Zellviabilität aller primären MLF, ohne einen Unterschied zwischen MLF aus der Wildtyp-Maus und den ADAM17^{ex/ex}-Mäusen zu zeigen (Anhang, Abbildung 9.2.b), sodass sich die primären MLF ebenfalls nicht für weitere Untersuchungen eignen.

Da sowohl die immortalisierten als auch die primären ADAM17^{ex/ex}-MLF nicht für die Untersuchung der Funktion von ADAM17 im nekroptotischen Zelltod herangezogen werden konnten, sollte ADAM17 in MEF und in HT-29-Zellen deletiert werden, um alternative murine und humane Zellmodelle zu erzeugen. MEF wurden gewählt, da diese bereits früher für Nekroptose-Studien verwendet worden waren (Hussain et al. 2018). Darüber hinaus stellen MEF und HT-29-Zellen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam etablierte Zellmodelle zur Analyse des nekroptotischen Signalweges dar (Voigt 2014; Fuchslocher Chico 2017; Saggau 2018).

ADAM17-defiziente MEF und HT-29-Zellen als Zellmodelle zur Analyse der Bedeutung von ADAM17 in der Nekroptose

Die Herstellung von ADAM17-defizienten HT-29-Zellen und MEF erfolgte mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode. Die Analyse der generierten ADAM17-defizienten HT-29- und MEF-Einzelklone erfolgte in Zusammenarbeit mit Thiemo Korn im Zuge seiner medizinischen Doktorarbeit. Die potenziellen ADAM17-defizienten HT-29- und MEF-Einzelklone wurden mittels Western Blot auf ADAM17-Defizienz überprüft und durch PCR zur Amplifikation des *ADAM17*-Bereiches, in dem die sgRNA binden, sowie Sequenzierung dieses Bereiches, validiert. Die validierten Klone wurden anschließend im Hinblick auf ihre Nekroptose-Sensitivität und das Auftreten von pMLKL als nekroptotischem Marker analysiert.

Im Fall des murinen MEF-Zellmodells zeigte der ADAM17-defiziente MEF-Klon 40 auf Proteinebene im Vergleich zu den parentalen MEF keine ADAM17-Bande (Abbildung 4.26.a). Auf genomischer Ebene zeigte sich zum einen, dass es sich um einen homozygoten Klon handelte (Abbildung 4.26.b). Zum anderen konnte die Sequenzierung des genomischen DNA-Abschnittes, in welchen die sgRNA binden, eine Deletion von 8 Bp an der Stelle 19398 der genomischen DNA detektieren (Abbildung 4.26.c). Dies führt zu einem Leserasterschub und einem vorzeitigen Stoppcodon, und damit zum Abbruch der Proteinbiosynthese nach 79 Aminosäuren (Abbildung 4.26.d). Die Analyse der Sensitivität gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes zeigte für den ADAM17-defizienten MEF Klon 40 im Vergleich zu den parentalen MEF einen erkennbaren Schutz (Abbildung 4.27.a). Im Einklang mit dem reduzierten Verlust der Membranintegrität wies der ADAM17-defiziente MEF-Klon 40 nach Induktion der Nekroptose ein schwächeres pMLKL-Signal als die parentalen MEF auf (Abbildung 4.27.b).

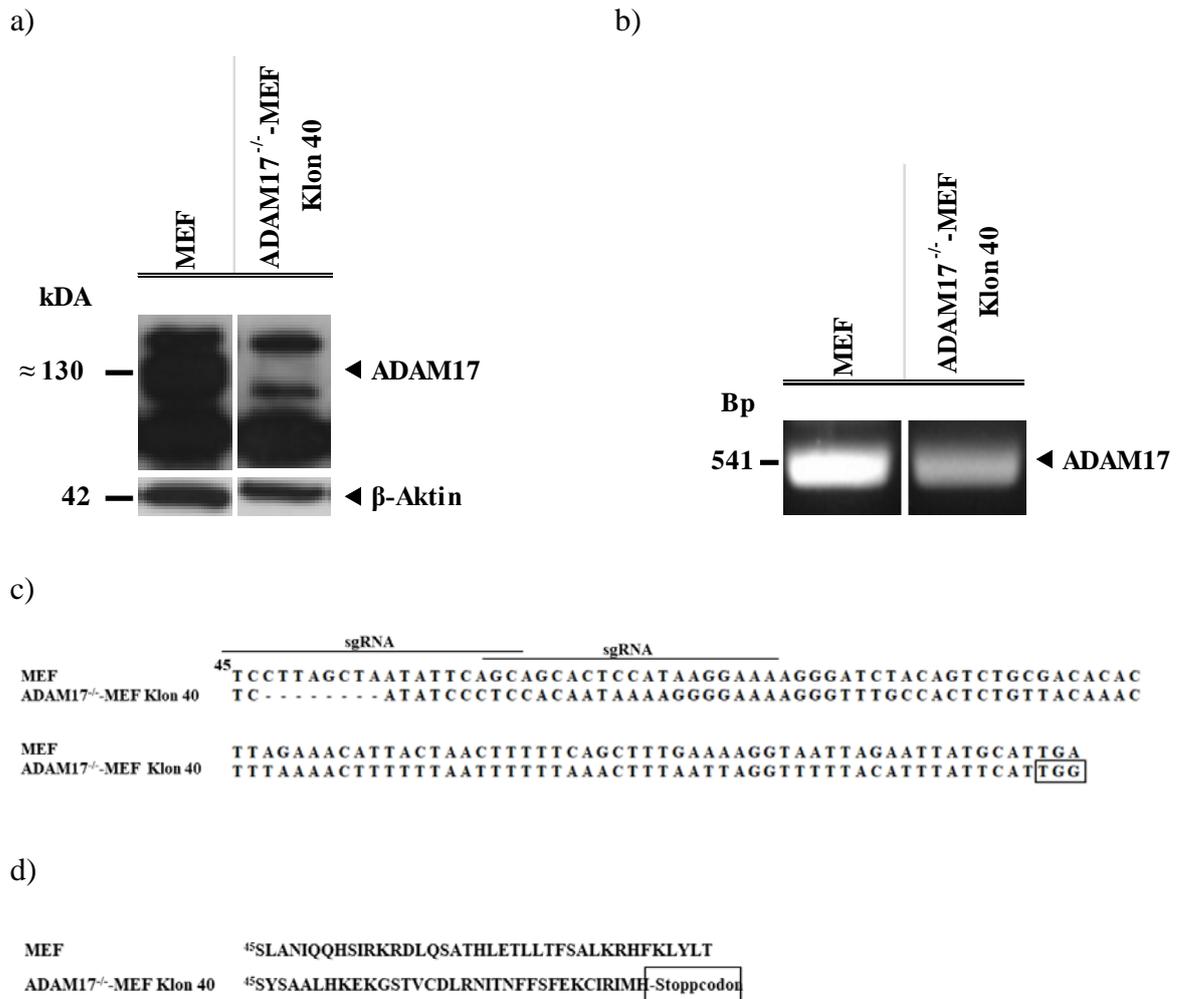


Abbildung 4.26: Generierung von ADAM17-defizienten MEF: Analyse des ADAM17-defizienten MEF-Klons 40 mittels spezifischem ADAM17-Antikörpernachweis und Sequenzierung der genomischen *ADAM17*-Region, in welcher die sgRNAs binden.

Zur Analyse der Deletion von ADAM17 auf Protein- und genomischer Ebene und zur Untersuchung der Nekroptose-Sensitivität wurden parentale MEF und der ADAM17-defiziente MEF-Klon 40 herangezogen. **(a)** Die Kontrolle der Deletion von ADAM17 auf Proteinebene erfolgte mittels spezifischem ADAM17-Antikörpernachweis (≈ 130 kDa). Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa). **(b)** Zur Kontrolle der Deletion von *ADAM17* auf genomischer Ebene wurde genomische DNA isoliert und der DNA-Abschnitt, in dem die sgRNAs binden, durch PCR amplifiziert und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die errechnete Größe der amplifizierten DNA von ADAM17 in parentalen MEF beträgt 541 Bp. Nach erfolgreicher Einführung einer Deletion in das *ADAM17*-Gen ist eine geringere Größe der Bande zu erwarten, was in der Gelelektrophorese nicht sichtbar wird. **(c)** Sequenzierung der Region, in der die sgRNAs binden. Gekennzeichnet sind die sgRNA-Sequenzen (\blackleftarrow), das Stoppcodon (\square) und die Deletion (--). Die Zahl 45 kennzeichnet die 45te Aminosäure des Proteins. **(d)** Dargestellt ist die zur aus der Sequenzierung ermittelten DNA-Sequenz korrespondierende translatierte Proteinsequenz. Die Zahl 45 kennzeichnet die 45te Aminosäure des Proteins, (--) gibt ein Fehlen der Aminosäure und (\square) das Stoppcodon an.

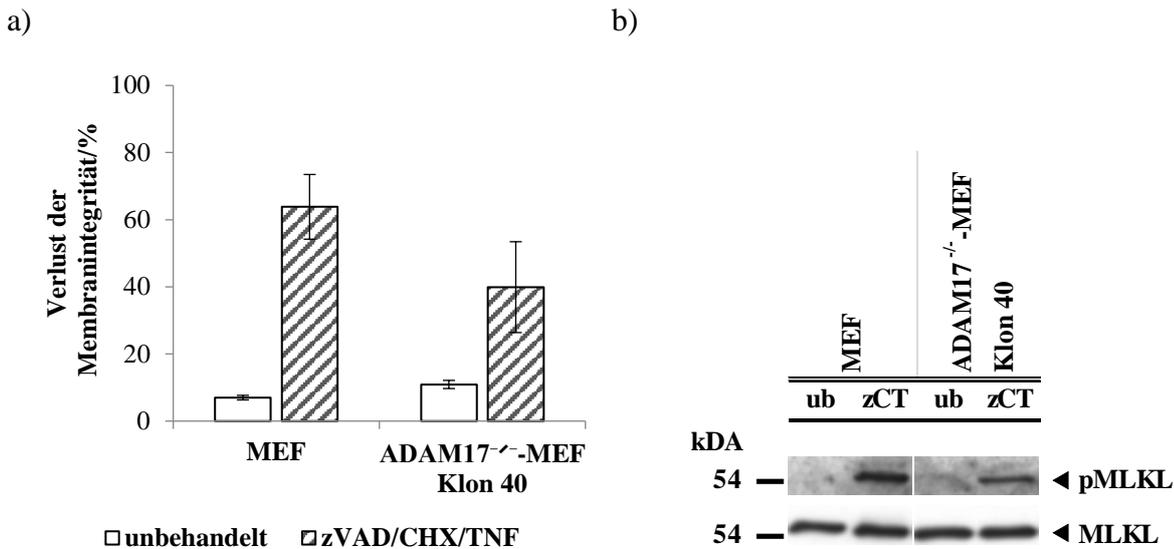


Abbildung 4.27: Generierung von ADAM17-defizienten MEF: Analyse der Nekroptose-Sensitivität des ADAM17-defizienten MEF-Klons 40 via FACS und Western Blot.

Die Analyse der Nekroptose-Sensitivität erfolgte in parentalen MEF und ADAM17-defizienten MEF (Klon 40). Zur Bestimmung der Nekroptose-Sensitivität wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen (ub) oder nach einer Präinkubation für 30 min mit 20 μ M zVAD (z) und 2 μ g mL⁻¹ CHX (C) zur Induktion des Zelltodes mit 100 ng mL⁻¹ TNF (T) für 16 Stunden behandelt. Im Anschluss daran wurden die Zellen hinsichtlich des Verlustes der Membranintegrität sowie des nekroptotischen Markers pMLKL untersucht. **(a)** Die Bestimmung des Verlustes der Membranintegrität erfolgte mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert des Verlustes der Membranintegrität, sowie dessen Standardfehler, welche jeweils aus sechs biologischen Replikaten bestimmt wurden. **(b)** Der Nachweis des nekroptotischen Markers pMLKL erfolgte mittels spezifischem pMLKL/MLKL (54 kDa)-Antikörpernachweis. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von MLKL.

Im humanen Zellmodell wies der ADAM17-defiziente HT-29-Klon 31 auf Proteinebene im Vergleich zu den parentalen HT-29-Zellen keine ADAM17-Bande auf (Abbildung 4.28.a). Auf genomischer Ebene bestätigte sich, dass es sich um einen homozygoten Klon handelte (Abbildung 4.28.b), welcher eine Deletion von 16 Bp an der Stelle 22691 der genomischen DNA zeigte (Abbildung 4.28.c). Dies führt wiederum zu einem Leserasterschub und einem vorzeitigen Stoppcodon, was den Abbruch der Proteinbiosynthese nach 49 Aminosäuren zur Folge hat (Abbildung 4.28.d). Nach Induktion des nekroptotischen Zelltodes zeigte der ADAM17-defiziente HT-29-Klon 31 im Vergleich zu parentalen HT-29-Zellen einen geringen, aber erkennbaren Schutz (Abbildung 4.29.a), und entsprechend ein schwächeres pMLKL-Signal als die parentalen MEF (Abbildung 4.29.b).

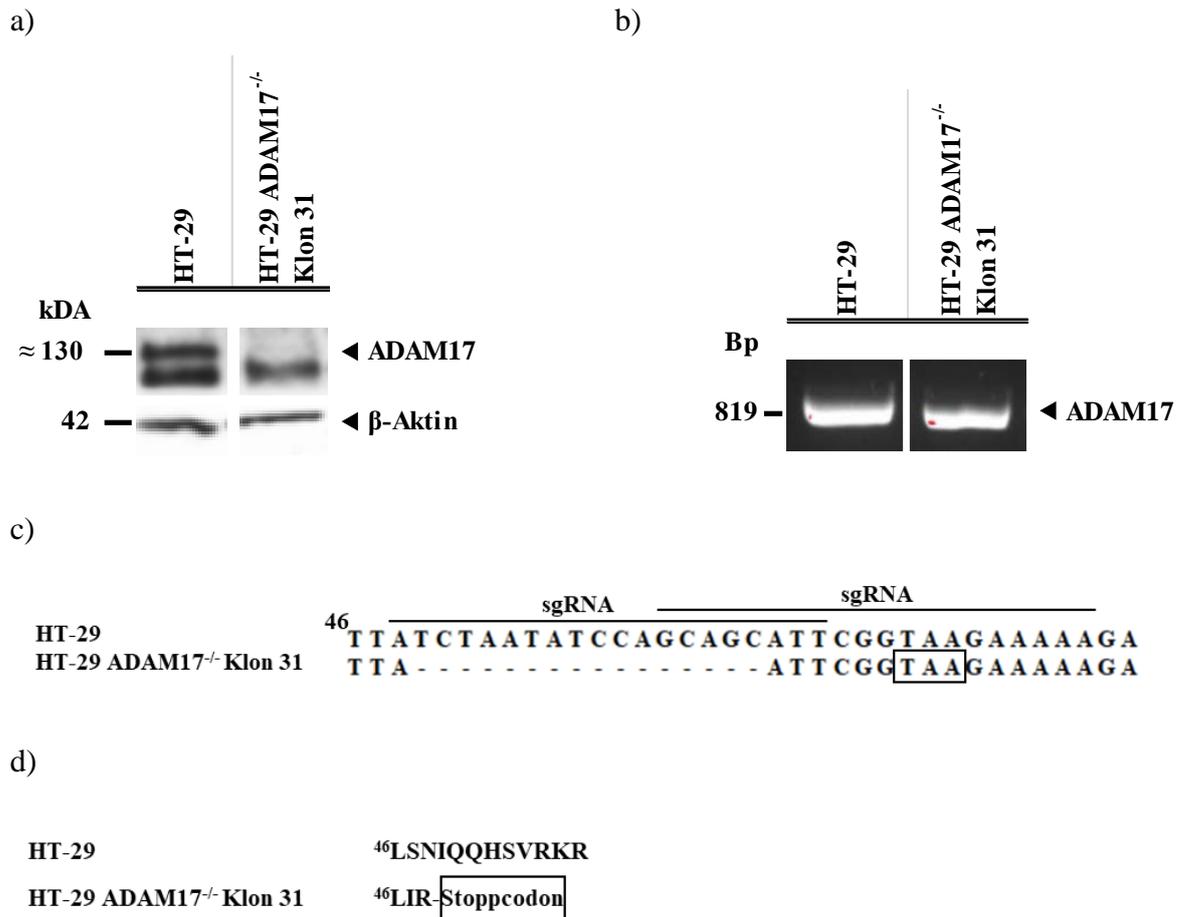


Abbildung 4.28: Generierung von ADAM17-defizienten HT-29-Zellen: Analyse des ADAM17-defizienten HT-29-Klons 31 mittels spezifischem ADAM17-Antikörpernachweis und Sequenzierung der genomischen *ADAM17*-Region, in welcher die sgRNAs binden.

Zur Analyse der Deletion von ADAM17 auf Protein- und genomischer Ebene wurden parentale HT-29-Zellen und der ADAM17-defiziente HT-29-Klon 31 herangezogen. **(a)** Die Kontrolle der Deletion von ADAM17 auf Proteinebene erfolgte mittels spezifischem ADAM17-Antikörpernachweis (≈ 130 kDa). Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa). **(b)** Zur Kontrolle der Deletion von *ADAM17* auf genomischer Ebene wurde genomische DNA isoliert und der DNA-Abschnitt, in dem die sgRNAs binden, durch PCR amplifiziert und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die errechnete Größe der amplifizierten DNA von ADAM17 in parentalen HT-29-Zellen beträgt 819 Bp. Nach erfolgreicher Einführung einer Deletion in das *ADAM17*-Gen ist eine geringere Größe der Bande zu erwarten **(c)** Sequenzierung der Region, in der die sgRNAs binden. Gekennzeichnet sind die sgRNA-Sequenzen ($\overline{\hspace{1cm}}$), das Stoppcodon (\square) und die Deletion (--). Die Zahl 46 kennzeichnet die 46te Aminosäure des Proteins. **(d)** Dargestellt ist die zur aus der Sequenzierung ermittelten DNA-Sequenz korrespondierende translatierte Proteinsequenz. Die Zahl 46 kennzeichnet die 46te Aminosäure des Proteins, (--) gibt ein Fehlen der Aminosäure und (\square) das Stoppcodon an.

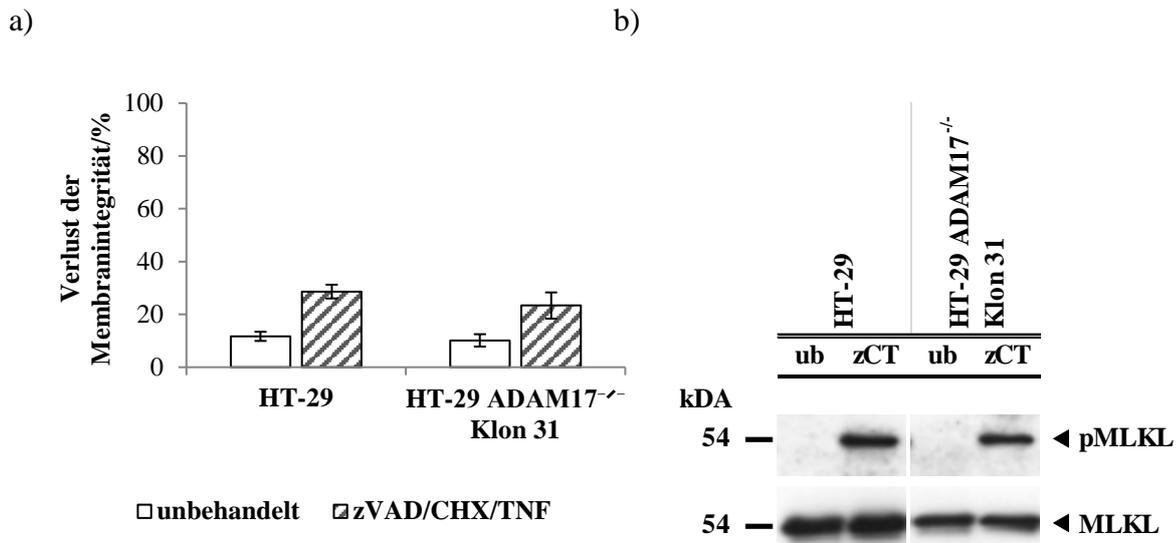


Abbildung 4.29: Generierung von ADAM17-defizienten HT-29-Zellen: Analyse der Nekroptose-Sensitivität des ADAM17-defizienten HT-29-Klons 31 via FACS und Western Blot.

Die Analyse der Nekroptose-Sensitivität erfolgte in parental HT-29- und ADAM17-defizienten HT-29 (Klon 31)-Zellen. Zur Bestimmung der Nekroptose-Sensitivität wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen (ub) oder nach einer Präinkubation für 30 min mit 20 μ M zVAD (z) und 8 μ g mL⁻¹ CHX (C) zur Induktion des Zelltodes mit 100 ng mL⁻¹ TNF (T) für 24 Stunden behandelt. Im Anschluss daran wurden die Zellen hinsichtlich des Verlustes der Membranintegrität sowie des nekroptotischen Markers pMLKL untersucht. **(a)** Die Bestimmung des Verlustes der Membranintegrität erfolgte mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert des Verlustes der Membranintegrität, sowie dessen Standardfehler, welche jeweils aus sechs biologischen Replikaten bestimmt wurden. **(b)** Der Nachweis des nekroptotischen Markers pMLKL erfolgte mittels spezifischem pMLKL/MLKL (54 kDa)-Antikörpernachweis. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von MLKL.

Insgesamt konnte sowohl im murinen als auch im humanen Zellmodell ein Schutz gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes nach der Deletion von ADAM17 detektiert werden. Da dieser jedoch beiden Zellmodellen bisher nur gering ausfiel, bedarf es einer Validierung der Ergebnisse in weiteren Versuchen.

Zusammenfassung der Funktion von ADAM17 im nekroptotischen Signalweg

Insgesamt erwiesen sich sowohl die immortalisierten als auch die primären ADAM17^{ex/ex}-Lungenfibroblasten als nicht geeignet zur Analyse der Rolle von ADAM17 im nekroptotischen Zelltod. Die Deletion von ADAM17 in den murinen MEF und humanen HT-29-Zellen führte hingegen zu einem, wenn auch bisher nur geringen, Schutz gegenüber der Induktion der Nekroptose, sodass diese nach weiterer Validierung geeignete Zellmodelle für weitere Untersuchungen darstellen könnten.



4.4. Die Kartierung der Spaltstellen der A-SMase, über die diese in der Nekroptose proteolytisch aktiviert wird

Frau Dr. Susann Voigt hatte im Verlauf ihrer Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam nachweisen können, dass die A-SMase während der Nekroptose proteolytisch aktiviert wird (Voigt 2014). Zusätzlich waren in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam Deletions- und Mutagenese-Studien zur genaueren Lokalisierung der Spaltstelle innerhalb der A-SMase durchgeführt worden, welche zur Eingrenzung der Spaltstelle auf eine 30 Aminosäuren große Region (V200-C229) geführt hatten. Darüber hinaus war gezeigt worden, dass in dieser Region mindestens zwei Spaltstellen existieren müssen (Fuchslocher Chico 2017).

Die in dieser Arbeit verfolgte Strategie zur weiteren Kartierung der nekroptotischen Spaltstellen der A-SMase basierte auf einer Publikation von Fukumori et al.. Dort wurde in einem anderen Protein unmittelbar C-terminal der zu untersuchenden Region ein FLAG-Tag und die Spaltsequenz für die TEV-Protease eingefügt (Fukumori et al. 2010). Dadurch kann mittels der TEV-Protease die zu untersuchende Region vom restlichen Protein abgespalten und anschließend mittels des FLAG-Tags angereichert werden, sodass in nachfolgenden massenspektrometrischen Untersuchungen nicht das gesamte Protein analysiert werden muss.

In dieser Arbeit wurde zunächst die FLAG-TEV-Sequenz C-terminal zur 30 Aminosäuren großen Region der A-SMase, in welcher die nekroptotischen Spaltstellen vermutet werden, einkloniert (Abbildung 4.30, schematische Darstellung) und die modifizierte A-SMase stabil in L929Ts-Zellen transfiziert. In den stabil transfizierten L929Ts pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-FLAG-TEV-Zellen wurde zunächst untersucht, ob die Einklonierung der zusätzlichen FLAG-TEV-Sequenz einen negativen Einfluss auf die Spaltung der A-SMase hatte. Als Kontrolle dienten L929Ts pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-Zellen, welche die mit einem V5-Tag versehene A-SMase ebenfalls stabil exprimieren (Voigt 2014), allerdings ohne die FLAG-TEV-Sequenz. Darüber hinaus wurde überprüft, ob die FLAG-TEV-A-SMase über das eingebaute FLAG-Tag im Western Blot detektierbar war.



Abbildung 4.30: Schematische Darstellung der FLAG-TEV-A-SMase.

Schematische Darstellung der FLAG-TEV-A-SMase, in welcher C-terminal zur 30 Aminosäure großen Region (V200-C229), in welcher mindestens zwei nekroptotische Spaltstellen der A-SMase vermutet werden, ein FLAG-Tag und die Spaltsequenz für die TEV-Protease eingefügt wurde. C-terminal zum FLAG-Tag und der Spaltsequenz für die TEV-Protease befindet sich die apoptotische Spaltstelle (D267.L268) der A-SMase. Darüber hinaus verfügt die FLAG-TEV-A-SMase am C-Terminus über ein V5-Tag.

Die Ergebnisse der Analyse der Spaltung der FLAG-TEV-A-SMase sind in der Abbildung 4.31 dargestellt und zeigten im Vergleich zur Kontrolle ohne FLAG-TEV-Sequenz für die in dieser Arbeit hergestellten unbehandelten L929Ts pEF6.V5/His/SMPD1_FLAG_TEV-Klone 1 und 3 keine verminderte basale Spaltung, die auf den Einbau der FLAG-TEV-Sequenz zurückgehen könnte. Da der L929Ts pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-FLAG-TEV-Klon 1 eine ausgeprägtere Expression der FLAG-TEV-A-SMase als Klon 3 zeigte, wurde Klon 1 für die folgenden Versuche verwendet. Darüber hinaus zeigte dieser Versuch, dass die FLAG-TEV-A-SMase mittels FLAG-Antikörper nachweis detektiert werden konnte (ebenso wie mit V5-Antikörper nachweis, wobei dort ein stärkeres Signal beobachtet wurde) (Abbildung 4.31).

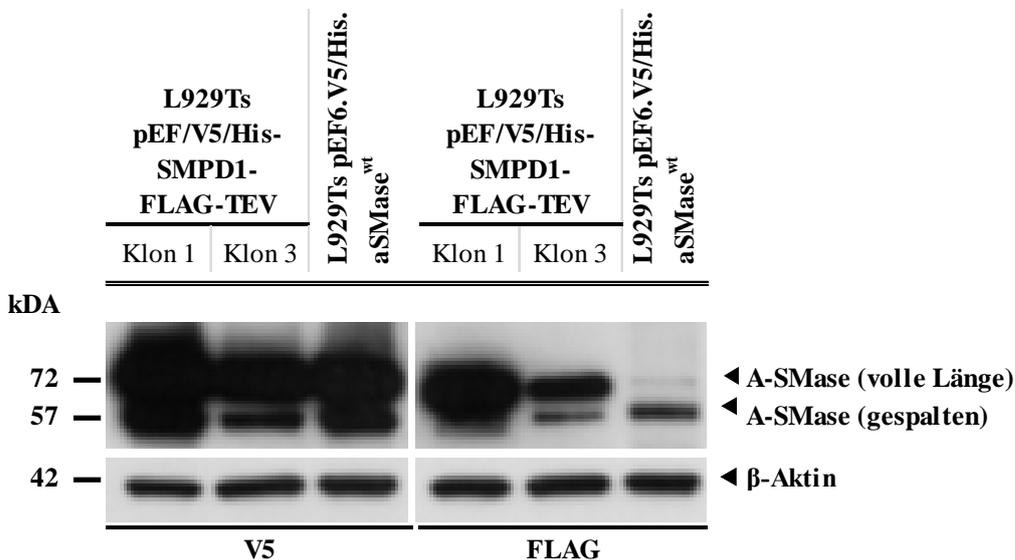


Abbildung 4.31: Kartierung der Spaltstellen der FLAG-TEV-A-SMase: Kontrolle der basalen Spaltung der FLAG-TEV-A-SMase mittels V5- und FLAG-Antikörper.

Zur Analyse der basalen Spaltung der FLAG-TEV-A-SMase wurden aus den stabil transfizierten L929Ts pEF6.V5/His/SMPD1_FLAG_TEV-Klonen 1 und 3 sowie als Kontrolle aus L929Ts pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-Zellen Lysate hergestellt. Diese wurden mittels Western Blot hinsichtlich der nekroptotischen Spaltung der FLAG-TEV-A-SMase durch V5- (links) und FLAG-Antikörper nachweis (rechts) untersucht. Dabei war für die ungespaltene FLAG-TEV-A-SMase eine molekulare Masse von 72 kDa und für die gespaltene eine molekulare Masse von 57 kDa zu erwarten. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa).

Des Weiteren wurde kontrolliert, ob die TEV-Protease die FLAG-TEV-A-SMase auch tatsächlich spaltet. Nach Inkubation der Lysate aus L929Ts pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-FLAG-TEV-Zellen, in welchen zuvor Nekroptose induziert wurde, mit der TEV Protease konnte eine große Menge an gespaltener FLAG-TEV-A-SMase bereits nach einer Stunde detektiert werden. Nach fünf Stunden war eine nahezu komplette Spaltung zu beobachten (Abbildung 4.32). Für die Folgeexperimente wurde eine dreistündige Inkubationszeit gewählt, da dort bereits nahezu die gesamte FLAG-TEV-A-SMase gespalten worden war. Darüber hinaus zeigte sich im TEV-Verdau im Vergleich zum unbehandelten Lysat aus L929Ts pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-Zellen (ohne FLAG-TEV-Sequenz) eine kleinere Bande, was zeigt, dass die Spaltstelle für die nekroptotische Spaltung der A-SMase N-terminal zur TEV-Protease-Spaltstelle lokalisiert ist, und damit nicht der apoptotischen Spaltstelle (Edelmann et al. 2011) entsprechen kann (siehe Abbildung 4.30).

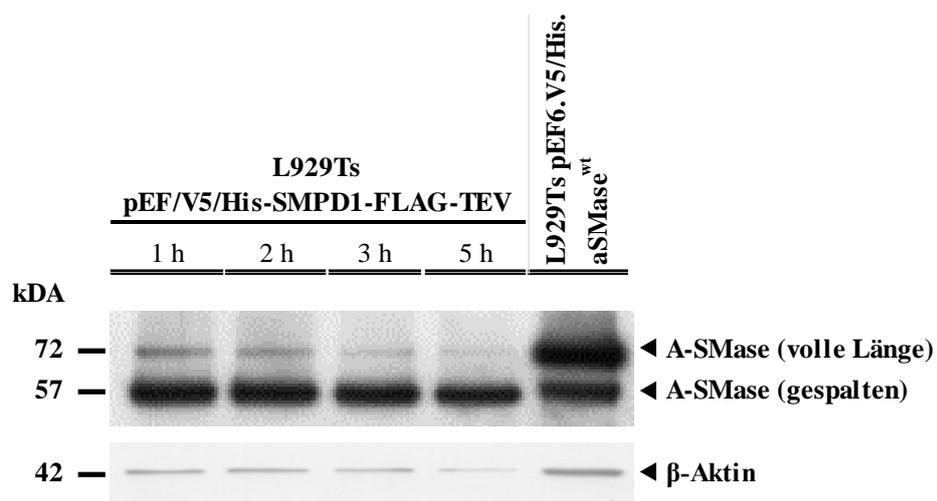


Abbildung 4.32: Kartierung der Spaltstellen der A-SMase: Kontrolle der Spaltung der FLAG-TEV-A-SMase durch die TEV-Protease.

Die Kontrolle der Spaltung der FLAG-TEV-A-SMase durch die TEV-Protease erfolgte in nekroptotischen Zelllysaten, die aus L929Ts pEF6.V5/His/SMPD1_FLAG_TEV -Zellen hergestellt und mit der TEV-Protease über einen Zeitraum von 1, 2, 3 und 5 Stunden inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten Zelllysate unbehandelter L929Ts pEF6.V5/His.aSMase^{wt}-Zellen. Die Detektion der gespaltenen und ungespaltenen A-SMase erfolgte mittels spezifischem V5-Antikörpernachweis. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa).

Im Hinblick auf die Frage, ob eine Anreicherung der FLAG-TEV-A-SMase über eine V5- oder FLAG-IP möglich ist, konnte nach der V5-IP im Vergleich zur FLAG-IP eine höhere Anreicherung der gespaltenen FLAG-TEV-A-SMase detektiert werden (Abbildung 4.33), weswegen im Folgenden V5-IPs zur Herstellung der Proben für die massenspektrometrischen Untersuchungen herangezogen wurden

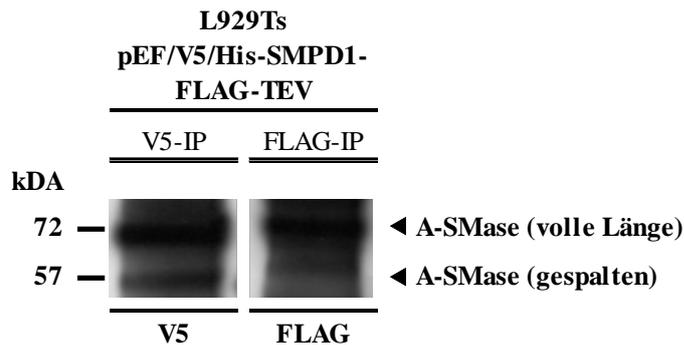


Abbildung 4.33: Kartierung der Spaltstellen der A-SMase: Anreicherung der FLAG-TEV-A-SMase mittels V5- und FLAG-IP.

Zur Analyse der Anreicherung der FLAG-TEV-A-SMase mittels V5- und FLAG-IP wurden Zellysate von nekroptotischen L929Ts pEF6.V5/His/SMPD1_FLAG_TEV-Zellen hergestellt. Mit diesen wurden eine V5- und eine FLAG-IP durchgeführt. Der Nachweis der Anreicherung der A-SMase erfolgte mittels spezifischem V5 (V5-IP)- oder FLAG (FLAG-IP)-Antikörpernachweis.

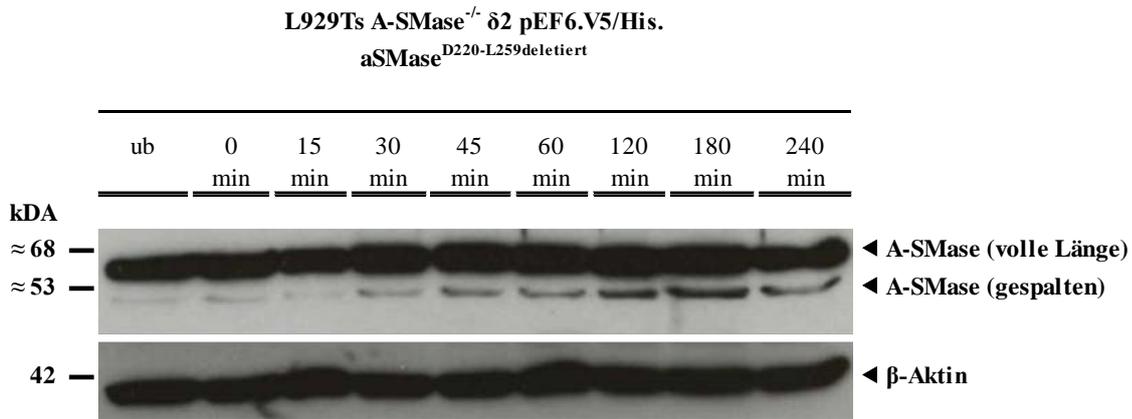
Nach Bestätigung, dass die FLAG-TEV-A-SMase auch nach Einfügen der FLAG-TEV-Sequenz nach wie vor in der Nekroptose gespalten wird, mittels V5- und FLAG-Antikörpern via IP angereichert und detektiert werden kann und an der neu eingeführten TEV-Spaltstelle durch die TEV-Protease gespalten wird, wurde die nekroptotische Spaltung der FLAG-TEV-A-SMase in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Tholey (Kiel, Deutschland) massenspektrometrisch untersucht (siehe Kapitel „Massenspektrometrische Analyse der nekroptotisch gespaltenen FLAG-TEV-A-SMase“). In diesen Analysen konnte (neben der ungespaltenen FLAG-TEV-A-SMase und dem neu generierten N-Terminus der TEV-Spaltstelle), ein neu generierter N-Terminus an der Position P.221 detektiert werden, der vermutlich eine nekroptotische Spaltstelle der A-SMase darstellt. Die Spaltstelle D220.P221 wurde nachfolgend in einem zweiten Ansatz mittels reduktiver Dimethylierung als eine nekroptotische Spaltstelle der A-SMase bestätigt (Anhang, Abbildung 9.3)

Zum Kartieren weiterer potenzieller nekroptotischer Spaltstellen der A-SMase wurden im nächsten Schritt die Plasmide pEF6.V5/His.aSMase^{D220-L259deletiert} und pEF6.V5/His.aSMase^{P221-R230randomisiert} stabil in A-SMase-defiziente L929Ts-Zellen transfiziert. Mittels des pEF6.V5/His.aSMase^{D220-L259deletiert}-Plasmids wird die A-SMase_{D220-L259deletiert} exprimiert, in welcher die neu gefundene D220-P221-Spaltstelle deletiert ist. Das pEF6.V5/His.aSMase^{P221-R230randomisiert}-Plasmid exprimiert die A-SMase_{P221-R230randomisiert}, welche eine randomisierte Aminosäuresequenz im Bereich der Spaltstelle D220-P221 aufweist (DPDCADPLCC→DACCPLCPDD). In beiden Fällen kann keine Spaltung zwischen D220 und P221 in der Nekroptose mehr stattfinden (Anhang, Abbildung 9.4). Die nekroptotische Spaltung der A-SMase_{D220-L259deletiert} und der

A-SMase_P221-R230_{randomisiert} wurde in einem zeitlichen Verlauf von drei Stunden analysiert (Abbildung 4.34). Die L929Ts A-SMase^{-/-} $\delta 2$ pEF6.V5/His.aSMase^{D220-L259deletiert}-Zellen zeigten eine zeitliche Zunahme der nekroptotischen Spaltung mit einem Maximum nach 180 min. Für die L929Ts A-SMase^{-/-} $\delta 3$ pEF6.V5/His.aSMase^{P221-R230randomisiert}-Zellen konnten unabhängig von der Stimulationszeit gleiche Intensitäten der nekroptotisch gespaltenen A-SMase_P221-R230_{randomisiert} detektiert werden. Darauf basierend wurde die nekroptotische Spaltung der A-SMase_D220-L259_{deletiert} und A-SMase_P221-R230_{randomisiert} nach 20 und 180 min in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Tholey (Kiel, Deutschland) massenspektrometrisch untersucht (siehe Kapitel „Analyse der nekroptotisch gespaltenen A-SMase_D220-L259_{deletiert} und A-SMase_P221-R230_{randomisiert}“).

In der massenspektrometrischen Analyse der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase_D220-L259_{deletiert} konnte N-terminal zur 30 Aminosäuren großen Region (V200-C229), in welcher zwei nekroptotische Spaltstelle vermutet worden waren, ein dimethylierter Aspartat-Rest an der Position D143 detektiert werden. D142.D143 als mögliche nekroptotische Spaltstelle der A-SMase bedarf jedoch einer weitergehenden Analyse. Innerhalb der 30 Aminosäuren großen Region V200-C229 konnten im Falle der A-SMase_P221-R230_{randomisiert} drei dimethylierte semi-tryptische Peptide an den Positionen I203, F205 und L206 identifiziert werden (Anhang, Abbildung 9.5). Von diesen drei potenziellen nekroptotischen Spaltstellen konnte jedoch einzig das dimethylierte semi-chymotryptische Peptid (FLTDLHW) an der Position F205 auch in der Analyse der A-SMase_D220-L259_{deletiert} detektiert werden (Anhang, Abbildung 9.6), sodass L204.F205 die zweite identifizierte nekroptotische Spaltstelle der A-SMase darstellt.

a)



b)

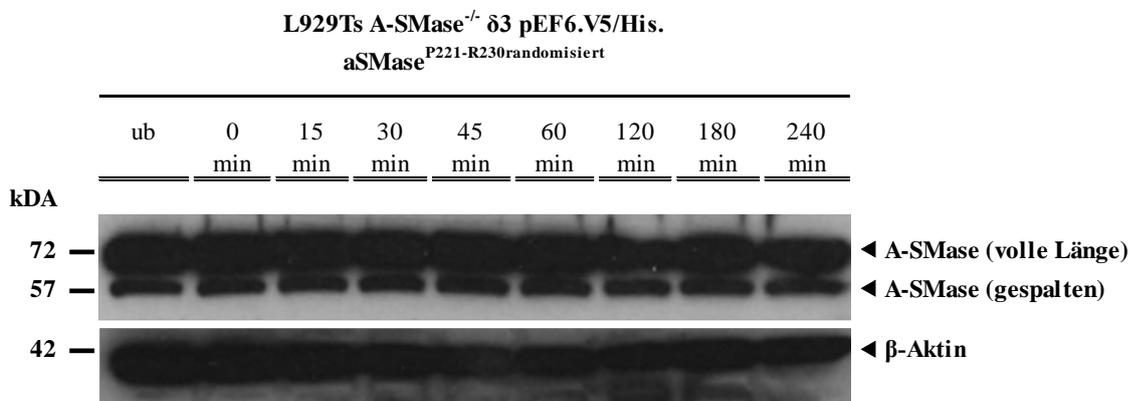


Abbildung 4.34: Kartierung der Spaltstellen der A-SMase_{D220-L259deletiert} und A-SMase_{P221-R230randomisiert}: Kontrolle der nekroptotischen Spaltung der A-SMase_{D220-L259deletiert} und A-SMase_{P221-R230randomisiert} im zeitlichen Verlauf.

Zur Kontrolle der nekroptotischen Spaltung der A-SMase_{D220-L259deletiert} (a) und A-SMase_{P221-R230randomisiert} (b) wurden im zeitlichen Verlauf von 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180 und 240 min nach Induktion der Nekroptose Lysate von L929Ts A-SMase^{-/-} δ 2 pEF6.V5/His.aSMase^{D220-L259deletiert}- und L929Ts A-SMase^{-/-} δ 3 pEF6.V5/His.aSMase^{P221-R230randomisiert}-Zellen hergestellt. Als Kontrolle dienten Lysate unbehandelter L929Ts A-SMase^{-/-} δ 2 pEF6.V5/His.aSMase^{D220-L259deletiert}- und L929Ts A-SMase^{-/-} δ 3 pEF6.V5/His.aSMase^{P221-R230randomisiert}-Zellen. Die Detektion der gespaltenen und ungespaltenen A-SMase erfolgte mittels spezifischem V5-Antikörpernachweis. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente der Nachweis von β -Aktin (42 kDa).

Zusammenfassung der Analyse der nekroptotischen Spaltstellen der A-SMase

In den durchgeführten Versuchen konnten bislang zwei unbekannte nekroptotische Spaltstellen der A-SMase an den Positionen L204.F205 und D220.P221 identifiziert und validiert werden (Abbildung 4.35, schematische Darstellung).

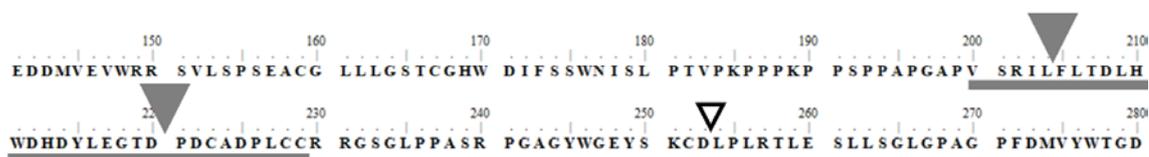


Abbildung 4.35: Kartierung der Spaltstellen der A-SMase: Schematische Darstellung der identifizierten nekroptotischen Spaltstellen der A-SMase.

A-SMase: Gekennzeichnet ist die 30 Aminosäuren große Region (—), in welcher mindestens zwei nekroptotische Spaltstellen vermutet worden waren, die identifizierten nekroptotischen Spaltstellen der A-SMase L204.F205 und D220.P221 (▼), sowie die apoptotische Spaltstelle der A-SMase (▽).

5. Diskussion und Ausblick

5.1. Die Spezies-spezifische Rolle der Caspase-8 und die Rolle der Caspase-10 in der Nekroptose

In früheren Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam hatte die Herunterregulierung oder die Deletion der murinen Caspase-8 einen verstärkten nekroptotischen Zelltod gezeigt, wohingegen die Herunterregulierung oder Deletion der humanen Caspase-8 zum Schutz gegenüber der Induktion der Nekroptose führte (Voigt 2014; Saggau 2018). Murine Caspase-8-defiziente L929Ts/C8/B3-Zellen hatten dabei im Vergleich zu parentalen L929Ts-Zellen im zeitlichen Verlauf frühere und stärker ausgeprägte pMLKL-Banden gezeigt (Saggau 2018). Wie in diesen Vorarbeiten zeigten die Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen auch in dieser Arbeit nach Induktion der Nekroptose einen erhöhten Verlust der Membranintegrität und verstärkte pMLKL-Signale. In den parentalen L929Ts-Zellen war in dieser Arbeit pMLKL dagegen – abhängig von der jeweiligen Stimulationskombination – nur schwach oder noch nicht detektierbar. Dies könnte auf die in dieser Arbeit verwendete kürzere Stimulationszeit von zwei Stunden zurückzuführen sein. Diese verkürzte Zeit war notwendig, da bei längerer Stimulation zwar die pMLKL-Signale in den parentalen L929Ts-Zellen deutlicher sichtbar wurden, die sensitiveren Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen dann aber vollständig starben und keine Unterschiede in den jeweiligen Stimulationskombinationen mehr detektierbar waren. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in dieser Arbeit hatte auch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam in früheren Untersuchungen in parentalen L929Ts-Zellen erst zwei Stunden nach Induktion der Nekroptose eine schwache pMLKL-Bande detektiert (Saggau 2018). Zudem war in umfangreichen Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam belegt worden, dass L929Ts-Zellen ein etabliertes Zellmodell für Nekroptose darstellen (Voigt 2014; Saggau 2018).

Ein nekroptotischer Zelltod nach der Deletion der Caspase-8 *in vivo* war im murinen Modell bereits bei Oberst et al. beschrieben worden. So zeigte sich die Deletion der Caspase-8 in Mäusen um den embryonalen Tag E10,5 als letal, durch die zusätzliche Deletion von RIPK3 konnten jedoch lebendige Mäuse erhalten werden, woraus geschlossen wurde, dass die Caspase-8 insgesamt die RIPK3-abhängige Nekrose inhibiert (Oberst et al. 2011). Dies belegt wiederum eine Schlüsselrolle der Caspase-8 als regulatorisches Molekül

der Nekroptose in der embryonalen Entwicklung. Im humanen Zellmodell konnte in dieser Arbeit der früher beobachtete Schutz der Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes (Saggau 2018) bestätigt werden. In anderen Studien war der Effekt der Caspase-8-Deletion in humanen Zellen bislang einzig in Kombination mit SMAC-Mimetika untersucht worden. Dort hatte die Deletion der Caspase-8 akute myeloische Leukämie-Zellen für den BP-induzierten nekroptotischen Zelltod sensitiviert (Brumatti et al. 2016).

Im Rahmen einer eingehenderen Betrachtung der Spezies-spezifischen Rolle der Caspase-8 konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass im murinen Zellmodell die humane Wildtyp-Caspase-8 die Funktion der murinen Caspase-8 zumindest teilweise übernehmen kann. So war, im Vergleich zu Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen, sowohl der Verlust der Membranintegrität als auch der nekroptotische Marker pMLKL nach Induktion der Nekroptose in L929Ts/C8/B3-Zellen reduziert, die mit der humanen Wildtyp-Caspase-8 rekonstituiert worden waren (wenn auch nicht so stark wie in mit der murinen Wildtyp-Caspase-8 rekonstituierten L929Ts/C8/B3-Zellen). Im Gegensatz dazu zeigten humane Caspase-8-defiziente HT-29/C8/F11-Zellen, in denen die murine Wildtyp-Caspase-8 exprimiert wurde, im Vergleich zu Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen keine Änderung im Hinblick auf nekroptotische und apoptotische Marker oder ihre Sensitivität gegenüber der Nekroptose- oder Apoptose-Induktion. Dies spricht – im Einklang mit den früheren, vorläufigen Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam – dafür, dass die murine Caspase-8 in humanen Zellen die Funktion der humanen Caspase-8 nicht übernehmen kann. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnten daher die Hinweise auf eine differentielle Rolle der Caspase-8 in der Regulation der murinen und humanen Nekroptose validiert und erweitert werden. Die Sequenz der murinen und humanen Caspase-8 betrachtend, besteht eine 76 %ige Sequenzähnlichkeit und eine 70 %ige Sequenzübereinstimmung, welche vergleichsweise zu anderen homologen Proteinen, wie der Caspase-6 mit einer 96 % Sequenzähnlichkeit zwischen der murinen und humanen Form, gering ist (van de Craen et al. 1998). Eine unterschiedliche Funktion der humanen und murinen Caspase-8 ist bereits an der Gegebenheit ersichtlich, dass eine Deletion der murinen Caspase-8 zur embryonalen Letalität führt (Kaiser et al. 2011), wohingegen eine Caspase-8-Defizienz im Menschen (c.1096C>T- und p.248R>W-Mutation) bislang in vier Patienten nachgewiesen wurde (Stand 2015 (Niemela et al. 2015)). Diese Defizienz ist mit

multiorganischer lymphozytärer Infiltration und Granulomen sowie einer Immunschwäche/Immundysregulation verbunden, aber nicht letal (Chun et al. 2002; Niemela et al. 2015).

Generell konnte im murinen Zellmodell nach der Rekonstitution der L929Ts/C8/B3-Zellen mit den Protease-aktiven Formen der humanen und murinen Caspase-8 und der Caspase-10 sowie in den parentalen L929Ts-Zellen nach der Induktion des Zelltodes unter der Zugabe von zVAD Nekroptose und ohne die Zugabe von zVAD Apoptose (Ausnahme: Nekroptose in TNF-stimulierten parentalen L929Ts-Zellen) detektiert werden. Gleiches gilt im humanen Zellmodell für die parentalen HT-29- und die mit den Protease-aktiven Formen der humanen Caspase-8 und der Caspase-10 rekonstituierten HT-29/C8/F11-Zellen. Im Gegensatz dazu konnte in den Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3- und HT-29/C8/F11-Zellen, sowie in den mit den Protease-inaktiven Formen der Caspasen rekonstituierten Caspase-8-defizienten Zellen auch ohne die Zugabe von zVAD nach Induktion des Zelltodes einzig Nekroptose ausgelöst werden. Newton et al. detektierten, dass die katalytische Aktivität der Caspase-8 entscheidend für die Entwicklung der Maus ist. So zeigten Mäuse, welche eine katalytisch inaktive Caspase-8 (C362A) exprimierten, einen embryonalen Tod zwischen den Tagen E10,5 und E12,5, welcher mit dem Auftreten von pRIPK3 und Nekroptose verbunden war. Eine zusätzliche Deletion von MLKL bewirkte ein Überleben der Mäuse bis zur Geburt, jedoch starben sie perinatal eines Nekroptose-unabhängigen Todes. Interessanterweise konnte die Überexpression einer Caspase-8-Mutante (D212A/D218A/D225A/D387A), die nicht in der Lage ist, sich mittels Autoprozessierung zu aktivieren, die Letalität der Caspase-8-Deletion aufheben (Newton et al. 2019). Katalytisch inaktive Formen der Caspase-8, in denen die Autoprozessierung inhibiert ist, sind in der Lage, durch Bildung eines Komplexes mit c-FLIP_L aktiviert zu werden, jedoch werden diesem c-FLIP_L-Caspase-8-Komplex Überlebens- und Differenzierungsaufgaben anstatt Induktion von Apoptose zugeschrieben, da die Effektivität dieses Komplexes für die Spaltung der pro-apoptischen Proteine BID und Caspase-3 geringer als beispielsweise für RIPK1 ist, für das Funktionen in proliferativen Antworten postuliert werden (Pop et al. 2011). c-FLIP_L-Caspase-8-Heterodimere können wiederum andere c-FLIP_L-Caspase-8-Heterodimere mit höherer Affinität als Pro-Caspase-8-Homodimere spalten, was ihren anti-apoptischen Effekt verstärkt. Allgemein kompetiert c-FLIP_L mit der Pro-Caspase-8 um die Bildung von Apoptose-induzierenden Homodimeren oder Überlebenssignal-induzierenden Heterodimeren, sodass eine hohe c-FLIP_L-Konzentration Apoptose inhibiert und niedrige Konzentrationen Apoptose fördern (Smyth et al. 2020). Der c-FLIP_L-Caspase-8-Komplex

kann zusätzlich vor der RIPK3-abhängigen Nekrose schützen, wie in Oberst et al. beschrieben (Oberst et al. 2011). Über die Rolle der Caspase-8-Aktivität im murinen Zellmodell ist zusammenfassend somit aus der Literatur folgendes bekannt: Die Deletion der Caspase-8, die Inhibierung ihrer Aktivität, sowie eine Mutation im katalytischen Zentrum ist mit nekroptotischen Zelltod verbunden. Die Inhibierung der Caspase-8-Autoprozessierung sowie hohe c-FLIP_L-Spiegel bewirken hingegen die Bildung von Heterodimeren und fördern das Zellüberleben. Eine hohe Caspase-8-Aktivität, verbunden mit geringen c-FLIP_L-Spiegeln, induziert den apoptotischen Zelltod. Die Induktion der Nekroptose durch die Deletion oder Inhibierung der Caspase-8, sowie die Induktion der Apoptose mittels der Rekonstitution der katalytisch aktiven Form der Caspase-8 konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zum murinen Zellmodell ist die Rolle der Caspase-8-Aktivität im humanen Zellmodell weit weniger gut untersucht. In einer Studie führte die Deletion der Caspase-8 in akuten myeloischen Leukämie-Zellen, in Kombination mit dem SMAC-Mimetikum BP, zur Sensitivierung für den nekroptotischen Zelltod (Brumatti et al. 2016). In Übereinstimmung mit dieser Studie konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass die Zugabe von BP den in humanen Caspase-8-defizienten Zellen vorhandenen Schutz vor Nekroptose aufhebt und für Nekroptose sensitiviert. Dies beruht möglicherweise auf einem durch BP induzierten Abbau von IAP-Proteinen, die die Nekroptose hemmen (Safferthal 2017, Abbildung 1.2). Durch den Abbau der IAPs entsteht mehr deubiquitinyliertes RIPK1, wodurch die Assoziation von RIPK1 und RIPK3 gefördert und das Nekrosom stabilisiert wird (Vandenabeele et al. 2010). Durch den BP-bedingten Druck auf die verstärkte Assoziation des Nekrosoms könnte somit der in humanen Caspase-8-defizienten Zellen vorhandene Schutz vor Nekroptose überkommen werden. Ebenso wie die murine Caspase-8 geht die humane Caspase-8 heterodimere Komplexe mit c-FLIP_L ein (Smyth et al. 2020). In Fortführung früherer, vorläufiger Befunde der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam (Voigt 2014; Saggau 2018), zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht nur den Schutz der humanen Caspase-8-defizienten HT-29-Zellen vor nekroptotischem Zelltod, sondern sie belegen auch, dass die Rekonstitution der Protease-aktiven Formen der humanen Caspase-8 und interessanterweise auch der Caspase-10, nicht aber der murinen Caspase-8, die Nekroptose-Sensitivität der parentalen HT-29-Zellen wiederherstellt oder sogar noch verstärkt. Dies gilt insbesondere, und anders als im murinen Zellmodell, auch für die Protease-inaktiven Formen der Caspasen, am stärksten ausgeprägt für die humane

inaktive Caspase-8 und Caspase-10, aber wiederum nicht für die murine Caspase-8. Dies deutet darauf hin, dass im humanen Zellmodell das Vorhandensein der Caspase-8 (inhibiert oder katalytisch inaktiv) entscheidend für die Induktion des nekroptotischen Signalweges ist. Insgesamt führen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zu einem neuen Modell der Spezies-spezifischen Rolle der Caspase-8 im murinen und humanen Zellmodell, das in der Abbildung 5.1 zu finden ist.

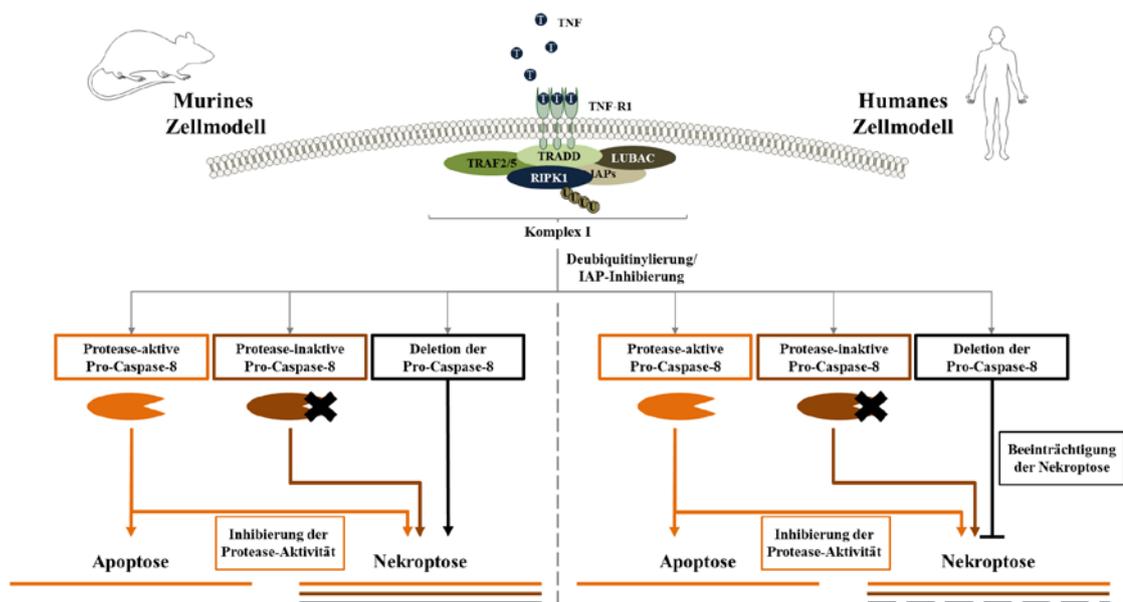


Abbildung 5.1: Gegenüberstellung der Spezies-spezifischen Rolle der Caspase-8 im murinen und humanen Zellmodell.

Dem murinen und humanen Zellmodell der Spezies-spezifischen Rolle der Caspase-8 ist gemeinsam, dass Apoptose beim Vorhandensein der Protease-aktiven Form der murinen Caspase-8 (im murinen Zellmodell) bzw. der humanen Caspase-8 (im humanen Zellmodell) induziert wird. Die Inhibierung der Aktivität der Caspase-8 zum Beispiel durch die Zugabe von zVAD, wie auch die Protease-inaktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 führen hingegen zur Induktion des nekroptotischen Zelltodes. Die Spezies-spezifische Rolle der Caspase-8 rührt daher, dass im murinen Zellmodell die Deletion der Caspase-8 die Induktion der Nekroptose bewirkt, wohingegen im humanen Zellmodell die Deletion der humanen Caspase-8 zur Beeinträchtigung der Nekroptose führt. Somit scheint das Vorhandensein der Caspase-8 als *scaffold* im humanen Zellmodell, jedoch nicht im murinen Zellmodell, entscheidend die Induktion des nekroptotischen Zelltodes zu sein.

Zusätzlich zur Spezies-spezifischen Rolle der Caspase-8 wurde in dieser Arbeit die Funktion der Caspase-10 in der Nekroptose eingehender untersucht. Die Caspase-10, die im Menschen exprimiert wird, in Nagetieren im Laufe der Evolution jedoch verloren gegangen ist, besitzt eine 46 %ige Sequenzübereinstimmung der katalytischen Domäne mit der humanen Caspase-8 (Wachmann et al. 2010) und eine 66 %ige Sequenzähnlichkeit und 55 %ige Sequenzübereinstimmung mit der murinen Caspase-8 (van de Craen et al. 1998). Überlappende Substratspezifitäten der Caspase-10 und der humanen Caspase-8 wurden in Fischer et al. beschrieben (Fischer et al. 2006). In dieser Arbeit konnte die rekonstituierte Protease-aktive Form der Caspase-10 sowohl im murinen als auch im humanen Zellmodell, d. h. in Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3- und HT-29/C8/F11-Zellen, die ursprüngliche

Sensitivität der parentalen L929Ts- und HT-29-Zellen gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes wiederherstellen, und somit sowohl die Funktion der murinen Caspase-8 (im murinen Zellmodell) als auch der humanen Caspase-8 (im humanen Zellmodell) in der Nekroptose übernehmen. Dies deutet auf eine mögliche Übernahme von Funktionen der Caspase-10 durch die murine Caspase-8 nach dem Verlust der Caspase-10 aus dem murinen Genom hin. Im Hinblick auf apoptotische und nekroptotische Marker zeigten die mit der Wildtyp-Caspase-10 rekonstituierten L929Ts/C8/B3-Zellen im Vergleich zu den parentalen L929Ts-Zellen nach der Stimulation mit CHX/TNF stärkere apoptotische Marker. Im humanen Zellmodell konnten für die HT-29- und HT-29/C8/F11-Zellen, welche mit der Wildtyp-Caspase-10 rekonstituiert worden waren, nach der Stimulation mit CHX/TNF gleiche Intensitäten der apoptotischen Marker detektiert werden. Bislang wurde die Rolle der Caspase-10 einzig im apoptotischen, jedoch nicht im nekroptotischen Signalweg eingehender untersucht. Im apoptotischen Signalweg zeigten Wang et al., dass Caspase-8-defiziente Jurkat I9.2-Zellen vor FasL- und TRAIL-induziertem Zelltod geschützt sind, und, dass dieser Effekt durch die Überexpression der Caspase-10 wieder aufgehoben wurde. Anders als die Caspase-8 zeigte die Caspase-10 in diesen Untersuchungen jedoch keine Spaltung von RIPK1. Die Caspase-3 hingegen wurde sowohl von Caspase-8 als auch von Caspase-10 gespalten (Wang et al. 2001). Gleichwertige Funktionen in der Induktion der Apoptose wurden der Caspase-8 und der Caspase-10 in Kischkel et al. zugesprochen (Kischkel et al. 2001). Im Gegensatz dazu zeigten Sprick et al., dass die Caspase-10 in Caspase-8-defizienten Jurkat-Zellen zwar zum TRAIL- und FasL-induzierten DISC rekrutiert und dort aktiviert wird, ihre Überexpression jedoch nicht zur erhöhten TRAIL- oder FasL-induzierten Apoptose führt. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Caspase-10 die Funktion der Caspase-8 nicht vollständig übernehmen konnte. Zudem wurde ein alternativer, Caspase-10-abhängiger Signalweg postuliert. Darüber hinaus zeigten sie in Zellen, welche Caspase-10 nicht exprimieren, dass die Rekrutierung und Aktivierung der Caspase-8, sowie die Induktion der Apoptose unabhängig von der Caspase-10 stattfand (Sprick et al. 2002). In Übereinstimmung mit diesen Befunden beschrieben Horn et al., dass die Caspase-8 als *scaffold*, jedoch nicht die Caspase-10, essenziell für die Bildung des DISC-Komplexes ist (Horn et al. 2017). Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte der Caspase-10 in Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen konnten nur nach Überexpression der Caspase-10 beobachtet werden, sodass die untersuchten Caspase-10-Konzentrationen nicht den physiologischen Bedingungen entsprachen. Insgesamt konnten in dieser Arbeit jedoch überlappende Funktionen der Caspase-10 mit der murinen und humanen Caspase-8

detektiert werden, sodass eine partielle Übernahme der Funktion der Caspase-8 durch die Caspase-10, welche im apoptotischen Signalweg beobachtet wurde, auch in der Nekroptose denkbar ist.

Die Rolle der Protease-aktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 und Caspase-10 wurde neben den Caspase-8-defizienten murinen und humanen L929Ts/C8/B3- und HT-29/C8/F11-Zellmodellen auch in Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen untersucht. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam war in früheren Versuchen nach der Deletion der Caspase-10 in humanen U937- und HT-29-Zellen (Klon G14) ein verstärkter Verlust der Membranintegrität nach Induktion der Nekroptose beobachtet worden (Saggau 2018). Im Gegensatz dazu zeigte derselbe Caspase-10-defiziente HT-29-Klon G14 in dieser Arbeit eine den parentalen HT-29-Zellen ähnliche Sensitivität gegenüber der Induktion der Nekroptose. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam hatte darüber hinaus die Nekrosom-Zusammensetzung in den Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11- und Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen analysiert. In den parentalen HT-29-Zellen war nach der Induktion der Nekroptose eine zeitliche Zunahme der Assoziation der Caspase-8 mit RIPK1, RIPK3 und Caspase-10 detektiert worden. Im Gegensatz dazu war in den Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen kein zeitlicher Anstieg der Nekrosom-Komponenten und in den Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen erhöhte RIPK1-, RIPK3- und Caspase-8-Spiegel im Nekrosom nach der Induktion der Nekroptose beobachtet worden (Saggau 2018). Im Hinblick auf diese Ergebnisse wurde in dieser Arbeit die Induktion des nekroptotischen Signalweges mittels Zugabe des Nekroptose-Inhibitors GSK'872 untersucht. In den parentalen HT-29- und mit den Protease-aktiven und -inaktiven Formen der Caspase-10 rekonstituierten Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen, jedoch nicht in den Caspase-10-defizienten HT-29/C10/G14-Zellen allein, konnte eine Reduktion des Zelltodes erzielt werden. Dies deutet im Gegensatz zu den früheren Ergebnissen (Saggau 2018) auf eine Beeinträchtigung der Nekroptose durch die Deletion der Caspase-10 hin. Horn et al. identifizierte die Caspase-10 als negativen Regulator der Fas-DISC-induzierten Aktivierung der Caspase-8 und als Aktivator des NF- κ B-Überlebenssignalweges (Horn et al. 2017). Dies würde für einen vermehrten apoptotischen Zelltod nach der Deletion der Caspase-10 sprechen, welcher in dieser Arbeit jedoch nicht detektiert wurde. Vielmehr war die Überexpression der Wildtyp-Caspase-10 in L929Ts/C8/B3- und HT-29/C8/F11-Zellen mit apoptotischen Markern verbunden. Darüber hinaus wurde berichtet, dass die Caspase-10 wie die Caspase-8 Komplexe mit c-FLIP_L-

eingehen kann. Interessanterweise sind Caspase-10-c-FLIP_L-Heterodimere im Gegensatz zu Caspase-8-c-FLIP_L-Heterodimeren in der Lage, BID zu spalten und den intrinsischen apoptotischen Signalweg auszulösen (Wachmann et al. 2010; van Raam et al. 2012). Dies würde wiederum im Einklang mit den Ergebnissen in dieser Arbeit stehen.

Bei der Betrachtung der Bedeutung der katalytischen Aktivität der Caspase-8 und der Caspase-10 im nekroptotischen Signalweg sollte ein Augenmerk darauf gerichtet sein, dass zVAD die Caspase-Aktivität der Caspase-8 und der Caspase-10 inhibiert. So zeigten auch in dieser Arbeit die mit den Protease-aktiven Formen der humanen Caspase-8 und Caspase-10 rekonstituierten L929Ts/C8/B3- und HT-29/C8/F11-Zellen nach Induktion der Apoptose einen starken Anstieg der Caspase-3- und Caspase-8-Aktivität, welche nach der Zugabe von zVAD auf ein Basislevel reduziert wurde (Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14). Im Vergleich zu den Protease-aktiven Formen der humanen Caspase-8 und Caspase-10 zeigte sich nach der Rekonstitution der L929Ts/C8/B3- und HT-29/C8/F11-Zellen mit den Protease-inaktiven Formen wie erwartet keine signifikante Aktivität der Caspase-3 und Caspase-8. Die mit der murinen Caspase-8 rekonstituierten L929Ts/C8/B3- und HT-29/C8/F11-Zellen wiesen trotz starker Expression der murinen Caspase-8 im Vergleich zu der Protease-inaktiven Form der murinen Caspase-8 nur eine geringe Aktivität auf. Diese geringe Aktivität, welche dem Basislevel der Caspasen-Aktivität nach der Zugabe von zVAD glich, war jedoch ausreichend, um den parentalen Phänotyp in den mit der murinen Caspase-8 rekonstituierten Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen wiederherzustellen. Eine Restaktivität der Caspasen trotz Inhibierung konnte darüber hinaus in Lafont et al. beobachtet werden. Dort konnte die Zugabe von zVAD die Caspase-10-Prozessierung während des Fas-Signalweges in HeLa-Zellen nicht inhibieren. Gleichzeitig zeigten sie die Möglichkeit eines alternativen, zVAD-resistenten pro-apoptotischen Signalweges auf (Lafont et al. 2010). Neben einer möglichen Restaktivität nach der Zugabe von zVAD als mögliche Theorie zur Erklärung des schützenden Effekts der Expression der humanen und murinen Wildtyp-Caspase-8 und Wildtyp-Caspase-10 in murinen Caspase-8-defizienten L929Ts/C8/B3-Zellen gegenüber der Induktion der Nekroptose und einen Nekroptose-fördernden Effekt nach der Expression der humanen Wildtyp-Caspase-8 und Wildtyp-Caspase-10 in humanen Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen, ist im humanen System darüber hinaus zudem eine *scaffold*-Funktion der Caspase-8 in der Nekroptose denkbar. Für den apoptotischen Signalweg wurde bereits eine *scaffold*-Funktion der humanen Caspase-8 berichtet. So konnte die Inhibierung der Caspase-8 die TRAIL-

induzierte Apoptose, jedoch nicht die Zytokin-Produktion inhibieren. Im Gegensatz zeigte die Deletion und Herunterregulierung der humanen Caspase-8 eine Blockierung des apoptotischen Signalweges und der Produktion der Zytokine. Als *scaffold* bildete die Caspase-8 einen Teil des FADDosoms, welche eine NF- κ B-abhängige Entzündung auslöste (Henry et al. 2017). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der Protease-Aktivität der humanen Caspase-8 ebenso wie die Rekonstitution der L929Ts/C8/B3- und HT-29/C8/F11-Zellen mit der Protease-inaktiven Form der humanen Caspase-8 zur Induktion des nekroptotischen Signalweges führt, sodass sich in der Nekroptose ebenfalls eine *scaffold*-Funktion der humanen Caspase-8 vermuten lässt.

Die Rolle der Protease-inaktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 und Caspase-10 im nekroptotischen Signalweg wurde in dieser Arbeit eingehender betrachtet, da deren Expression eine erhöhte Zytotoxizität zur Folge hatte. Basierend darauf, dass unter Inhibierung des apoptotischen und nekroptotischen Signalwegs eine über die *scaffold*-Funktion der Caspase-8-bedingte Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (siehe Kapitel „Pyroptose“) berichtet wurde (Kang et al. 2015; Fritsch 2020), wurde in dieser Arbeit eine Induktion der Pyroptose in den mit den Protease-aktiven und -inaktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 und Caspase-10 rekonstituierten L929Ts/C8/B3-, HT-29/C8/F11 und HT-29/C10/G14-Zellen untersucht. In den drei untersuchten Zellmodellen wurde jedoch keine Spaltung von GSDMD, einem Marker für die Pyroptose, detektiert. Darüber hinaus konnte in den mit den Protease-inaktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 und Caspase-10 rekonstituierten HT-29/C8/F11-Zellen mittels Zugabe des RIPK3-Inhibitors GSK'872 die Zytotoxizität der Expression der katalytisch inaktiven Caspasen auf einen nekroptotischen Zelltod zurückgeführt werden.

Für zukünftige Analysen der Rolle der Caspase-8 und Caspase-10 im humanen System wurden Caspase-8- und -10-defiziente HT-29/C8/C10-Zellen generiert, mit denen es möglich ist, Effekte von endogen vorhandener Caspase-8 oder Caspase-10 zu eliminieren. Die Caspase-8- und -10-defizienten HT-29/C8/C10-Zellen zeigten im Vergleich zu den parental HT-29-Zellen eine ähnliche Sensitivität gegenüber der Induktion der Nekroptose, jedoch verstärkte pMLKL-Banden. Eine Verstärkung des nekroptotischen Zelltodes nach der Deletion der humanen Caspase-8 und Caspase-10 im humanen Zellmodell steht jedoch nicht im Einklang mit den Ergebnissen der Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen, bei denen die Deletion der Caspase-8 zum Schutz gegenüber der Induktion der Nekroptose

fürte. Darüber hinaus zeigten die mit den Protease-aktiven oder -inaktiven Formen der Caspase-10 rekonstituierten Caspase-8-defizienten HT-29/C8/F11-Zellen einen verstärkten nekroptotischen Zelltod, sodass eine mögliche Verstärkung der Nekroptose in Caspase-8- und -10-defizienten HT-29/C8/C10-Zellen in zukünftigen Arbeiten eingehender untersucht werden muss.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Komplexität der Regulation und Funktion der Caspase-8 und der Caspase-10. Die Spezies-spezifische Rolle der Caspase-8 stellt darüber hinaus einen entscheidenden Punkt für die Entwicklung von zukünftigen Nekroptose-basierten Therapien dar. In der Krebstherapie beispielsweise kann die Induktion der Nekroptose Tumorzell-abhängig zum reduzierten Tumorwachstum führen und könnte im Fall, dass Tumore Resistenzen gegen Apoptose-induzierte Therapien entwickeln, als alternativer Behandlungszugang dienen. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Induktion der Nekroptose entzündliche Reaktionen auslöst und die Bildung von Metastasen und Immunsuppression fördern kann (Gong et al. 2019). Eine gezielte Therapie zur Induktion oder Inhibierung des nekroptotischen Signalweges könnte somit entscheidend für das Überleben des Patienten sein. Bei Nichtbetrachtung der differentiellen Funktion der Caspase-8 in der Maus, dem häufigsten Versuchstier, und dem Menschen, könnte eine therapeutische Inhibition der Caspase-8 nicht zur nekroptotischen Eliminierung des Tumors, sondern stattdessen zum verstärkten Überleben der Tumorzellen und zum Tod des Patienten führen. Die weitere Untersuchung der Spezies-spezifischen Rolle der Caspase-8 ist somit auch in therapeutischer Hinsicht von großer Bedeutung. Unter diesem Aspekt könnten in der Zukunft Analysen der Komplex II- und Nekrosom-Komposition in Mensch vs. Maus neue und tiefere Einblicke geben. Da der nekroptotische und apoptotische Signalweg keine 100 %ige Trennung voneinander erlauben, ist darüber hinaus die gleichzeitige Analyse der DISC von Interesse.

5.2. Der Wirkmechanismus der Serinprotease HtrA2/OMI in der Nekroptose

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam war in Vorarbeiten ein schützender Effekt der HtrA2/OMI-Defizienz oder -Inhibierung gegenüber der Induktion des nekroptotischen Signalweges entdeckt worden (Sosna et al. 2013; Sosna et al. 2016), der genaue Wirkmechanismus der Serinprotease in der Nekroptose ist jedoch bislang nicht aufgeklärt.

Im Hinblick auf die Frage, die Protease-Aktivität von HtrA2/OMI für die Funktion in der Nekroptose entscheidend ist oder ob HtrA2/OMI als *scaffold*-Protein wirksam wird, konnte in dieser Arbeit nach Rekonstitution der HtrA2/OMI-defizienten MEF und L929Ts-Zellen mit der Protease-aktiven Form von HtrA2/OMI die Sensitivität gegenüber der Nekroptose-Induktion in L929Ts-Zellen wieder auf das Niveau der parental Zellen, und im Fall der MEF ebenfalls, wenn auch in geringerem Umfang, wiederhergestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten mit der katalytisch inaktiven Form von HtrA2/OMI rekonstituierte L929Ts HtrA2/OMI^{-/-}-Zellen keine Wiederherstellung ihrer Nekroptose-Sensitivität. Die Ergebnisse in den entsprechend rekonstituierten HtrA2/OMI^{-/-}-MEF (Wiederherstellung der Nekroptose-Sensitivität) sind wegen der geringen Expression der Protease-inaktiven Form von HtrA2/OMI und dem hohen Grad an Zelltod in den unbehandelten Zellen derzeit noch mit Vorsicht zu interpretieren. Insgesamt sprechen die erhaltenen Ergebnisse jedoch dafür, dass die Protease-Aktivität für die Funktion von HtrA2/OMI in der Nekroptose entscheidend ist. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von Blink et al., die detektierten, dass in humanen Neutrophilen die HtrA2/OMI-Protease-Aktivität entscheidend für den zVAD/TNF-induzierten Zelltod war. So konnte der zVAD/TNF-abhängige Zelltod durch die Zugabe von UCF-101, einem spezifischen Inhibitor der HtrA2/OMI-Protease-Aktivität, verhindert werden (Blink et al. 2004).

Während der Apoptose transloziert HtrA2/OMI aus den Mitochondrien in das Zytoplasma, wo es IAPs bindet und durch deren Inhibierung den apoptotischen Zelltod verstärkt. Hinsichtlich der intrazellulären Lokalisation von HtrA2/OMI im Verlauf der Nekroptose existieren widersprüchliche Studien. So berichteten Fuchslocher Chico (murines Zellmodell) und Blink et al. (humanes Zellmodell), dass HtrA2/OMI in den Mitochondrien verbleibt (Blink et al. 2004; Fuchslocher Chico 2017), wohingegen Zhang et al. (humanes Zellmodell) eine Translokation von HtrA2/OMI aus den Mitochondrien in das Zytoplasma

detektierten (Zhang et al. 2019). In dieser Arbeit konnte sowohl in L929Ts-Zellen als auch in MEF in einem Zeitraum von 1-5 Stunden eine Translokation von HtrA2/OMI in das Zytosol, gefolgt von einer Relokalisation zu den Mitochondrien nach 6 Stunden, detektiert werden. Blink et al. und Zhang et al. hatten nach Induktion der Nekroptose jeweils mitochondriale und zytosolische Fraktionen von Zellen untersucht mit dem Unterschied, dass Blink et al. die Lokalisation von HtrA2/OMI nach 6 Stunden (Blink et al. 2004) und Zhang et al. die Lokalisation im zeitlichen Verlauf von 0, 3 und 5 Stunden untersuchten (Zhang et al. 2019). Dies könnte erklären, warum Blink et al. keine und Zhang et al., in Übereinstimmung mit dem hier gezeigten Ergebnissen, nach Nekroptose-Induktion eine Translokation von HtrA2/OMI aus den Mitochondrien beschrieben hatten. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam waren unabhängig ebenfalls mitochondriale und zytosolische Fraktionen von murinen Zellen im zeitlichen Verlauf nach Induktion der Nekroptose untersucht worden. Diese zeigten ebenfalls die Tendenz einer Translokation aus den Mitochondrien in das Zytoplasma und einer anschließenden Relokalisation (Gill 2019; Li 2022).

Im Hinblick auf die Identifizierung neuer voran- und nachgeschalter Mediatoren von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg wurde Stathmin1, welches in der Nekroptose gespalten wird (Voigt 2014; Saggau 2018), in dieser Arbeit als ein für den nekroptotischen Signalweg entbehrliches Protein identifiziert, da seine Herunterregulierung in L929Ts-Zellen und MEF keinen Einfluss auf deren Sensitivität gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes zeigte. Im Gegensatz dazu wirkt Stathmin1 im apoptotischen Zelltod als suppressorisches Onkoprotein, dessen Verlust zum Zellzyklusarrest und zur Induktion der Apoptose führt (Belletti et al. 2011). Die proteomische Analyse von nekroptotischen Mitochondrien zeigte eine Hochregulierung von *Isoform 8 of Band 4.1-like protein 3* und eine vermehrte Spaltung von *Interferon-activable protein 205-B* in parentalen MEF im Vergleich zu HtrA2/OMI-defizienten MEF. Eine Überexpression von *Isoform 8 of Band 4.1-like protein 3* ist mit der Induktion der Apoptose und G2/M-Zellzyklusarrest verbunden, welche durch die Aktivierung der Caspasen-3, -8 und -9 sowie des *Cyclin-dependent kinase 1/Cyclin B1 signaling* ausgelöst wird (Zeng et al. 2018). Im Gegensatz dazu ist eine Inaktivierung des Enzyms mit der Entwicklung vieler Krebsarten, einschließlich Lungenadenokarzinom, Meningeom, Brustkrebs, Eierstockkrebs oder Prostatakrebs assoziiert (Yuan et al. 2019). Die beobachtete Hochregulation in MEF im Vergleich zu HtrA2/OMI^{-/-}-MEF, welche gegenüber der Induktion der Nekroptose geschützt

sind, würde ebenfalls für eine pro-nekroptotische Rolle von *Isoform 8 of Band 4.1-like protein 3* in der HtrA2/OMI-vermittelten Nekroptose sprechen. *Interferon-activable protein 205-B* inhibiert das Zellwachstum mittels *p53/TP53* und *RBI*-abhängigen und -unabhängigen Signalwegen (Asefa et al. 2006). Generell ist jedoch wenig bekannt über das *Interferon-activable protein 205-B*, sodass noch keine Aussage über eine mögliche Rolle im HtrA2/OMI vermittelten nekroptotischen Zelltodweg getroffen werden kann. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass die mitochondrialen Fraktionen ausschließlich nach der Induktion der Nekroptose gewonnen wurden, sodass eventuelle Unterschiede nicht mit einbezogen wurden, die bereits in den unbehandelten parentalen MEF und HtrA2/OMI^{-/-}-MEF vorhanden sind. Insgesamt bedarf es somit einer weiteren Analyse einer möglichen Rolle von *Isoform 8 of Band 4.1-like protein 3* und *Interferon-activable protein 205-B* in der HtrA2/OMI-vermittelten Nekroptose. Unabhängig von den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde in Studien von Vande Walle et al. und Zhang et al. berichtet, dass HtrA2/OMI im murinen Zellmodell mit RIPK1 interagiert, wodurch RIPK1 gespalten und die RIPK1-abhängige Aktivierung von Überlebenssignalen (Aktivierung von NF-κB und den MAP Kinasen p38 und JNK) verhindert (Vande Walle et al. 2010) oder Zelltod via Nekroptose über noch unklare Mechanismen gefördert wird (Zhang et al. 2019). Vande Walle et al. berichteten, dass RIPK1 im humanen Zellmodell *in vitro* nicht gespalten wird, wohingegen Zhang et al. eine Spaltung von RIPK1 in den humanen HT-29-Zellen *in vivo* detektierten konnten. Trotz dieser Diskrepanzen ist insgesamt im murinen Zellmodell (und vermutlich auch im humanen Zellmodell) die Spaltung von RIPK1 jedoch ein wahrscheinlicher Regulationsmechanismus der HtrA2/OMI-vermittelten Nekroptose. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen hatten Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam gezeigt, dass HtrA2/OMI oberhalb von RIPK3 am nekroptotischen Signalweg teilnimmt (Fuchslocher Chico 2017).

Wie bereits beschrieben, transloziert HtrA2/OMI im apoptotischen Signalweg aus den Mitochondrien in das Zytoplasma, wo es an IAPs bindet und sie durch Spaltung inaktiviert. Dies wiederum verstärkt den apoptotischen Zelltod. In Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam war gezeigt worden, dass XIAP in parentalen, jedoch nicht in HtrA2/OMI-defizienten Zellen gespalten wird. Darüber hinaus konnte der schützende Effekt der HtrA2/OMI-Deletion gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes durch die Zugabe des IAP-inhibierenden SMAC-Mimetikums BP aufgehoben werden (Saggau 2018), sodass im nekroptotischen Signalweg eine HtrA2/OMI-vermittelte Spaltung der IAPs als

Regulationsmechanismus denkbar wäre. Die Annahme einer HtrA2/OMI-vermittelten Spaltung von XIAP während der Nekroptose wurde ebenfalls in einer Studie von Wicki et al. bekräftigt, welche zeigten, dass in murinen Neutrophilen unter Inhibierung der Caspase-Aktivität die Sensitivität gegenüber der Induktion des nekroptotischen Signalweges durch die Deletion von XIAP erhöht wurde (Wicki et al. 2016). In dieser Arbeit konnte in den analysierten MEF, HtrA2/OMI^{-/-}-MEF, L929Ts- und L929Ts HtrA2/OMI^{-/-}-Zellen ebenfalls eine Erhöhung des nekroptotischen Zelltodes durch die Inhibierung von XIAP mittels des spezifischen XIAP-Inhibitors XB2d89 erzielt werden, möglicherweise, weil HtrA2/OMI den nekroptotischen Zelltod über die Spaltung von XIAP vermittelt. Dies muss jedoch in zukünftigen Experimenten noch eingehender untersucht werden.

Zur Untersuchung von HtrA2/OMI im humanen Zellmodell wurden in dieser Arbeit HtrA2/OMI-defiziente HT-29-Zellen generiert. Die mittels PCR und Sequenzierung validierten HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Einzelklone 4 und 42 zeigten jedoch ein stark unterschiedliches Verhalten nach Induktion des nekroptotischen Signalweges. So zeigte Klon 4 im Vergleich zu den parentalen HT-29-Zellen einen erhöhten Verlust der Membranintegrität und Klon 42 ein den parentalen HT-29-Zellen ähnlichen Verlust der Membranintegrität. Im Gegensatz zu den untersuchten HtrA2/OMI-defizienten MEF und L929Ts-Zellen konnte jedoch kein Schutz nach der Deletion von HtrA2/OMI detektiert werden. Ein Grund könnte eine zu kurze Stimulationszeit mit TNF sein, da die parentalen HT-29-Zellen selbst nur einen geringen Verlust der Membranintegrität von 30 % aufwiesen und somit schützende Effekte der Deletion von HtrA2/OMI möglicherweise noch nicht sichtbar waren. Dr. Fuchslocher Chico hatte in seiner Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam ebenfalls HtrA2/OMI-defiziente HT-29-Klone hergestellt, welche wie in dieser Arbeit uneinheitliche Verluste der Membranintegrität zeigten (Fuchslocher Chico 2017). Insgesamt bedarf es somit zur Etablierung eines humanen HtrA2/OMI-Zellmodells einer weiterführenden Analyse der in dieser Arbeit generierten HtrA2/OMI-defizienten HT-29-Einzelklone.

Zusammenfassend konnten die bisherigen Erkenntnisse über den Wirkmechanismus von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg dahingehend erweitert werden, dass die Protease-Aktivität von HtrA2/OMI für seine Funktion in der Nekroptose vermutlich notwendig ist, dass eine Translokation aus den Mitochondrien, gefolgt von einer anschließenden Relokalisation erfolgt, und durch die Identifizierung von zwei potenziellen

Mediatoren erweitert werden. Zukünftig könnten Versuche mit UCF-101, einem spezifischen Inhibitor der HtrA2/OMI-Aktivität, HtrA2/OMI-Analysen in mitochondrialen und cytosolischen Fraktionen nekroptotischer Zellen sowie die Analyse der Rolle *Isoform 8 of Band 4.1-like protein 3* und *Interferon-activable protein 205-B* in der HtrA2/OMI-bedingten Nekroptose weitere Aufschlüsse über den Wirkmechanismus von HtrA2/OMI im nekroptotischen Zelltod geben.

5.3. Die Funktion von ADAM17 im nekroptotischen Signalweg

Die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam erhobenen Vordaten hatten eine Rolle von ADAM17 in der Regulation der Nekroptose sowohl in Mäusen als auch in murinen Zellmodellen nahegelegt (Fuchslocher Chico et al. 2018). Für vertiefende Untersuchungen wurden in dieser Arbeit weitere murine und humane Zellmodelle mit reduzierter oder vollständig fehlender Expression von ADAM17 generiert und analysiert.

Die in dieser Arbeit isolierten spontan immortalisierten ADAM17^{ex/ex}-MLF zeigten eine inhomogene Sensitivität gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes, die jedoch nicht mit dem jeweiligen Grad der RIPK3-Expression noch mit den verwendeten Passagen korrelierte und wahrscheinlich durch die für die Immortalisierung nötige lange Kultivierung und dadurch verursachte Variabilitäten in den einzelnen MLF-Kulturen hervorgerufen wurde. Als eine solche Variabilität wäre z. B. eine unterschiedliche Übernahme der Funktionen von ADAM17 durch ADAM10 denkbar. So berichtete Rövekamp, dass die Nekroptose in HT-29- Zellen nicht nur mit einer Erhöhung der *Sheddase*-Aktivität, sondern auch mit einem Wechsel der ADAM17-vermittelten Spaltung zur hauptsächlich ADAM10-vermittelten Spaltung einherging (Rövekamp 2019). Ob dies auch in den untersuchten ADAM17^{ex/ex}-MLF der Fall war, muss jedoch eingehender untersucht werden, da die Aktivität von ADAM-Proteasen als Zelltyp-spezifisch identifiziert wurde (Cai et al. 2016; Fritsch et al. 2021). Darüber hinaus induzierten Hussain et al. Nekroptose in MEF und MLF und konnten differierende Zelltodraten identifizieren. Dabei zeigten die MLF im Vergleich zu MEF einen verfrühten und erhöhten Verlust der Membranintegrität. Die erhöhte Anfälligkeit der MLF gegenüber der Induktion der Nekroptose im Vergleich zu MEF könnte ebenfalls eine negative Auswirkung auf einen möglichen Schutz durch die reduzierte ADAM17-Expression in den ADAM17^{ex/ex}-MLF gehabt bzw. diesen außer Kraft gesetzt haben (Hussain et al. 2018). Dies könnte auch die hohe Rate an spontanem Zelltod in den als Alternative isolierten primären unbehandelten ADAM17^{ex/ex}-MLF erklären, die aus diesem Grund ebenfalls nicht für eine informative Analyse zugänglich waren. Hierbei könnten beispielsweise Unterschiede in der Membranzusammensetzung, welche entscheidend für die Aktivität von ADAM17 sind (Al-Salihi et al. 2021; Fritsch et al. 2021) oder auch die Expressionsstärke der ADAM-Proteasen, insbesondere von ADAM10 und ADAM17 ausschlaggebend für den nicht vorhandenen Schutz der Lungenfibroblasten sein. In dieser Arbeit zeigten die MLF aus einer parentalen Maus mit einer Erhöhung des Verlustes der Membranintegrität um 15 % nach der Zugabe

von zVAD/CHX/TNF nur einen geringen Zelltod. Hussain et al. konnten hingegen nach der Zugabe des BP-ähnlichen SMAC-Mimetikums BV6 bereits nach 6 Stunden einen 60 %igen Zelltod detektieren (Hussain et al. 2018), sodass weitere Nekroptose-induzierende Stimulationskombinationen zukünftig zur Analyse der MLF von Interesse wären. Insgesamt stellen die ADAM17^{ex/ex}-MLF jedoch bislang kein zuverlässiges Zellmodell zur Analyse der Rolle von ADAM17 dar.

Aufgrund dessen wurden *ADAM17*-Gendelektionen in MEF und HT-29-Zellen durchgeführt. ADAM17-defiziente MEF und HT-29-Zellen zeigten im Vergleich zu den parentalen MEF und HT-29-Zellen einen erkennbaren Schutz gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes. Ein entsprechender Schutz von aus ADAM17^{ex/ex}-Mäusen isolierten MEF konnte ebenfalls in zwei unabhängigen Studien detektiert werden (Fuchslocher Chico et al. 2018; Bolik et al. 2022). Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie von Fritsch et al. keinen schützenden Effekt der verminderten ADAM17-Expression im nekroptotischen Signalweg (Fritsch et al. 2021). Die drei betrachteten Studien unterschieden sich in den Stimulationskonzentrationen, Stimulationszeiten und teilweise in ihren Analysemethoden. Nichtsdestotrotz konnten sie entweder einen deutlichen Schutz gegenüber dem nekroptotischen Zelltod oder keinen Effekt detektieren, welcher per se nicht auf die unterschiedlichen Behandlungen und Analysemethoden zurückgeführt werden konnte. Mechanistisch betrachtet, setzten Fuchslocher Chico et al. die Rolle von ADAM17 in der Nekroptose oberhalb der RIPK3/MLKL-Ebene an, da die Phosphorylierung von RIPK3 und MLKL in ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-Mäusen im Vergleich zur Wildtyp-Maus inhibiert war (Fuchslocher Chico et al. 2017). Cai et al. hingegen detektierten eine Komplexbildung von ADAM10 mit pMLKL (Cai et al. 2016). Dies wiederum spricht für eine komplexere Rolle von ADAM17 in der Nekroptose. Weiterhin berichteten Bolik et al., dass die ADAM17-vermittelte TNFR1-Ektodomäne-Spaltung notwendig für die Induktion der TNF-vermittelten Nekroptose ist (Bolik et al. 2022). Fritsch et al. wiederum identifizierten ADAM17 als Enzym zur Feinabstimmung des apoptotischen oder nekroptotischen Signalweges (Fritsch et al. 2021).

Zusammenfassend ist ersichtlich, dass aufgrund der Komplexität von ADAM17 als *Sheddase* von über 70 Substraten, darunter Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren, die Analyse der Rolle von ADAM17 in der Nekroptose noch in ihren Anfängen steht. Anders als RIPK3 stellt ADAM17 jedoch kein Schlüsselenzym im

nekroptotischen Signalweg, sondern vermutlich eher einen Modulator der Nekroptose dar (Fritsch et al. 2021). Zukünftig werden Rekonstitutionsstudien der hergestellten ADAM17-defizienten Zellen mit Mutanten von ADAM17, in den einzelne Domänen in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, Aufschluss darüber geben, welche Domäne in der Nekroptose entscheidend ist, was wiederum einen Einblick auf den Mechanismus geben könnte. Darüber hinaus wäre es von Interesse, die Rolle von ADAM17 in Kombination mit anderen ADAM-Proteasen wie ADAM10 und ADAM9 in der Regulation der Nekroptose zu untersuchen.



5.4. Die Kartierung der Spaltstellen der A-SMase, über die diese in der Nekroptose proteolytisch aktiviert wird

In dieser Arbeit wurden durch massenspektrometrische Analysen die Aminosäuren D220.P221 als eine nekroptotische Spaltstelle der A-SMase in der Sequenz EGTDPD identifiziert und in einem zweiten Ansatz mittels einer reduktiven Dimethylierung validiert. Proteasen mit dieser Erkennungssequenz stellen beispielsweise Caspasen dar, welche spezifisch Aspartat, Glutamat und Phosphoserin spalten (Seaman et al. 2016). Die Spaltung nach EGTD wurde bereits für die Caspase-3 im *C53/LZAP*-Protein beschrieben (Wu et al. 2013). Darüber hinaus berichtete Frau Dr. Susann Voigt in ihrer Dissertation, dass die Deletion der Caspase-7, welche die A-SMase im apoptotischen Signalweg aktiviert, ebenfalls zu einer verminderten Spaltung der A-SMase in der Nekroptose führt (Voigt 2014). Problematisch an der Hypothese der Aktivierung der A-SMase durch Caspasen in der Nekroptose ist die Tatsache, dass zur experimentellen Induktion der Nekroptose Caspasen durch Zugabe des Pan-Caspase-Inhibitors zVAD blockiert werden müssen, da sonst Apoptose stattfindet. Denkbare Erklärungen wären, dass eine geringe Restaktivität der Caspasen trotz Zugabe von zVAD ausreichend für die Induktion der Spaltung ist, oder aber, dass andere, noch unbekannte Proteasen für die Spaltung verantwortlich sind, die in zukünftigen Untersuchungen identifiziert werden müssen.

In früheren Deletions- und Mutagenese-Studien in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam war gezeigt worden, dass sich in einer Region von 30 Aminosäuren innerhalb der A-SMase mindestens zwei Spaltstellen befinden müssen. So war in Versuchen, in denen die Sequenz um die Spaltstelle D220.P221 deletiert oder randomisiert worden war, eine schwächere Spaltung der A-SMase im Vergleich zur parentalen A-SMase detektiert worden (Fuchslocher Chico 2017). Mit Hilfe von Mutanten der A-SMase mit einer Deletion der Region D220-L259 oder einer Randomisierung der Aminosäuresequenz in der Region P221-R230 konnte eine zweite Spaltstelle an der Position L204.F205 identifiziert werden. Die Spaltung nach Leucin stellt keine Spaltstelle von Caspasen dar (Seaman et al. 2016), sodass, in Übereinstimmung mit der Caspase-Unabhängigkeit des nekroptotischen Signalwegs, eine Caspasen-unabhängige Aktivierung denkbar wäre. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass neben den zwei identifizierten nekroptotischen Spaltstellen noch weitere Spaltstellen existieren, wären Studien, in denen beide Spaltstellen deletiert oder randomisiert sind, zukünftig von Interesse.

Zusammenfassend stellen die identifizierten nekroptotischen Spaltstellen der A-SMase L204.F205 und D220.P221 einen großen Fortschritt für die zukünftige Identifizierung der Protease/Proteasen, welche für die Aktivierung der A-SMase in der Nekroptose verantwortlich ist/sind, dar.

6. Zusammenfassung

Zelltod ist ein essenzieller Mechanismus für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Neben der Apoptose als reguliertem, Caspase-abhängigem Zelltodweg, sind heute zahlreiche regulierte, Caspase-unabhängige Zelltodwege bekannt, darunter die Nekroptose. Im Zelltod werden zahlreiche Schritte wie Aktivierung und Degradierung von Enzymen durch Proteolyse gesteuert. Aufgrund der zentralen Bedeutung der Proteolyse wurde in dieser Arbeit die Proteolyse in der Regulation der Nekroptose anhand der Proteasen Caspase-8, Caspase-10, HtrA2/OMI und ADAM17 untersucht. Zudem wurde die proteolytische Spaltung der Lipase A-SMase analysiert.

Für die Analyse der Spezies-spezifischen Rolle der Caspase-8, deren Deletion im murinen Zellmodell zum verstärkten und im humanen Zellmodell zum reduzierten nekroptotischen Zelltod führt, sowie der Rolle der Caspase-10, welche im Menschen exprimiert wird, in Nagetieren jedoch im Laufe der Evolution verloren ging, wurden Rekonstitutionsstudien in murinen Caspase-8-defizienten L929Ts- und humanen Caspase-8-defizienten HT-29-Zellen durchgeführt. Dazu wurde jeweils eine Protease-aktive (Wildtyp) und -inaktive Form (Mutante) der murinen und humanen Caspase-8 und der Caspase-10 in die Caspase-8-defizienten Zellen transduziert. Im murinen Zellmodell konnte die Sensitivität der L929Ts-Zellen gegenüber dem nekroptotischen Zelltod nach der Rekonstitution der Caspase-8-defizienten L929Ts-Zellen mit der Protease-aktiven Form der murinen Caspase-8 wiederhergestellt werden. Darüber hinaus konnte die Protease-aktive Form der Caspase-10 die Rolle der murinen Caspase-8 im vollen Maß und die humane Wildtyp-Caspase-8 die Rolle der murinen Caspase-8 in geringerem Maß übernehmen. Nach Rekonstitution der Caspase-8-defizienten L929Ts-Zellen mit Protease-inaktiven Formen der Caspasen glich die Sensitivität gegenüber dem nekroptotischen Zelltod hingegen der der Caspase-8-defizienten L929Ts-Zellen. Im humanen Zellmodell konnte der Schutz der Caspase-8-defizienten HT-29-Zellen gegenüber der Induktion der Nekroptose durch die Rekonstitution der Protease-aktiven Form der humanen Caspase-8 aufgehoben werden. Anders als im murinen Zellmodell konnte nur die Wildtyp-Caspase-10, jedoch nicht die murine Wildtyp-Caspase-8, die Funktion der humanen Caspase-8 übernehmen. Im Unterschied zum murinen Zellmodell führte die Deletion der Caspase-8 darüber hinaus zu keinem gesteigerten, sondern zu einem reduzierten nekroptotischen Tod, und das Vorhandensein, nicht aber die proteolytische Aktivität der jeweiligen Caspase, war zur Auslösung der Nekroptose notwendig. Dies deutet

auf eine unterschiedliche Aktivierung des Nekrosoms in Abhängigkeit des Vorhandenseins der Caspase-8 im murinen und humanen Zellmodell hin. Humane HT-29-Zellen mit einer Deletion der Caspase-10 sowie mit den Proteasen-aktiven und -inaktiven Formen der murinen und humanen Caspase-8 und Caspase-10 rekonstituierte Caspase-10-defizienten HT-29-Zellen zeigten keine markanten Änderungen der Sensitivitäten für die Induktion des nekroptotischen Zelltodes. Einzig die Inhibierung der Nekroptose mittels der Zugabe des RIPK3-Inhibitors GSK'872 führte zu einem nekroptotischen Zelltod in den parentalen HT-29- und mit den Protease-aktiven und -inaktiven Formen der Caspase-10 rekonstituierte Caspase-10-defizienten HT-29-Zellen, jedoch nicht in den Caspase-10-defizienten HT-29-Zellen allein, sodass eine Beeinträchtigung der Nekroptose durch die Deletion der Caspase-10 denkbar ist. Zudem konnten Caspase-8 und Caspase-10-doppeldefiziente HT-29-Zellen erfolgreich generiert werden. Im Vergleich zu den parentalen HT-29-Zellen zeigten diese Zellen eine ähnliche Sensitivität gegenüber der Induktion der Nekroptose, jedoch eine erhöhte Menge des nekroptotischen Markers pMLKL, was für eine Verstärkung des nekroptotischen Zelltodes durch die zusätzliche Deletion der Caspase-10 in Caspase-8-defizienten HT-29 -Zellen spricht.

In Vorarbeiten war gezeigt worden, dass die Deletion der Serinprotease HtrA2/OMI in MEF und L929Ts-Zellen zu einem Schutz gegenüber der Induktion der Nekroptose führt. Im apoptotischen Signalweg ist bekannt, dass HtrA2/OMI aus den Mitochondrien in das Zytoplasma transloziert und dort an IAPs bindet, wodurch diese inaktiviert werden, und die Apoptose verstärkt wird. Der Wirkmechanismus von HtrA2/OMI in der Nekroptose ist hingegen unbekannt. In dieser Arbeit wurde eine Translokation von HtrA2/OMI aus den Mitochondrien und eine anschließende Relokalisation in die Mitochondrien in zwei murinen Zellmodellen anhand von Immunfluoreszenzanalysen detektiert. Darüber hinaus deuten erste Versuche in murinen Zellmodellen auf eine Notwendigkeit der Protease-Aktivität der Serinprotease im nekroptotischen Signalweg hin. Zur Analyse der Bedeutung der Protease-Aktivität von HtrA2/OMI in humanen Zellen wurden HtrA2/OMI-defiziente HT-29-Zellen generiert. Aufgrund der divergierenden Sensitivität der HT-29-HtrA2/OMI^{-/-}-Einzelklone gegenüber der Induktion des nekroptotischen Zelltodes bedarf es jedoch einer weiteren Untersuchung der Auswirkung der HtrA2/OMI-Deletion auf die Nekroptose-Sensitivität im humanen Zellmodell. Die Suche nach neuen nachgeschalteten Mediatoren von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg mittels massenspektrometrischer Analyse nekroptotischer Mitochondrien identifizierte *Band 4.1-like protein 3* und *Interferon-activable protein 205-B*

als potenzielle intramitochondriale Mediatoren der HtrA2/OMI-vermittelten Nekroptose. Für Stathmin1 konnte trotz Spaltung in der Nekroptose keine Schlüsselrolle im nekroptotischen Signalweg nachgewiesen werden, eine mögliche Rolle von XIAP muss noch weiter validiert werden.

In früheren Untersuchungen konnte sowohl in ADAM17^{ex/ex}-Mäusen, welche im Vergleich zu parentalen Mäusen eine um 95 % verringerte Expression von ADAM17 aufweisen, als auch in ADAM17^{ex/ex}RIPK3^{-/-}-Mäusen ein Schutz gegenüber der Induktion der Nekroptose detektiert werden. Diese Ergebnisse waren in MEF, isoliert aus ADAM17^{ex/ex}-Mäusen, repliziert worden. Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein neues Zellmodell zur Untersuchung der Funktion von ADAM17 im nekroptotischen Signalweg zu generieren. Aus ADAM17^{ex/ex}-Mäusen isolierte Lungenfibroblasten (primär und spontan immortalisiert) stellten sich jedoch als ungeeignet heraus, da sie eine inhomogene Sensitivität gegenüber der Induktion von Nekroptose aufwiesen. ADAM17-defiziente MEF und HT-29-Zellen konnten hingegen erfolgreich generiert werden und zeigten im Vergleich zu den parentalen Zellen einen leichten Schutz gegenüber der Induktion des nekroptotischen Signalweges, sodass sich diese Zellen für zukünftige Analysen der Funktion von ADAM17 in der Nekroptose eignen.

Die A-SMase wird während der Nekroptose proteolytisch gespalten und aktiviert. Vorarbeiten zur Ermittlung der nekroptotischen Spaltstelle und der für die Spaltung verantwortlichen Protease hatten die Spaltstelle auf eine 30-Aminosäuren große Region eingegrenzt, in welcher sich mindestens zwei Spaltstellen befinden müssen. In dieser Arbeit konnten die Spaltstellen L204.F205 und D220.P221 mittels massenspektrometrischer Analyse als nekroptotische Spaltstellen identifiziert und mittels reduktiver Dimethylierung validiert werden.

7. Summary

Cell death is an essential mechanism for the maintenance of cellular homeostasis. In addition to apoptosis as a regulated, caspase-dependent cell death pathway, numerous regulated, caspase-independent cell death pathways are known today, including necroptosis. In the course of cell death, numerous steps such as activation and degradation of enzymes are controlled by proteolysis. Due to this central importance, proteolysis in the regulation of necroptosis was investigated in this work, in particular the role of the proteases caspase-8, caspase-10, HtrA2/OMI and ADAM17. In addition, the proteolytic cleavage of the lipase A-SMase was investigated.

To analyze the species-specific role of caspase-8, whose deletion leads to increased necroptotic cell death in the murine cell model and to reduced necroptotic cell death in the human cell model, and to investigate the role of caspase-10, which is expressed in humans but was lost in rodents in the course of evolution, reconstitution studies were performed in murine caspase-8-deficient L929Ts and human caspase-8-deficient HT-29 cells. For this purpose, protease-active (wild type) and -inactive forms (mutant) of murine and human caspase-8 and caspase-10 were transduced into the caspase-8-deficient cells. In the murine cell model, the sensitivity of L929Ts cells to necroptotic cell death could be restored after reconstitution of caspase-8-deficient L929Ts cells with the protease-active form of murine caspase-8. Furthermore, the protease-active form of caspase-10 could fully substitute for murine caspase-8, and wild-type human caspase-8 mimicked the role of murine caspase-8 to a minimal extent. The sensitivity to necroptotic cell death of caspase-8-deficient L929Ts cells reconstituted with the protease-inactive forms of the caspases was similar to the sensitivity of the caspase-8-deficient L929Ts cells. In the human cell model, the protection of caspase-8-deficient HT-29 cells against the induction of necroptosis could be overcome by reconstitution of the protease-active form of human caspase-8. In contrast to the murine cell model, only wild-type caspase-10, but not murine wild-type caspase-8 was able to functionally substitute for human caspase-8. Furthermore, unlike the murine cell model, the deletion of caspase-8 did not result in increased necroptotic death, and the presence, but not the proteolytic activity of the respective caspase was necessary to induce necroptosis. This indicates a differential activation of the necrosome depending on the presence of caspase-8 in murine and human cell models. Human HT-29 cells with a deletion of caspase-10 and caspase-10-deficient HT-29 cells reconstituted with the protease-active and -inactive form

of murine and human caspase-8 and caspase-10 did not show any significant changes of the sensitivities for the induction of necroptotic cell death. Only the inhibition of necroptosis by addition of the RIPK3 inhibitor GSK'872 led to necroptotic cell death in the parental HT-29 and caspase-10-deficient HT-29 cells reconstituted with the protease-active and -inactive forms of caspase-10, however not in the caspase-10-deficient HT-29 cells alone, so that an impairment of necroptosis by the caspase-10 deletion is conceivable. In addition, caspase-8- and caspase-10-double-deficient HT-29 cells were successfully generated. Compared to the parental HT-29 cells, these cells showed a comparable sensitivity to the induction of necroptosis, but an increased amount of the necroptotic marker pMLKL, suggesting that the additional deletion of caspase-10 in caspase-8-deficient HT-29 cells enhances necroptotic cell death.

Preliminary work had shown that deletion of the serine protease HtrA2/OMI in MEF and L929Ts cells confers protection against induction of necroptosis. In the apoptotic pathway, HtrA2/OMI is known to translocate from mitochondria to the cytoplasm, where it binds to IAPs, inactivating them and enhancing apoptosis. However, the mechanism of action of HtrA2/OMI in necroptosis is unknown. In this work, a translocation of HtrA2/OMI from the mitochondria and a subsequent relocalization into the mitochondria was detected in two murine cell models using immunofluorescence analysis. In addition, initial experiments in murine cell models suggest that the protease activity of the serine protease is necessary in the necroptotic signaling pathway. To analyze the importance of HtrA2/OMI protease activity in human cells, HtrA2/OMI-deficient HT-29 cells were generated. However, due to the divergent sensitivity of the HT-29-HtrA2/OMI^{-/-}-single clones to the induction of necroptotic cell death, further investigation of the effect of the HtrA2/OMI deletion on necroptosis sensitivity in the human cell model is required. The search for novel downstream mediators of HtrA2/OMI in the necroptotic pathway by mass spectrometric analysis of necroptotic mitochondria identified Band 4.1-like protein 3 and interferon-activable protein 205 B as potential intramitochondrial mediators of HtrA2/OMI-mediated necroptosis. Despite cleavage during necroptosis, a key role in necroptosis could not be assigned to Stathmin1, a possible role of XIAP needs to be further validated.

In earlier studies, protection against the induction of necroptosis had been detected in ADAM17^{ex/ex} mice, which have a 95% reduced expression of ADAM17 compared to parental mice, as well as in ADAM17^{ex/ex}RIPK3^{-/-} mice. These results had been replicated

in MEF isolated from ADAM17^{ex/ex} mice. One aim of this work was to generate a new cell model to investigate the function of ADAM17 in the necroptotic signaling pathway. However, lung fibroblasts (primarily and spontaneously immortalized) isolated from ADAM17^{ex/ex} mice turned out to be unsuitable because they showed an inhomogeneous sensitivity to the induction of necroptosis. ADAM17-deficient MEF and HT-29 cells, on the other hand, could be successfully generated and showed a slight protection against the induction of the necroptotic signaling pathway when compared to parental cells, making them suitable for future analyses of the function of ADAM17 in necroptosis.

A-SMase is proteolytically cleaved and activated during necroptosis. Preliminary work to determine the necroptotic cleavage site and the protease responsible for the cleavage had narrowed down the cleavage site to a region of 30-amino acids in which at least two cleavage sites must be located. In this work, the cleavage sites D220.P221 and L204.F205 were identified as necroptotic cleavage sites using mass spectrometric analysis.

8. Literaturverzeichnis

- Alnemri, ES; Livingston, DJ; Nicholson, DW; Salvesen, G; Thornberry, NA; Wong, WW, et al. (1996).** Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell*, 87(2):171.
- Al-Salihi, M; Bornikoel, A; Zhuang, Y; Stachura, P; Scheller, J; Lang, KS, et al. (2021).** The role of ADAM17 during liver damage. *Biological Chemistry*, 402(9):1115–1128.
- Amarante-Mendes, GP; Adjemian, S; Branco, LM; Zanetti, LC; Weinlich, R; Bortoluci, KR (2018).** Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Frontiers in Immunology*, 9:2379.
- Amin, P; Florez, M; Najafov, A; Pan, H; Geng, J; Ofengeim, D, et al. (2018).** Regulation of a distinct activated RIPK1 intermediate bridging complex I and complex II in TNF α -mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(26):e5944-E5953.
- Annibaldi, A; Wicky John, S; Vanden Berghe, T; Swatek, KN; Ruan, J; Liccardi, G, et al. (2018).** Ubiquitin-Mediated Regulation of RIPK1 Kinase Activity Independent of IKK and MK2. *Molecular Cell*, 69(4):566-580.e5.
- Asefa, B; Dermott, JM; Kaldis, P; Stefanisko, K; Garfinkel, DJ; Keller, JR (2006).** p205, a potential tumor suppressor, inhibits cell proliferation via multiple pathways of cell cycle regulation. *FEBS Letters*, 580(5):1205–1214.
- Ashford, T; Porter, K (1962).** Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *The Journal of Cell Biology*, 12:198–202.
- Bandsma, RHJ; van Goor, H; Yourshaw, M; Horlings, RK; Jonkman, MF; Schölvinck, EH, et al. (2015).** Loss of ADAM17 is associated with severe multiorgan dysfunction. *Human Pathology*, 46(6):923–928.
- Bataller, M; Sánchez-García, A; Garcia-Mayea, Y; Mir, C; Rodriguez, I; LLeonart, ME (2021).** The Role of Sphingolipids Metabolism in Cancer Drug Resistance. *Frontiers in Oncology*, 11:807636.
- Bedoui, S; Herold, MJ; Strasser, A (2020).** Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(11):678–695.
- Belletti, B; Baldassarre, G (2011).** Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(11):1249–1266.
- Bertheloot, D; Latz, E; Franklin, BS (2021).** Necroptosis, pyroptosis and apoptosis. An intricate game of cell death. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(5):1106–1121.

-
- Blink, E; Maianski, NA; Alnemri, ES; Zervos, AS; Roos, D; Kuijpers, TW (2004).** Intramitochondrial serine protease activity of Omi/HtrA2 is required for caspase-independent cell death of human neutrophils. *Cell Death and Differentiation*, 11(8):937–939.
- Bolik, J; Krause, F; Stevanovic, M; Gandraß, M; Thomsen, I; Schacht, S-S, et al. (2022).** Inhibition of ADAM17 impairs endothelial cell necroptosis and blocks metastasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 219(1):e20201039.
- Botham, A; Coyaud, E; Nirmalanandhan, VS; Gronda, M; Hurren, R; Maclean, N, et al. (2019).** Global Interactome Mapping of Mitochondrial Intermembrane Space Proteases Identifies a Novel Function for HTRA2. *Proteomics*, 19(24):e1900139.
- Brinkmann, V; Reichard, U; Goosmann, C; Fauler, B; Uhlemann, Y; Weiss, DS, et al. (2004).** Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663):1532–1535.
- Brumatti, G; Ma, C; Lalaoui, N; Nguyen, N-Y; Navarro, M; Tanzer, MC, et al. (2016).** The caspase-8 inhibitor emricasan combines with the SMAC mimetic birinapant to induce necroptosis and treat acute myeloid leukemia. *Science Translational Medicine*, 8(339):339ra69.
- Burdette, BE; Esparza, AN; Zhu, H; Wang, S (2021).** Gasdermin D in pyroptosis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(9):2768–2782.
- Cai, Z; Jitkaew, S; Zhao, J; Chiang, H-C; Choksi, S; Liu, J, et al. (2014).** Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nature Cell Biology*, 16(1):55–65.
- Cai, Z; Zhang, A; Choksi, S; Li, W; Li, T; Zhang, X-M, et al. (2016).** Activation of cell-surface proteases promotes necroptosis, inflammation and cell migration. *Cell Research*, 26(8):886–900.
- Calligaris, M; Cuffaro, D; Bonelli, S; Spanò, DP; Rossello, A; Nuti, E, et al. (2021).** Strategies to Target ADAM17 in Disease: From its Discovery to the iRhom Revolution. *Molecules*, 26(4):944.
- Carney, BK; Cassimeris, L (2010).** Stathmin/oncoprotein 18, a microtubule regulatory protein, is required for survival of both normal and cancer cell lines lacking the tumor suppressor, p53. *Cancer Biology & Therapy*, 9(9):699–709.
- Carpinteiro, A; Dumitru, C; Schenck, M; Gulbins, E (2008).** Ceramide-induced cell death in malignant cells. *Cancer Letters*, 264(1):1–10.

- Carrington, EM; Zhan, Y; Brady, JL; Zhang, J-G; Sutherland, RM; Anstee, NS, et al. (2017).** Anti-apoptotic proteins BCL-2, MCL-1 and A1 summate collectively to maintain survival of immune cell populations both in vitro and in vivo. *Cell Death and Differentiation*, 24(5):878–888.
- Castro-Obregón, S; Rao, RV; del Rio, G; Chen, SF; Poksay, KS; Rabizadeh, S, et al. (2004).** Alternative, nonapoptotic programmed cell death. Mediation by arrestin 2, ERK2, and Nur77. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17):17543–17553.
- Chaganti, LK; Dutta, S; Kuppili, RR; Mandal, M; Bose, K (2019).** Structural modeling and role of HAX-1 as a positive allosteric modulator of human serine protease HtrA2. *The Biochemical Journal*, 476(20):2965–2980.
- Chalaris, A; Adam, N; Sina, C; Rosenstiel, P; Lehmann-Koch, J; Schirmacher, P, et al. (2010).** Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(8):1617–1624.
- Chen, Y; Smith, MR; Thirumalai, K; Zychlinsky, A (1996).** A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. *The EMBO Journal*, 15(15):3853–3860.
- Chen, X; Li, W; Ren, J; Huang, D; He, W-T; Song, Y, et al. (2014).** Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Research*, 24(1):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(12):1486.
- Chen, Y; Li, Y; Guo, L; Hong, J; Zhao, W; Hu, X, et al. (2020).** Bibliometric Analysis of the Inflammasome and Pyroptosis in Brain. *Frontiers in Pharmacology*, 11:626502.
- Chen, X; Zhu, R; Zhong, J; Ying, Y; Wang, W; Cao, Y, et al. (2022).** Mosaic composition of RIP1-RIP3 signalling hub and its role in regulating cell death. *Nature Cell Biology*, 24(4):471–482.
- Chi, S; Kitanaka, C; Noguchi, K; Mochizuki, T; Nagashima, Y; Shirouzu, M, et al. (1999).** Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene*, 18(13):2281–2290.
- Chun, HJ; Zheng, L; Ahmad, M; Wang, J; Speirs, CK; Siegel, RM, et al. (2002).** Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature*, 419(6905):395–399.

-
- Chung, H;** Vilaysane, A; Lau, A; Stahl, M; Morampudi, V; Bondzi-Simpson, A, et al. (2016). NLRP3 regulates a non-canonical platform for caspase-8 activation during epithelial cell apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 23(8):1331–1346.
- Chung, H-J;** Jamal, MAHM; Hong, S-T (2020). The function of bacterial HtrA is evolutionally conserved in mammalian HtrA2/Omi. *Scientific Reports*, 10(1):5284.
- Clausen, T;** Kaiser, M; Huber, R; Ehrmann, M (2011). HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(3):152–162.
- Cookson, BT;** Brennan, MA (2001). Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in Microbiology*, 9(3):113–114.
- David, KK;** Andrabi, SA; Dawson, TM; Dawson, VL (2009). Parthanatos, a messenger of death. *Frontiers in Bioscience*, 14(3):1116–1128.
- De Duve, C;** Pressman, BC; Gianetto, R; Wattiaux, R; Appelmans, F (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *The Biochemical Journal*, 60(4):604–617.
- De Duve, C;** De Reuck, AVS; Cameron, MP (1963). Ciba Foundation Symposium: Lysosomes. Boston: Little, Brown and Company.
- Degterev, A;** Huang, Z; Boyce, M; Li, Y; Jagtap, P; Mizushima, N, et al. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, 1(2):112–119.
- Diamantis, A;** Magiorkinis, E; Sakorafas, GH; Androutsos, G (2008). A brief history of apoptosis. From ancient to modern times. *Onkologie*, 31(12):702–706.
- Dillon, CP;** Weinlich, R; Rodriguez, DA; Cripps, JG; Quarato, G; Gurung, P, et al. (2014). RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase-8 and RIPK3. *Cell*, 157(5):1189–1202.
- Dixon, SJ;** Lemberg, KM; Lamprecht, MR; Skouta, R; Zaitsev, EM; Gleason, CE, et al. (2012). Ferroptosis. An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5):1060–1072.
- Dondelinger, Y;** Delanghe, T; Priem, D; Wynosky-Dolfi, MA; Sorobetea, D; Rojas-Rivera, D, et al. (2019). Serine 25 phosphorylation inhibits RIPK1 kinase-dependent cell death in models of infection and inflammation. *Nature Communications*, 10(1):1729.
- Dorstyn, L;** Akey, CW; Kumar, S (2018). New insights into apoptosome structure and function. *Cell Death and Differentiation*, 25(7):1194–1208.

- Düsterhöft, S; Lokau, J; Garbers, C (2019).** The metalloprotease ADAM17 in inflammation and cancer. *Pathology, Research and Practice*, 215(6):152410.
- Eckhart, L; Ballaun, C; Hermann, M; VandeBerg, JL; Sipos, W; Uthman, A, et al. (2008).** Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Molecular Biology and Evolution*, 25(5):831–841.
- Edelmann, B; Bertsch, U; Tchikov, V; Winoto-Morbach, S; Perrotta, C; Jakob, M, et al. (2011).** Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptosomes. *The EMBO Journal*, 30(2):379–394.
- Elsässer, B; Goettig, P (2021).** Mechanisms of Proteolytic Enzymes and Their Inhibition in QM/MM Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6):3232.
- Esposti, MD (1998).** Apoptosis. Who was first? *Cell Death and Differentiation*, 5(9):719.
- Fan, W; Guo, J; Gao, B; Zhang, W; Ling, L; Xu, T, et al. (2019).** Flotillin-mediated endocytosis and ALIX-syntenin-1-mediated exocytosis protect the cell membrane from damage caused by necroptosis. *Science Signaling*, 12(583):eaaw3423.
- Fang, Y; Tian, S; Pan, Y; Li, W; Wang, Q; Tang, Y, et al. (2020).** Pyroptosis. A new frontier in cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 121:109595.
- Fischer, U; Stroh, C; Schulze-Osthoff, K (2006).** Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene*, 25(1):152–159.
- Flemming, W (1885).** Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graafscher Follikel. *Archiv für Anatomie und Physiologie: Anatomische Abteilung*: 221–244.
- Frisch, SM; Francis, H (1994).** Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 124(4):619–626.
- Fritsch, M (2020).** Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. Dissertation, Köln.
- Fritsch, M; Günther, SD; Schwarzer, R; Albert, M-C; Schorn, F; Werthenbach, JP, et al. (2019).** Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. *Nature*, 575(7784):683–687.
- Fritsch, J; Frankenheim, J; Marischen, L; Vadasz, T; Troeger, A; Rose-John, S, et al. (2021).** Roles for ADAM17 in TNF-R1 Mediated Cell Death and Survival in Human U937 and Jurkat Cells. *Cells*, 10(11):3100.
- Fuchslocher Chico, J; Saggau, C; Adam, D (2017).** Proteolytic control of regulated necrosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(11 Pt B):2147–2161.

-
- Fuchslocher Chico, J;** Falk-Paulsen, M; Luzius, A; Saggau, C; Ruder, B; Bolik, J, et al. (2018). The enhanced susceptibility of ADAM-17 hypomorphic mice to DSS-induced colitis is not ameliorated by loss of RIPK3, revealing an unexpected function of ADAM-17 in necroptosis. *Oncotarget*, 9(16):12941–12958.
- Fuchslocher Chico, JI (2017).** Proteolytic control of necroptosis. Dissertation, Kiel.
- Fukumori, A;** Fluhner, R; Steiner, H; Haass, C (2010). Three-amino acid spacing of presenilin endoproteolysis suggests a general stepwise cleavage of gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis. *The Journal of Neuroscience*, 30(23):7853–7862.
- Galluzzi, L;** Vitale, I; Aaronson, SA; Abrams, JM; Adam, D; Agostinis, P, et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death. Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3):486–541.
- Gatt, S (1963).** Enzymic Hydrolysis and Synthesis of Ceramides. *The Journal of Biological Chemistry*, 238:3131–3133.
- Gieldon, A;** Zurawa-Janicka, D; Jarzab, M; Wenta, T; Golik, P; Dubin, G, et al. (2016). Distinct 3D Architecture and Dynamics of the Human HtrA2(Omi) Protease and Its Mutated Variants. *PLOS ONE*, 11(8):e0161526.
- Gill, SA (2019).** Untersuchung der proteolytischen Regulation der Nekroptose anhand der Initiator-Caspasen-8/-10 sowie des Proteins HtrA2/Omi. Bachelorarbeit, Kiel.
- Glucksmann, A (1951).** Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 26(1):59–86.
- Goncharov, T;** Hedayati, S; Mulvihill, MM; Izrael-Tomasevic, A; Zobel, K; Jeet, S, et al. (2018). Disruption of XIAP-RIP2 Association Blocks NOD2-Mediated Inflammatory Signaling. *Molecular Cell*, 69(4):551-565.e7.
- Gong, Y;** Fan, Z; Luo, G; Yang, C; Huang, Q; Fan, K, et al. (2019). The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer*, 18(1):100.
- Gong, W;** Shi, Y; Ren, J (2020). Research progresses of molecular mechanism of pyroptosis and its related diseases. *Immunobiology*, 225(2):151884.
- Groth, E;** Pruessmeyer, J; Babendreyer, A; Schumacher, J; Pasqualon, T; Dreytmueller, D, et al. (2016). Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(11):2795–2808.
- Grötzinger, J;** Lorenzen, I; Düsterhöft, S (2017). Molecular insights into the multilayered regulation of ADAM17: The role of the extracellular region. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(11 Pt B):2088–2095.

- Gudipaty, SA; Conner, CM; Rosenblatt, J; Montell, DJ (2018).** Unconventional Ways to Live and Die. Cell Death and Survival in Development, Homeostasis, and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 34:311–332.
- Gulbins, E; Kolesnick, R (2002).** Acid sphingomyelinase-derived ceramide signaling in apoptosis. *Sub-Cellular Biochemistry*, 36:229–244.
- Guo, W; Dong, A; Pan, X; Lin, X; Lin, Y; He, M, et al. (2016).** Role of caspase-10 in the death of acute leukemia cells. *Oncology Letters*, 12(2):1623–1629.
- Guo, M; Lu, B; Gan, J; Wang, S; Jiang, X; Li, H (2021).** Apoptosis detection. A purpose-dependent approach selection. *Cell Cycle*, 20(11):1033–1040.
- Gupta, S; Singh, R; Datta, P; Zhang, Z; Orr, C; Lu, Z, et al. (2004).** The C-terminal tail of presenilin regulates Omi/HtrA2 protease activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(44):45844–45854.
- Han, J-H; Park, J; Kang, T-B; Lee, K-H (2021).** Regulation of Caspase-8 Activity at the Crossroads of Pro-Inflammation and Anti-Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7):3318.
- Hanifeh, M; Ataei, F (2022).** XIAP as a multifaceted molecule in Cellular Signaling. *Apoptosis*, 7-8:441-453.
- Hartkamp, J; Roberts, SGE (2010).** HtrA2, taming the oncogenic activities of WT1. *Cell Cycle*, 9(13):2508–2514.
- Heib, M; Rose-John, S; Adam, D (2020).** Necroptosis, ADAM proteases and intestinal (dys)function. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 353:83–152.
- Heib, M; Weiß, J; Saggau, C; Hoyer, J; Fuchslocher Chico, J; Voigt, S, et al. (2022).** Ars moriendi. Proteases as sculptors of cellular suicide. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1869(4):119191.
- Heinrich, M; Neumeyer, J; Jakob, M; Hallas, C; Tchikov, V; Winoto-Morbach, S, et al. (2004).** Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death and Differentiation*, 11(5):550–563.
- Henry, CM; Martin, SJ (2017).** Caspase-8 Acts in a Non-enzymatic Role as a Scaffold for Assembly of a Pro-inflammatory "FADDosome" Complex upon TRAIL Stimulation. *Molecular Cell*, 65(4):715-729.e5.
- Holler, N; Zaru, R; Micheau, O; Thome, M; Attinger, A; Valitutti, S, et al. (2000).** Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunology*, 1(6):489–495.

-
- Horn, S;** Hughes, MA; Schilling, R; Sticht, C; Tenev, T; Ploesser, M, et al. (2017). Caspase-10 Negatively Regulates Caspase-8-Mediated Cell Death, Switching the Response to CD95L in Favor of NF- κ B Activation and Cell Survival. *Cell Reports*, 19(4):785–797.
- Hu, X-M;** Li, Z-X; Lin, R-H; Shan, J-Q; Yu, Q-W; Wang, R-X, et al. (2021). Guidelines for Regulated Cell Death Assays. A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9:634690.
- Hu, Y;** Wang, B; Li, S; Yang, S (2022). Pyroptosis, and its Role in Central Nervous System Disease. *Journal of Molecular Biology*, 434(4):167379.
- Huang, D;** Zheng, X; Wang, Z-A; Chen, X; He, W-T; Zhang, Y, et al. (2017). The MLKL Channel in Necroptosis Is an Octamer Formed by Tetramers in a Dyadic Process. *Molecular and Cellular Biology*, 37(5):e00497-16.
- Hussain, M;** Zimmermann, V; van Wijk, SJL; Fulda, S (2018). Mouse lung fibroblasts are highly susceptible to necroptosis in a reactive oxygen species-dependent manner. *Biochemical Pharmacology*, 153:242–247.
- Jacobsen, AV;** Lowes, KN; Tanzer, MC; Lucet, IS; Hildebrand, JM; Petrie, EJ, et al. (2016). HSP90 activity is required for MLKL oligomerisation and membrane translocation and the induction of necroptotic cell death. *Cell Death & Disease*, 7:e2051.
- Jenkins, RW;** Canals, D; Hannun, YA (2009). Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cellular Signalling*, 21(6):836–846.
- Jenkins, RW;** Idkowiak-Baldys, J; Simbari, F; Canals, D; Roddy, P; Riner, CD, et al. (2011). A novel mechanism of lysosomal acid sphingomyelinase maturation: requirement for carboxyl-terminal proteolytic processing. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(5):3777–3788.
- Jiang, M;** Qi, L; Li, L; Wu, Y; Song, D; Li, Y (2021). Caspase-8: A key protein of cross-talk signal way in "PANoptosis" in cancer. *International Journal of Cancer*, 149(7):1408–1420.
- Jin, Z;** Li, Y; Pitti, R; Lawrence, D; Pham, VC; Lill, JR, et al. (2009). Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell*, 137(4):721–735.
- Julien, O;** Wells, JA (2017). Caspases and their substrates. *Cell Death and Differentiation*, 24(8):1380–1389.
- Kaiser, WJ;** Upton, JW; Long, AB; Livingston-Rosanoff, D; Daley-Bauer, LP; Hakem, R, et al. (2011). RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature*, 471(7338):368–372.

- Kang, S;** Fernandes-Alnemri, T; Rogers, C; Mayes, L; Wang, Y; Dillon, C, et al. (2015). Caspase-8 scaffolding function and MLKL regulate NLRP3 inflammasome activation downstream of TLR3. *Nature Communications*, 6:7515.
- Karasuyama, H;** Melchers, F (1988). Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *European Journal of Immunology*, 18(1):97–104.
- Kerr, JF;** Wyllie, AH; Currie, AR (1972). Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4):239–257.
- Khalid, N;** Azimpouran, M (2022). Necrosis. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32491559/>
Zugegriffen: 16. Januar 2023.
- Khan, I;** Yousif, A; Chesnokov, M; Hong, L; Chefetz, I (2021). A decade of cell death studies. Breathing new life into necroptosis. *Pharmacology & Therapeutics*, 220:107717.
- Kischkel, FC;** Lawrence, DA; Tinel, A; LeBlanc, H; Virmani, A; Schow, P, et al. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(49):46639–46646.
- Kist, M;** Vucic, D (2021). Cell death pathways: intricate connections and disease implications. *The EMBO Journal*, 40(5):e106700.
- Knapp, B (2002).** Nobelpreis 2002 Organentwicklung und programmierter Zelltod. *Der Anaesthetist*, 51(12):1020–1021.
- Kornhuber, J;** Rhein, C; Müller, CP; Mühle, C (2015). Secretory sphingomyelinase in health and disease. *Biological Chemistry*, 396(6-7):707–736.
- Kumari, R;** Deshmukh, RS; Das, S (2019). Caspase-10 inhibits ATP-citrate lyase-mediated metabolic and epigenetic reprogramming to suppress tumorigenesis. *Nature Communications*, 10(1):4255.
- Kuninaka, S;** Nomura, M; Hirota, T; Iida, S-I; Hara, T; Honda, S, et al. (2005). The tumor suppressor WARTS activates the Omi / HtrA2-dependent pathway of cell death. *Oncogene*, 24(34):5287–5298.
- Lafont, E;** Milhas, D; Teissié, J; Therville, N; Andrieu-Abadie, N; Levade, T, et al. (2010). Caspase-10-dependent cell death in Fas/CD95 signalling is not abrogated by caspase inhibitor zVAD-fmk. *PLOS ONE*, 5(10):e13638.
- Laster, SM;** Wood, JG; Gooding, LR (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *Journal of Immunology*, 141(8):2629–2634.

-
- Li, C; Wang, A; Wu, Y; Gulbins, E; Grassmé, H; Zhao, Z (2019a).** Acid Sphingomyelinase-Ceramide System in Bacterial Infections. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 52(2):280–301.
- Li, C; Guo, S; Pang, W; Zhao, Z (2019b).** Crosstalk Between Acid Sphingomyelinase and Inflammasome Signaling and Their Emerging Roles in Tissue Injury and Fibrosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7:378.
- Li, X; Zhong, C-Q; Wu, R; Xu, X; Yang, Z-H; Cai, S, et al. (2021).** RIP1-dependent linear and nonlinear recruitments of caspase-8 and RIP3 respectively to necrosome specify distinct cell death outcomes. *Protein & Cell*, 12(11):858–876.
- Li, X; Li, F; Zhang, X; Zhang, H; Zhao, Q; Li, M, et al. (2022).** Caspase-8 auto-cleavage regulates programmed cell death and collaborates with RIPK3/MLKL to prevent lymphopenia. *Cell Death and Differentiation*, 8:1500-1512.
- Li, J (2022).** Untersuchung der Mechanismen über die die Protease HtrA2/OMI den nekroptischen und den parthanatischen Zelltod reguliert. Masterarbeit, Kiel.
- Liu, Y; Shoji-Kawata, S; Sumpter, RM; Wei, Y; Ginet, V; Zhang, L, et al. (2013).** Autosis is a Na⁺,K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(51):20364–20371.
- Liu, B; He, R; Zhang, L; Hao, B; Jiang, W; Wang, W, et al. (2021a).** Inflammatory Caspases Drive Pyroptosis in Acute Lung Injury. *Frontiers in Pharmacology*, 12:631256.
- Liu, X; Xie, X; Ren, Y; Shao, Z; Zhang, N; Li, L, et al. (2021b).** The role of necroptosis in disease and treatment. *MedComm*, 2(4):730–755.
- Lockshin, RA; Williams, CM (1964).** Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of Insect Physiology*, 10(4):643–649.
- Lorenzen, I; Lokau, J; Korpys, Y; Oldefest, M; Flynn, CM; Künzel, U, et al. (2016).** Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation. *Scientific Reports*, 6:35067.
- Lu, NT; Liu, NM; Patel, D; Vu, JQ; Liu, L; Kim, CY, et al. (2018).** Oncoprotein Stathmin Modulates Sensitivity to Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells During Hepatitis C Viral Replication. *Journal of Cell Death*, 11:1179066018785141.
- MacKenzie, SH; Clark, AC (2012).** Death by caspase dimerization. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 747:55–73.

- Malireddi, RKS; Gurung, P; Kesavardhana, S; Samir, P; Burton, A; Mummareddy, H, et al. (2020).** Innate immune priming in the absence of TAK1 drives RIPK1 kinase activity-independent pyroptosis, apoptosis, necroptosis, and inflammatory disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(3):jem.20191644.
- Marabese, M; Mazzeletti, M; Vikhanskaya, F; Brogini, M (2008).** HtrA2 enhances the apoptotic functions of p73 on bax. *Cell Death and Differentiation*, 15(5):849–858.
- Martins, LM; Morrison, A; Klupsch, K; Fedele, V; Moiso, N; Teismann, P, et al. (2004).** Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Molecular and Cellular Biology*, 24(22):9848–9862.
- Matas Pérez, E; Valdivieso Shephard, JL; Bravo García-Morato, M; Robles Marhuenda, Á; Martínez-Ojinaga Nodal, E; Prieto Bozano, G, et al. (2021).** Variants in CASP10, a diagnostic challenge: Single center experience and review of the literature. *Clinical Immunology*, 230:108812.
- Matthess, Y; Raab, M; Sanhaji, M; Lavrik, IN; Strebhardt, K (2010).** Cdk1/cyclin B1 controls Fas-mediated apoptosis by regulating caspase-8 activity. *Molecular and Cellular Biology*, 30(24):5726–5740.
- McNamara, DE; Quarato, G; Guy, CS; Green, DR; Moldoveanu, T (2018).** Characterization of MLKL-mediated Plasma Membrane Rupture in Necroptosis. *Journal of Visualized Experiments*, (138):58088.
- McNamara, DE; Dovey, CM; Hale, AT; Quarato, G; Grace, CR; Guibao, CD, et al. (2019).** Direct Activation of Human MLKL by a Select Repertoire of Inositol Phosphate Metabolites. *Cell Chemical Biology*, 26(6):863-877.e7.
- Meng, Y; Sandow, JJ; Czabotar, PE; Murphy, JM (2021).** The regulation of necroptosis by post-translational modifications. *Cell Death and Differentiation*, 28(3):861–883.
- Merski, M; Moreira, C; Abreu, RM; Ramos, MJ; Fernandes, PA; Martins, LM, et al. (2017).** Molecular motion regulates the activity of the Mitochondrial Serine Protease HtrA2. *Cell Death & Disease*, 8(10):e3119.
- Micheau, O; Tschopp, J (2003).** Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114(2):181–190.
- Miguel, C de; Pelegrín, P; Baroja-Mazo, A; Cuevas, S (2021).** Emerging Role of the Inflammasome and Pyroptosis in Hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3):1064.

-
- Milhas, D;** Cuvillier, O; Therville, N; Clavé, P; Thomsen, M; Levade, T, et al. (2005). Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(20):19836–19842.
- Mohr, A;** Deedigan, L; Jencz, S; Mehrabadi, Y; Houlden, L; Albarenque, S-M, et al. (2018). Caspase-10: a molecular switch from cell-autonomous apoptosis to communal cell death in response to chemotherapeutic drug treatment. *Cell Death and Differentiation*, 25(2):340–352.
- Moriwaki, K;** Chan, FK-M (2016). Regulation of RIPK3- and RHIM-dependent Necroptosis by the Proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(11):5948–5959.
- Newton, K;** Wickliffe, KE; Dugger, DL; Maltzman, A; Roose-Girma, M; Dohse, M, et al. (2019). Cleavage of RIPK1 by caspase-8 is crucial for limiting apoptosis and necroptosis. *Nature*, 574(7778):428–431.
- Nguyen, LN;** Kanneganti, T-D (2022). PANoptosis in Viral Infection: The Missing Puzzle Piece in the Cell Death Field. *Journal of Molecular Biology*, 434(4):167249.
- Ni, X;** Morales, CR (2006). The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic*, 7(7):889–902.
- Niemela, J;** Kuehn, HS; Kelly, C; Zhang, M; Davies, J; Melendez, J, et al. (2015). Caspase-8 Deficiency Presenting as Late-Onset Multi-Organ Lymphocytic Infiltration with Granulomas in two Adult Siblings. *Journal of Clinical Immunology*, 35(4):348–355.
- Novikoff, A;** Beaufay, H; Duve, C (1956). Electron microscopy of lysosomerich fractions from rat liver. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 2(4 Suppl):179–184.
- Oberst, A;** Dillon, CP; Weinlich, R; McCormick, LL; Fitzgerald, P; Pop, C, et al. (2011). Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature*, 471(7338):363–367.
- Ohsumi, Y (2014).** Historical landmarks of autophagy research. *Cell Research*, 24(1):9–23.
- Onizawa, M;** Oshima, S; Schulze-Topphoff, U; Osés-Prieto, JA; Lu, T; Tavares, R, et al. (2015). The ubiquitin-modifying enzyme A20 restricts ubiquitination of the kinase RIPK3 and protects cells from necroptosis. *Nature Immunology*, 16(6):618–627.
- Orning, P;** Lien, E (2021). Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 109(1):121–141.

- Orning, P;** Weng, D; Starheim, K; Ratner, D; Best, Z; Lee, B, et al. (2018). Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death. *Science*, 362(6418):1064–1069.
- Overholtzer, M;** Maillieux, AA; Mouneimne, G; Normand, G; Schnitt, SJ; King, RW, et al. (2007). A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell*, 131(5):966–979.
- Parrish, AB;** Freel, CD; Kornbluth, S (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(6):a008672.
- Perrotta, C;** Cervia, D; Palma, C de; Assi, E; Pellegrino, P; Bassi, MT, et al. (2015). The emerging role of acid sphingomyelinase in autophagy. *Apoptosis*, 20(5):635–644.
- Peschon, JJ;** Slack, JL; Reddy, P; Stocking, KL; Sunnarborg, SW; Lee, DC, et al. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, 282(5392):1281–1284.
- Petrie, EJ;** Birkinshaw, RW; Koide, A; Denbaum, E; Hildebrand, JM; Garnish, SE, et al. (2020). Identification of MLKL membrane translocation as a checkpoint in necroptotic cell death using Monobodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(15):8468–8475.
- Philipp, S;** Sosna, J; Adam, D (2016). Cancer and necroptosis: friend or foe? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(11-12):2183–2193.
- Pinto, C;** Sousa, D; Ghilas, V; Dardis, A; Scarpa, M; Macedo, MF (2021). Acid Sphingomyelinase Deficiency: A Clinical and Immunological Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23):12870.
- Pop, C;** Oberst, A; Drag, M; van Raam, BJ; Riedl, SJ; Green, DR, et al. (2011). FLIP(L) induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity. *The Biochemical Journal*, 433(3):447–457.
- Poreba, M;** Strózyk, A; Salvesen, GS; Drag, M (2013). Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(8):a008680.
- Radosevich, JA** (2018). Apoptosis and beyond. The many ways cells die. Hoboken, New York: Wiley Blackwell.
- Roberts, JZ;** Crawford, N; Longley, DB (2022). The role of Ubiquitination in Apoptosis and Necroptosis. *Cell Death and Differentiation*, 29(2):272–284.
- Rodrigue-Gervais, IG;** Doiron, K; Champagne, C; Mayes, L; Leiva-Torres, GA; Vanié, P, et al. (2018). The mitochondrial protease HtrA2 restricts the NLRP3 and AIM2 inflammasomes. *Scientific Reports*, 8(1):8446.

-
- Rövekamp, HC (2019).** Die Rolle der Nekroptose für die ADAM10- und ADAM17-Aktivierung. Dissertation, Kiel.
- Safferthal, C; Rohde, K; Fulda, S (2017).** Therapeutic targeting of necroptosis by Smac mimetic bypasses apoptosis resistance in acute myeloid leukemia cells. *Oncogene*, 36(11):1487–1502.
- Saggau, C (2018).** The species-specific role of caspase-8 as a regulator of necroptosis. Dissertation, Kiel.
- Sakamaki, K; Imai, K; Tomii, K; Miller, DJ (2015).** Evolutionary analyses of caspase-8 and its paralogs: Deep origins of the apoptotic signaling pathways. *BioEssays*, 37(7):767–776.
- Sakimoto, T; Yamada, A; Sawa, M (2009).** Release of soluble tumor necrosis factor receptor 1 from corneal epithelium by TNF-alpha-converting enzyme-dependent ectodomain shedding. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(10):4618–4621.
- Salvesen, GS; Dixit, VM (1999).** Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20):10964–10967.
- Samson, AL; Zhang, Y; Geoghegan, ND; Gavin, XJ; Davies, KA; Mlodzianoski, MJ, et al. (2020).** MLKL trafficking and accumulation at the plasma membrane control the kinetics and threshold for necroptosis. *Nature Communications*, 11(1):3151.
- Sawai, H (2016).** Induction of Apoptosis in TNF-Treated L929 Cells in the Presence of Necrostatin-1. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10):1678.
- Scaturro, P; Pichlmair, A (2018).** Oxeiptosis-a cell death pathway to mitigate damage caused by radicals. *Cell Death and Differentiation*, 25(7):1191–1193.
- Schissel, SL; Schuchman, EH; Williams, KJ; Tabas, I (1996).** Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(31):18431–18436.
- Schleiden, MJ (1838).** Beiträge zur Phytogenesis. Berlin: Veit et Comp.
- Schwann, T (1839).** Mikroskopische Untersuchungen über die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen. Berlin: Sander.
- Schweichel, JU; Merker, HJ (1973).** The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7(3):253–266.
- Seaman, JE; Julien, O; Lee, PS; Rettenmaier, TJ; Thomsen, ND; Wells, JA (2016).** Caspases: caspases can cleave after aspartate, glutamate and phosphoserine residues. *Cell Death and Differentiation*, 23(10):1717–1726.

- Seegar, TC; Blacklow, SC (2019).** Domain integration of ADAM family proteins: Emerging themes from structural studies. *Experimental Biology and Medicine*, 244(17):1510–1519.
- Seo, J; Nam, YW; Kim, S; Oh, D-B; Song, J (2021).** Necroptosis molecular mechanisms. Recent findings regarding novel necroptosis regulators. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(6):1007–1017.
- Seong, Y-M; Choi, J-Y; Park, H-J; Kim, K-J; Ahn, S-G; Seong, G-H, et al. (2004).** Autocatalytic processing of HtrA2/Omi is essential for induction of caspase-dependent cell death through antagonizing XIAP. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(36):37588–37596.
- Sharma, RK; Li, J; Krishnan, S; Richards, EM; Raizada, MK; Mohandas, R (2021).** Angiotensin-converting enzyme 2 and COVID-19 in cardiorenal diseases. *Clinical Science*, 135(1):1–17.
- Shlomovitz, I; Erlich, Z; Arad, G; Edry-Botzer, L; Zargarian, S; Cohen, H, et al. (2021).** Proteomic analysis of necroptotic extracellular vesicles. *Cell Death & Disease*, 12(11):1059.
- Singh, R; Letai, A; Sarosiek, K (2019).** Regulation of apoptosis in health and disease. The balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3):175–193.
- Sisto, M; Ribatti, D; Lisi, S (2021).** ADAM 17 and Epithelial-to-Mesenchymal Transition: The Evolving Story and Its Link to Fibrosis and Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 10(15):3373.
- Skulachev, VP (1999).** Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Molecular Aspects of Medicine*, 20(3):139–184.
- Smyth, P; Sessler, T; Scott, CJ; Longley, DB (2020).** FLIP(L): the pseudo-caspase. *The FEBS Journal*, 287(19):4246–4260.
- Song, X; Zhu, S; Xie, Y; Liu, J; Sun, L; Zeng, D, et al. (2018).** JTC801 Induces pH-dependent Death Specifically in Cancer Cells and Slows Growth of Tumors in Mice. *Gastroenterology*, 154(5):1480–1493.
- Sosna, J; Voigt, S; Mathieu, S; Kabelitz, D; Trad, A; Janssen, O, et al. (2013).** The proteases HtrA2/Omi and UCH-L1 regulate TNF-induced necroptosis. *Cell Communication and Signaling*, 11:76.

-
- Sosna, J; Philipp, S; Fuchslocher Chico, J; Saggau, C; Fritsch, J; Föll, A, et al. (2016).** Differences and Similarities in TRAIL- and Tumor Necrosis Factor-Mediated Necroptotic Signaling in Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 36(20):2626–2644.
- Sprick, MR; Rieser, E; Stahl, H; Grosse-Wilde, A; Weigand, MA; Walczak, H (2002).** Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *The EMBO Journal*, 21(17):4520–4530.
- Su, XJ; Huang, L; Qu, Y; Mu, D (2019).** Progress in research on the role of Omi/HtrA2 in neurological diseases. *Reviews in the Neurosciences*, 30(3):279–287.
- Sun, J; Li, Y (2022).** Pyroptosis and respiratory diseases: A review of current knowledge. *Frontiers in Immunology*, 13:920464.
- Takahashi, N; Vereecke, L; Bertrand, MJM; Duprez, L; Berger, SB; Divert, T, et al. (2014).** RIPK1 ensures intestinal homeostasis by protecting the epithelium against apoptosis. *Nature*, 513(7516):95–99.
- Tanzer, MC; Khan, N; Rickard, JA; Etemadi, N; Lalaoui, N; Spall, SK, et al. (2017).** Combination of IAP antagonist and IFN γ activates novel caspase-10- and RIPK1-dependent cell death pathways. *Cell Death and Differentiation*, 24(3):481–491.
- Tchikov, V; Fritsch, J; Schütze, S (2014).** Separation of magnetically isolated TNF receptors from mitochondria. *Methods in Enzymology*, 535:327–349.
- Thon, L; Möhlig, H; Mathieu, S; Lange, A; Bulanova, E; Winoto-Morbach, S, et al. (2005).** Ceramide mediates caspase-independent programmed cell death. *The FASEB Journal*, 19(14):1945–1956.
- Thon, L; Mathieu, S; Kabelitz, D; Adam, D (2006).** The murine TRAIL receptor signals caspase-independent cell death through ceramide. *Experimental Cell Research*, 312(19):3808–3821.
- Toyama, Y; Harkness, RW; Lee, TYT; Maynes, JT; Kay, LE (2021).** Oligomeric assembly regulating mitochondrial HtrA2 function as examined by methyl-TROSY NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(11):e2025022118.
- Tsuchiya, K (2020).** Inflammasome-associated cell death: Pyroptosis, apoptosis, and physiological implications. *Microbiology and Immunology*, 64(4):252–269.

- Tsuchiya, K;** Nakajima, S; Hosojima, S; Thi Nguyen, D; Hattori, T; Manh Le, T, et al. (2019). Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. *Nature Communications*, 10(1):2091.
- van de Craen, M;** van Loo, G; Declercq, W; Schotte, P; van den brande, I; Mandruzzato, S, et al. (1998). Molecular cloning and identification of murine caspase-8. *Journal of Molecular Biology*, 284(4):1017–1026.
- van Loo, G;** van Gurp, M; Depuydt, B; Srinivasula, SM; Rodriguez, I; Alnemri, ES, et al. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death and Differentiation*, 9(1):20–26.
- van Opdenbosch, N;** Lamkanfi, M (2019). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*, 50(6):1352–1364.
- van Raam, BJ;** Salvesen, GS (2012). Proliferative versus apoptotic functions of caspase-8 Hetero or homo: the caspase-8 dimer controls cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824(1):113–122.
- Vande Walle, L;** Wirawan, E; Lamkanfi, M; Festjens, N; Verspurten, J; Saelens, X, et al. (2010). The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi cleaves RIP1 during apoptosis of Ba/F3 cells induced by growth factor withdrawal. *Cell Research*, 20(4):421–433.
- Vanden Berghe, T;** Hassannia, B; Vandenabeele, P (2016). An outline of necrosome triggers. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(11-12):2137–2152.
- Vandenabeele, P;** Galluzzi, L; Vanden Berghe, T; Kroemer, G (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10):700–714.
- Varfolomeev, E;** Blankenship, JW; Wayson, SM; Fedorova, AV; Kayagaki, N; Garg, P, et al. (2007). IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell*, 131(4):669–681.
- Vercammen, D;** Brouckaert, G; Denecker, G; van de Craen, M; Declercq, W; Fiers, W, et al. (1998a). Dual signaling of the Fas receptor. Initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(5):919–930.
- Vercammen, D;** Beyaert, R; Denecker, G; Goossens, V; van Loo, G; Declercq, W, et al. (1998b). Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(9):1477–1485.

-
- Virchow, R (1989).** Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutrition Reviews*, 47(1):23–25.
- Vogt, C; Vogt, KC (1842).** Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstetrican). Solothurn: Jent & Gassmann.
- Voigt, S (2014).** Induction, execution and clinical relevance of TNF- and TRAIL-induced necroptosis. Dissertation, Kiel.
- Wachmann, K; Pop, C; van Raam, BJ; Drag, M; Mace, PD; Snipas, SJ, et al. (2010).** Activation and specificity of human caspase-10. *Biochemistry*, 49(38):8307–8315.
- Wang, J; Chun, HJ; Wong, W; Spencer, DM; Lenardo, MJ (2001).** Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24):13884–13888.
- Wang, H; Meng, H; Li, X; Zhu, K; Dong, K; Mookhtiar, AK, et al. (2017).** PELI1 functions as a dual modulator of necroptosis and apoptosis by regulating ubiquitination of RIPK1 and mRNA levels of c-FLIP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(45):11944–11949.
- Wang, Y; Kanneganti, T-D (2021a).** From pyroptosis, apoptosis and necroptosis to PANoptosis: A mechanistic compendium of programmed cell death pathways. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19:4641–4657.
- Wang, Q; Fan, D; Xia, Y; Ye, Q; Xi, X; Zhang, G, et al. (2021b).** The latest information on the RIPK1 post-translational modifications and functions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142:112082.
- Wicki, S; Gurzeler, U; Wei-Lynn Wong, W; Jost, PJ; Bachmann, D; Kaufmann, T (2016).** Loss of XIAP facilitates switch to TNF α -induced necroptosis in mouse neutrophils. *Cell Death & Disease*, 7(10):e2422.
- Wong, E; Maretzky, T; Peleg, Y; Blobel, CP; Sagi, I (2015).** The Functional Maturation of A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 Requires Processing at a Newly Identified Proprotein Convertase (PC) Cleavage Site. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(19):12135–12146.
- Wu, J; Jiang, H; Luo, S; Zhang, M; Zhang, Y; Sun, F, et al. (2013).** Caspase-mediated cleavage of C53/LZAP protein causes abnormal microtubule bundling and rupture of the nuclear envelope. *Cell Research*, 23(5):691–704.
- Xia, B; Fang, S; Chen, X; Hu, H; Chen, P; Wang, H, et al. (2016).** MLKL forms cation channels. *Cell Research*, 26(5):517–528.

- Xu, X; Lai, Y; Hua, Z-C (2019).** Apoptosis and apoptotic body. Disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 39(1):BSR20180992.
- Yan, G; Elbadawi, M; Efferth, T (2020).** Multiple cell death modalities and their key features. *World Academy of Sciences Journal*:39–48.
- Yang, Z-H; Wu, X-N; He, P; Wang, X; Wu, J; Ai, T, et al. (2020).** A Non-canonical PDK1-RSK Signal Diminishes Pro-caspase-8-Mediated Necroptosis Blockade. *Molecular Cell*, 80(2):296-310.e6.
- Yang, G; Cui, M; Jiang, W; Sheng, J; Yang, Y; Zhang, X (2021).** Molecular switch in human diseases-disintegrin and metalloproteinases, ADAM17. *Aging*, 13(12):16859–16872.
- Yu, P; Zhang, X; Liu, N; Tang, L; Peng, C; Chen, X (2021).** Pyroptosis. Mechanisms and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1):128.
- Yuan, X; Piao, L; Wang, L; Han, X; Zhuang, M; Liu, Z (2019).** Pivotal roles of protein 4.1B/DAL-1, a FERM-domain containing protein, in tumor progression. *International Journal of Oncology*, 55(5):979–987.
- Zeng, R; Liu, Y; Jiang, Z-J; Huang, J-P; Wang, Y; Li, X-F, et al. (2018).** EPB41L3 is a potential tumor suppressor gene and prognostic indicator in esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology*, 52(5):1443–1454.
- Zhang, Y; Chen, X; Gueydan, C; Han, J (2018).** Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research*, 28(1):9–21.
- Zhang, C; He, A; Liu, S; He, Q; Luo, Y; He, Z, et al. (2019).** Inhibition of HtrA2 alleviated dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis by preventing necroptosis of intestinal epithelial cells. *Cell Death & Disease*, 10(5):344.
- Zunke, F; Rose-John, S (2017).** The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(11 Pt B):2059–2070.
- Zurawa-Janicka, D; Jarzab, M; Polit, A; Skorko-Glonek, J; Lesner, A; Gitlin, A, et al. (2013).** Temperature-induced changes of HtrA2(Omi) protease activity and structure. *Cell Stress & Chaperones*, 18(1):35–51.
- Zychlinsky, A; Prevost, MC; Sansonetti, PJ (1992).** Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*, 358(6382):167–169.

Tabelle 9.1: Massenspektrometrische Analyse der Mitochondrien nekroptotischer parentaler MEF und HtrA2/OMI^{-/-}-MEF zur Identifizierung neuer Mediatoren von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg: Liste der in den parentalen MEF oder HtrA2/OMI^{-/-}-MEF hochregulierten Proteine.

Die Bestimmung der hochregulierten Proteine erfolgte aus der Differenz des Logarithmus der Basis 2 der Abundanzen der mitochondrialen HtrA2/OMI^{-/-}-MEF- und MEF-Proteine, wobei ein Wert über 0,877 für eine Hochregulierung in HtrA2/OMI^{-/-}-MEF und ein Wert von -0,8 für eine Hochregulierung in den parentalen MEF gesetzt wurde. Für den durchgeführten t-Test wurde ein P-Wert von $\leq 0,05$ als Grenzwert verwendet.

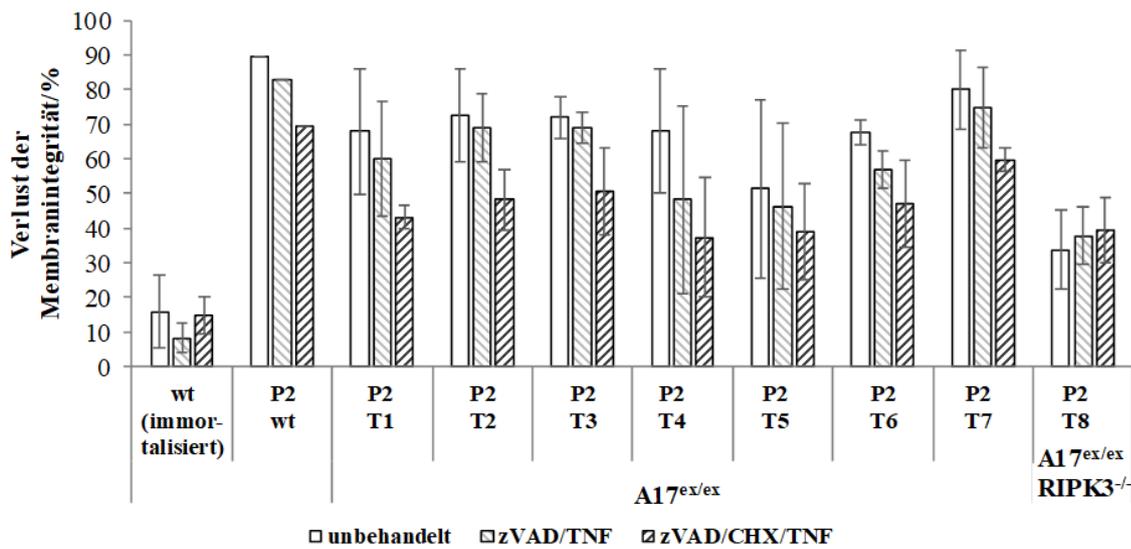
Protein	Accession number	Hochreguliert in
<i>DDRGK domain-containing protein 1</i>	Q80WW9	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>SH2 domain-containing protein 4A</i>	Q9D7V1	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Centrobin</i>	Q8CB62	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Sciellin</i>	Q9EQG3	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>High mobility group protein B3</i>	O54879	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Myelin basic protein</i>	P04370-1	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Ezrin</i>	P26040	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Cathepsin Z</i>	Q9WUU7	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Cysteine-rich protein 2</i>	Q9WUU7	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Mds1 and evi1 complex locus protein evi1</i>	P14404	MEF
<i>Cathepsin B</i>	P10605	MEF
<i>Isoform 2 of Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein</i>	Q9DBZ1-2	MEF
<i>Fatty acid-binding protein, epidermal</i>	Q05816	MEF
<i>Fos-related antigen 1</i>	P48755	MEF
<i>Myosin regulatory light polypeptide 9</i>	Q9CQ19	MEF
<i>Isoform 8 of Band 4.1-like protein 3</i>	Q9WV92-8	MEF
<i>Muscle-related coiled-coil protein</i>	A2AMM0	MEF
<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>	P29533-1	MEF
<i>Isoform 2 of Serine/threonine-protein kinase DCLK1</i>	Q9JLM8-2	MEF
<i>Protein S100-A4</i>	P07091	MEF

Tabelle 9.2: Massenspektrometrische Analyse der Mitochondrien nekroptotischer parentaler MEF und HtrA2/OMI^{-/-}-MEF zur Identifizierung neuer Mediatoren von HtrA2/OMI im nekroptotischen Signalweg mittels N-terminaler Anreicherung der Peptide: Liste der in den parentalen MEF oder HtrA2/OMI^{-/-}-MEF vermehrt gespaltenen Proteine.

Die Bestimmung der vermehrt gespaltenen Proteine erfolgte aus der Differenz des Logarithmus der Basis 2 der Abundanzen der mitochondrialen HtrA2/OMI^{-/-}-MEF-Proteine und MEF-Proteine, wobei ein Wert über 1,3 für eine vermehrte Spaltung in HtrA2/OMI^{-/-}-MEF und ein Wert von -1,2 für eine vermehrte Spaltung in den parentalen MEF gesetzt wurde. Für den durchgeführten t-Test wurde ein P-Wert von $\leq 0,05$ als Grenzwert verwendet.

Protein	Accession number	Vermehrt gespalten in
<i>Ankyrin-3</i>	G5E8K5-1	MEF
<i>Cathepsin B</i>	P10605	MEF
<i>Histone H1.4</i>	P43274	MEF
<i>Protein RCC2</i>	Q8BK67	MEF
<i>High mobility group protein HMG-I/HMG-Y</i>	P17095-2	MEF
<i>Interferon-activable protein 205-B</i>	P0DOV1	MEF
<i>60S ribosomal protein L8</i>	P62918	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>EMILIN-1</i>	Q99K41	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Integrin alpha-7</i>	Q61738	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog</i>	P97792-1	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15</i>	P11031	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1</i>	Q80XU3	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/delta/epsilon/gamma</i>	Q61029; Q61033-1	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>60S ribosomal protein L6</i>	P47911	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Keratin, type II cytoskeletal 8</i>	P11679	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Basigin</i>	P18572-1	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Pirin</i>	Q9D711	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Protein CDV3</i>	Q4VAA2-1	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Non-histone chromosomal protein HMG-14</i>	P18608	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Spindlin-1</i>	Q61142	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Histone H2A.Z</i>	P0C0S6	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>60S ribosomal protein L29</i>	P47915	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Non-histone chromosomal protein HMG-17</i>	P09602	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Charged multivesicular body protein 4c</i>	Q9D7F7	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A</i>	O88508-1	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Histone H1.4</i>	P43274	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Septin-9</i>	Q80UG5-1	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Solute carrier organic anion transporter family member 2A1</i>	Q9EPT5-1	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF
<i>Histone H2A.Z</i>	P0C0S6	HtrA2/OMI ^{-/-} -MEF

a)



b)

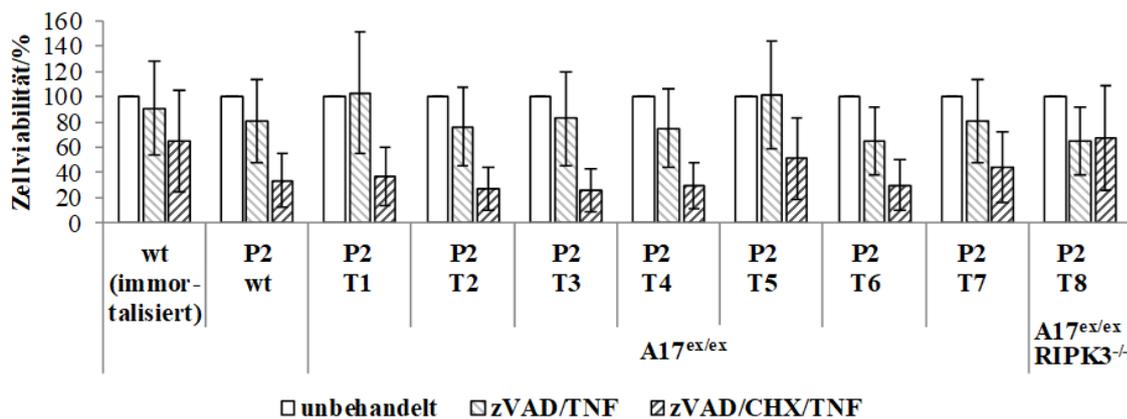
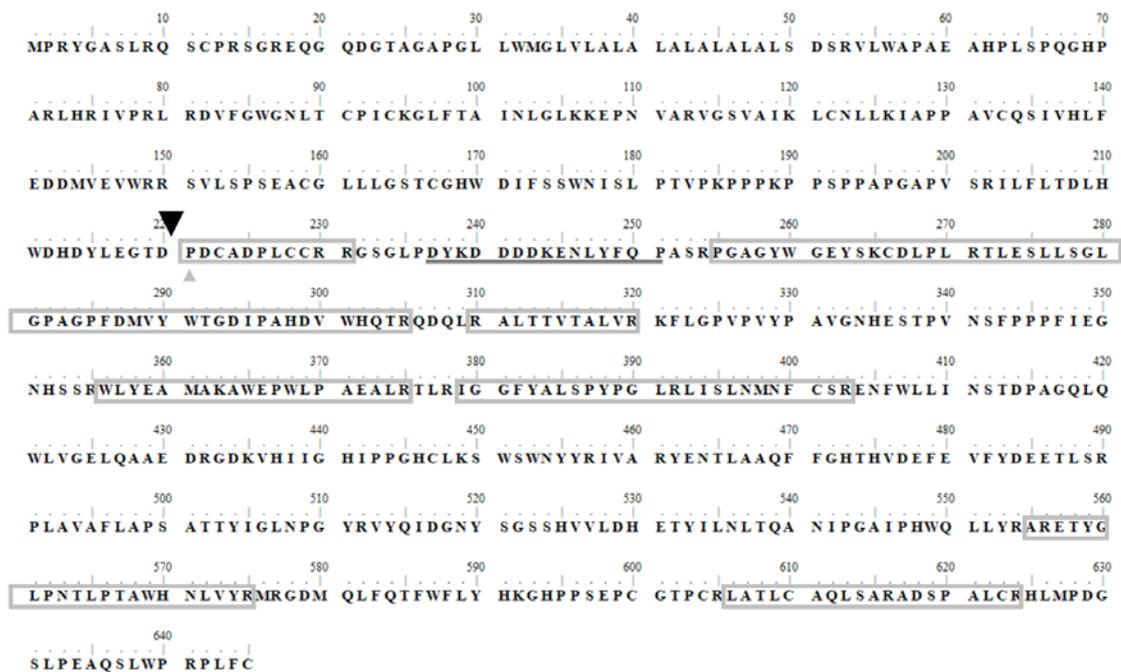


Abbildung 9.2: Zweite Passage der ADAM17^{ex/ex}- und ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-Lungenfibroblasten: Messung des Verlustes der Membranintegrität und Analyse der intrazellulären ATP-Spiegel nach der Induktion der Nekroptose.

Die Messung der Membranintegrität und die Analyse der intrazellulären ATP-Spiegel nach der Induktion der Nekroptose erfolgte in primären Lungenfibroblasten einer Wildtyp-Maus (wt), sieben ADAM17^{ex/ex}-Mäusen (T1-T7), sowie einer ADAM17^{ex/ex}/RIPK3^{-/-}-Maus (T8) (jeweils mit der zweiten Passage). Die Lungenfibroblasten wurden unbehandelt belassen oder für 30 min mit 20 μ M zVAD oder 20 μ M zVAD plus 1 μ g mL⁻¹ CHX prästimuliert und anschließend für 16 Stunden mit 100 ng mL⁻¹ TNF zur Induktion des Zelltodes inkubiert. (a) Der Verlust der Membranintegrität wurde mittels einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung der PI-positiven und -negativen Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert des Verlustes der Membranintegrität, sowie dessen Standardfehler, ermittelt aus drei biologischen Replikaten mit je drei technischen Replikaten. (b) Bestimmung der intrazellulären ATP-Spiegel. Dargestellt ist der Mittelwert, sowie dessen Standardfehler, ermittelt aus zwei biologischen Replikaten mit jeweils drei technischen Replikaten.

a)



b)

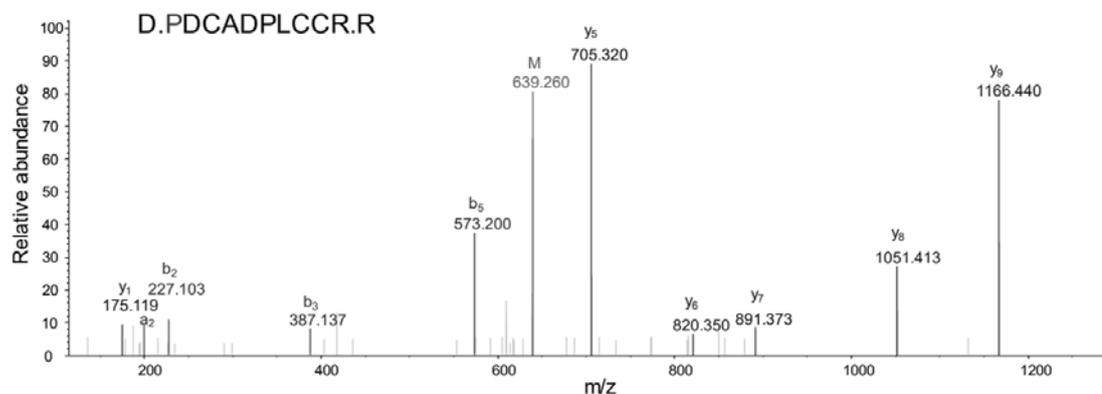


Abbildung 9.3: Kartierung der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der nekroptotischen Spaltstelle der FLAG-TEV-A-SMase.

(a) Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der FLAG-TEV-A-SMase, in welcher folgende Markierungen zu sehen sind: Inkorporierte FLAG-TEV-Sequenz (—), dimethylierter N-Terminus der nekroptotischen Spaltstelle (▲), Peptide, welche in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert wurden (□) und die identifizierte nekroptotische Spaltstelle der FLAG-TEV-A-SMase (▼). (b) Dargestellt ist das MS/MS-Spektrum des Peptids D.PDCADPLCCR.R. Die Methylierung von Prolin (P221) nach reduktiver Dimethylierung (massenisotopische Masse von 639,260 Da ($z = 2$)) bestätigt die nekroptotische Spaltstelle der FLAG-TEV-A-SMase an Position D220.P221.

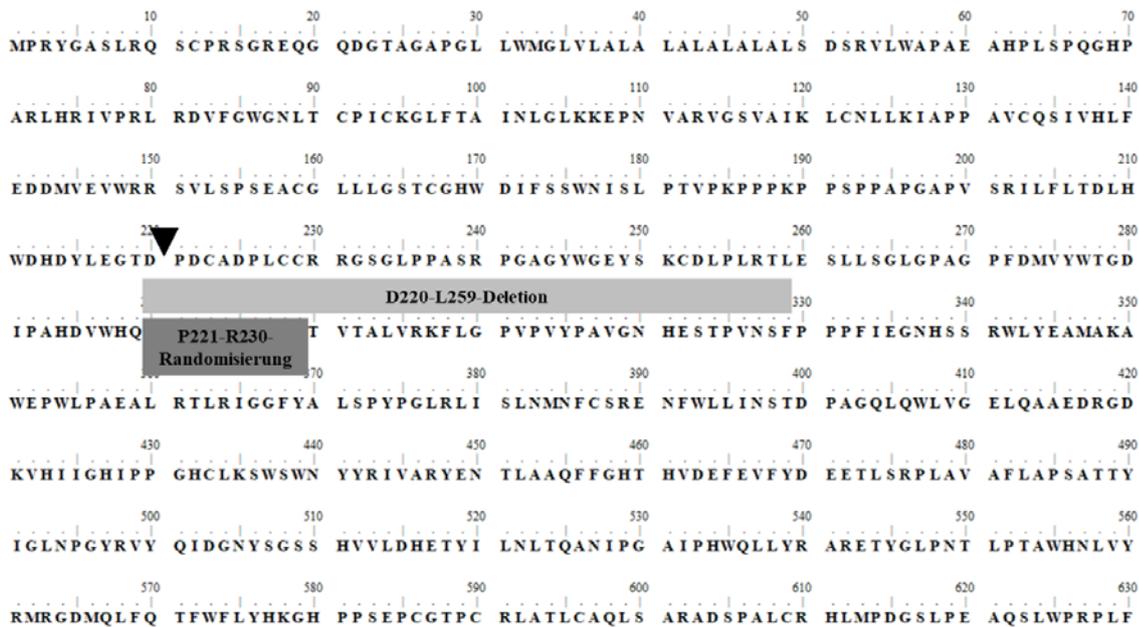
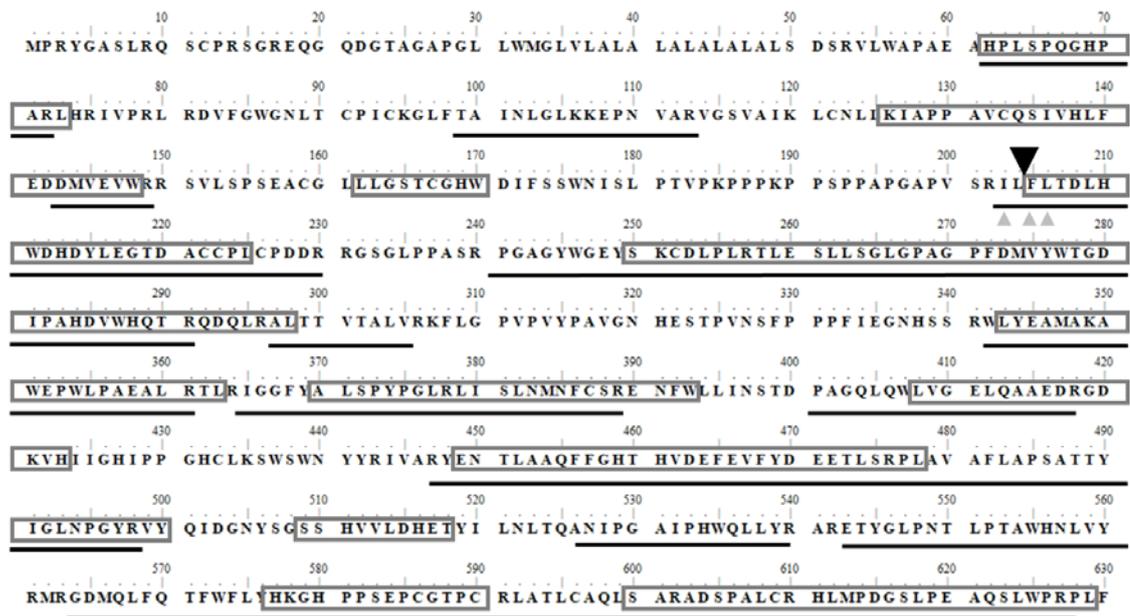


Abbildung 9.4: Kartierung der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase_{D220-L259}^{deletiert} und A-SMase_{P221-R230}^{randomisiert}: Darstellung der randomisierten und deletierten Aminosäuresequenz der A-SMase.

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der A-SMase, in welcher folgende Markierungen zu sehen sind: Deletion der Aminosäuren D220-L259, Randomisierung der Aminosäuresequenz P221-R230 und die identifizierte nekroptotische Spaltstelle der FLAG-TEV-A-SMase (▼).

a)



c

b)

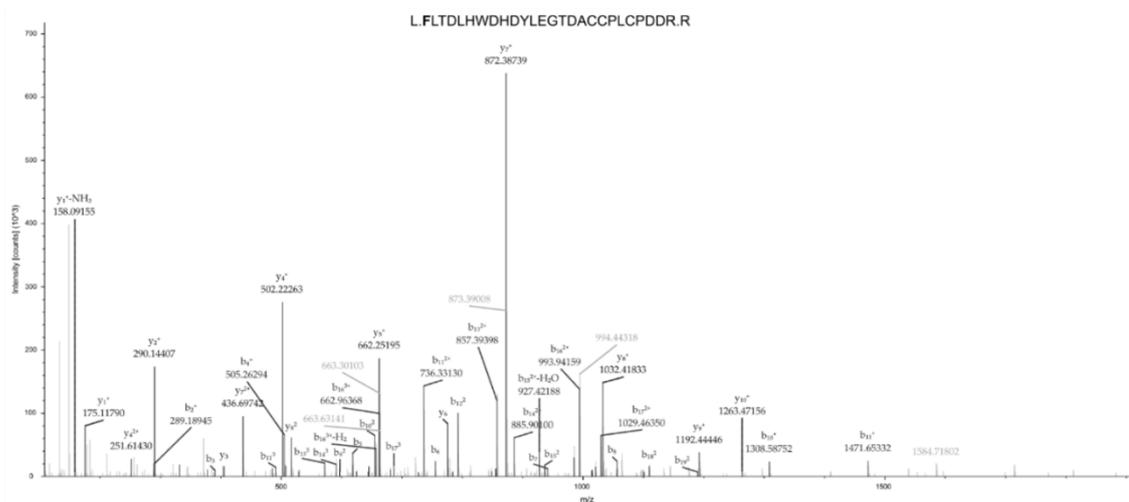
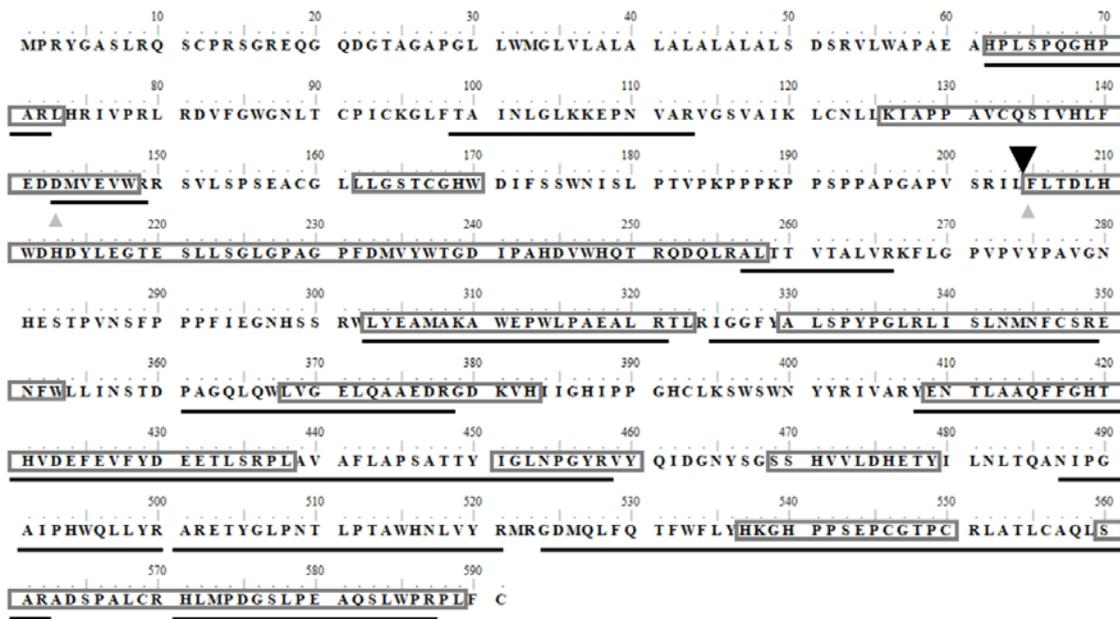


Abbildung 9.5: Kartierung der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase_P221-R230_{randomisiert}: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase_P221-R230_{randomisiert}.

A-SMase_P221-R230_{randomisiert}: **(b)** Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der A-SMase_P221-R230_{randomisiert}, in welcher folgende Markierungen zu sehen sind: Detektierte semi-chymotryptische Peptide (\square), semi-tryptische Peptide (—), dimethylierte Aminosäuren (\blacktriangle) und nekroptotische Spaltstelle der A-SMase_P221-R230_{randomisiert} (\blacktriangledown). **(a)** Dargestellt ist das MS/MS-Spektrum des Peptids L.FLTDLHWDHDYLEGTDACCPICPDDR.R. Die Dimethylierung von Phenylalanin (massenisotopische Masse von 813,098 Da ($z = 4$)) bestätigt die nekroptotische Spaltstelle A-SMase_P221-R230_{randomisiert} an Position L204.F205.

a)



b)

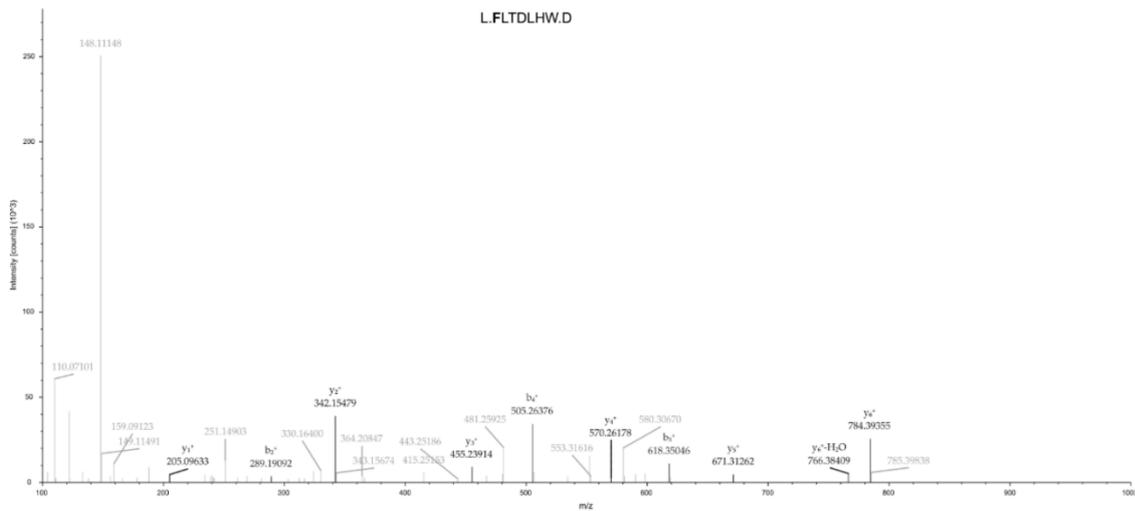


Abbildung 9.6: Kartierung der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase_D220-L259^{deletiert}: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der nekroptotischen Spaltstelle der A-SMase_D220-L259^{deletiert}.

A-SMase_D220-L259^{deletiert}: (a) Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der A-SMase_D220-L259^{deletiert}, in welcher folgende Markierungen zu sehen sind: Detektierte semi-chymotryptische Peptide (□), semi-tryptische Peptide (—), dimethylierte Aminosäuren (▲) und nekroptotische Spaltstelle der A-SMase_D220-L259^{deletiert} (▼). (b) Dargestellt ist das MS/MS-Spektrum des Peptids L.FLTDLHW.D. Die Dimethylierung von Phenylalanin (massenisotopische Masse von 480,254 Da (z = 4)) bestätigt die nekroptotische Spaltstelle der A-SMase_D220-L259^{deletiert} an Position L204.F205.

Publikationsliste

Heib, M; Rose-John, S; Adam, D (2020). Necroptosis, ADAM proteases and intestinal (dys)function. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 353:83–152.

Heib, M; Weiß, J; Saggau, C; Hoyer, J; Fuchslocher Chico, J; Voigt, S, et al. (2022). Ars moriendi: Proteases as sculptors of cellular suicide. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1869(4):119191.

Kabelitz, D; Zarobkiewicz, M; **Heib, M;** Serrano, R; Kunz, M; Chitadze, G, et al. (2022). Signal strength of STING activation determines cytokine plasticity and cell death in human monocytes. *Scientific Reports*, 12(1).

Schewe, DM; Vogiatzi, F; Heymann, J; Müller, K; Winterberg, D; Drakul, A; Rösner, T; Lenk, L; **Heib, M,** et al. (2022). Venetoclax enhances the efficacy of therapeutic antibodies in B-cell malignancies by augmenting tumor cell phagocytosis. *Blood Advances*, 6(6):4847-4858

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Michelle Heib, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Abhandlung mit dem Titel:

„Proteolyse in der Regulation des nicht-apoptotischen Zelltodweges Nekroptose“

nach den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Dabei habe ich keine Hilfe, außer der wissenschaftlichen Beratung durch meinen Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Dieter Adam und durch die namentlich erwähnten Kooperationspartner in Anspruch genommen. Diese Arbeit wurde bisher an keiner Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Darüber hinaus wurde mir in der Vergangenheit kein akademischer Grad entzogen.

Kiel, 25.01.2023

Michelle Heib

Danksagung

Allen voran möchte ich meinen besonderen Dank an meinen Betreuer Prof. Dr. Dieter Adam richten. Vielen Dank für die Ermöglichung dieser Arbeit und das vielfältige Thema. Ich weiß es sehr zu schätzen, dass Du mir immer mit Rat und Tat zur Seite standest und ich bin Dir sehr dankbar für die stetige Unterstützung, Motivation und wissenschaftlichen Gespräche in den letzten vier Jahren.

Des Weiteren möchte mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Dr. h. c. Thomas C. G. Bosch für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Mein weiterer Dank gilt dem Direktor des Institutes für Immunologie, Prof. Dr. Alexander Scheffold für die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie, besonders zu erwähnen sind dabei Iris Raßmann und Dr. Susanne Quabius, für die lieben Gespräche und die Unterstützung bedanken.

Ebenfalls danke ich herzlich Prof. Dr. Andreas Tholey, sowie seinen Mitarbeitern Dr. Tomas Koudelka, Dr. Mohammad Abukhalaf und Dr. Konrad Winkels für die durchgeführten massenspektrometrischen Analysen.

Besonders erwähnen möchte ich alle Mitglieder der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Adam. Vielen Dank an Katja Bruch für die liebe Einarbeitung und Jonas Weiß, Friederike Dierks, Rieke Winkelmann, Sunita Gill, Gökhan Alp, Alena Müller-Kaiser, Merle Brummert, Tabea Schröder, Annika Fellermann, Jingyu Li, Thiemo Korn, Alexander Knüppel, Jilline Küster, Linda Sengelmann und Laura Nowack für die gute Stimmung im Labor. Ich habe sehr gerne mit Euch zusammengearbeitet und danke Euch für die Freundschaften, die ich gefunden habe.

Zuletzt möchte ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben danken, meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meiner Mama Gabi, Börni, meiner Schwester Steffi und meinem Lebenspartner Artem. Danke, dass Ihr immer für mich da seid!