

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

Nekroptose im Mammakarzinom - Expression und Funktion der Nekroptose-
assoziierten Proteine MLKL und RIP3

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

Vorgelegt von

Kimberley Wyss (geborene Westhöfer)
aus Wiesbaden

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

22. Mai 2023

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Mammakarzinom.....	1
1.1.1 Histopathologie des Mammakarzinoms	1
1.1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren des Mammakarzinoms.....	2
1.1.3 Karzinogenese und Pathogenese des Mammakarzinoms.....	3
1.1.4 Metastasierung	4
1.1.5 Therapie und Therapieresistenz	5
1.2 Programmierter Zelltod.....	6
1.2.1 Charakteristika von Apoptose und Nekrose.....	6
1.2.2 Signalwege der Apoptose.....	7
1.2.3 Signalwege der Nekroptose.....	8
1.2.4 RIP3 und MLKL, die Kernkomponenten der Nekroptose	10
1.2.5 Physiologische Relevanz der Nekroptose	11
1.3 Ziel dieser Arbeit	12
2 Material	13
2.1 Zelllinien	13
2.2 Bakterienstämme	13
2.3 Kulturmedien	13
2.3.1 Kulturmedien für adhärent wachsende Zelllinien	13
2.3.2 Kulturmedien für <i>E. coli</i> Bakterien.....	14
2.3.3 Antibiotika zur Selektion von <i>E. coli</i> Bakterien.....	14
2.4 Nukleinsäuren	14

2.4.1	Oligonukleotide	14
2.4.2	Plasmide	16
2.4.3	Größenstandards für die DNA- und RNA-Gelelektrophorese	16
2.4.4	Proteine	16
2.4.5	Antikörper	17
2.4.6	Proteingrößenstandards für die SDS-PAGE	18
2.4.7	Weitere Proteine	18
2.5	Puffer und Lösungen	18
2.5.1	Puffer für Immunoblot-Analysen	19
2.5.2	Färbelösungen.....	20
2.5.3	Puffer für die DNA- und RNA-Gelelektrophorese.....	21
2.6	Chemikalien und Reagenzien	21
2.6.1	Chemikalien	21
2.6.2	Inhibitoren.....	21
2.6.3	Sonstige Reagenzien.....	21
2.6.4	Reagenziensets.....	22
2.6.5	Weiteres	22
2.7	Geräte und Software	22
2.7.1	Geräte.....	22
2.7.2	Software	23
3	Methoden	25
3.1	Zellbiologische Methoden.....	25
3.1.1	Kultivierung und Kryokonservierung von Mammakarzinom-Zelllinien	25
3.1.2	Bestimmung der optimalen G418-Konzentration zur Selektion der Mammakarzinom-Zellen.....	26
3.1.3	Modifikation der Genexpression	26
3.2	Mikrobiologische Methoden.....	27

3.2.1	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> Stämmen	27
3.2.2	Herstellung und Transformation KCM-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	27
3.3	Molekularbiologische Methoden	28
3.3.1	Restriktionsverdau	28
3.3.2	Ligation	29
3.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Phusion DNA-Polymerase .	29
3.3.4	Reverse Transkription der RNA	30
3.3.5	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	31
3.3.6	Klonierung des Plasmids pcDNA3-RIP3.....	33
3.3.7	DNA Sequenz-Analyse	33
3.4	Biochemische und physikalische Methoden.....	34
3.4.1	Plasmid-Isolation	34
3.4.2	RNA-Isolierung	35
3.4.3	Bestimmung der DNA und RNA Konzentration	35
3.4.4	DNA- und RNA-Gelelektrophorese	35
3.4.5	Proteinextraktion.....	36
3.4.6	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	36
3.4.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
3.4.8	Western-Transfer.....	38
3.4.9	Immunoblot-Analyse.....	39
3.4.10	Immunfluoreszenz-Färbung.....	39
3.4.11	Herstellung Formalin-fixierter Paraffin-Zellblöcke.....	40
3.4.12	Immunhistochemische Färbungen	41
3.4.13	Kristallviolett-Färbung.....	41
3.4.14	Statistik.....	42
4	Ergebnisse	43

4.1	Untersuchung der Nekroptose-Sensitivität von Mammakarzinom-Zellen	43
4.1.1	Untersuchung der Expression Nekroptose-assoziiierter Proteine in Mammakarzinom-Zelllinien	43
4.1.2	Analyse der Nekroptose-Sensitivität	45
4.1.3	Analyse der Expression Nekroptose-assoziiierter Proteine nach Nekroptose-Stimulus	47
4.2	Auswirkung einer modulierten Expression von RIP3 und MLKL auf die Nekroptose	48
4.2.1	Untersuchung der Effekte einer verminderten Expression von RIP3 und MLKL in den Zelllinien T47D und SK-BR-3	49
4.2.2	Untersuchung der Effekte einer RIP3-Überexpression in den Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231	52
4.3	Untersuchungen der Zellmorphologie nach Nekroptose-Induktion	58
4.3.1	Beurteilung der Morphologie der Zellen unter dem Phasenkontrast-Mikroskop	58
4.3.2	Immunfluoreszenz-Analyse zur Untersuchung der Zellmorphologie und der RIP3-Lokalisation	60
4.3.3	Immunfluoreszenz-Analyse zur Untersuchung der Lokalisation des Nekroptose-assoziierten Proteins pMLKL	63
5	Diskussion	71
5.1	Expressionsanalyse der Nekroptose-assoziierten Proteine	71
5.2	Analyse der Nekroptose-Sensitivität	72
5.3	Auswirkung eines Nekroptose-Stimulus auf die Morphologie der Tumorzellen	73
5.4	Auswirkungen eines Nekroptose-Stimulus auf die Lokalisation von RIP3	74
5.5	Auswirkungen eines Nekroptose-Stimulus auf die Lokalisation von pMLKL	76
5.6	Klinische Relevanz der Nekroptose	77

Inhaltsverzeichnis

6	Zusammenfassung.....	79
7	Literaturverzeichnis.....	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Brustdrüse.....	1
Abbildung 2: Schematischer Ablauf der Nekroptose.....	10
Abbildung 3: Analyse der endogenen Expression Nekroptose-assoziiertes Proteine in Mammakarzinom-Zelllinien.....	43
Abbildung 4: Untersuchung der mRNA-Expressionslevel von RIP3	44
Abbildung 5: Untersuchung der Nekroptose-Sensitivität in den Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7, MDA MB 231, T47D und SK-BR-3	46
Abbildung 6: Qualitative Analyse der Expression Nekroptose-assoziiertes Proteine nach Induktion der Nekroptose	48
Abbildung 7: Analyse der siRNA-vermittelten Reduktion von RIP3 und MLKL in den Mammakarzinom-Zelllinien T47D und SK-BR-3.....	50
Abbildung 8: Analyse der Nekroptose-Sensitivität nach der siRNA-vermittelten Verminderung der Expression von RIP3 und MLKL.....	51
Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis der RIP3-Expression nach stabiler Transfektion.....	53
Abbildung 10: Analyse der RIP3-Expression nach stabiler Transfektion.	54
Abbildung 11: Analyse der Nekroptose-Sensitivität der RIP3-Überexpressionsklone MCF-7 #1/#2 und MDA MB 231 #1.	55
Abbildung 12: Qualitative Analyse der Nekroptose-assoziiertes Proteine nach Induktion der Nekroptose in MCF-7 RIP3 #1 und #2 und MDA MB 231 RIP3 #1 Einzelzellklonen	57
Abbildung 13: Morphologische Analyse der Zelllinien HT 29, MCF-pcDNA3, MCF-7 RIP3 #1, MDA MB 231 pcDNA3 und MDA MB 231 RIP3 #1	59
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von RIP3, Phalloidin, β-Tubulin in MCF-7 pcDNA3 und MCF-7 RIP3#1.....	61
Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung von RIP3, Phalloidin, β-Tubulin in MDA MB 231 pcDNA3 und MDA MB 231 RIP3 #1	62

Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung pMLKL in den Zelllinien HT 29, MCF-7 und SK-BR-3	65
Abbildung 17: Analyse der Lokalisation von pMLKL und E-Cadherin in der Zelllinie MCF-7.....	66
Abbildung 18: Analyse der Lokalisation von pMLKL und Occludin in den Zelllinien MCF-7 und SK-BR-3	67
Abbildung 19: Analyse der Lokalisation von pMLKL und Occludin in den Zelllinien HT 29, MCF-7, MDA MB 231, T47D und SK-BR-3	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zur Selektion von <i>E. coli</i> verwendete Antibiotika	14
Tabelle 2: Oligonukleotide als Primer für die PCR	15
Tabelle 3: Oligonukleotide für die quantitative PCR	15
Tabelle 4: Oligonukleotide als siRNA für die Transfektion.....	15
Tabelle 5: Plasmide, die im Rahmen dieser Doktorarbeit konstruiert wurde	16
Tabelle 6: Zum enzymatischen Verdau verwendete Restriktionsendonukleasen	16
Tabelle 7: Verwendete Polymerase.....	16
Tabelle 8: Primärantikörper, die für Immunoblot-Analysen, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz verwendet wurden	17
Tabelle 9: Verwendete Inhibitoren.....	21
Tabelle 10: Verwendete Reagenzien	21
Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die PCR unter Verwendung der Phusion DNA-Polymerase.....	29
Tabelle 12: Zyklus-Konditionen für die PCR unter Verwendung der Phusion DNA-Polymerase.....	30
Tabelle 13: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Herstellung einer cDNA	30
Tabelle 14: Temperaturprogramm für die cDNA-Synthese	31
Tabelle 15: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die qRT-PCR	32
Tabelle 16: Reaktionsbedingungen für die qRT-PCR mit SYBR® Green.....	32
Tabelle 17: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele der SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
Tabelle 18: p-Werte.....	42

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁶)
ATP	Adenosintriphosphat
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2
bp	Basenpaar
BRCA1/2	Breast cancer 1/2
BSA	Rinderserumalbumin
Caspasen	Cysteine aspartic acid-specific proteases
cDNA	Complementary DNA
C _T	Schwellenwertzyklus (Cycle threshold)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ECL	Enhanced chemiluminescence
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
<i>et al.</i>	Und andere
FBS	Fetal bovine serum
FISH	Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
gDNA	Genomische DNA
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
kDa	Kilo Dalton
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
MLKL	Mixed lineage kinase domain-like Pseudokinase
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-RNA

Abkürzungsverzeichnis

n	Nano (10 ⁻⁹)
Nec-1	Necrostatin-1
NOS	Not otherwise specified
NSA	Necrosulfonamid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RIP1	Receptor-interacting serine/ threonine-protein kinase1
RIP3	Receptor-interacting serine/ threonine-protein kinase 3
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotation pro Minute (engl. revolutions per minute)
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	small interfering RNA
SNP	Single nucleotide polymorphisms
SSB	Einzelstrangbruch
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TEMED	N, N,N',N' Tetramethylethyldiamin
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VE	deionisiert
WHO	World Health Organization
z-VAD	z-VAD(OMe)-FMK

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Histopathologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist eine maligne Erkrankung des Brustdrüsengewebes. Dieses setzt sich aus Drüsenanteilen und fibrösem Stützgewebe, dem Stroma, zusammen. Das Brustdrüsenparenchym besteht aus ca. 15-20 Läppchen. Hier erfolgt die Sekretion, wobei sich das gebildete Sekret in den Milchgängen sammelt und zentral zur Mamille transportiert wird (Abbildung 1).

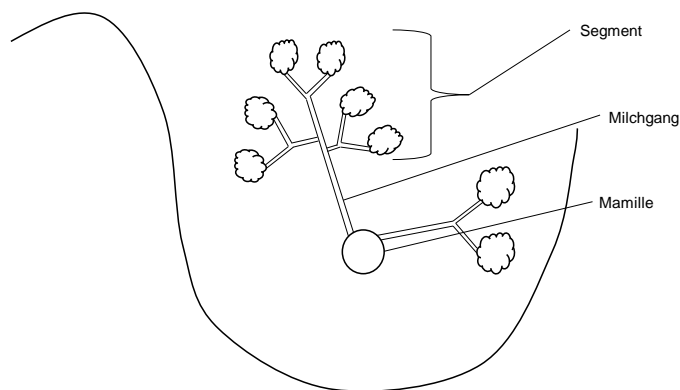


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Brustdrüse.

Quelle: in Anlehnung an Bubendorf *et al.* (1)

Als zytologische Untereinheiten der Brustdrüse findet man duktales und lobuläres Epithel, Myoepithelien, Schaumzellen und Fettgewebszellen (1).

Um zu beschreiben, wo der Tumor in der Brust liegt, wird diese in vier Quadranten eingeteilt. Am häufigsten tritt das Mammakarzinom am oberen äußeren Quadranten auf. Es wird vermutet, dass diese Häufung auf eine erhöhte Anzahl Brustdrüsenzellen im äußeren oberen Quadranten zurückzuführen ist (2). In einer weiteren Hypothese steht die Lokalisation mit dem Gebrauch von aluminiumhaltigen Kosmetika in Zusammenhang (3).

Mammakarzinome lassen sich anhand des Ursprungsgewebes in zwei große Subtypen unterscheiden. Dies sind zum einen die invasiven Karzinome ohne speziellen Typ (NST= no special type), ehemals beschrieben als invasiv duktales Karzinom. Mit einem Anteil von 70-80 % stellen invasive Mammakarzinome vom

nicht speziellen Typ (NST) die größte Gruppe dar (4, 5). In die zweite große Gruppe fällt das lobuläre Mammakarzinom, welches den Drüsenläppchen aus der Brust entstammt und 15 % aller Mammakarzinome ausmacht (6). Neben den zwei großen Tumorgruppen gibt es noch seltene Formen wie z. B. das medulläre, muzinöse, invasiv tubuläre oder papilläre Mammakarzinom (6).

Immunhistochemisch können Mammakarzinome in vier molekulare Subtypen gegliedert werden: Luminal A, Luminal B, Her2-positiv und triple-negativ. Die Einteilung basiert auf der Expression der Marker Östrogen, Progesteron, Her2 und des Proliferationsmarkers Ki67. Die klinische Relevanz für diese Subtypen zeigt sich in Therapieentscheidung und -ansprechen, sowie im klinischen Verlauf der Erkrankung (7, 8).

1.1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom gehört mit ca. 2 Millionen Neuerkrankungen jährlich und einem Anteil von 11,6 % unter allen Tumorneuerkrankungen zu den weltweit häufigsten Tumorentitäten. Während bei Frauen das Mammakarzinom mit einem Anteil von 24,0 % die häufigste Tumorentität darstellt, ist das Mammakarzinom bei Männern eher ein seltener Befund (6, 9).

Im Jahr 2016 sind in Deutschland 68.950 Frauen und 710 Männer an Brustkrebs erkrankt. Es zeigte sich eine 10-Jahres Prävalenz von 584.900 in Deutschland, sowie eine mit Brustkrebs-assoziierte Mortalität von 18.570 (10). In der westlichen Bevölkerung erkrankt aus statistischer Sicht aktuell jede 8.-10. Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom (11). Trotz des Fortschreitens der Tumortherapie-Forschung betrug die Mammakarzinom-assoziierte Mortalität weltweit im Jahr 2018 627.000 (11). Bei männlichen Mammakarzinom-Patienten lag die 5-Jahres-Überlebensrate 2008 in Deutschland bei 76 % (12).

Ein hohes Risiko an Brustkrebs zu erkranken haben Trägerinnen einer BRCA1- oder BRCA2-Mutation. Die Gefahr an einem Mammakarzinom zu erkranken, steigt bei Trägerinnen dieser Mutation um ungefähr 80 % an (13). Neben den bekannten BRCA-Mutationen existieren weitere Gene deren Mutation mit der Entstehung eines Mammakarzinoms assoziiert sind. Zum Beispiel führt die Keimbahnmutation des TP53-Gens zu dem Li-Fraumeni-Syndrom. Dieses Syndrom tritt relativ selten auf, geht aber für die Betroffenen mit einem erhöhten Risiko an einem Mammakarzinom oder einer anderen Tumorentität zu erkranken

einher (14). Des Weiteren erhöht eine Mutation des CHEK2-Gens, eine Steigerung des Lebenszeitriskos, an Brustkrebs zu erkranken. CHEK2 ist eine an der DNA-Reparatur involvierte Checkpoint-Kinase, welche die Aktivität von p53 und BRCA1 über Phosphorylierung moduliert (15). Neben den erwähnten Mutationen zeigt das Mammakarzinom wie viele andere Tumorentitäten eine familiäre Häufung. Bei positiver Familienanamnese steigt die Wahrscheinlichkeit bereits um 1,57 (16). Studien zeigen, dass Frauen, die bereits an einem Mammakarzinom erkrankt sind, ein zwei- bis sechsfach erhöhtes Lebenszeitrisiko haben kontralateral ebenfalls an einem Mammakarzinom zu erkranken (17). Ebenso wird eine lange Expositionszeit mit endogenem Östrogen, Kinderlosigkeit, Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum sowie ionisierende Strahlen in unterschiedlichen Studien mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer malignen Erkrankung der Brustdrüse assoziiert (18-25).

Die häufigsten Risikofaktoren für einen Mann an einem Mammakarzinom zu erkranken sind eine genetische Prädisposition, Variationen im Östrogen-Testosteron-Haushalt und ionisierende Strahlungen (9).

Um Hochrisiko-Patientinnen besser und frühzeitiger zu entdecken sind verschiedene Modelle zur Risikoberechnung entwickelt worden. Zum Beispiel das Gail2-Modell, das Claus-Modell oder das Cuzick-Tyrer-Modell. Diese Modelle beziehen das Alter der Patientin, die medizinische Eigenanamnese, die Familienanamnese, persönliche Risikofaktoren, Alter der Primipara sowie genetische Mutationen wie die BRCA-Mutationen und viele weitere mit ein (26, 27).

1.1.3 Karzinogenese und Pathogenese des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist in seiner Erscheinung und Malignität sehr heterogen und stellt kein einheitliches Krankheitsbild dar. Die genauen Mechanismen der Karzinogenese dieser malignen Erkrankung sind bislang noch unklar. Allerdings wurde durch mehrere wissenschaftliche Studien und Modelle eine multifaktorielle Genese untermauert (28):

Zu Beginn der Karzinogenese kommt es häufig zum Verlust eines Tumorsuppressorgens. Dies führt zu einer fehlerhaften DNA-Reparatur, welche eine Anhäufung von genetischen Schäden mit sich bringt. Im weiteren Verlauf tritt zusätzlich eine Aktivierung von Proto-Onkogenen auf. Besteht dann ein

Selektionsvorteil der entarteten Zelle, folgt die weitere Vermehrung (29). Selektionsvorteile bieten hierbei der Verlust der Differenzierung, unkontrolliertes und verdrängendes Wachstum, eine Apoptose-Resistenz, der Verlust von Zell-Zell-Kontakten und die Förderung der Angiogenese (30, 31). Letztere ermöglicht dem Tumor bei Zunahme der Tumormasse seine Zellen mit Nährstoffen zu versorgen (29).

1.1.4 Metastasierung

Trotz fortgeschrittener Therapiemöglichkeiten für Mammakarzinom-Patienten, müssen metastasierte Karzinome weiterhin als unheilbar angesehen werden. Rezidive des Mammakarzinoms, auch solche die erst nach langer Latenzzeit auftreten, stellen die häufigste Todesursache dar. Bei ca. 40 % aller Patienten kommt es im Laufe der Zeit zu einem Rezidiv, an welchem die meisten anschließend versterben (32). Das Risiko eines Rezidivs ist in den ersten Jahren nach Diagnose des Primärtumors am größten. Wobei es sich bei rund der Hälfte der Rezidive vor allem um Fernmetastasen handelt. In Studien konnte eine erhöhte Mortalität in Zusammenhang mit Fernmetastasen nachgewiesen werden (33).

Es können zwei Metastasierungsmodelle voneinander unterschieden werden. Das lineare Progressionsmodell geht von einer schrittweisen Metastasierung der Zellen aus. Diese Zellen durchlaufen unterschiedliche epigenetische Veränderungen, welche ihnen am Ende die Fähigkeit geben Gewebe autonom zu infiltrieren. Letzteres kann zu einer Tumorphiliferation führen. Das zweite Modell der parallelen Progression besagt, dass es bereits in frühem Stadium zu einem zeitgleichen Wachstum von Primärtumor und Metastase kommt. Im Rahmen der frühen Dissemination kommt es zu dem Ausbilden unterschiedlicher Eigenschaften und Resistenzen (34).

Das Mammakarzinom metastasiert sowohl hämatogen, als auch lymphogen. Betroffen sind vor allem die Lymphknotenstationen entlang der Vena axillaris. Die Fähigkeit der frühen hämatogenen Streuung stellt weiterhin ein Problem der Mammakarzinom-Therapie dar. Es führt dazu, dass bei Diagnosestellung bei vielen Mammakarzinom-Patientinnen bereits eine systemische Erkrankung vorliegt (35).

1.1.5 Therapie und Therapieresistenz

Die Behandlung des Mammakarzinoms sollte als eine interdisziplinäre und stadiengerechte Therapie erfolgen, in der verschiedene Verfahren, wie lokale sowie systemische Verfahren zum Einsatz kommen. Es sollte, wenn möglich immer eine komplette operative Exzision des Tumors erfolgen. Mittel der Wahl ist heutzutage eine brusterhaltende Therapie (BET) (36). Die Entfernung der axillären Lymphknoten erfolgt nach Analyse des Sentinelnode im Schnellschnittverfahren. Bei nicht-befallenem Sentinelnode kann von einer Lymphknotendissektion abgesehen werden. Wenn der Sentinel-Lymphknoten befallen ist wird das betroffene Lymphknotenpaket operativ entfernt, da in 85 % der Fälle weitere Lymphknoten des Abflussgebietes betroffen sind (36).

Tumoren die bereits das *in situ*-Stadium überschritten haben, sollten im Anschluss an eine lokoregionäre Therapie noch mit einer zusätzlichen systemischen Therapie behandelt werden. Systemische Therapien erfolgen mit dem Ziel die restlichen Tumorzellen zu eliminieren und dadurch die Wahrscheinlichkeit eines Rezidiv zu verringern und das Gesamtüberleben zu erhöhen (36).

Zu den systemischen Therapien gehören die Radiatio, die Chemotherapie, endokrine Therapie und Antikörpertherapie. Systemische Therapien können neoadjuvant, d.h. vor einer operativen Exzision angewendet werden, mit dem Ziel der Reduktion der Tumormasse zur besseren Operabilität oder bei fortgeschrittenem Tumor zum Schaffen einer möglichen Operabilität. Obligat findet eine adjuvante postoperative Radiatio nach einer brusterhaltenden Therapie statt. Bei Patientinnen nach Mastektomie, bei großer Tumormasse oder Lymphknotenbefall, ist eine Radiatio indiziert (37).

In der zytostatischen Chemotherapie werden verschiedene Substanzen miteinander kombiniert. Zu den gebräuchlichsten Substanzen gehören die Anthrazykline (z. B. Doxorubicin, Epirubicin), Taxane (z. B. Paclitaxel, Docetaxel), Cyclophosphamid und 5-Fluoruracil (36). Es existieren monoklonale Antikörper, wie Trastuzumab, die bei einem Tumor mit Her2/neu Positivität gute Erfolge erzielen (38). Endokrine Therapien können je nach vorliegendem Rezeptorstatus des Tumors durchgeführt werden (39). Hierbei ist eine wichtige Säule der Östrogenentzug beispielsweise durch den selektiven Östrogenmodulator Tamoxifen. Die Wirkung von Tamoxifen erfolgt über eine

kompetitive Bindung an den Östrogenrezeptor, wodurch je nach Gewebe eine agonistische oder antagonistische Wirkung entsteht. Die antagonistische Wirkung entfaltet Tamoxifen durch Reduktion des Zellwachstums im Brustgewebe und Östrogen-positiven Brusttumoren. Hierdurch werden die Rezidivrate und die Mortalitätsrate gesenkt. Im Gegensatz hierzu wirkt Tamoxifen agonistisch auf die Proliferation des Endometrium, hierdurch steigt unter Therapie das Risiko einer Endometriumhyperplasie und die Entstehung von Endometriumkarzinomen (40).

1.2 Programmierter Zelltod

1.2.1 Charakteristika von Apoptose und Nekrose

In der Zellbiologie unterscheidet man zwei klassische Zelltodsignalwege, die Apoptose und die Nekrose. Diese können anhand morphologischer Unterschiede und biochemischer Prozesse, welche in der Zelle ablaufen, unterschieden werden.

Unter Apoptose versteht man einen biochemischen Prozess bei dem über verschiedene Teilschritte, die vollständige Fragmentierung der Zelle im Zelltod endet. Durch Induktion mittels eines Apoptose-Stimulus erfolgen die Fragmentierung der DNA sowie die Kondensation des Chromatins. Es kommt zu einer Schrumpfung des Zytoplasmas und der Bildung von Membranausstülpungen, den sogenannten apoptotischen Vesikeln. Diese beinhalten Zellfragmente und Zytoplasma und werden von Resten der ehemaligen Plasmamembran umgeben. Auf der Innenseite der Plasmamembran liegt das Phospholipid Phosphatidylserin. Bei der Apoptose kommt es zu einer Translokation auf die Außenseite der Plasmamembran, wodurch die apoptotischen Partikel von Phagozyten erkannt und abgebaut werden. Der Ablauf der Apoptose ist streng reguliert, es kommt zu einem organisierten Abbau der Zelle ohne Entzündungsreaktion (41, 42).

Im Gegensatz hierzu wird die Nekrose in den meisten Fällen durch eine unspezifische Verletzung des Gewebes, z. B. durch mechanische Traumata, Einwirkung von Toxinen oder den Einfluss von Infektionen durch Mikroorganismen, verursacht. Es kommt morphologisch zu einem unkontrollierten Anschwellen der Zelle. Ein histologisches Kennzeichen der

regulierten Nekrose ist der Verlust der Integrität der Zellmembran, das Aufschwemmen der Zellorganellen und die Zunahme des Zellvolumens. Die Integrität der Plasmamembran wird ab einem gewissen Volumen verletzt, sodass der zelluläre Inhalt unkontrolliert in das umliegende Gewebe freigesetzt wird. Dies ruft im umliegenden Gewebe eine Entzündungsreaktion hervor. Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass die Nekrose eine Art zufälligen Zelltod darstellt. Die Entdeckung von chemischen Nekrose-Inhibitoren hat die ehemaligen Annahmen verändert und die Existenz von verschiedenen Signalwegen aufgedeckt (43, 44).

Unter dem Begriff der programmierten Nekrose werden unter anderem die Nekroptose, Ferroptose, Parthanatos und die Pyroptose zusammengefasst (44). In weiterführenden Studien des apoptotischen Zelltodes, wurde eine erhöhte Zelltod-Rate in Caspase-8-, als auch in FADD-depletierten Zellen beobachtet. Dies führte zu der Überlegung, dass neben der Apoptose noch weitere Formen des programmierten Zelltodes existieren (45, 46). Es zeigte sich, dass eine Nekrose mit Hilfe spezifischer Faktoren ebenso wie die Apoptose streng reguliert ablaufen kann (47). Diese Form des programmierten Zelltodes nennt man Nekroptose. Die Nekroptose ist im Vergleich zur Nekrose nicht auf passive Effekte an der Zelle zurückzuführen, sondern wird durch spezifische molekularbiologische Vorgänge genau reguliert (48).

Die Nekroptose stellt aktuell den am besten charakterisierten nekrotischen Zelltod dar und ist aufgrund einer möglichen Nutzung in der Tumor-Therapie ein verbreitetes Forschungsthema (49).

1.2.2 Signalwege der Apoptose

Erstmals wurde die Apoptose 1972 als ein Mechanismus des programmierten Zelltods beschrieben (50). In einem Organismus, bzw. Zellverband herrscht eine Balance zwischen Zellwachstum und Zelluntergang. Die Apoptose ist ein wichtiges Regularium in der Entwicklung, der Zellhomöostase und der Immunität von Organismen. Eine Störung der Apoptose kann zu der Entstehung verschiedener Erkrankungen, wie z. B. Autoimmunerkrankungen, Chorea Huntington, Morbus Parkinson und Krebserkrankungen, führen (51).

Die Apoptose kann in zwei Signalwege unterteilt werden, den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg. Für beide Signalwege ist die Aktivierung

verschiedener Proteasen der Cysteinyl-aspartate-specific (Caspase-)-Familie charakteristisch. Caspasen werden daher auch als die zentralen „Exekutoren der Apoptose“ bezeichnet. Sie liegen als inaktive enzymatische Zymogene vor, welche durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Die Initiierung der Apoptose führt auf beiden Signalwegen zur Aktivierung der Effektor-Caspase-3 (52). Die Initiierung führt auf beiden Signalwegen zur Aktivierung der Effektor-Caspase-3 (52). Der extrinsische Signalweg wird durch extrazelluläre Stresssignale aktiviert, die sogenannte DAMPs (damage associated molecular patterns) oder über die Aktivierung von transmembranären Rezeptoren der Gruppe der Tumornekrose-Faktor-(TNF-)Superfamilie (37, 53). Die Bindung der Liganden an den Zelloberflächenrezeptoren führt zu ihrer Oligomerisation innerhalb der Zellmembran und über eine Kaskaden-Aktivierung unterschiedlicher Caspasen zur Einleitung der Apoptose (54). Der intrinsische Signalweg wird durch intrazellulären Stress, wie z. B. DNA-Schäden, oxidativen Stress, Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration durch eine erhöhte Permeabilität der mitochondrialen Membran oder das Freisetzen mitochondrialer Faktoren wie Cytochrom C, induziert (55).

Zentraler Bestandteil des intrinsischen Signalweges sind die Mitochondrien, welche im Verlauf des programmierten Zelltodes klassische Veränderungen aufweisen. Als Folge der Auslösung des programmierten Zelltodes werden pro-apoptotische Faktoren aus dem Intramembranraum, wie beispielsweise Cytochrom C, ins Zytoplasma freigesetzt. Dies führt zur Formation des Apoptosoms, eines Komplexes, welcher die autoproteolytische Aktivierung der Effektor-Caspasen induziert (56). Eine weitere zentrale Bedeutung im intrinsischen Signalweg haben die pro- und anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie (57).

1.2.3 Signalwege der Nekroptose

Die Nekroptose kann als Caspase-unabhängiger Zelltod bezeichnet werden. Im Unterschied zur Apoptose dringen bei der Nekroptose DAMPs (damage-associated molecular patterns) in das extrazelluläre Gewebe ein, woraufhin eine inflammatorische Reaktion hervorgerufen wird. Die Inflammation im Gewebe wird durch die Perforation und Ruptur der Zellmembran ausgelöst und hat morphologisch große Ähnlichkeit mit der Nekrose (49, 58).

Die Induktion der Nekroptose gleicht der der Apoptose. Die Aktivierung von Todesrezeptoren durch die Liganden FASL, TNF oder TRAIL führt zu einer Aktivierung des Komplex I. Am besten charakterisiert ist auf molekularer Ebene die TNF-induzierte Nekroptose. Durch die Aktivierung des TNF-Rezeptors werden RIP1 und TRADD über ihre Todesdomänen (Death Domäne = DD) gebunden. Dies stellt den Komplex I der Signalkaskade dar. Der membrangebundene Komplex I kann nun unabhängig weitere Signalwege aktivieren. Unter normalen Zellbedingungen wird das Protein RIP1 durch cIAP1 und cIAP2 polyubiquitiniert und somit der NF- κ B-Signalweg aktiviert. Die Deubiquitinierung des RIP1 wird durch die Deubiquitinase CYLD katalysiert. Diese hat eine Verminderung des NF- κ B-Überlebenssignals und die Einleitung des Zelltodes zur Folge (53, 59). Der darauffolgende Komplex II ist abhängig vom Vorhandensein der Caspase 8 in der Zelle und leitet entweder die Apoptose oder die Nekroptose ein. Die Bindung und Aktivierung des RIP3 durch das zuvor ubiquitinierte RIP1 im Komplex II führt zur Ausbildung des Nekrosoms (54). Die Interaktion der beiden Proteine ermöglicht die Phosphorylierung des RIP3, welche essentiell für die Rekrutierung und Aktivierung des Effektorproteins MLKL (mixed lineage kinase domain-like) ist (60, 61). Die Aktivierung des MLKL erfolgt über eine Phosphorylierung und anschließende Oligomerisierung (62). Die aktivierten MLKL-Oligomere verbinden sich im Verlauf mit der Zellmembran und führen zu einer Permeabilisierung (siehe Abbildung 2) (54). Eine mögliche Erklärung ist, dass MLKL oligomerisiert und durch Bindung von Phosphatidylinositol an die Zellmembran transportiert wird und diese dort direkt perforiert (61, 63). Andere Arbeiten legen die Vermutung nah, dass oligomerisiertes MLKL als eine Art Ionenkanal fungiert und die Zelle durch einen unkontrollierten Natrium- und Calcium-Einstrom untergeht (64).

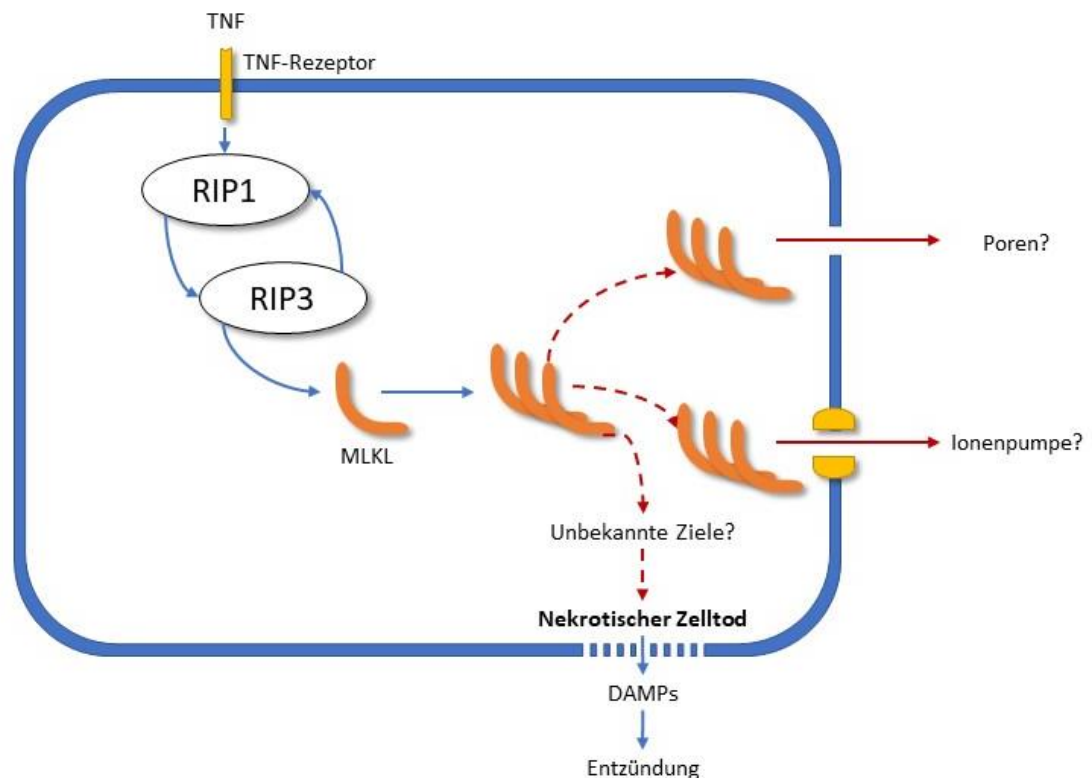


Abbildung 2: Schematischer Ablauf der Nekroptose

Modifizierte Abbildung nach Wallach *et al.* (65). Die Initiierung der Nekroptose erfolgt extrazellulär über den Tumornekrosefaktor. Die Aktivierung von RIP1 und RIP3 resultiert in der Phosphorylierung und Oligomerisierung von MLKL. Oligomerisiertes MLKL löst am Ende der Kaskade den nekroptotischen Zelltod aus.

1.2.4 RIP3 und MLKL, die Kernkomponenten der Nekroptose

Als Schlüsselkomponenten der Nekroptose zählen die Proteine RIP1, RIP3 und MLKL, welche im Verlauf in einer Kaskade aktiviert werden.

Der molekulare Aufbau der Pseudokinase MLKL besteht aus einem C-terminalen Pseudokinase-Bereich, zwei helikalen Brace-Domänen und einer N-terminalen Four-Helix-Bundle-(4HB)-Domäne. Die Phosphorylierung durch das Protein RIP3 erfolgt an T357 und S358 im Bereich der Pseudokinase-Domäne (62, 66). Durch diese Phosphorylierung kommt es zu einer Konformationsänderung und der Aufhebung einer inhibitorischen Protein-Wechselwirkung innerhalb der Four-Helix-Bundle-(4HB)-Domäne. Die Oligomerisierung des MLKL wird durch Disulfidbrücken bewerkstelligt (67).

Im Vergleich zur Pseudokinase MLKL, stellt das Protein RIP3 eine echte Kinase dar. Der C-terminale Teil von RIP3 besteht aus 8 α -Helices und einem β -Faltblatt,

wohingegen der N-Terminus aus einem antiparallelen, fünfsträngigen β -Faltblatt, sowie einer Aktivierungshelix besteht (68).

RIP1 und RIP3 gehören zur Gruppe der Receptor-interacting protein Kinase Gruppe. Diese umfasst 7 Proteine, welche dieselbe homologe Kinase Domäne gemeinsam haben (69).

1.2.5 Physiologische Relevanz der Nekroptose

Im Hinblick auf seine physiologische Rolle, wird angenommen, dass die Nekroptose als alternativer Mechanismus zur Beseitigung von intrazellulären Krankheitserregern fungiert, wenn der Apoptose-Signalweg beeinträchtigt ist. Im Normalfall ist die Apoptose ein Werkzeug, mit welchem kranke Zellen aus dem Organismus beseitigt werden können. Die apoptotischen Zellen werden durch Phagozytose vom Organismus, mitsamt der Krankheitserreger, eliminiert. Diese haben unterschiedliche Mechanismen entwickelt der immunologischen Abwehr zu entgehen und die Apoptose der befallenen Wirtszelle zu inhibieren (70). Ist die Apoptose in der Zelle durch unterschiedliche Auslöser blockiert, kann die Zelle wie oben bereits beschrieben den nekroptotischen Zelltod einleiten. Bei Aktivierung des nekroptotischen Zelltodes kommt es zur Freisetzung von intrazellulären DAMPs und damit einer Aktivierung des Immunsystems mit Inflammation und der Beseitigung der Pathogene (71, 72).

In der Pathophysiologie von unterschiedlichsten Krankheiten, wie z. B. Schlaganfällen und Herzinfarkten, Pankreatitiden, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und der Alzheimer-Krankheit spielt die Nekroptose eine entscheidende Rolle (73-75). Nogusa *et al.* konnte in RIP3-defizienten, Nekroptose-resistenten Mäusen eine erhöhte Sensibilität gegenüber Influenza A Viren beobachten (76). Komplementär hierzu wurden Studien veröffentlicht, welche in genetisch RIP3- bzw. MLKL-depletierten Mäusen keinen pathologischen Einfluss auf die Entwicklung der Tiere nachgewiesen werden konnte (74, 77). Dies wirft die Frage der realen Bedeutung der Nekroptose in physiologischen Prozessen auf.

Der Aufbau der Nekroptose-Signalkaskade mit verschiedenen Teilschritten und mit unterschiedlichen aufeinanderfolgenden Aktivierungsschritten ermöglicht eine Vielzahl an Interventionen in dem Ablauf des programmierten Zelltodes. Zum Beispiel könnte die Kinaseaktivität von RIP1 spezifisch über den Inhibitor

Necrostatin blockiert und im weiteren Verlauf die Bildung des Nekrosoms erschwert werden (78). Allerdings spielt die RIP1-Kinase nicht nur in der Nekroptose eine wichtige Rolle, sondern trägt auch entscheidend zum Ablauf der Apoptose bei. Um lediglich gezielt in den Nekroptose-Signalweg einzugreifen, sind daher RIP3- und MLKL-Inhibitoren von entscheidender Bedeutung. Ein vielversprechender RIP3-Kinase Inhibitor ist HS-137. Es verhindert die enzymatische Aktivierung des RIP3 durch Blockierung der ATP-Bindungsstelle und damit den nekroptotischen Zelltod (79). Großes therapeutisches Potential hat ebenfalls der MLKL Inhibitor Necrosulfonamid. Necrosulfonamid inhibiert die Nekroptose in dem es die Translokation des phosphorylierten MLKL, nicht aber die Aktivierung des MLKL selbst verhindert (61).

1.3 Ziel dieser Arbeit

Das Mammakarzinom ist weltweit der häufigste Tumor der Frau. Trotz vieler Fortschritte in der therapeutischen Behandlung stellen Therapieresistenzen immer noch eine große Herausforderung dar (11). In diesem Zusammenhang könnte die gezielte Auslösung der Nekroptose, vor allem bei bestehender Apoptose-Resistenz, eine mögliche therapeutische Behandlung des Mammakarzinoms darstellen. Allerdings ist die Bedeutung der Nekroptose für die Behandlung des Mammakarzinoms bislang weitgehend unbekannt. Daher sollte zur Charakterisierung der Nekroptose im Mammakarzinom in dieser Arbeit die Nekroptose-Sensitivität verschiedener Mammakarzinom-Zelllinien untersucht werden. Hierzu sollte die Expression Nekroptose-assoziiierter Proteine sowie die Effekte eines Nekroptose-Stimulus auf die Viabilität der Zellen analysiert werden. Weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von RIP3 und MLKL hinsichtlich der Nekroptose-Sensitivität zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollte zum einen in unterschiedlichen Zelllinien die Expression von RIP3 und MLKL mittels siRNA vermindert und zum anderen die Expression von RIP3 mittels eines Überexpressionsplasmids erhöht werden. Anschließend sollte die Aktivierbarkeit des Nekroptose-Signalweges sowie die Nekroptose-Sensitivität untersucht werden. Des Weiteren sollte die Lokalisation von RIP3 und phosphorylierten MLKL mittels Immunfluoreszenz ermittelt werden.

2 Material

2.1 Zelllinien

Folgende adhären wachsende humanen Zellkulturlinien wurden für die Versuche dieser Arbeit verwendet:

- MCF-7 Mammakarzinom-Zelllinie
- MDA MB 231 Mammakarzinom-Zelllinie
- T47D Mammakarzinom-Zelllinie
- SK-BR-3 Mammakarzinom-Zelllinie

Des Weiteren wurde die adhären wachsende Colonkarzinom-Zelllinie HT 29 verwendet. HT 29 Zellen exprimieren RIP3 (80) und dienen in dieser Arbeit als Positivkontrolle für die Nekroptose-Induktion.

2.2 Bakterienstämme

Es wurde folgender *Escherichia coli* Stamm verwendet:

- TOP10, genotype: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*araleu*)7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, C404003)

2.3 Kulturmedien

2.3.1 Kulturmedien für adhären wachsende Zelllinien

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C, gesättigter Wasserdampfatosphäre und einem Kohlenstoffdioxid-Gehalt von 5 % inkubiert. Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte in Gibco™ RPMI 1640 Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 21875034), bzw. McCoy5A (ATCC, Manassas, VA, USA, 30-2007) (SK-BR-3) unter Zugabe von 10 % FBS (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, S0615) und 1 % Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 15140122). Diese Zusätze gewährleiten ein optimales Zellwachstum und verhindern eine mögliche Kontamination.

Zur Kultivierung stabil transfizierter Zelllinien wurde zusätzlich 4 mg/ml (MCF-7), bzw. 8 mg/ml (MDA MB 231) G418 Sulfat (Geneticin® selective antibiotic) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 10131027) für Selektionszwecke hinzugegeben.

Einfriermedium für adhärent wachsende Zellen

Das Einfriermedium für adhärent wachsende Zellen setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen:

10 % (v/v)	DMSO
20 % (v/v)	FCS
70 % (v/v)	RPML, bzw. McCoy5A

2.3.2 Kulturmedien für *E. coli* Bakterien

Alle Medien und Lösungen zum Kultivieren von Bakterien wurden nach der Herstellung direkt autoklaviert.

LB Medium für *E. coli*

0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
0,5 % (w/v)	NaCl
1 % (w/v)	Tryptone
Ad 1000 ml ddH ₂ O	

LB Agar Medium für *E. coli*

Es wurden 6 g Agar-Agar zu 400 ml LB-Medium hinzugefügt.

2.3.3 Antibiotika zur Selektion von *E. coli* Bakterien

Flüssigmedien und Agarplatten enthielten Antibiotika in folgenden Konzentrationen

Tabelle 1: Zur Selektion von *E. coli* verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Konzentration der Gebrauchslösung	Hersteller	Artikelnummer
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml	Sigma-Aldrich	A9518

2.4 Nukleinsäuren

2.4.1 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide für die PCR und, quantitative PCR wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Material

2.4.1.1 Oligonukleotide als Primer für die PCR

Tabelle 2: Oligonukleotide als Primer für die PCR

Zielgen	Primer	Primer Sequenz (5' – 3')	Restriktionsenzyme für die Erkennungssequenz
RIP3	RIP3	GATCGATCGAGCGGGCCGCGCCACCA	NotI
	Forward	TGTCGTGCGTCCAAGTTATGG	
RIP3	RIP3	TCGATCGATCCTCGAGTTATTTCCCG	XhoI
	Reverse	CTATGATTATACCAA	

Rot markiert ist die Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme.

2.4.1.2 Oligonukleotide als Primer für die quantitative PCR

Tabelle 3: Oligonukleotide für die quantitative PCR

Zielgen	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (5' - 3')	Vorrats Konz.
18S	CATGGCCGTTCTTAGTTGGT	ATGCCAGAGTCTCGTTCGTT	5 µM
RIP3	GATCGATCGAGCGGGCCGCGC	TCGATCGATCCTCGAGTTATTT	5 µM
	CACCATGTCGTGCGTCCAAGT	CCCGCTATGATTATACCAA	
	TATGG		

Rot markiert ist die Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme.

2.4.1.3 Oligonukleotide als siRNA für die Transfektion

Tabelle 4: Oligonukleotide als siRNA für die Transfektion

Zielgen	Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
RIP3	RIP3 #1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
RIP3	RIP3 #2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
MLKL	MLKL #1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
MLKL	MLKL #2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
Kontroll siRNA	scram	Dharmacon, Lafayette, CO, USA	D-001810-10-20

2.4.2 Plasmide

Folgende Plasmide wurden zur Klonierung verwendet:

- pcDNA3 (Invitrogen, Groningen, Niederlande, V79020)

Folgendes Plasmid wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit konstruiert:

Tabelle 5: Plasmide, die im Rahmen dieser Doktorarbeit konstruiert wurde

Bezeichnung	Ausgangsplasmid	Insert
pcDNA3-RIP3	pcDNA3	Kodierende Sequenz für humanes RIP3

2.4.3 Größenstandards für die DNA- und RNA-Gelelektrophorese

Die folgenden DNA-Leitern wurden von New England Biolabs (Frankfurt a.M., Deutschland) erworben und als molekulare Größenstandards für die DNA- und RNA-Gelelektrophorese verwendet.

- 100 bp DNA-Leiter: 12 DNA Fragmente in einem Bereich von 100 bis 1517 Basen (N3231S)
- 1 kb DNA-Leiter: 10 Fragmente in einem Bereich von 0,5 bis 10,0 Kilobasen (N3232S)

2.4.4 Proteine

2.4.4.1 Restriktionsendonukleasen

Tabelle 6: Zum enzymatischen Verdau verwendete Restriktionsendonukleasen

Enzyme	U/ml	Hersteller	Artikelnummer
XhoI	20.000	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Germany	R0146S
NotI	20.000	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Germany	R3189S

2.4.4.2 Polymerasen

Tabelle 7: Verwendete Polymerase

Enzyme	U/ml	Hersteller	Artikelnummer
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	F530S
SuperscriptTM II Reverse Transkriptase	200	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	18064014

2.4.5 Antikörper

2.4.5.1 Primärantikörper

Tabelle 8: Primärantikörper, die für Immunoblot-Analysen, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz verwendet wurden

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Hersteller ^a	Artikelnummer	Methode ^b
β-tubulin	Kaninchen	1:200	Cell Signaling	2116	IF
Aktin	Maus	1:10.000	Merck KGaA	MAB1501	IB
GAPDH	Maus	1:10.000	Santa Cruz	Sc-32233	IB
MLKL	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling	14993	IB
Occludin	Maus	1:200	Sigma	33-1500	IB, IF
pMLKL (S358)	Kaninchen	1:500 - 1:1.000	Abcam	187091	IB, IF
pRIP (S166)	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling	65746	IB
RIP	Maus	1:1.000	BD Biosciences	610458	IB
RIP3	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling	13526	IB
RIP3	Kaninchen	1:100	Novus Biologicals	NBP2-24588	IF, IHC

^aAbcam, Cambridge, UK

BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA

Imgenex, San Diego, CA, USA

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Novus Biologicals, Wiesbaden, Deutschland

Santa Cruz, Dallas TX, USA

^bIB: Immunoblot, IF: Immunfluoreszenz, IHC: Immunhistochemie

2.4.5.2 Sekundärantikörper

Die folgenden Sekundärantikörper, wurden in der Immunoblot-Analyse verwendet:

- Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (IgG) (H+L) (BioRad, München, Deutschland, 1706515), Verdünnung 1:3.000 in 5 % fettfreiem Trocken-Milchpulver in TBST
- Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper (IgG) (H+L) (BioRad, München, Deutschland, 1706516), Verdünnung 1:3.000 in 5 % fettfreiem Trocken-Milchpulver in TBST

Die folgenden Sekundärantikörper wurden in der Immunfluoreszenz-Färbung verwendet:

- Alexa Fluor® 488 Ziege- α -Kaninchen Antikörper IgG (H+L) (Invitrogen, Karlsbad, USA, A11008)
- Alexa Fluor® 546 Ziege- α -Maus-Antikörper IgG (H+L) (Invitrogen, Karlsbad, USA, A11030)

2.4.6 Proteingrößenstandards für die SDS-PAGE

- Als Größenstandard für die Immunoblot-Analysen zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteine wurde ein vorgefärbter, definierter Protein-Größenmarker verwendet: Page Ruler™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 26616)

2.4.7 Weitere Proteine

- Kälber Serum Albumin (BSA) (10 mg/ml) (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland, B90015)
- RNase Inhibitor (20 U/ μ l) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, N8080119)

2.5 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt.

Unter sterilen Bedingungen wurden für alle Versuche entweder PBS mit Mg^{2+}/Ca^{2+} (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA, D8662-500ml) oder PBS ohne Mg^{2+}/Ca^{2+} (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA, D8537-500ml) verwendet. Für alle Experimente, bei denen keine sterilen Bedingungen erforderlich waren, wurde die folgende nicht-sterile PBS-Lösung angesetzt:

PBS (10x)

140 mM	NaCl
8 mM	$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$
2 mM	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$

2.5.1 Puffer für Immunoblot-Analysen

Protein-Lysepuffer (1 ml)

20 µl	Protease und Phosphatase Inhibitoren Cocktail (100x) (78440)
100 µl	Lyse Puffer (10x) (9803S)

Protein-Probenpuffer (6x)

35 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
10,2 % (w/v)	SDS
36 % (v/v)	Glycerin
600 mM	DTT
Spatelspitze	Bromphenolblau

Sammelgel-Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gele

500 mM	Tris-HCl, pH 6,8
--------	------------------

Der Sammelgel-Puffer wurde nach der Herstellung autoklaviert und bei 4 °C gelagert um die Haltbarkeit zu gewährleisten.

Trenngel-Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gele

1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
-------	------------------

SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)

250 mM	Tris
1,92 M	Glycin
1 % (w/v)	SDS

Semi-dry Transferpuffer (10x)

480 mM	Tris
390 mM	Glycin
0,375 % (w/v)	SDS

Der Semi-dry Transferpuffer wurde bei 4 °C gelagert um die Haltbarkeit der Lösung zu gewährleisten.

Semi-dry Transferpuffer (1x)

10 % (v/v)	Semi-dry Blot Puffer (10x)
20 % (v/v)	Methanol

TBS (10x)

200 mM	Tris
1,38 M	NaCl

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 7,6 unter Verwendung HCl eingestellt.

TBST

0,1 % (v/v)	Tween 20
-------------	----------

In TBS Puffer (1x)

Blockierungspuffer

5 % (w/v)	fettfreies Trockenmilchpulver
-----------	-------------------------------

In TBST Puffer

Detektierlösung

10 ml	100 mM Tris-HCl, pH 8,5	
50 µl	Luminol	(250 mM in 100 % DMSO)
25 µl	Coumarinsäure	(90 mM in 100 % DMSO)
4 µl	H ₂ O ₂	(30 % (v/v))

2.5.2 Färbelösungen

Ponceau S-Färbelösung

0,5 % (w/v)	Ponceau S
1 % (v/v)	Konzentrierte Essigsäure

Kristallviolett-Lösung

0,5 % (w/v)	Kristallviolett
10 % (v/v)	Ethanol

Die Kristallviolett-Lösung wurde nach Herstellung filtriert.

2.5.3 Puffer für die DNA- und RNA-Gelelektrophorese

DNA- und RNA-Probenpuffer (6x)

6 mg/ml Orange G

In 50 mM EDTA-Lösung, welche 50 % Glycerin enthält.

TAE-Puffer (50x) für die DNA-Gelelektrophorese

2 M Tris

10 % (v/v) EDTA (500 mM)

5,7 % (v/v) Konzentrierte Essigsäure

2.6 Chemikalien und Reagenzien

2.6.1 Chemikalien

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden angegebenen Herstellern erworben: AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA).

2.6.2 Inhibitoren

Die folgenden Inhibitoren wurden in den durchgeführten Experimenten verwendet:

Tabelle 9: Verwendete Inhibitoren

Inhibitor	Zielstruktur	Hersteller	Artikelnummer
z-VAD(OMe)-FMK	Caspasen	Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA	BML-P4160001
BV6	clAP, XIAP	Selleckchem, USA	S7597
Necrostatin-1	RIP1	Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA	BML-AP309-0020
Necrosulfonamid	MLKL	Calbiochem, USA	480073

2.6.3 Sonstige Reagenzien

Tabelle 10: Verwendete Reagenzien

Reagenz	Zielstruktur	Hersteller	Artikelnummer
rh TNF-α	TNF- α -Rezeptor	ImmunoTools, Germany	11343017

2.6.4 Reagenziensets

- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland, 51304)
- QIAGEN® EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland, 12362)
- QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland, 12163)
- QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland, 28704)
- QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland, 28104)
- QIAshredder (Qiagen, Hilden, Deutschland, 79654)
- RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland, 74134)

2.6.5 Weiteres

- 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, D9542)
- Dako REAL® Detektionssystem (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, K5001)
- Dako Target Retrieval Solution, High pH (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, K8004)
- Dako Target Retrieval Solution, Low pH (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, K8005)
- Dako REAL Antikörper Verdünnungsmedium (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, S0809)
- Dako Protein Block Serum-frei (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, X0909)
- Orange G (AppliChem, Darmstadt, Deutschland, A1404)
- SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 4364346)

2.7 Geräte und Software

2.7.1 Geräte

- Quant Studio™ 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Autostainer Link 48 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Bakterien-Inkubator Cultura® M (Orion Diagnostica, Espoo, Finnland)

- Zellkultur Hood HERAsafe® KS12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Universalzentrifuge Heraeus™ Multifuge™ X3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- CO₂ Inkubator Heracell™ 240i (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Kühl-Mikrozentrifuge Z 216 M (Hermle Labortechnik, Wehingen, Deutschland)
- Elektrophorese-System Mini-Protean® Tetra Cell (Bio-Rad, München, Deutschland, 1658000)
- NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Netzteil PowerPac™ (Bio-Rad, München, Deutschland)
- Trans-Blot® SD (Bio-Rad, München, Deutschland)
- Trans-Blot® Turbo™ Blotting System (Bio-Rad, München, Deutschland)
- Western Blot Bildgebungssystem Fusion Solo S (Vilber Lourmat, Eberhardtzell, Deutschland)
- Konfokalmikroskop Leica SP8 (Leica, Wetzlar, Germany)
- Lichtmikroskop Eclipse TS100-F (Nikon, Tokyo, Japan)

2.7.2 Software

- Quant Studio™ 3 Firmware v1.3.3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) zur Auswertung der quantitativen Real-Time PCR
- Adobe® Photoshop CS5 (San José, CA, USA) zum Erstellen von Abbildungen
- Aperio ImageScope v.12. 1. 0. 5029 (Leica Biosystems Imaging, Wetzlar, Deutschland) zur Auswertung von immunhistochemischen Färbung am PC
- Fusion Software, Evolution-Capt (Vilber Lourmat, Eberhardtzell, Deutschland) zur digitalen Detektion von Western Blot Chemilumineszenz
- Microsoft® Office Professional 2007 mit den Programmen Excel, Powerpoint, Word (Redmont, WA, USA) zur Datenanalyse und Erstellung von Diagrammen

Material

- ND-1000 V3.81 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) zur Messung von DNA-/RNA-Konzentration am NanoDrop 1000 Spektrophotometer

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Mammakarzinom-Zelllinien

Die Authentizität der humanen Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7, MDA MB 231, T-47D und SK-BR-3 wurde von der Fa. Multiplexion (Heidelberg, Deutschland) mittels SNP-Typing bestätigt (81).

Die Mammakarzinom-Zelllinien wurden bei konfluentem Wachstum zweimal wöchentlich passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit PBS (ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}) gewaschen und mit Trypsin, bzw. Accutase für 5, bzw. 10 Minuten bei 37 °C von der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in Standard-Wachstumsmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:2 – 1:10 in frischem Medium ausgesät. Zur Vermeidung von Kontaminationen erfolgte die Arbeit mit den Zelllinien unter einer Sterilbank.

Zur Kryokonservierung wurden die Zelllinien angezüchtet und portionsweise bei -80 °C eingefroren. Zu diesem Zweck wurden die Zellen abgelöst, in Standard-Wachstumsmedium resuspendiert und anschließend zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, 4 °C). Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet mit 1ml Einfriermedium resuspendiert und die Zellsuspension in ein Kryogefäß überführt. Das Kryogefäß wurde in einer speziellen Einfrierbox in einem -80 °C Gefrierschrank eingefroren. Die Einfrierbox sorgt mit einer sukzessiven Temperaturabsenkung von -1 °C pro Minute für einen optimalen Einfrierprozess der Zellen und gewährleistet eine hohe Überlebensrate der Zellen. Intrazelluläre Eiskristalle würden bei einem schnellen Einfrierprozess entstehen und die Zellen dadurch schädigen.

Für die Versuche wurden alle drei Monate frische Zellen aufgetaut, kultiviert und verwendet. Dafür wurde ein gefrorenes Aliquot von Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in eine Zellkulturflasche mit vorgelegtem Wachstumsmedium gegeben und bei Standardbedingungen inkubiert. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Wachstumsmedium abgesaugt um das darin enthaltene DMSO zu entfernen und die Zellkulturflasche mit frischem Wachstumsmedium befüllt.

3.1.2 Bestimmung der optimalen G418-Konzentration zur Selektion der Mammakarzinom-Zellen

Mammakarzinom-Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Standard-Wachstumsmedium abgesaugt und durch G418-haltiges Wachstumsmedium ersetzt. Die G418-Konzentration wurde in einem Bereich von 0 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1 mg/ml ausgetestet. 72 Stunden nach Zellaussaat wurden die Zellen mit PBS (ohne Mg^{2+} / Ca^{2+}) gewaschen, mit Trypsin gelöst und erneut ausgesät. Zur Visualisierung der verbliebenen Zellen wurden die Schalen am Folgetag mit PBS gewaschen und mit Kristallviolett für 15 Minuten gefärbt.

Die optimale Konzentration des eingesetzten G418-Konzentration für die Selektion stabil transfizierter Zellen, wurde als diejenige definiert bei der alle Zellen ihre Adhärenz verloren hatten.

3.1.3 Modifikation der Genexpression

3.1.3.1 Transiente Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden

Die vorübergehende Unterdrückung der Expression endogener Proteine erfolgte an den verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien mithilfe von siRNA. Lipofectamin[®]2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 11668019) wurde als Transfektionsreagenz und Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 51985026), als Transfektionsmedium bei den Versuchen verwendet. Mit Hilfe der RNA-Interferenz wird die Translation des Zielproteins verhindert, sodass die Funktion des Proteins in weiteren Versuchen eingehender untersucht werden kann. Zur Kontrolle wurde stets eine Kontroll-siRNA mitgeführt, die in den Versuchen als scram bezeichnet wird.

Es wurden Zellen in 6 cm- bzw. 10 cm-Schalen ausgesät und für 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem Transfektionsgemisch inkubiert. Das Transfektionsgemisch enthielt 1 nM siRNA, 8 μ l bzw. 20 μ l Lipofectamin[®]2000 in 400 μ l bzw. 1 ml Opti-MEM. Nach einer Inkubationszeit von 5-6 Stunden wurden dem Transfektionsgemisch das gleiche Volumen Standard-Wachstumsmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion für nachfolgende Versuche weiterverwendet.

3.1.3.2 Transfektion mit Plasmid-DNA

Für die Überexpression von Proteinen, wurden Mammakarzinom-Zelllinien mit Plasmid-DNA unter der Verwendung von Lipofectamin[®]2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 11668019), als Transfektionsreagenz und Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 51985026) als Transfektionsmedium, transfiziert. Es wurden Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät und für 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Für die Transfektion wurden die Zellen zuvor mit PBS gewaschen, dann mit dem Transfektionsgemisch beschichtet und unter Standardbedingungen inkubiert. Das Transfektionsgemisch setzte sich zusammen aus 2 µg Plasmid-DNA und 10 µl Lipofectamin[®]2000 und 4 ml Opti-MEM zusammen. Nach 6 Stunden Inkubationszeit wurde das Transfektionsgemisch durch Standard-Wachstumsmedium ersetzt. Um eine Selektion der Zelllinien mit stabiler Protein-Überexpression zu erhalten, wurde das Standard-Wachstumsmedium 48 Stunden nach der Transfektionsreaktion durch ein Selektionsmedium ersetzt. Das Selektionsmedium enthielt 4 mg/ml, bzw. 8 mg/ml G418-Sulfat. Die Überexpression des Proteins wurde in Immunoblot-Analysen überprüft.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli* Stämmen

Die Kultivierung von *E. coli* Top10 erfolgte in LB-Medium mit entsprechender Antibiotika-Zugabe bei 37 °C. Die Lagerung der *E. coli* Flüssigkulturen (für bis zu eine Woche) oder der auf Agarplatten ausgestrichenen Kulturen (bis einen Monat) erfolgte bei 4 °C. Bei längeren Lagerungszeiten wurden die *E. coli* Bakterien in glycerinhaltigem LB-Medium (20 %iger Glycerin-Anteil) bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Herstellung und Transformation KCM-kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung KCM-kompetenter Zellen wurde eine *E. coli* Top10 Kolonie in 1 ml LB-Medium angeimpft. Die daraus entstandene Vorkultur wurde nach Inkubation am Folgetag in 100 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 - 0,6 kultiviert. anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (15 min, 4.000 rpm, 4 °C), das Zellsediment wurde in 7,5 ml TBS-Medium resuspendiert

und nach einer Inkubationszeit von eine Stunde auf Eis in 100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur anschließenden Transformation wurden 100 µl *E. coli* Top10 Zellen auf Eis aufgetaut und in folgende Lösung überführt:

20 µl	5 x KCM Lösung
10 µl	1 µg Plasmid in ddH ₂ O gelöst
Ad 100 µl	ddH ₂ O

Das Gemisch wurde für 20 min auf Eis und dann 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde nach abgeschlossener Inkubationszeit in 0,8 ml LB-Medium überführt. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, um die Expression der Resistenzgene zu gewährleisten. Von diesem Ansatz wurden 50 µl auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Restriktionsverdau

Der Verdau von Plasmiden und PCR-Produkten mit Hilfe von Restriktionsenzymen diente in dieser Arbeit der Klonierung des RIP3-Plasmids sowie der anschließenden Charakterisierung der einzelnen Bakterienkolonien, im Anschluss an die durchgeführte Transformation mit dem Ligationsansatz. Um sicherzustellen, dass die komplett eingesetzte DNA verdaut wird, wurden die Restriktionsenzyme im Überschuss in den Ansatz gegeben. Die Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangabe in einem Reaktionsvolumen von 50 – 150 µl eingesetzt. Dabei wurde beachtet, dass das Volumen der Restriktionsenzyme weniger als 5 % des Gesamtvolumens des Ansatzes ausmacht. Der Enzymverdau erfolgte bei 37 °C für 2 Stunden.

Die Kontrolle der erfolgreichen Restriktion erfolgte im Agarose-Gel. Zur Gewinnung einer großen Menge an verdauter DNA zur Klonierung erfolgte eine präparativer Verdau. Im Anschluss wurde die gewünschte Bande unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraktions Kits aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Alternativ erfolgte eine Aufreinigung mit dem QIAquick® PCR Purification Kit.

Zur Charakterisierung einzelner Bakterienkolonien wurde ein analytischer Verdau durchgeführt und das Bandenmuster anschließend auf einem Agarose-Gel überprüft.

3.3.2 Ligation

Nach dem Verdau mit Hilfe der Restriktionsenzyme erfolgte die Ligation von Vektor und Insert. 200 ng des Inserts wurden im molaren Verhältnis 3:1 (Insert zu Vektor) eingesetzt. Es wurden 2 µl T4 DNA-Ligase Reaktionspuffers (10x) und 0,2 µl T4 DNA-Ligase hinzugefügt. Das Ligationsgemisch wurde mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und bei 22 °C für 10 min inkubiert.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Ligation von Vektor und Insert erfolgte eine Auftrennung des Ligationsgemisches im Agarose-Gel.

3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Phusion DNA-Polymerase

Die PCR dient der Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte. Es wurde die Phusion-Polymerase verwendet, da diese eine Korrekturlese-Funktion besitzt und dadurch die exakte Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenz sichergestellt wird. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 11, das verwendete PCR-Protokoll in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die PCR unter Verwendung der Phusion DNA-Polymerase

Reagenz	Endkonzentration
5x Phusion HF Puffer	1x
25 µM Vorwärts Primer	0,5 µM
25 µM Rückwärts Primer	0,5 µM
10 mM dNTPs	200 µM
DNA- Template	1-5 ng/µl
2 U/µl Phusion DNA-Polymerase	1 U
Nukleasefreies Wasser	Ad 50 µl

Die PCR Zyklus-Konditionen sind in folgender Tabelle aufgeführt

Tabelle 12: Zyklus-Konditionen für die PCR unter Verwendung der Phusion DNA-Polymerase

Zyklus-Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Anfangsdenaturierung	98 °C	30 s	1
Denaturierung	98 °C	10 s	
Anlagern	58 – 65 °C	30 s	35
Kettenverlängerung	72 °C	30 s/kb	
Finale	72 °C	10 min	1
Kettenverlängerung			

Die Kontrolle des vervielfältigten PCR-Produktes erfolgte auf einem Agarose-Gel. Die gesuchten Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraktion Kits aufgereinigt.

3.3.4 Reverse Transkription der RNA

Bei diesem Verfahren wurde zuvor extrahierte RNA, durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase in cDNA umgeschrieben. Die RNA-Konzentration wurde hierfür auf 2 µg RNA in 10 µl nukleasefreiem Wasser eingestellt. Es wurden 10 µl des Reaktionsgemisches (Tabelle 13) der RNA hinzugefügt. Das Umschreiben in cDNA wurde mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Herstellung einer cDNA

Reagenz	Menge
10x RT Buffer	2 µl
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10x RT Random Primers	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
Nukleasefreies Wasser	3,2 µl

Tabelle 14: Temperaturprogramm für die cDNA-Synthese

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zeit	10 min	120 min	5 min	∞

Die cDNA wurde nach der Synthese im Verhältnis 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und für weitere Experimente verwendet oder bei -20 °C gelagert.

3.3.4.1 Qualitätsprüfung der Primer

Zur Überprüfung der Primer-Paaren, wurde die cDNA in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000) in der quantitativen PCR die Spezifität der Primer getestet. Die Primer-Paare wurden in einer Konzentration von 500 nM eingesetzt. Als Kriterium für die Primer-Qualität wurde die Standardkurve sowie die Schmelzkurve der verwendeten Primer betrachtet. Eine Steigung der Standardkurve von $3,3 \pm 0,1$ wird als optimal gewertet. Eine zu steile Standardkurve weist auf eine zu geringe Primer-Konzentration, während eine zu flache Kurve für eine zu hohe Primer-Konzentration spricht. Unter allen eingesetzten Verdünnungen sollten die Schmelzkurven den gleichen Verlauf sowie eine Kurvenspitze aufweisen. Eine mögliche Dimerisierung der Primer wurde durch das Mitführen einer Wasserkontrolle überprüft.

3.3.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR dient der Quantifizierung des Genexpressionsmusters der Zellen. Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR können exprimierte Gene anhand der cDNA detektiert und analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden spezifische Primer verwendet, welche an den entsprechenden DNA-Sequenzen binden. Die Methode verwendet den fluoreszierenden Farbstoff SYBR® Green. Die Färbung erfolgte durch die Bindung des asymmetrischen Cyanin-Farbstoffs SYBR® Green zwischen den neu synthetisierten DNA-Doppelsträngen, ohne die Beeinflussung der durchgeführten PCR. Diese Fluoreszenz ermöglicht eine Echtzeitdetektion der amplifizierten PCR-Produkte. Das daraus resultierende Fluoreszenzsignal, steigt mit jedem Zyklus proportional zur Menge des amplifizierten PCR-Produktes an.

Methoden

Zur Quantifizierung werden die Emissionswerte der spezifischen DNA-Produkte in Relation zu einem Referenzgen gesetzt. Diese Referenzgene haben die Eigenschaft, dass sich ihre Expressionsmuster in verschiedenen Zelltypen und Zellzyklusphasen idealerweise nicht ändern. Durch die Verwendung von Referenzgenen können unterschiedliche cDNA-Mengen der verwendeten Proben angeglichen werden. Es wurde die 18s rRNA als Referenzgen verwendet.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die qRT-PCR

Reagenz	Menge
cDNA (1 ng/µl)	16,6 µl
SYBR® Green PCR Master Mix	2,1 µl
Primer-Paar Mix	4,4 µl

Tabelle 16: Reaktionsbedingungen für die qRT-PCR mit SYBR® Green

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Anfangsdenaturierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	40
Annealing & Elongation	60 °C	60 s	
Schmelzkurve *	95 °C	15 s	
	60 °C	60 s	
	95 °C	1 s	

* Die Schmelzkurve wird erstellt, indem die Blockierungstemperatur von 60 °C schrittweise um 0,15 °C/s bis zu einer Endtemperatur von 95 °C erhöht wird, wobei die Fluoreszenz bei jedem Schritt überwacht wird.

Die Messung erfolgte mit dem QuantStudio™ 3 Real Time-System (Applied Biosystems von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Zur Auswertung wurde die zugehörige QuantStudio™ Design & Analysis Software verwendet.

Die qRT-PCR liefert eine Darstellung, welche die Zunahme der Fluoreszenzintensität der Zyklanzahl der PCR gegenüberstellt. Zur quantitativen Bestimmung des amplifizierten PCR-Produktes liefert die zugehörige Software einen notwendigen Schwellenwert, den C_T Wert. Dieser

beschreibt die Anzahl der PCR-Zyklen ab dem die durch das SYBR Green® entstandene Fluoreszenz die Hintergrund-Fluoreszenz deutlich überschritten hat.

Mit Hilfe des C_T -Wertes der Referenz (18s rRNA), wurden die zur Auswertung untersuchenden Proben zuerst normalisiert (ΔC_T -Wert):

$$\Delta C_T = C_{T\text{Referenzgen}} - C_{T\text{Zielgen}}$$

Um eine Veränderung zwischen behandelter Probe und entsprechender Kontrolle feststellen zu können ($\Delta\Delta C_T$), wurde die folgende Formel verwendet:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{Probe}} - \Delta C_{T\text{Kontrolle}}$$

Die endgültige Ermittlung der relativen cDNA- Menge wurde mit folgender Formel ermittelt, wobei für die Kontrolle der Wert 1 festgelegt wurde:

$$\text{relative cDNA Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

3.3.6 Klonierung des Plasmids pcDNA3-RIP3

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die kodierende Sequenz von humanem RIP3 in den Vektor pcDNA3 kloniert. Dazu wurde die kodierende Sequenz für RIP3 zunächst mittels PCR-Methode amplifiziert, durch überhängende Primer (NotI_ACC_ATG_RIP3 fw und RIP3_TAA_XhoI rv) wurde am 5'-Ende des Amplikons sowohl eine NotI-Schnittstelle als auch eine Kozak-Sequenz eingefügt. Am 3'-Ende wurde stromabwärts des Stopp-Codons eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym XhoI eingebracht. Mittels einer Agarose-Gelelektrophorese wurde das gewünschte DNA-Fragment nachgewiesen und im Verlauf aufgereinigt. Das so entstandene PCR-Produkt RIP3, als auch der Vektor pcDNA3 wurden mit den Restriktionsenzymen NotI und XhoI verdaut, aufgereinigt und im Anschluss an eine Phosphatase-Behandlung des Vektors im Verhältnis 3:1 (Insert: Vektor) ligiert. Die so hergestellten Ligationsprodukte wurden in *E. coli* Top10 Zellen transformiert. Die Plasmid-DNA der durch Ampicillin selektionierten Kolonien wurde durch eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen NotI und XhoI überprüft und anschließend sequenziert.

3.3.7 DNA Sequenz-Analyse

DNA-Sequenzanalysen wurden von der Firma Starseq (Mainz) durchgeführt.

3.4 Biochemische und physikalische Methoden

3.4.1 Plasmid-Isolation

3.4.1.1 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien: Mini-Kit

Nach der Transformation des *E. coli* Bakterienstammes mit dem Ligationsprodukt wurden Einzelkolonien, die auf LB-Agar-Platten selektiert worden waren, in 5 ml mit Antibiotikum angereichertem LB-Medium über Nacht bei 37 °C schüttelnd kultiviert. Im Anschluss an die Inkubation wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension für 1 min bei 16.000 rpm zentrifugiert. Die in den Bakterien enthaltene Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des QIAprep® Spin Miniprep Kit isoliert.

Die Bakterien wurden mittels alkalischer Lyse aufgebrochen und die enthaltene Plasmid-DNA an eine Silikatmembran gebunden. Es folgten mehrere Waschschrte zur Aufreinigung der Plasmid-DNA mit anschließender Elution. Ziel der Waschschrte war die Aufreinigung des Eluates von RNA, Proteinen und anderen niedrig molekularen Verbindungen. Die aufgereinigte DNA wurde in 50 µl ddH₂O eluiert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde einem analytischen Verdau mit Restriktionsenzymen unterzogen und anschließend sequenziert.

3.4.1.2 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien: Maxi-Kit

Die Isolation der Plasmid-DNA im großen Maßstab erfolgte nachdem mittels Sequenzierung die korrekte Sequenz des Inserts im Plasmid bestätigt wurde. Für die Plasmid-Isolation wurden 200 ml antibiotikumhaltiges LB Medium mit einer über Nacht gewachsenen *E. coli* Kultur beimpft. Die so hergestellte Bakteriensuspension wurde schüttelnd bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die DNA-Isolation mit dem QIAGEN® Plasmid Maxi Kit. Die Plasmid-DNA wurde mittels alkalischer Lyse aus den Bakterien isoliert. Es folgte die Aufreinigung mittels verschiedener Waschschrte während die DNA an das Granulat in der Säule gebunden blieb. Die Plasmid-DNA wurde mit einem Puffer mit hoher Salzkonzentration anschließend von der Säule eluiert und das so gewonnene Eluat mit Isopropanol gemischt, welches die gereinigte DNA fällt. Im letzten Schritt wurde die so gewonnene DNA mit Ethanol gewaschen. Das Gemisch wurde zentrifugiert, luftgetrocknet und die so isolierte Plasmid-DNA in 400 µl ddH₂O gelöst. Verunreinigungen mit niedrig molekularen Strukturen wie RNA, Proteinen oder Metaboliten wurden durch das Anionenaustauscher-

Granulat von der Plasmid-DNA getrennt. Die Konzentration der gelösten Plasmid-DNA wurde mit dem NanoDrop-Spektrometer gemessen und zur anschließenden Transfektion der Mammakarzinom-Zelllinien verwendet.

3.4.2 RNA-Isolierung

RNA wurde aus Mammakarzinom-Zelllinien isoliert und bei -80 °C gelagert. Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem RNeasy® Plus Mini Kit. Die genomische DNA wurde unter Verwendung der DNA-Eliminations-Säule entfernt und die RNA an die RNeasy-Säule gebunden. RNA mit weniger als 200 Nukleotiden, wie zum Beispiel 5,8S rRNA, 5S rRNA und tRNA wurden nicht an die RNeasy-Säule gebunden. Die gebundene RNA wurde mit 30 µl nukleasefreiem H₂O eluiert. Die Konzentration der RNA wurden mit Hilfe des NanoDrop-Spektrometers bestimmt. Zusätzlich diente die Auftrennung der RNA über ein Agarose-Gel der Beurteilung der Qualität der RNA. 28S und 18S rRNA wurden im Trennverfahren nicht entfernt und dienten daher als Indikator für die Qualität der isolierten RNA. Eine hohe Qualität der isolierten RNA bestand, wenn sich im Agarose-Gel eine 28S rRNA Bande bei 5 kb und eine 18S rRNA Bande bei 1,9 kb zeigte. Abgebaute RNA zeigte sich im Agarose-Gel als niedermolekularer „Schmier“.

3.4.3 Bestimmung der DNA und RNA Konzentration

Mit Hilfe des NanoDrop-Spektrometers wurde die Konzentration der DNA und RNA bestimmt. Mit dem Spektrometer konnte zusätzlich eine Aussage über die Reinheit der DNA und RNA, anhand des Absorptionsverhältnis bei 260 nm und 280 nm, getroffen werden. Bei einem Verhältnis von 1,8 bei DNA und 2,0 bei RNA wurde von einer guten Reinheit des gemessenen Produktes ausgegangen.

3.4.4 DNA- und RNA-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA wurde 0,8 – 2 %ige Agarose-Gele verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen in einem Mikrowellengerät gelöst und bevor die Gele gegossen wurden mit 0,003 % (w/v) Ethidiumbromid versetzt. Bei RNA-Analysen wurde der Puffer DEPC-TAE verwendet.

Die Proben wurden vor der Beladung des Gels mit 6x Orange G Probenpuffer und nukleasefreiem H₂O gemischt. Zur Größenbestimmung der Probe wurde ein

DNA-Größenmarker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Puffer bei konstanter Spannung von 100 V. Die Fragmente wurden unter Anregung des Ethidiumbromid mit Hilfe von UV-Licht visualisiert. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff welcher zwischen den Nukleinsäuren der DNA und RNA interkaliert. Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Analyse der mittels einer PCR amplifizierten DNA, der Kontrolle nach einem Restriktionsverdau oder der Kontrolle von Ligationen. Die RNA-Gelelektrophorese wurde als Qualitätskontrolle nach vorangehender RNA-Isolation durchgeführt.

3.4.5 Proteinextraktion

Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und mit 50 – 100 µl Lysepuffer von den Schalen abgeschabt. Der Lysepuffer enthielt Protease- und Phosphatase-Inhibitoren um einem Proteinerfall entgegen zu wirken. Die Lysate wurden 15 min auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert (13.200 rpm, 20 min, 4 °C). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit den löslichen Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Sediment verworfen. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford Protein Kit bestimmt. Unter Verwendung von 6 x Protein-Probenpuffer und Lysepuffer wurde die Proteinkonzentration für die spätere Verwendung im Western Blot auf 30 – 60 µg/20 µl eingestellt. Danach wurden die Proben im Heizblock für 5 min bei 95 °C erhitzt.

3.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford Methode mit Hilfe des Farbreagens der Firma Bio-Rad. Die quantitative Nachweismethode beruht auf einer Komplexbildung zwischen dem eingesetzten Farbstoff und dem Protein, was eine Änderung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm bewirkt. Die Messung erfolgte mit einem Spektrophotometer. Hierfür wurden 798 µl ddH₂O, 2 µl Zelllysat und 200 µl des Farbreagens in einem Reaktionsgefäß gut vermischt. 200 µl des Probengemischs wurden jeweils in die Vertiefung einer 96-Well-Platten pipettiert und anschließend spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Parallel dazu wurde ein Gemisch mit verschiedenen Proteinkonzentrationen (0, 1, 5, 10 und 15 µg/µl BSA) aus Rinderserum-Albumin (BSA) zur Erstellung einer Standardgeraden hergestellt

und ebenfalls vermessen. Die Proteinmenge jeder Probe wurde anschließend mit Hilfe der Standardgeraden berechnet.

3.4.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. In dieser Arbeit wurde die Methode nach Laemmli *et al.* (82) verwendet. Das Elektrophoresegel besteht bei dieser Methode aus einem Sammelgel (pH6,8) und einem darauffolgenden Trenngel (pH8,8). Das Sammelgel dient der Konzentrierung der eingesetzten Proteinlösungen und stellt den zeitgleichen Eintritt aller Proben in das Trenngel sicher. Abhängig von dem Molekulargewicht der Proteine, kann durch unterschiedlich eingesetzte Acrylamidkonzentrationen die Gittergröße des Gels beeinflusst werden. Je kleiner das Molekulargewicht der Proteine ist, desto höher sollte die Konzentration des Acrylamids sein. In dieser Arbeit wurden 10 %ige und 15 %ige SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet.

Für die Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele wurde zuerst das Trenngel gegossen und anschließend mit Isopropanol überschichtet. Dies dient dem Ebenen der Gelgrenzen und stellt eine Polymerisation unter Luftausschluss sicher. Nach der Polymerisierung wurde das Isopropanol wieder entfernt. Daraufhin wurde das Trenngel mit einem 5 %igen Sammelgel überschichtet und Probenkämme, mit definierten Aussparungen zur späteren Probenbeschickung, eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden die Kämmen entfernt, das Gel mit VE-Wasser gewaschen und in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer aufgefüllt und die Proben in jeweils eine Tasche des Gels pipettiert. Der Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder wurde hierbei zur Molekulargewichtsbestimmung verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V für ca. 90 min.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Chemikalien	Trenngel		Sammelgel
	10 %	15 %	5 %
ddH ₂ O	2 ml	1,2 ml	1,15 ml
Rotiphorese® Gel 30	1,7 ml	2,5 ml	330 µl
Sammelgelpuffer	-	-	500 µl
Trenngelpuffer	1,3 ml	1,3 ml	-
10 % (w/v) SDS	50 µl	50 µl	20 µl
10 % (w/v) APS	50 µl	50 µl	20 µl
TEMED	2 µl	2 µl	2 µl

3.4.8 Western-Transfer

Mit Hilfe der Western-Transfer-Methode, können die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamid-Trenngel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Hierbei erfolgt die Übertragung der Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Das Trennungsmuster bleibt hierbei erhalten und die Proteine werden aufgrund hydrophober Wechselwirkungen auf die Nitrozellulose-Membran überführt. Zur Vorbereitung wurden pro Gel sechs Lagen Whatman-Papier, die Nitrozellulose-Membran und das Gel in methanolhaltigem Transferpuffer äquilibriert. Für den Semi-dry Transfer wurde das Trans Blot® Turbo™ Blotting System von BioRad verwendet. In diese Transferkammer wurden drei Schichten Whatman-Papier, die Nitrozellulose-Membran, das Trenngel und wiederum drei Schichten Whatman-Papier luftblasenfrei übereinandergelegt. Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 25 V und einer Stromstärke von ca. 300 mA pro Gel für 30 min.

Nach dem vollständigen Transfer konnten die Proteine auf der Nitrozellulose-Membran mit Hilfe des Azofarbstoffes Ponceau S reversibel angefärbt werden. Der erfolgreiche Proteintransfer konnte mittels optischer Kontrolle durch die Rotfärbung der Aminogruppen der Proteinbanden verifiziert werden.

3.4.9 Immunoblot-Analyse

Nach dem Western-Transfer können die Proteine durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Die Detektion der Proteine erfolgte über den indirekten Nachweis mit antigenspezifischen primären und speziesspezifischen sekundären Antikörpern. Der sekundäre Antikörper ist an ein Reporterenzym (Peroxidase) gekoppelt, sodass mittels einer Chemilumineszenzreaktion die Proteindetektion ermöglicht wird.

Nach der Blockierung mit 5 %iger Milchpulverlösung, wurde die Nitrozellulose-Membran 2x für 5 min in TBST gewaschen und daraufhin über Nacht bei 4 °C in der Primär-Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper entfernt und die Membran 3x für 10 min mit TBST gewaschen. Daraufhin wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper (1:3000) in 5 %iger Milchpulverlösung in TBST inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x 10 min in TBST) konnte die Antikörperbindung mit Hilfe von selbsthergestellter Coumarinsäure-Luminol-H₂O₂-Lösung (ECL) oder mit dem sensitiveren WesternBright™ Sirius™ Detection Kit detektiert werden. Hierzu wurde die optisch sichtbare Strahlung durch einen Chemilumineszenz-Detektor erfasst.

3.4.10 Immunfluoreszenz-Färbung

Zur Visualisierung der erfolgten Aktivierung der Nekroptose-Kaskade und einem möglichen Nachweis der Lokalisation der Nekroptose-assoziierten Proteine wurden immunfluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet. Zuerst wurde in zwei einzelnen Inkubationsschritten zwei Primärantikörper verwendet, welche gegen die Zielstrukturen gerichtet sind. Daraufhin wurden zwei sekundäre farbstoffgekoppelte Antikörper eingesetzt, welche den zuvor gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex binden. Die Färbung wurde mit Hilfe eines Kofokalmikroskopes analysiert.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Mammakarzinom-Zellen auf Chamber Slides ausgesät. In diesen Kammern wurden die Zellen am folgenden Tag mit z-VAD, BV6 und TNF- α behandelt. Nach der Inkubationszeit von 3 h wurden die Zellen 15 min mit 3,7 % PFA fixiert und anschließend mehrmals mit PBS gewaschen. Zum Blockieren von unspezifischen Antigenbindungen wurden die

Zellen für 30 min bei 37 °C mit 10 % FCS und 0,1 % Triton inkubiert. Der erste Primärantikörper wurde in der Blockierungslösung in einem definierten Verhältnis verdünnt, auf die Zellen gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Antikörperreste durch Waschen mit einer Waschlösung entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper für eine Stunde und erneutem Waschen der Zellen. Daraufhin erfolgte die zeitgleiche Inkubation von Sekundärantikörpern und dem Kernfarbstoff DAPI (1:10.000) lichtgeschützt für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einem letzten Waschschrift wurden die mit Zellen beschichteten Objektträger mit Hilfe von ProLong™ Gold Antifade Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit Objektträgergläsern eingedeckt und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Die Aufnahme der Immunfluoreszenzbilder erfolgte an dem Konfokalmikroskop Leica SP8 (Leica Systems, Wetzlar, Germany).

3.4.11 Herstellung Formalin-fixierter Paraffin-Zellblöcke

Für die Herstellung von Formalin-fixierten Paraffin-Zellblöcken wurden Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät und für 3 Stunden mit z-VAD, BV6 und TNF- α behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS (ohne Mg²⁺/Ca²⁺) gewaschen, die Zellen wurden mit Accutase von den Schalen gelöst und im Standard-Wachstumsmedium in einem 15 ml Zentrifugationsgefäß resuspendiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, 4 °C) und mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen für 15 min bei 37 °C mit 2 ml 4 %iger Formalinlösung inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und anschließend in 500 μ l 100 %igem Ethanol resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Zentrifugationsgefäß überführt. Mit 100 μ l 30 %iger FCS Lösung wurden die Zellen anschließend ausgefällt. Um ein festes Zellpellet zu erhalten wurden die ausgefallten Zellen noch zentrifugiert (5.000 rpm, 5 min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde vom Zellpellet abpipettiert und das Zellpellet vorsichtig in eine Biopsiekapsel überführt. Die Biopsiekapseln wurden in 4 %iger Formalinlösung gelagert und im Anschluss in Paraffin überführt.

3.4.12 Immunhistochemische Färbungen

Zur immunhistochemischen Darstellung der Nekroptose in Zellen wurden die Färbung des Antikörper RIP3 an Paraffin eingebettetem Material etabliert. Die Schnittdicke betrug ca. 2 µm. Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit Hilfe von automatisierten Färbesystemen (Autostainer Link 48, Dako). Zur immunhistochemischen Färbungen wurde das Dako REAL Detection System Peroxidase/DAB verwendet.

Die angefertigten Schnittpräparate wurden in 15 min Xylol entparaffiniert, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 100 %, 70 %, 50 % jeweils 5 min rehydriert und somit für die folgende Färbung vorbereitet. Für die spätere Färbung mit Antikörpern wurden die Schnitte 30 min in Dako Target Retrieval Solution pH 6 in einem Dampfdrucktopf gekocht um die Antigen-Antikörperbindung zu ermöglichen. Zur Färbung wurde ein Färbeautomat Dako Autostainer Plus verwendet. Die immunhistochemische Färbung mit dem oben genannten Antikörper erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Die Bindung des primären Antikörpers wurde durch einen Biotin-gekoppelten Zweitantikörper erkannt. Die Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgte mit Hilfe einer Reaktion zwischen dem zuvor gebundenen Streptavidin-Meerrettichperoxidase an das Biotin und dem am Ende hinzugefügten DAB. Die Meerrettichperoxidase katalysiert eine Oxidation des DAB, welche als brauner Niederschlag sichtbar wird. Die Objektträger wurden mit Mayers Hämatoxylin (Kernfärbung) gegengefärbt und dann mit wasserfreiem Eindeckmedium (Entellan) und Objektträgerdeckgläsern eingedeckt.

3.4.13 Kristallviolett-Färbung

Die Kristallviolett-Färbung nach Gillies stellt ein Verfahren zur quantitativen Zellzahlbestimmung mittels spektralphotometrischem Nachweis dar (83). In dieser Arbeit wurde die Färbemethode zum Nachweis der Zellviabilität verwendet.

Die Zellen wurden in einer zuvor definierten Zellzahl in 100 µl/well in einer 96-well Platte ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen für 48 Stunden bzw. 72 Stunden behandelt. Die Inkubationszeit wurde mit PBS gestoppt und die Zellen anschließend 15 min mit einem Methanol/Ethanol-Gemisch mit 100 µl/well fixiert. Die Fixierungslösung

wurde dann entfernt und die Zellen nochmals mit PBS gewaschen. Die Färbung der Zellen mit der verdünnten Kristallviolett-Lösung erfolgte über 30 min unter konstanter Bewegung der 96-well Platten. Die Kristallviolett-Lösung färbt die Zellkerne der Zellen. Die vitalen Zellen verbleiben auf der 96-well Platte, die toten vom Plattenboden gelösten Zellen werden nach der Färbung mit dem Überstand verworfen. Die überschüssige Färbelösung wurde mit vollentsalztem Wasser abgespült und die Platten über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am Folgetag wurde 33 %ige Essigsäure 100 µl/well zu den gefärbten Zellen hinzugegeben und die 96-well Platte für 30 min bei konstanter Bewegung inkubiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm an einem Spektralphotometer gemessen.

3.4.14 Statistik

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde ein t-Test durchgeführt. Es wurden p-Werte mit $p < 0,05$ als signifikant betrachtet.

Tabelle 18: p-Werte

Symbol	p-Wert
*	< 0,05
**	< 0,01
***	< 0,001

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Nekroptose-Sensitivität von Mammakarzinom-Zellen

4.1.1 Untersuchung der Expression Nekroptose-assoziiierter Proteine in Mammakarzinom-Zelllinien

Bei der programmierten Nekrose handelt es sich um eine mögliche Therapieoption bei Tumoren, welche aufgrund einer verminderten Apoptose-Sensitivität gegenüber aktuellen Therapeutika resistent sind. Um die Nekroptose-Sensitivität in Mammakarzinom-Zelllinien genauer zu untersuchen, wurde zuerst eine Charakterisierung der Zelllinien hinsichtlich der endogenen Expressionslevel verschiedener Nekroptose-assoziiierter Proteine durchgeführt (Abbildung 3).

Als Vergleichszelllinie für alle Untersuchungen in dieser Arbeit diente die Nekroptose-sensitive Colonkarzinom-Zelllinie HT 29.

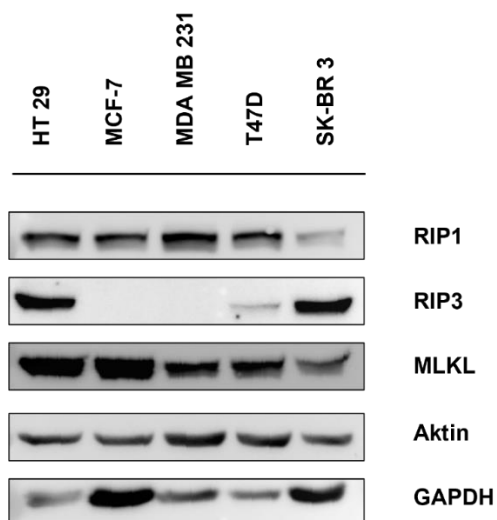


Abbildung 3: Analyse der endogenen Expression Nekroptose-assoziiierter Proteine in Mammakarzinom-Zelllinien.

Western Blot-Analyse der basalen Expression von RIP1, RIP3, MLKL und TNF R1 in den Zelllinien HT 29, MCF-7, MDA MB 231, T47D und SK-BR-3. Auf 10 %igen SDS-Gelen wurden 30 µg Protein-Lysat aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. GAPDH und Aktin dienten als Ladekontrolle.

In allen untersuchten Zelllinien konnte eine Expression der Proteine RIP1 und MLKL nachgewiesen werden, wobei die Zelllinie SK-BR-3 verminderte RIP1- und MLKL-Expressionslevel im Vergleich zu den anderen Zelllinien aufwies. Des

Weiteren lassen sich große Unterschiede in der endogenen RIP3-Expression feststellen. Während die Zelllinie SK-BR-3 ähnliche Level wie die Referenz-Zelllinie HT 29 aufwies, konnte in der Zelllinie T47D nur geringe Level und in den Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 keine Expression von RIP3 ermittelt werden (Abbildung 3). Um zu überprüfen, ob das Fehlen der RIP3-Expression in den Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 auf eine verminderte mRNA-Expression zurückzuführen war, wurden mittels quantitativer RealTime-PCR die RIP3-mRNA-Expressionslevel in allen verwendeten Zelllinien untersucht.

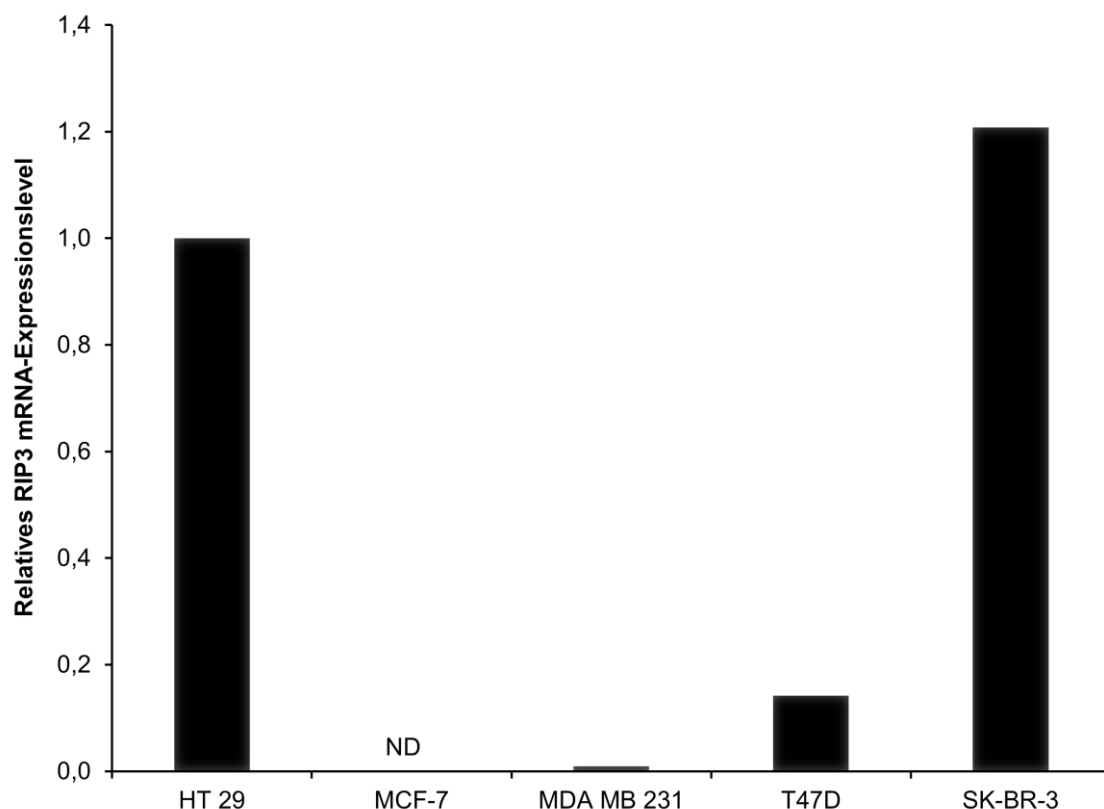


Abbildung 4: Untersuchung der mRNA-Expressionslevel von RIP3

Quantitative RT-PCR zur Analyse der relativen RIP3 mRNA-Expression der Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7, MDA MB 231, T47D, SK-BR-3, sowie der Colonkarzinom-Zelllinie HT 29. Normalisiert wurde auf die Expression der 18S rRNA. ND: nicht detektierbar.

Im Einklang mit der Proteinexpression konnte eine vergleichsweise hohe mRNA-Expression von RIP3 in den Zelllinien SK-BR-3 und HT 29 festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war die RIP3-mRNA-Expression in den T47D Zellen deutlich geringer und in den Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 nicht, bzw. nur marginal detektierbar (Abbildung 4).

4.1.2 Analyse der Nekroptose-Sensitivität

Zur Induktion der Nekroptose wurde eine Kombination aus z-VAD, TNF- α und BV6 verwendet, die bereits in anderen Arbeiten erfolgreich zum Auslösen der Nekroptose führte (80). In dieser Kombination aktiviert TNF- α durch seine Bindung an den TNF-Rezeptor den Nekroptose-Signalweg. Gleichzeitig inhibiert z-VAD als Pancaspase-Inhibitor die Apoptose. Das Smac-Mimetika BV6 verhindert den Abbau von RIP1, sodass dieses Protein der Nekroptose-Kaskade zur Verfügung steht.

Um den Effekt der Nekroptose-Induktion durch die Behandlung mit z-VAD, TNF- α und BV6 zu verdeutlichen, wurden alle Zelllinien zusätzlich noch mit Necrostatin oder Necrosulfonamid behandelt. Es handelt sich hierbei um Inhibitoren der Nekroptose. Necrostatin inhibiert das Protein RIP1, Necrosulfonamid das Protein MLKL, sodass die Nekroptose-Kaskade gehemmt wird. Im vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass ein Teil der verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien nicht alle Proteine der Nekroptose-Signalkaskade exprimiert. Daher wurde mittels eines Zytotoxizitäts-Assays untersucht, welchen Effekt die fehlende Expression der Nekroptose-assoziierten Proteine auf die Nekroptose-Induktion hat.

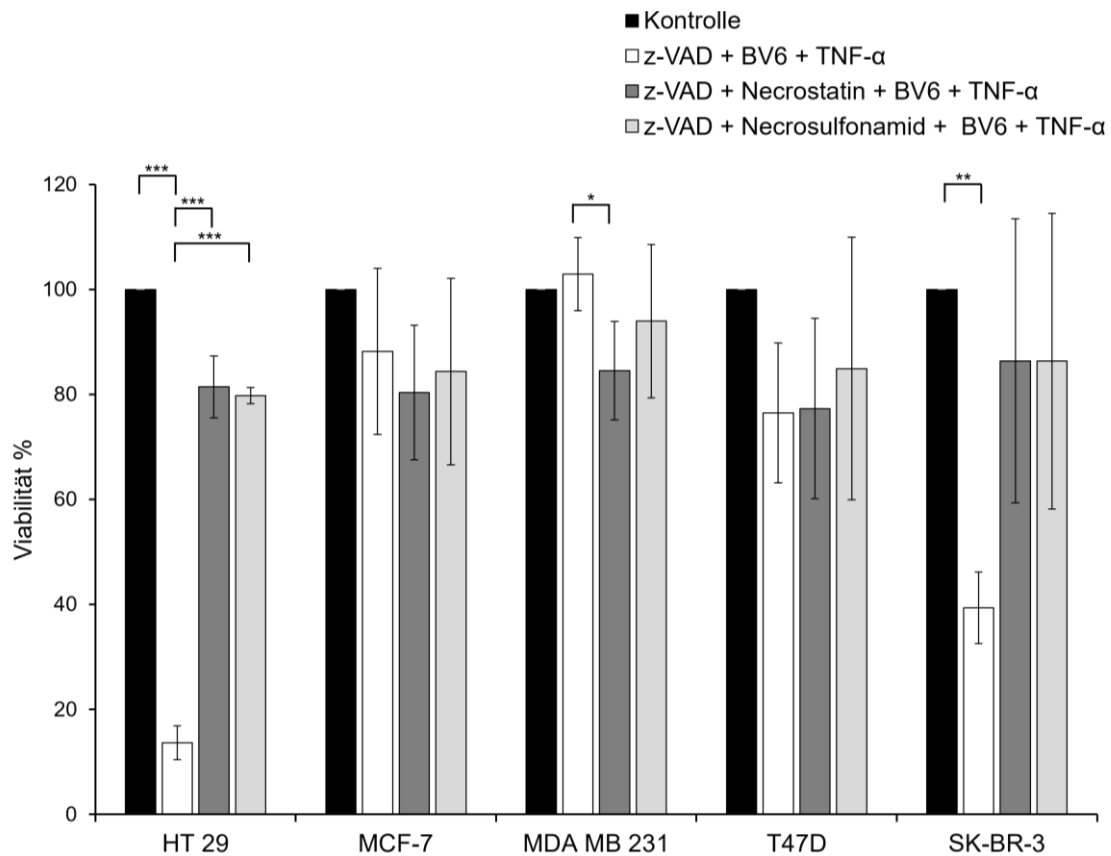


Abbildung 5: Untersuchung der Nekroptose-Sensitivität in den Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7, MDA MB 231, T47D und SK-BR-3

Alle Zelllinien wurden für 2 Stunden mit z-VAD (50 μ M) oder z-VAD (50 μ M) in Kombination mit Necrostatin (20 μ M), bzw. Necrosulfonamid (2 μ M) vorinkubiert. Anschließend wurde für weitere 48 Stunden BV6 (0,6 μ M) und TNF- α (25 ng/ml) hinzugegeben. Die Überlebensrate wurde mittels einer Kristallviolett-Färbung ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, deren Signifikanz mittels gepaartem t-Test berechnet wurde: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Hierbei konnte eine deutliche Nekroptose-Sensitivität der Kontrollzelllinie HT 29 beobachtet werden (Abbildung 5). Dieser Effekt wurde durch die gleichzeitige Behandlung mit den Inhibitoren Necrostatin und Necrosulfonamid wieder aufgehoben. Im vorangegangenen Versuch konnte eine RIP3-Defizienz in den Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 nachgewiesen werden. In diesen beiden Zelllinien führte der Nekroptose-Stimulus zu keinem deutlichen Verlust der Zellviabilität. MCF-7 Zellen zeigten ein mässiges Ansprechen mit ca. 10 % Zelltod auf die Behandlung mit z-VAD, BV6 und TNF- α , allerdings ließ sich der Effekt durch die Nekroptose-Inhibitoren nicht aufheben.

Die zwei weiteren Mammakarzinom-Zelllinien T47D und SK-BR-3 wiesen eine basale RIP3-Protein-Expression auf. Beide Zelllinien reagierten auf eine Nekroptose-Induktion mit einer deutlichen Verminderung der Zellzahl. Dieser

Effekt konnte in der Zelllinie T47D mit den Inhibitoren lediglich geringfügig wieder aufgehoben werden. Die Zelllinie SK-BR-3 weist ein im Vergleich zur Zelllinie HT 29 ähnliches Ansprechen auf die Inhibitoren Necrostatin und Necrosulfonamid auf. Der Zelltod konnte in dieser Zelllinie durch die Inhibitoren deutlich aufgehoben werden.

4.1.3 Analyse der Expression Nekroptose-assoziiierter Proteine nach Nekroptose-Stimulus

Im vorangegangenen Versuch konnte eine Nekroptose-Resistenz in RIP3-defizienten Zelllinien beobachtet werden. Zur genaueren Charakterisierung der Zelllinien wurde daher eine molekularbiologische Untersuchung der Aktivierung der RIP1-RIP3-MLKL-Signalkaskade durch den Nekroptose-Stimulus mit z-VAD, BV6 und TNF- α durchgeführt.

In der RIP3-positiven Referenz-Zelllinie HT 29 führte der Nekroptose-Stimulus zu einer Phosphorylierung der Proteine RIP1 und MLKL (Abbildung 6). Die Phosphorylierung beider Proteine konnte durch eine Vorbehandlung mit Necrostatin inhibiert werden. In den RIP3-positiven Zelllinien SK-BR-3 und T47D konnte ein ähnliches Ansprechen beobachtet werden. Allerdings konnte in den stimulierten T47D Zellen nur eine marginale Positivität des phosphorylierten MLKL detektiert werden. In den RIP3-defizienten Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 konnte nach Nekroptose-Stimulus eine Phosphorylierung von RIP1, allerdings nicht von MLKL nachgewiesen werden (Abbildung 6).

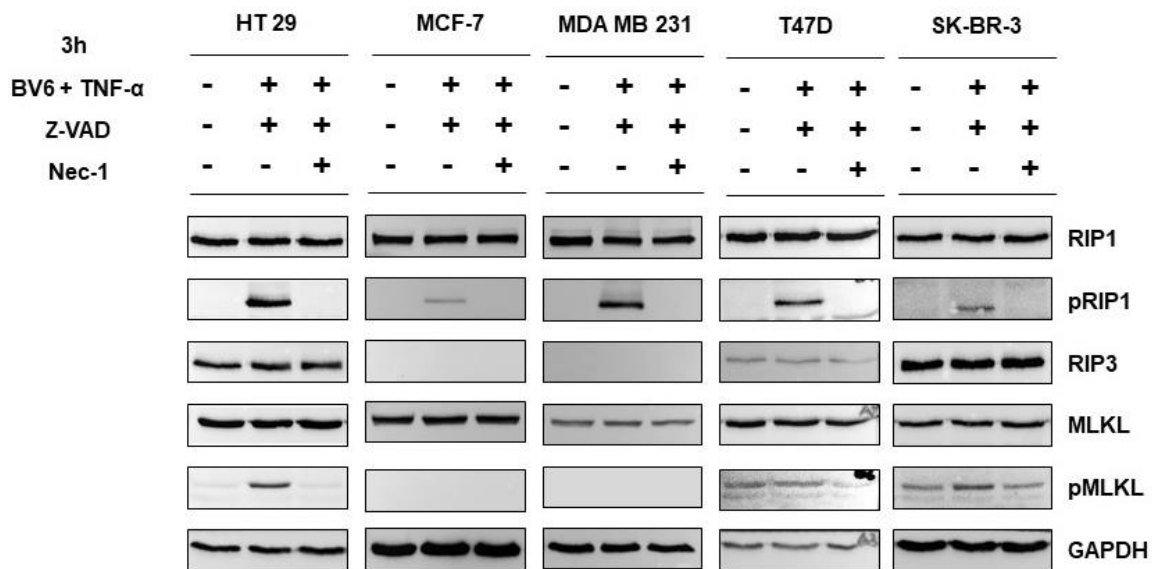


Abbildung 6: Qualitative Analyse der Expression Nekroptose-assoziiierter Proteine nach Induktion der Nekroptose

Qualitative Western Blot-Analyse zum Nachweis der phosphorylierten Nekroptose-assoziierten Proteine RIP1 und MLKL nach Nekroptose-Induktion mit z-VAD (50 μ M), BV6 (0,6 μ M) und TNF- α (25 ng/ml), bzw. Nekroptose-Inhibition mit Necrostatin (20 μ M) (Inkubationszeit von 3 Stunden). Es wurden 30 μ g Protein-Lysat auf einem 10 %igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Die unterschiedliche Reaktion der Mammakarzinom-Zellen gegenüber dem Nekroptose-Stimulus in der Western Blot-Analyse spiegelte die zuvor ermittelten Ergebnisse wider. RIP3-defiziente Mammakarzinom-Zellen zeigten im Western Blot auch nach dem Nekroptose-Stimulus keine Expression des phosphorylierten MLKL. Im Gegensatz dazu, konnte in der Referenzzelllinie HT 29 sowie weniger stark ausgeprägt in der Zelllinie SK-BR-3, nach der Nekroptose-Induktion eine Phosphorylierung des MLKL beobachtet werden.

4.2 Auswirkung einer modulierten Expression von RIP3 und MLKL auf die Nekroptose

Die bislang erhobenen Daten zeigten, dass in den RIP3-defizienten Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231, eine Nekroptose nicht ausgelöst werden konnte. Im Folgenden wurde der Einfluss der Expression von RIP3 und seiner Zielstruktur MLKL auf die Nekroptose-Sensitivität von Mammakarzinom-Zellen detaillierter untersucht.

4.2.1 Untersuchung der Effekte einer verminderten Expression von RIP3 und MLKL in den Zelllinien T47D und SK-BR-3

Um die Bedeutung einer verminderten Expression von RIP3 und MLKL für die Nekroptose-Sensitivität zu untersuchen, wurde die Expression dieser beiden Proteine in den Nekroptose-sensitiven und RIP3-positiven Zelllinien T47D und SK-BR-3 reduziert. In diesen beiden Zelllinien konnte sowohl die Expression des RIP3-Proteins, als auch eine verminderte Zellzahl durch die Nekroptose-Stimulation nachgewiesen werden.

Hierzu wurden zwei RIP3-spezifische siRNAs (si RIP3 #1, si RIP3 #2) und zwei MLKL-spezifische siRNAs (si MLKL #1, si MLKL #2) verwendet. Als Kontrolle diente eine unspezifische siRNA (scram).

Die Reduktion der RIP3- und MLKL-Expression wurde 48 Stunden nach der Transfektion der verschiedenen siRNAs untersucht (Abbildung 7). In der Zelllinie T47D konnte mit beiden RIP3 siRNAs eine deutliche Verminderung der RIP3-Expression erreicht werden. In der Zelllinie SK-BR-3 zeigte sich nach der Transfektion mit der siRNA RIP3 #1 eine deutliche Suppression der RIP3-Expression. Im Gegensatz dazu konnte durch die siRNA RIP3 #2 lediglich marginale Effekte erzielt werden. Die beiden MLKL-spezifischen siRNAs führte in beiden Zelllinien, T47D und SK-BR-3, zu einer deutlichen Verminderung der MLKL-Expression.

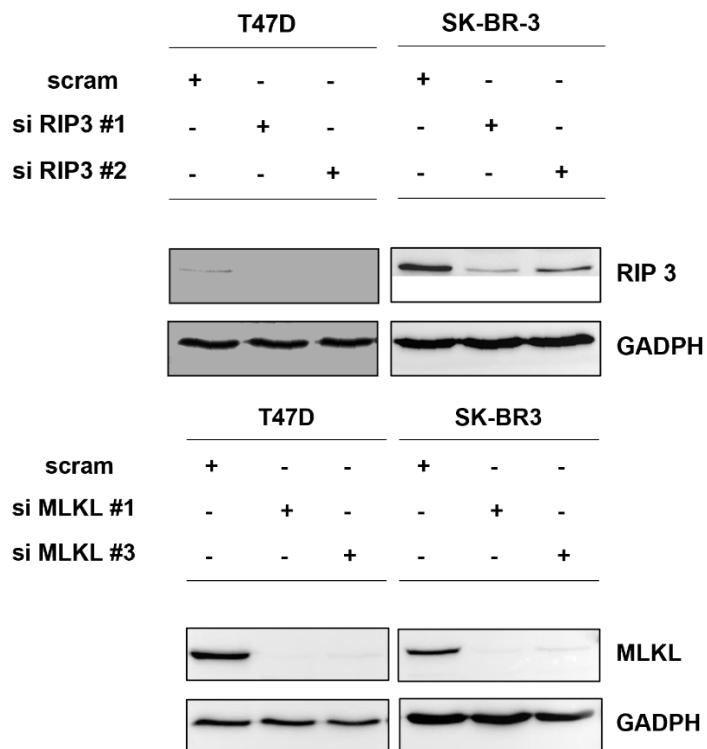


Abbildung 7: Analyse der siRNA-vermittelten Reduktion von RIP3 und MLKL in den Mammakarzinom-Zelllinien T47D und SK-BR-3.

Die Abbildung zeigt eine repräsentative qualitative Immunoblot-Analyse nach siRNA-induzierter Verminderung der Proteinlevel. Die Mammakarzinom-Zelllinien T47D und SK-BR-3 wurden mit 5 nM einer unspezifischen Kontroll-siRNA (scram) oder 5 nM einer spezifischen siRNA (si RIP3 #1, si RIP3 #2, si MLKL #1, si MLKL #2) transfiziert. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion lysiert. Es wurden 30 µg Protein-Lysat auf einem 10 %igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Zur Untersuchung des Effektes einer verminderten RIP3- oder MLKL-Expression auf die Nekroptose wurden im Anschluss an die Transfektion mit den RIP3- und MLKL-siRNAs die Zelllinien mit dem Nekroptose-Stimulus z-VAD, BV6 und TNF-α behandelt und bezüglich ihres Zellüberleben analysiert (Abbildung 8).

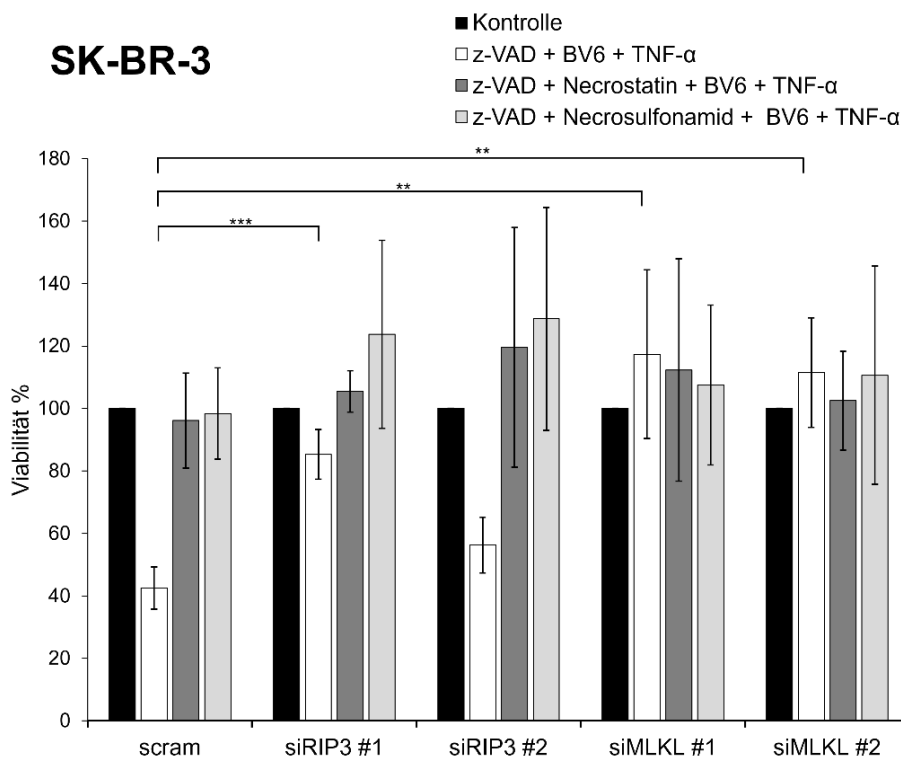
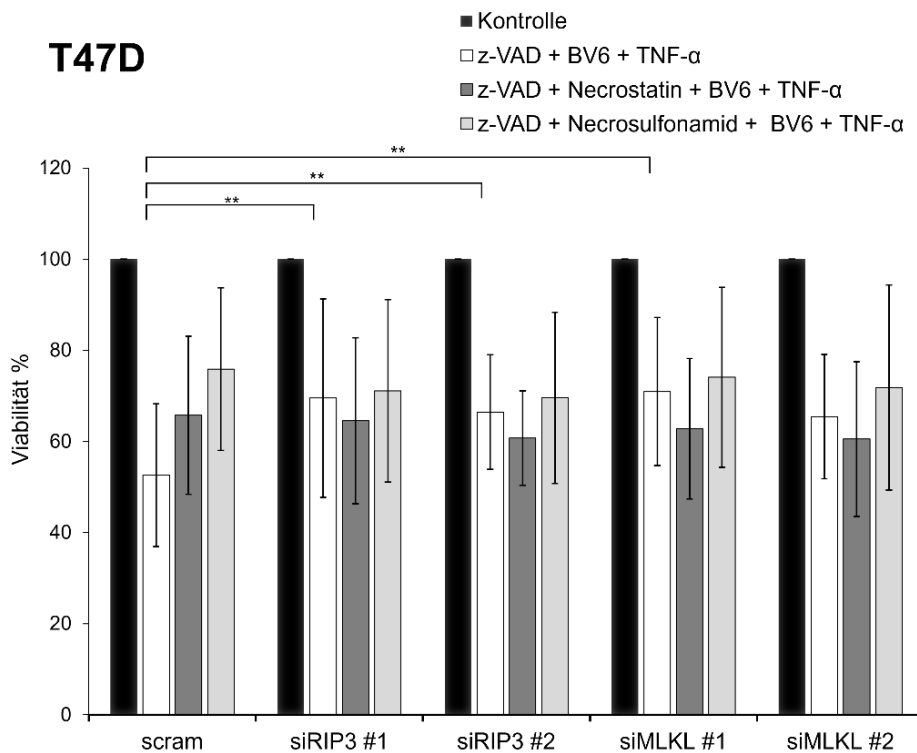


Abbildung 8: Analyse der Nekroptose-Sensitivität nach der siRNA-vermittelten Verminderung der Expression von RIP3 und MLKL.

Die Mammakarzinom-Zelllinien T47D und SK-BR-3 wurden transient mit 5 nM einer nicht-spezifischen siRNA (scram) und den RIP3- und MLKL-siRNAs transfiziert und nach 48 Stunden in 96-well Platten ausgesät. Zur Ermittlung der Nekroptose-Sensitivität wurden die Zellen in einem Zytotoxizitäts-Assay für 2 Stunden mit z-VAD (50 μ M) oder z-VAD in Kombination mit Necrostatin (20 μ M) oder Necrosulfonamid (2 μ M) inkubiert. Anschließend wurde für 48 Stunden BV6 (0,6 μ M) und TNF- α (25 ng/ml) hinzugegeben. Die Überlebensrate wurde mittels einer Kristallviolett-Färbung ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten, deren Signifikanz mittels gepaartem t-Test berechnet wurde: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

Im Einklang mit den bereits erhobenen Daten, konnte nach der Transfektion der scram siRNA in der Zelllinie T47D durch den Nekroptose-Stimulus eine deutliche Reduktion der Zell-Viabilität erzielt werden (Abbildung 8). Diese Verminderung konnte durch die Nekroptose-Inhibitoren Necrostatin und Necrosulfonamid nur zu einem gewissen Maße inhibiert werden. Die verminderte Expression von sowohl RIP3 als auch MLKL führte zu einer erhöhten Nekroptose-Resistenz der Zellen. Ähnliche Effekte konnten in der Zelllinie SK-BR-3 im Anschluss an die transiente Transfektion beobachtet werden. In den Kontroll-Zellen (scram) konnte eine deutliche Nekroptose-Sensitivität nachgewiesen werden. Diese Verminderung der Zellzahl zeigt sich unter dem Einfluss der Nekroptose-Inhibitoren nicht mehr (Abbildung 8). Die transiente Transfektion mit der siRNA RIP3 #1 und #2 führte zu einer deutlich (si RIP3 #1) bzw. marginal (si RIP3 #2) erhöhten Nekroptose-Resistenz. Der Effekt der Nekroptose-Induktion kann durch die beiden Nekroptose-Inhibitoren aufgehoben werden (Abbildung 8).

Nach Transfektion mit den zwei MLKL-siRNAs #1/#2 konnte in den SK-BR-3-Zellen ebenfalls eine signifikante Nekroptose-Resistenz beobachtet werden.

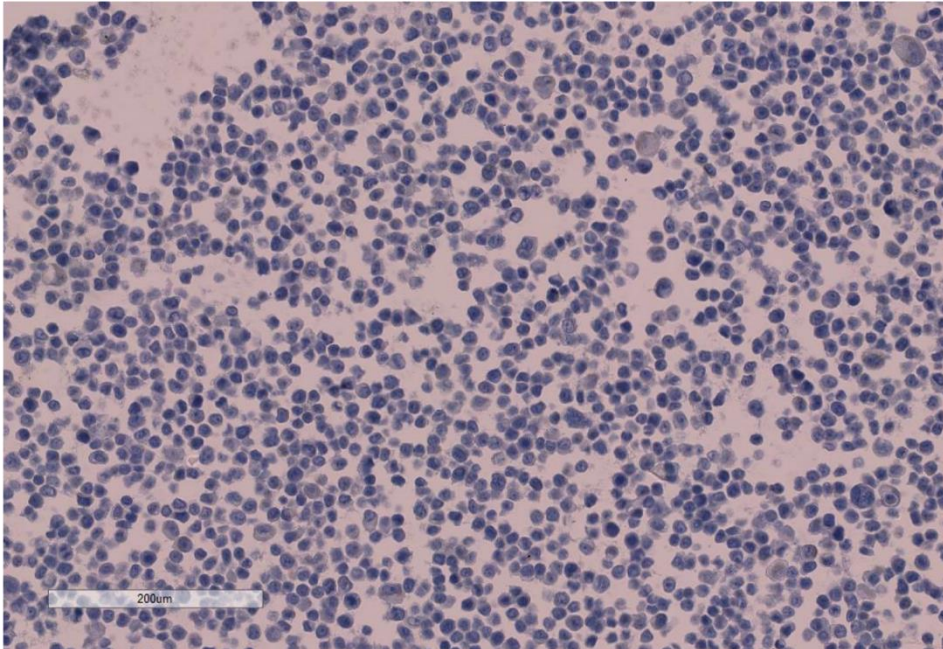
4.2.2 Untersuchung der Effekte einer RIP3-Überexpression in den Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231

Mit dem vorherigen Versuch konnte eine erhöhte Nekroptose-Resistenz durch die verminderte Expression von RIP3 und MLKL nachgewiesen werden. Im Umkehrschluss müssten Zellen, welche das Nekroptose-assoziierte Protein RIP3 nicht exprimieren, nach Transfektion mit einem RIP3-Überexpressionsplasmid die Sensitivität für den nekroptotischen Zelltod wiedererlangen.

Für die folgenden Versuche wurden die zwei RIP3-defizienten Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 verwendet. Zur Herstellung einer stabil-transfizierten Zelllinie wurde ein RIP3-Überexpressionsplasmid generiert. Zu diesem Zweck wurde die kodierende Sequenz des humanen RIP3 in den Vektor pcDNA3 kloniert. MCF-7 und MDA MB 231 Zellen wurden mit dem Plasmid pcDNA3-RIP3 und als Kontrolle mit dem Leervektor pcDNA3 transfiziert. Unter Selektionsdruck mittels geneticinhaltigem Medium wurden im Anschluss Einzelzellklone generiert. Die stabile Expression von RIP3 wurde immunhistochemisch und mittels einer Immunoblot-Analyse überprüft (Abbildung

9 und 10). Für die weiterführenden Versuche wurden Klone mit einer hohen RIP3-Expression ausgewählt.

MCF-7 pcDNA3



MCF-7 RIP3 #1

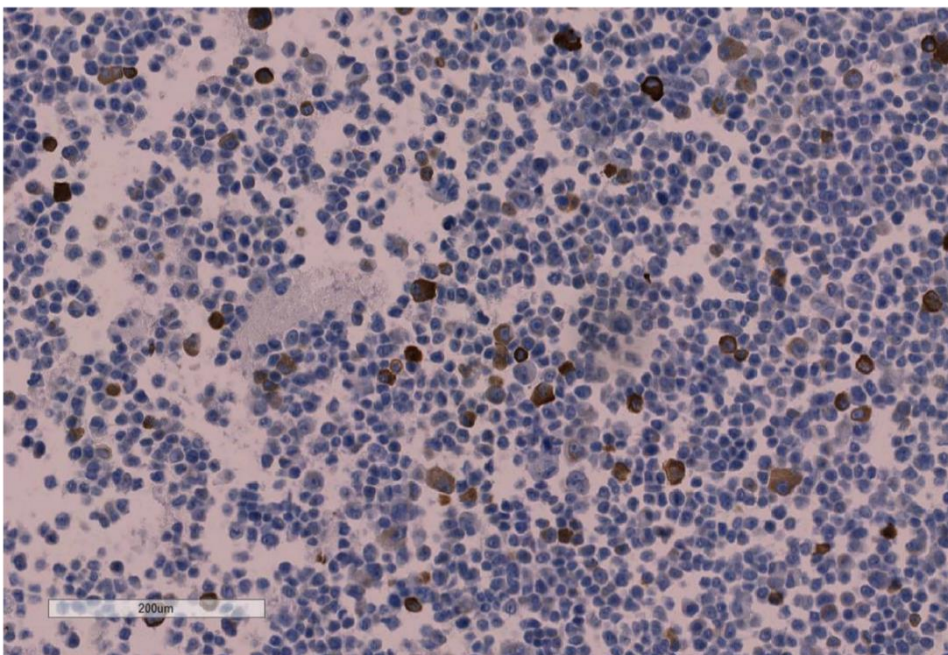


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis der RIP3-Expression nach stabiler Transfektion.

Die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 wurde mit einem RIP3-Überexpressionsplasmid, bzw. mit dem Kontrollplasmid pcDNA3 transfiziert und in G418-haltigem Wachstumsmedium selektioniert. Aus den anschließend generierten Einzelzellklonen wurde ein Zellblock hergestellt und die Expression von RIP3 immunhistochemisch untersucht. Exemplarisch dargestellt ist die RIP3-Färbung an dem Einzelzellklon MCF-7 RIP3 #1, sowie einem Einzelzellklon mit Kontrollplasmid pcDNA3. Der Maßstab entspricht 200 µm.

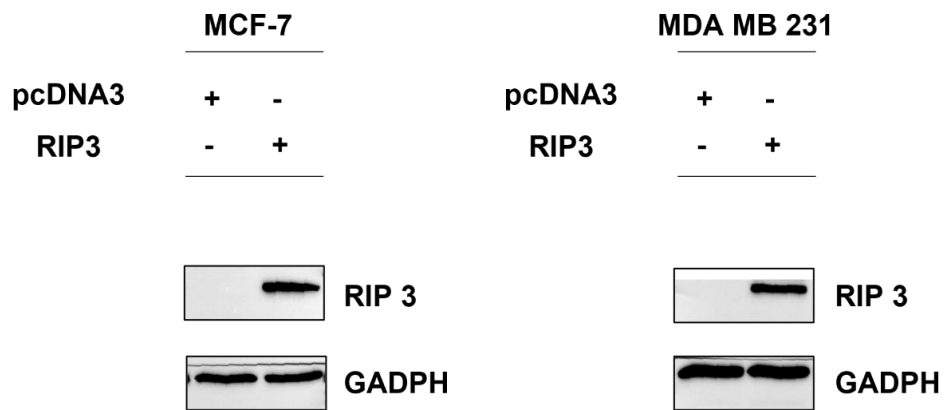


Abbildung 10: Analyse der RIP3-Expression nach stabiler Transfektion.

Die Abbildung zeigt eine repräsentative qualitative Immunoblot-Analyse zweier Einzelzellklone (MCF-7 RIP3 #1 und MDA MB 231 RIP3 #1) nach stabiler Transfektion mit dem Plasmid pcDNA3-RIP3. Es wurden 30 µg Protein-Lysat auf einem 10 %igen SDS-Gel elektrophoretisch ausgetrennt. GAPDH diente in dem Versuch als Ladekontrolle.

Zur Untersuchung des Effektes einer RIP3-Überexpression auf die Nekroptose wurde die stabil transfizierten Einzelzellklone mit dem Nekroptose-Stimulus behandelt und bezüglich ihres Zellüberlebens analysiert (Abbildung 11).

Ergebnisse

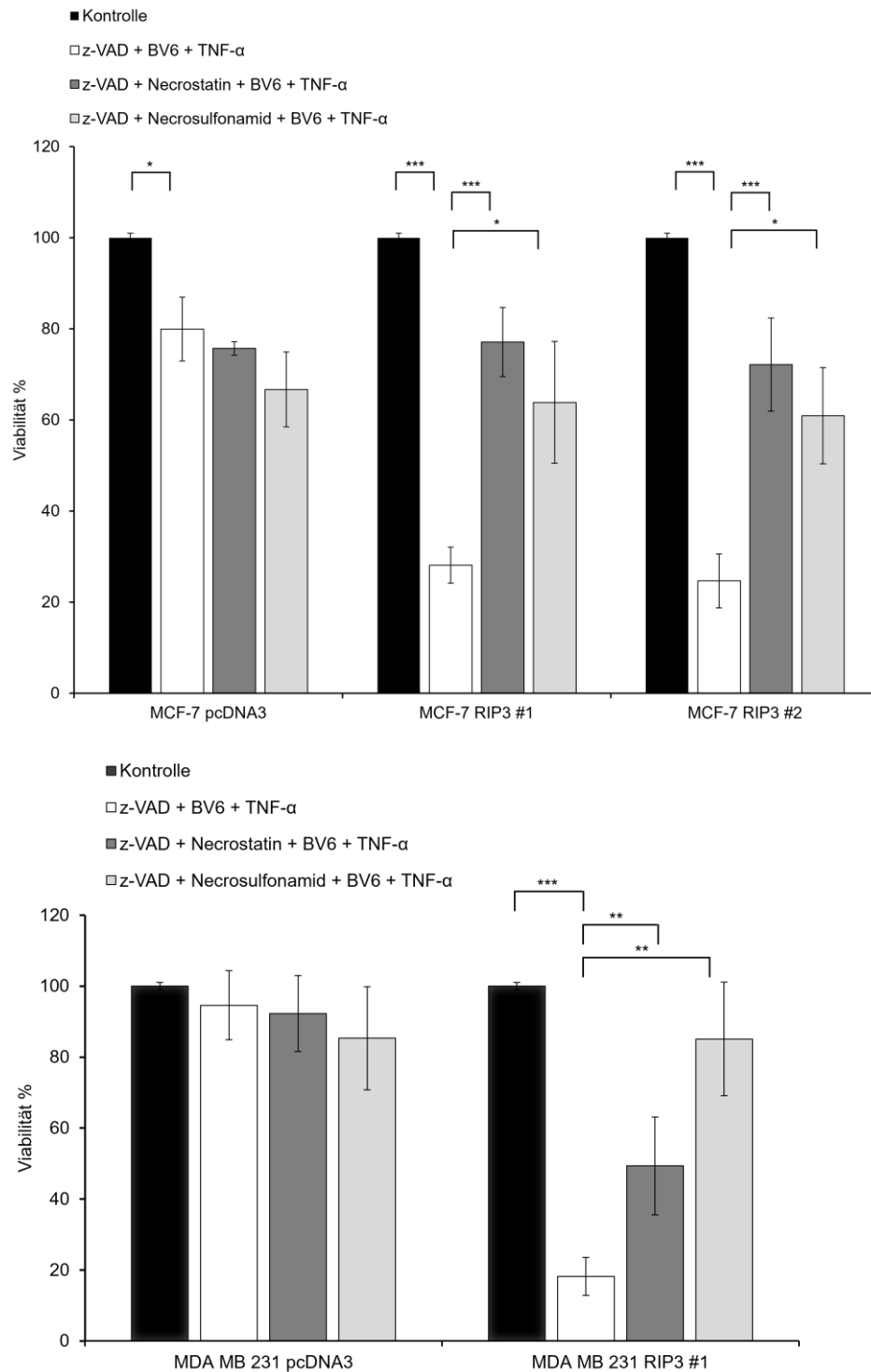


Abbildung 11: Analyse der Nekroptose-Sensitivität der RIP3-Überexpressionsklone MCF-7 #1/#2 und MDA MB 231 #1

Zur Ermittlung der Nekroptose-Sensitivität wurden die Zellen in einem Zytotoxizitäts-Assay für 2 Stunden mit z-VAD oder z-VAD in Kombination mit Necrostatin (20 μ M) oder Necrosulfonamid (2 μ M) inkubiert. Anschließend wurde für 48 Stunden BV6 (0,6 μ M) und TNF- α (25 ng/ml) hinzugegeben. Die obere Abbildung zeigt zwei mit RIP3 stabil transfizierte Zelllinien MCF-7 im Zytotoxizität-Assay im Vergleich zur Kontrolle, welche mit dem Leervektor pcDNA3 transfiziert wurde. Die untere Abbildung zeigt eine mit RIP3 stabil-transfizierte Zelllinie MDA MB 231 im Zytotoxizität-Assay im Vergleich zur Zelllinie mit dem Leervektor pcDNA3.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, deren Signifikanz mittels gepaartem t-Test berechnet wurde: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Sowohl in MCF-7 als auch in MDA MB 231 Zellen konnte durch die stabile Überexpression von RIP3 eine signifikante Erhöhung der Nekroptose-Sensitivität im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden. Diese Effekte konnten durch die Nekroptose-Inhibitoren Necrostatin und Necrosulfonamid wieder aufgehoben werden.

Im Einklang mit den Daten des Zytotoxizitäts-Assays (Abbildung 11), konnte durch die Nekroptose-Induktion mit z-VAD, BV6 und TNF α in den RIP3-überexprimierenden Zelllinien auch eine Phosphorylierung von MLKL nachgewiesen werden (Abbildung 12). Diese Phosphorylierung konnte wie auch in den vorangehenden Versuchen (Abbildung 6) mit dem Nekroptose-Inhibitor Necrostatin aufgehoben werden. Die Expression des Proteins RIP1 hat sich in den RIP3-Überexpressionsklonen im Vergleich zu den mit dem Leervektor-transfizierten Zelllinien nicht verändert (Siehe Abbildung 6 und 10).

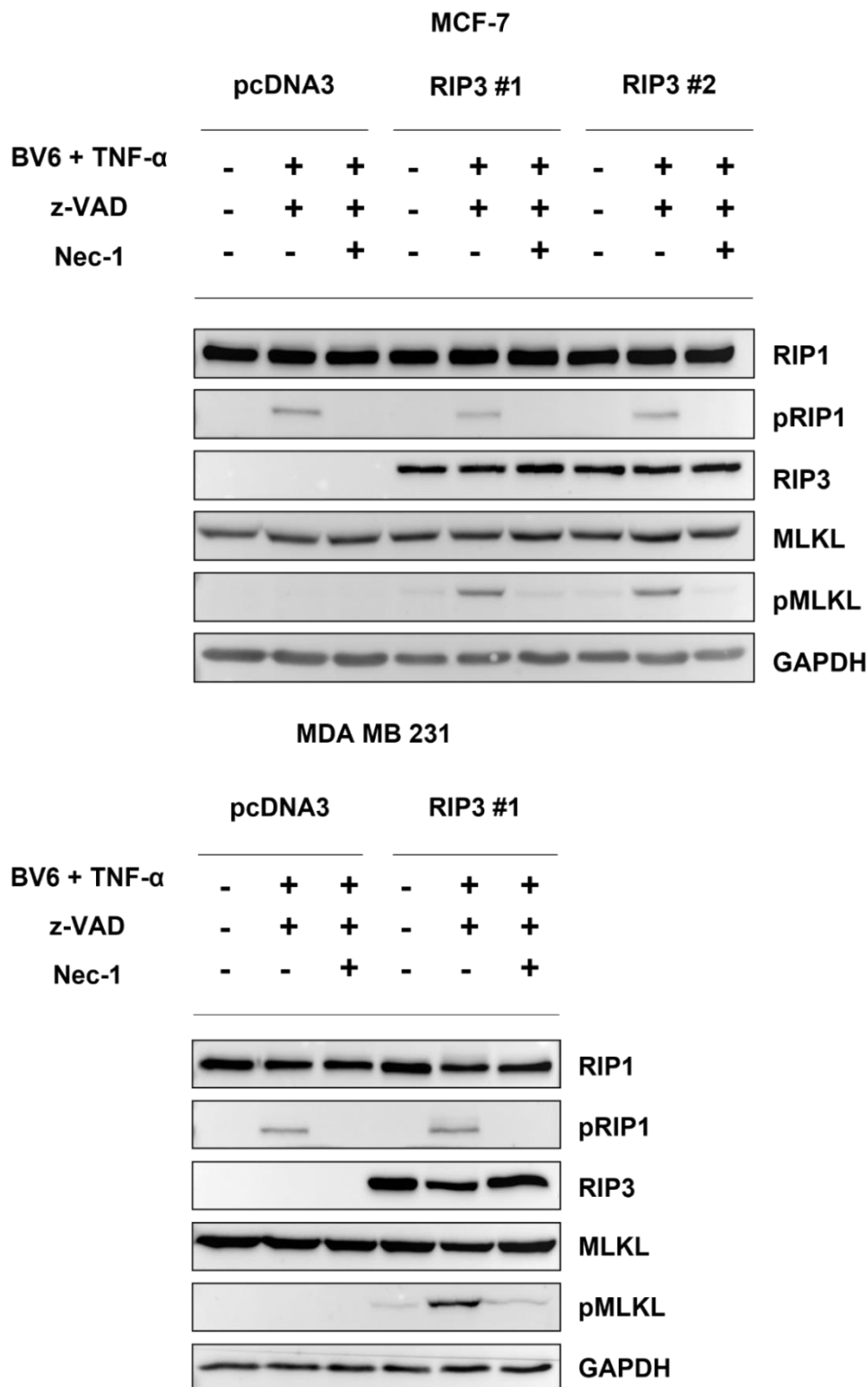


Abbildung 12: Qualitative Analyse der Nekroptose-assoziierten Proteine nach Induktion der Nekroptose in MCF-7 RIP3 #1 und #2 und MDA MB 231 RIP3 #1 Einzelzellklonen

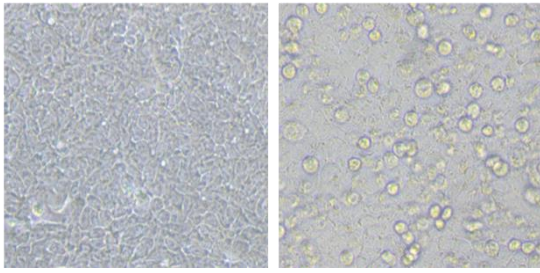
Qualitative Western Blot-Analyse zum Nachweis der Nekroptose-assoziierten Proteine RIP1, RIP3 und pRIP3, MLKL und pMLKL. Die Nekroptose-Induktion erfolgte für 2 Stunden mit z-VAD (50 μ M) oder z-VAD (50 μ M) in Kombination mit Necrostatin (20 μ M) oder Necrosulfonamid (2 μ M). Anschließend wurde für 3 Stunden BV6 (0,6 μ M) und TNF- α (25 ng/ml) hinzugegeben. Die Zellen wurden 5 Stunden nach der Nekroptose-Induktion lysiert. Es wurden 30 μ g Protein-Lysat auf einem 10 %igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. GAPDH diente als Ladekontrolle.

4.3 Untersuchungen der Zellmorphologie nach Nekroptose-Induktion

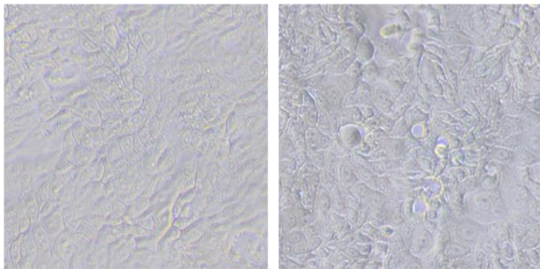
4.3.1 Beurteilung der Morphologie der Zellen unter dem Phasenkontrast-Mikroskop

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass eine Überexpression von RIP3 in Mammakarzinom-Zelllinien die Nekroptose-Sensitivität wiederherstellen konnte, stellte sich die Frage inwiefern sich die Morphologie der Zellen nach Nekroptose-Stimulus verändert. Dazu wurden die stabil mit dem RIP3-Überexpressionsplasmid transfizierten Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231, sowie die Colonkarzinom-Zelllinie HT 29 mit dem Nekroptose-Stimulus z-VAD, BV6 und TNF α behandelt. Die mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie erfolgte am Phasenkontrastmikroskop in einer 20-fachen Vergrößerung (Abbildung 13).

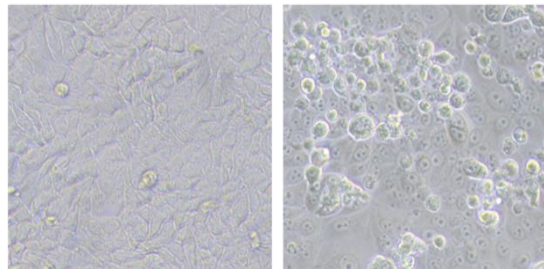
HT 29



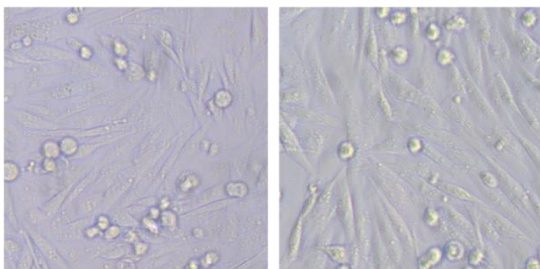
MCF-7 pcDNA3



MCF-7 RIP3 #1



MDA MB 231 pcDNA3



MDA MB 231 RIP3 #1

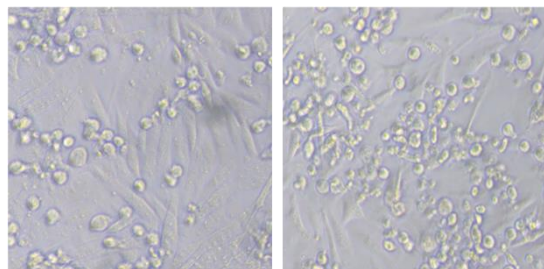


Abbildung 13: Morphologische Analyse der Zelllinien HT 29, MCF- pcDNA3, MCF-7 RIP3 #1, MDA MB 231 pcDNA3 und MDA MB 231 RIP3 #1

Die Zellen wurden entweder mit dem Nekroptose-Stimulus z-VAD (50 μ M) für 2 Stunden und anschließend mit BV6 (0,6 μ M) und TNF- α (25 ng/ml) für 48 Stunden inkubiert oder lediglich in Wachstumsmedium inkubiert. Die mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie erfolgte am Phasenkontrastmikroskop in einer 20-fachen Vergrößerung.

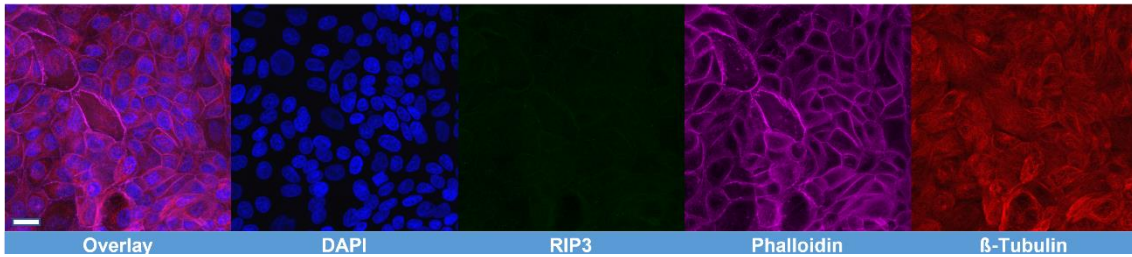
Die Abbildungen zeigen links jeweils die unstimulierten Zelllinien und rechts die Zelllinien nach Nekroptose-Induktion.

Alle Zelllinien zeigten nach dem Nekroptose-Stimulus eine morphologische Veränderung unterschiedlichsten Ausmaßes. Es konnte ein Abrunden der Zellen mit teilweiseem Verlust der Zellzellkontakte beobachtet werden. Während in den Kontrollzellen MCF-7 pcDNA3 und MDA MB 231 pcDNA3 einige wenige Zellen nach dem Nekroptose-Stimulus eine morphologische Änderung auswiesen, konnte sowohl in den RIP3-überexprimierenden Zelllinien MCF-7 RIP3 #1 und MDA MB 231 RIP3 #1 als auch in den RIP3-positiven Zellen HT 29 eine deutliche Reaktion auf den Nekroptose-Stimulus nachgewiesen werden.

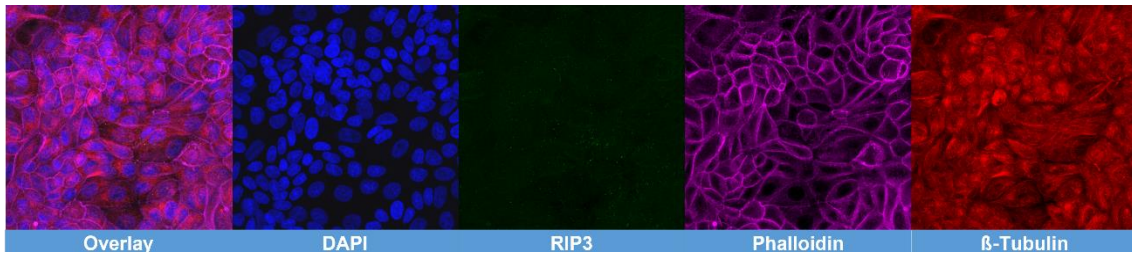
4.3.2 Immunfluoreszenz-Analyse zur Untersuchung der Zellmorphologie und der RIP3-Lokalisation

Zur genaueren Beurteilung der Zellmorphologie und der Lokalisation der Nekroptose-assoziierten Proteine wurden die stabil transfizierten Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 mit dem Nekroptose-Stimulus für 3 Stunden behandelt. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen RIP3 und β -Tubulin, sowie Phalloidin. Phalloidin ist ein Toxin welches aufgrund seiner hohen Affinität zu Aktin in molekularbiologischen Färbungen zur Darstellung des Zytoskeletts verwendet wird. β -Tubulin ist ein Protein, welches als Heterodimer in den Mikrotubuli des Zytoskeletts vorkommt. Die Kombinationsfärbung dient der genaueren Untersuchung zur Lokalisation des Protein RIP3 in der Nekroptose.

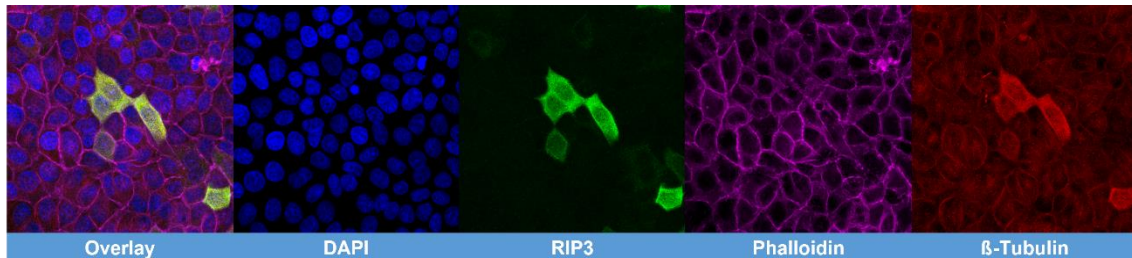
MCF-7 pcDNA3 unstimuliert



MCF-7 pcDNA3 stimuliert



MCF-7 RIP3 #1 unstimuliert



MCF-7 RIP3 #1 stimuliert

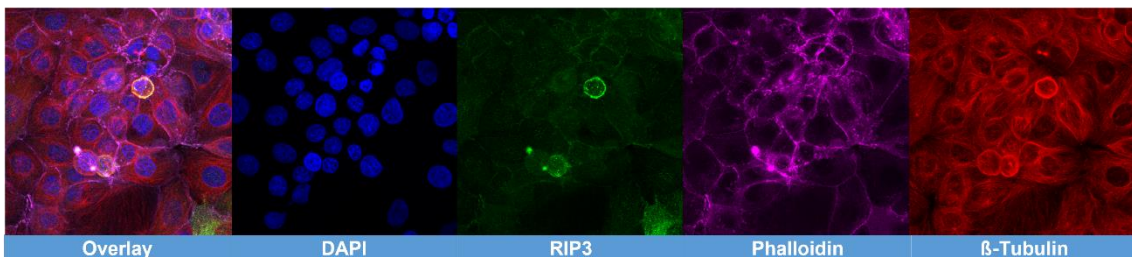
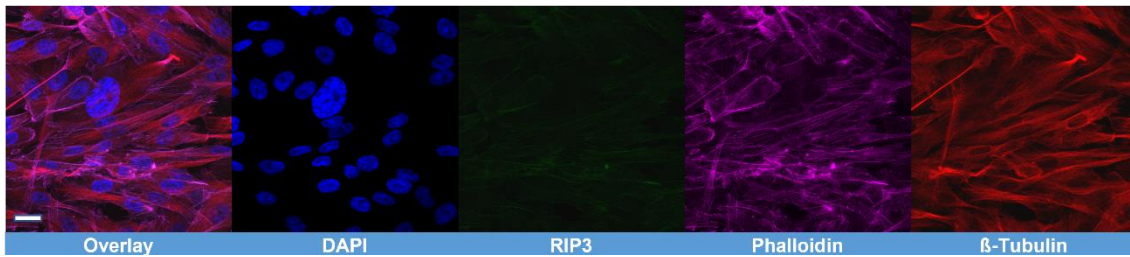


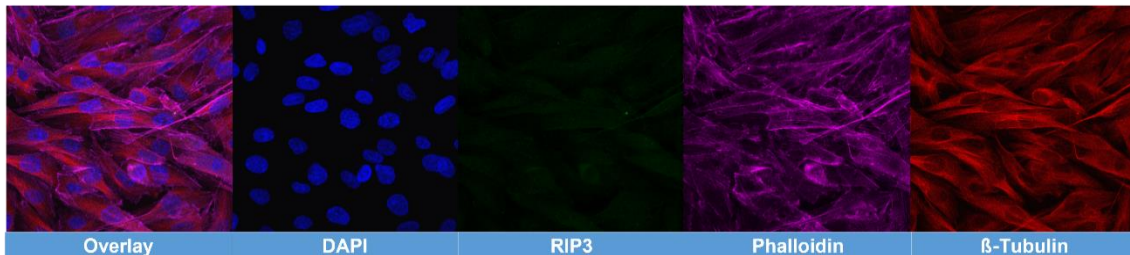
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von RIP3, Phalloidin, β -Tubulin in MCF-7 pcDNA3 und MCF-7 RIP3#1

Die Ansätze wurden mit dem Nekroptose-Stimulus z-VAD (50 μ M) für 2 Stunden und anschließend mit einer Kombination aus BV6 (0,6 μ M) und TNF- α (25 ng/ml) für 3 Stunden inkubiert. Die Immunfluoreszenzfärbung der Zellen wurde mit einem anti-RIP3 Antikörper (grün), Phalloidin (violett) und einem anti- β -Tubulin Antikörper (rot) durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Die Auswertung mittels repräsentativen Bildern erfolgte am Konfokalmikroskop. Der Maßstab entspricht 25 μ m.

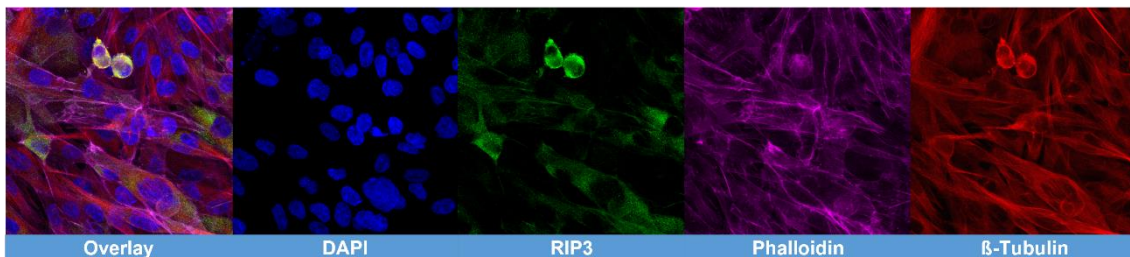
MDA MB 231 pcDNA3 unstimuliert



MDA MB 231 pcDNA3 stimuliert



MDA MB 231 RIP3 #1 unstimuliert



MDA MB 231 RIP3 #1 stimuliert

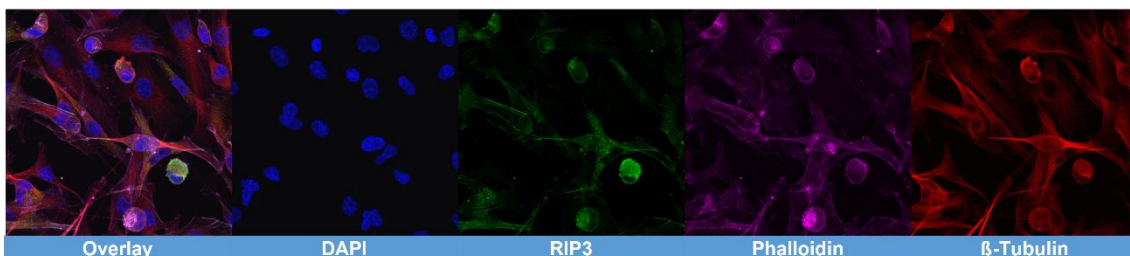


Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung von RIP3, Phalloidin, β -Tubulin in MDA MB 231 pcDNA3 und MDA MB 231 RIP3 #1

Die Ansätze wurden mit dem Nekroptose-Stimulus z-VAD (50 μ M) für 2 Stunden und anschließend mit einer Kombination aus BV6 (0,6 μ M) und TNF- α (25 ng/ml) für 3 Stunden inkubiert. Die Immunfluoreszenzfärbung der Zellen wurde mit einem anti-RIP3 Antikörper (grün), Phalloidin (violett) und einem anti- β -Tubulin Antikörper (rot) durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Die Auswertung mittels repräsentativen Bildern erfolgte am Konfokalmikroskop. Der Maßstab entspricht 25 μ m.

Sowohl MCF-7 als auch MDA MB 231 Zellen zeigten nach Transfektion mit dem Überexpressionsplasmid pcDNA-RIP3 im Vergleich zu den mit dem Leervektor pcDNA3 transfizierten Zellen eine positive Immunfluoreszenz-Reaktion auf das Protein RIP3. Nach dem Nekroptose-Stimulus konnte eine Veränderung der Zellmorphologie vor allem in der Zelllinie MDA MB 231 nachgewiesen werden.

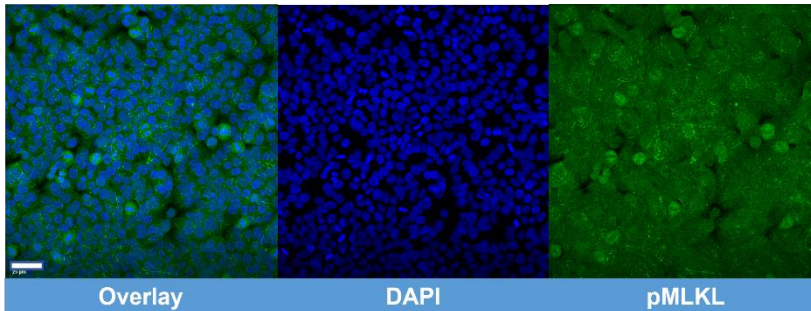
Die Zellen wiesen sowohl mit dem Leervektor, als auch mit dem Überexpressionsplasmid ein spindelförmiges Wachstum auf. In der mit dem Überexpressionsplasmid transfizierten Zelllinie fanden sich RIP3 positive Zellen, welche bei Nekroptose-Stimulus ein deutliches Abrunden der gesamten Zelle aufwiesen (Abbildung 15). Die übrigen RIP3-negativen Zellen zeigten dieses Verhalten nicht. Eine Veränderung im Verhalten im Zellverbundes kann angedeutet in der Zelllinie MCF-7 gesehen werden. Die mit dem RIP3-Überexpressionsplasmid transfizierte Zelllinie MCF-7 zeigte unter dem Nekroptose-Stimulus in einer Zelle ein Abkugeln der Zelle, sowie ein angedeutetes Herauslösen aus dem Zellverbund (Abbildung 14). Die RIP3-positiven Zellen der mit dem Überexpressionsplasmid pcDNA3-RIP3 stabil transfizierten Zelllinie MCF-7 zeigten ohne den Nekroptose-Stimulus ein nukleozytoplasmatisches Färberergebnis. Mit dem Nekroptose-Stimulus veränderte sich das Färbemuster in ein membranäres (Abbildung 14). Dieser Effekt konnte in der Zelllinie MDA MB 231 ebenfalls, allerdings in schwächerer Ausprägung beobachtet werden (Abbildung 15).

4.3.3 Immunfluoreszenz-Analyse zur Untersuchung der Lokalisation des Nekroptose-assoziierten Proteins pMLKL

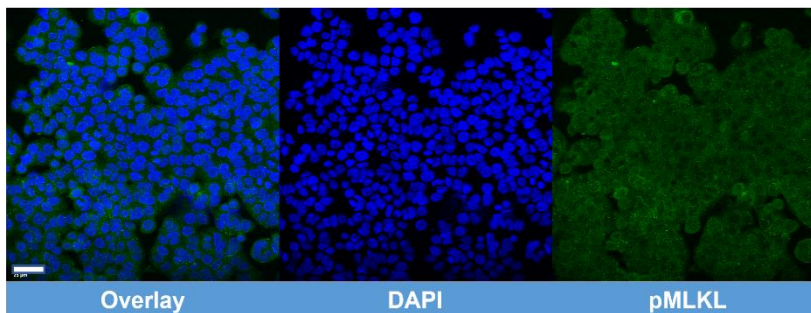
Die bisherigen Immunfluoreszenz-Analysen konnten als Konsequenz des Nekroptose-Stimulus in den mit dem Überexpressionsplasmid transfizierten Zelllinien ein Abrunden der Zellen, sowie einen partiellen Verlust des Zellverbundes nachweisen. In den weiteren Immunfluoreszenz-Analysen wurde die Lokalisation des phosphorylierten MLKL-Proteins genauer untersucht. Im folgenden Experiment wurde zusätzlich zur Referenz-Zelllinie HT 29 die RIP3-positive Zelllinie SK-BR-3 und die RIP3-negative Zelllinie MCF-7 verwendet. Im Anschluss an einen Nekroptose-Stimulus wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen das Protein pMLKL durchgeführt. In der Immunfluoreszenz-Analyse konnte in allen untersuchten Zelllinien ein membranäres Färberergebnis im Bereich der Zell-Zell-Kontakte für das Protein pMLKL beobachtet werden (Abbildung 16). Dieses Färbeergebnis zeigte sich sowohl in den zuvor stimulierten, als auch in den unstimulierten Zellen und unabhängig vom RIP3-Expressionsstatus. Eine verstärkte Lokalisation von pMLKL an der Plasmamembran konnte nach dem Nekroptose-Stimulus nicht detektiert werden.

Allerdings wiesen die Zellen nach der kurzen Stimulation von 3 Stunden auch keine Nekroptose-typischen morphologischen Änderungen, wie beispielsweise ein Abkugeln der Zellen aus dem Zellverband, auf.

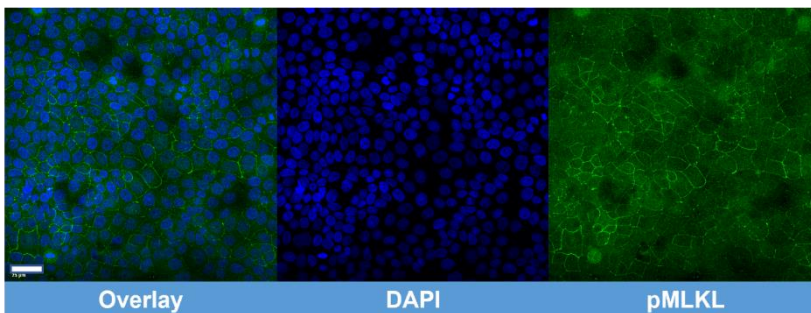
HT 29 unstimuliert



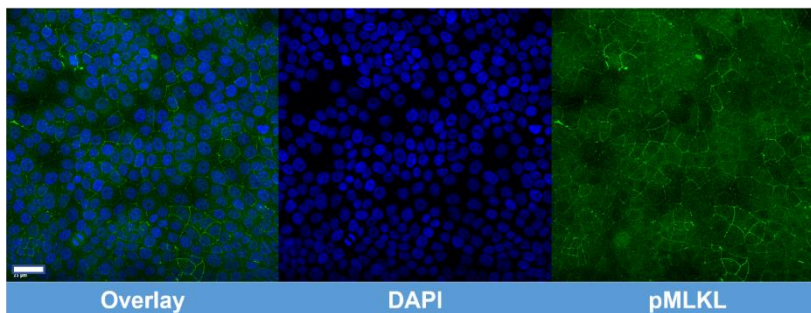
HT 29 stimuliert



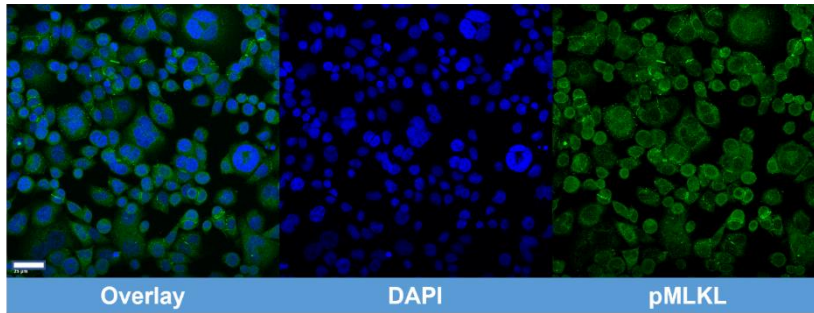
MCF-7 unstimuliert



MCF-7 stimuliert



SK-BR-3 unstimuliert



SK-BR-3 stimuliert

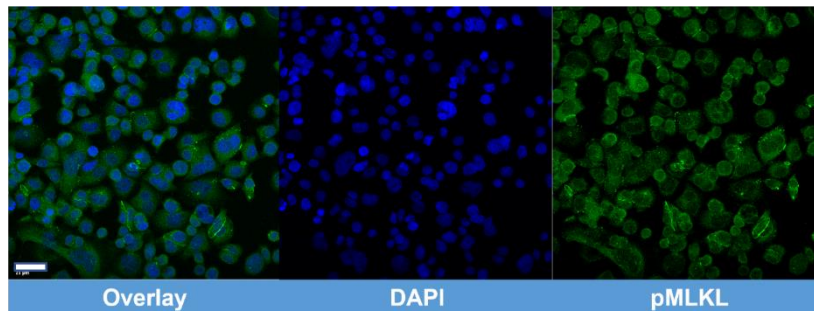


Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung pMLKL in den Zelllinien HT 29, MCF-7 und SK-BR-3

Die Zellen wurden mit dem Nekroptose-Stimulus z-VAD (50 μ M) für 2 Stunden und anschließend mit einer Kombination aus BV6 (0,6 μ M) und TNF- α (25 ng/ml) für 3 Stunden inkubiert. Die Immunfluoreszenzfärbung der Zellen wurde mit einem anti-pMLKL Antikörper (grün) durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Die Auswertung mittels repräsentativen Bildern erfolgte am Konfokalmikroskop. Der Maßstab entspricht 25 μ m.

Da im vorangehenden Versuch auch ohne Nekroptose-Stimulus eine membranäre Lokalisation von pMLKL im Bereich der Zell-Zell-Kontakte beobachtet werden konnte, sollte diese Lokalisation genauer untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Co-Färbungen mit pMLKL sowie E-Cadherin, einem Bestandteil der Adhärenz-Verbindungen bzw. Occludin, einem Bestandteil der Tight Junctions durchgeführt. Während E-Cadherine basolateral lokalisiert sind, bilden Tight Junctions die Grenze zwischen apikalen und basolateralen Membranen.

In nachfolgenden Immunfluoreszenz-Analysen konnte keine Co-Lokalisation von pMLKL und E-Cadherin nachgewiesen werden (Abbildung 17). Allerdings konnte eine Co-Lokalisation von pMLKL und Occludin in den Zelllinien MCF-7 und SK-BR-3 (Abbildung 18) beobachtet werden.

MCF-7 unstimuliert

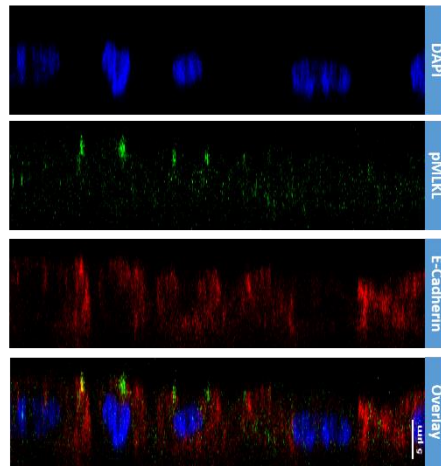
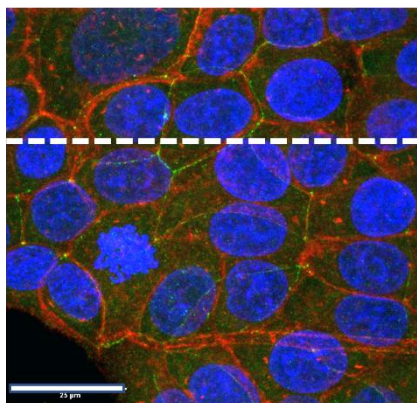
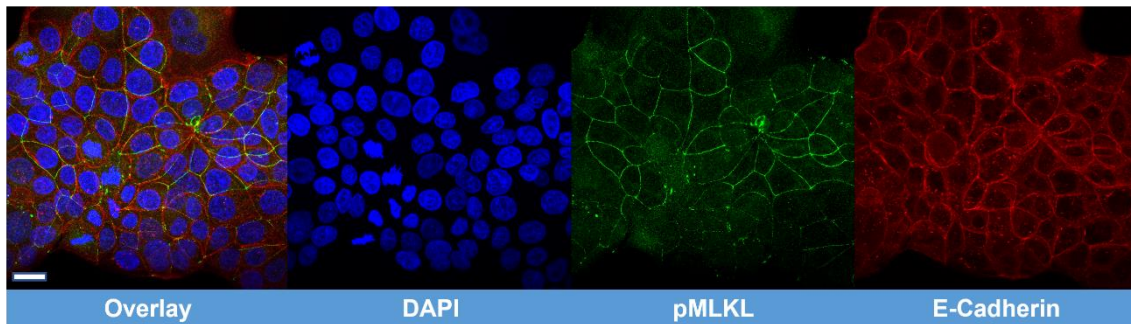
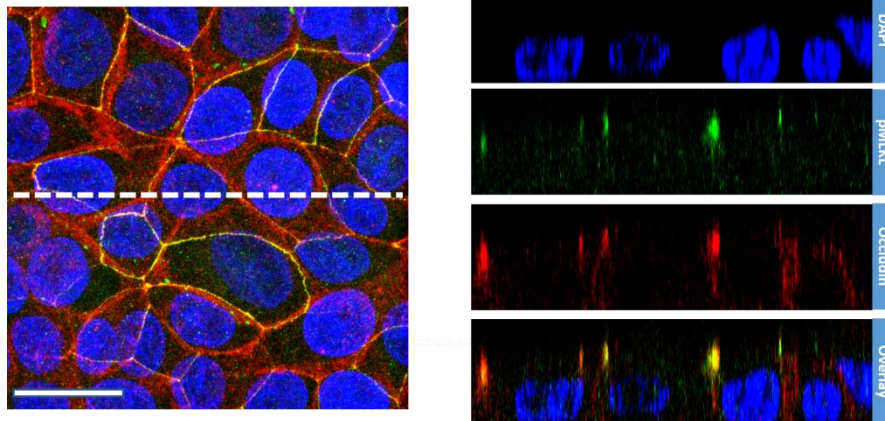


Abbildung 17: Analyse der Lokalisation von pMLKL und E-Cadherin in der Zelllinie MCF-7
Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem anti-pMLKL Antikörper (grün) und anti-E-Cadherin Antikörper (rot) durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Die Auswertung der repräsentativen Bilder erfolgte am Konfokalmikroskop (oben). Der Maßstab entspricht 25 µm. Zusätzlich erfolgte eine repräsentative Analyse entlang der z-Achse (unten).

MCF-7 unstimuliert



SK-BR-3 unstimuliert

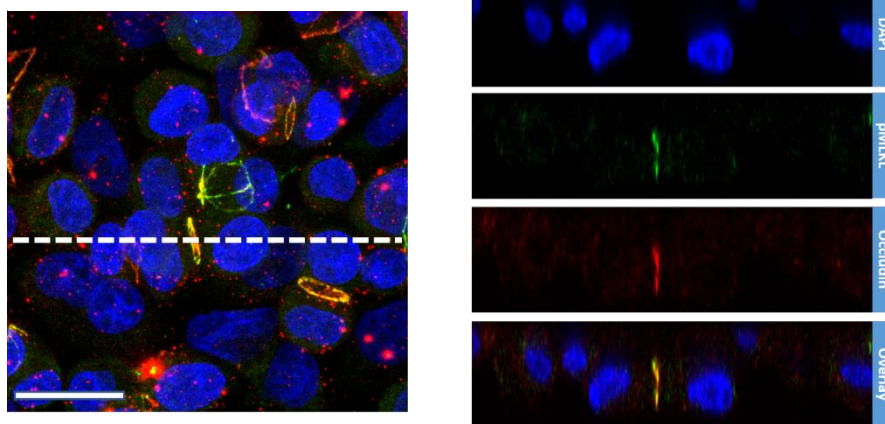


Abbildung 18: Analyse der Lokalisation von pMLKL und Occludin in den Zelllinien MCF-7 und SK-BR-3

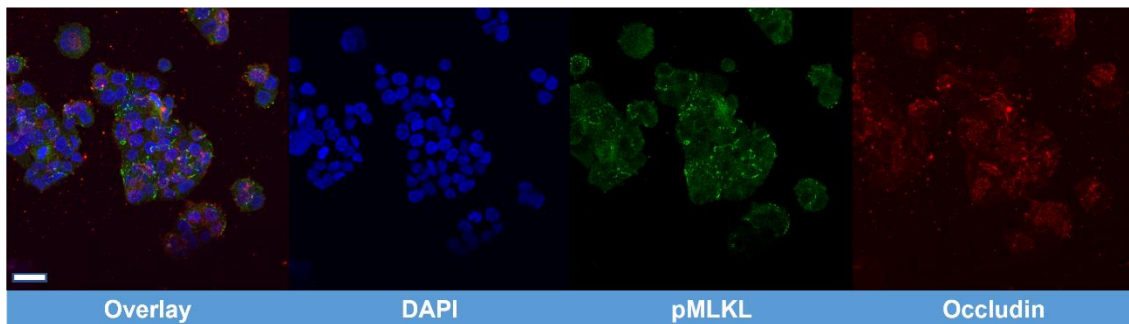
Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem anti-pMLKL Antikörper (grün) und anti-Occludin Antikörper (rot) durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Die Auswertung der repräsentativen Bilder erfolgte am Konfokalmikroskop. Zusätzlich erfolgte eine repräsentative Analyse entlang der z-Achse. Der Maßstab entspricht 25 µm.

Diese Co-Lokalisation von pMLKL und Occludin wurde im nächsten Schritt an allen anderen in der Studie verwendeten Mammakarzinom-Zellen sowie der Referenzzelllinie HT 29 untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss eines Nekroptose-Stimulus auf die Co-Lokalisation analysiert.

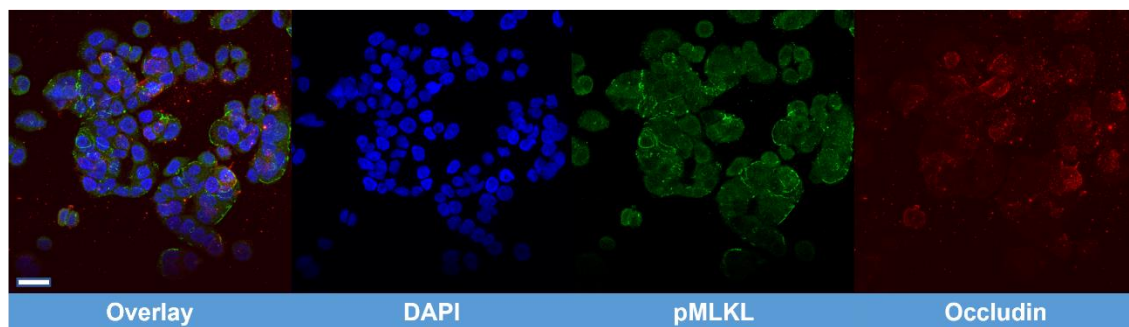
Mittels Immunfluoreszenzanalysen konnte in der Zelllinie HT 29 sowohl eine Positivität für pMLKL als auch für Occludin beobachtet werden. Eine Co-Lokalisation zeigte sich in der Zelllinie nicht (Abbildung 19). Anders hingegen zeigte die Zelllinie MCF-7 eine ausgeprägte Co-Lokalisation von pMLKL mit Occludin. Dieses Ergebnis kann in einer geringeren Intensität auch in der Zelllinie SK-BR-3 beobachtet werden (Abbildung 19).

In den Zelllinien MDA MB 231 und T47D konnte weder in unstimulierten noch in stimulierten Zellen eine pMLKL- oder Occludin-Positivität nachgewiesen werden (Abbildung 19). In keiner Zelllinie konnte nach dem Nekroptose-Stimulus eine Änderung in der Lokalisation von pMLKL bzw. Occludin beobachtet werden. Allerdings wiesen die Zellen nach der kurzen Stimulation von 3 Stunden auch keine Nekroptose-charakteristischen Veränderungen auf.

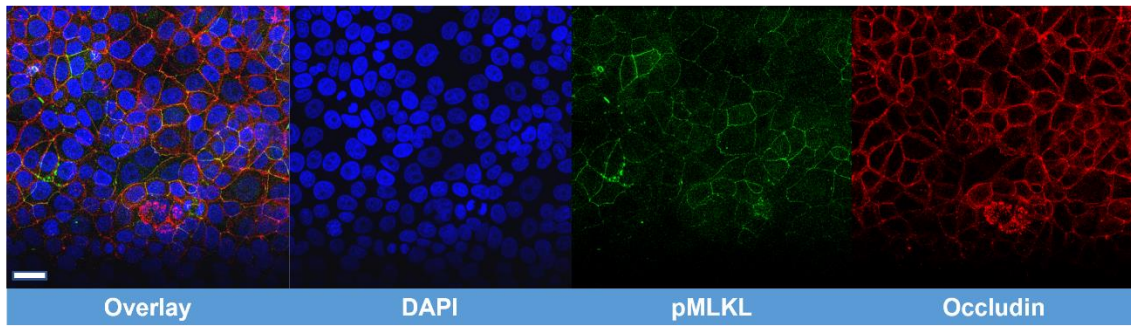
HT 29 unstimuliert



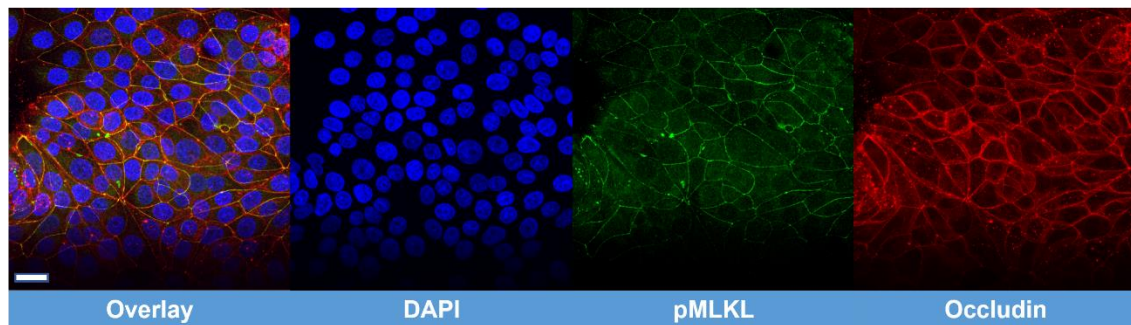
HT 29 stimuliert



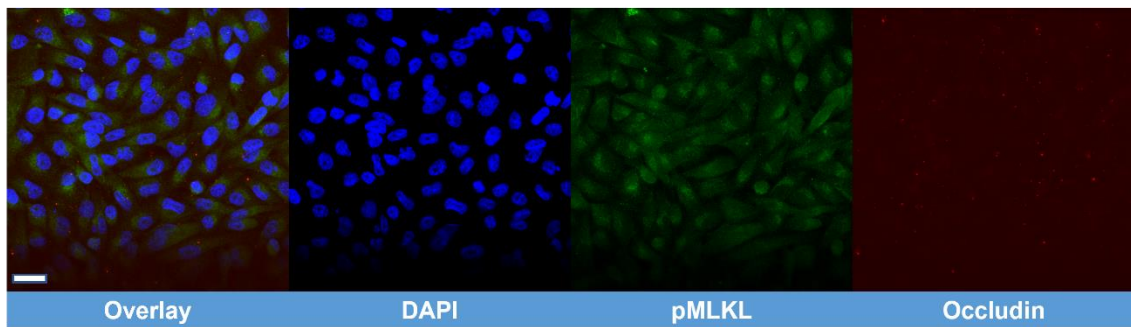
MCF-7 unstimuliert



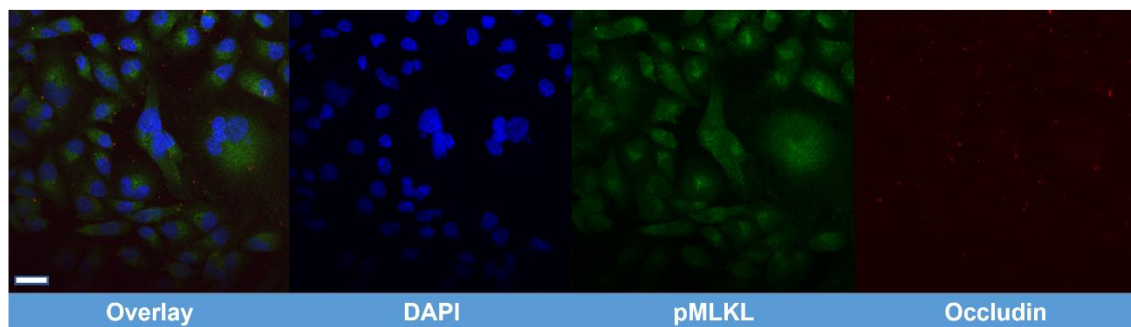
MCF-7 stimuliert



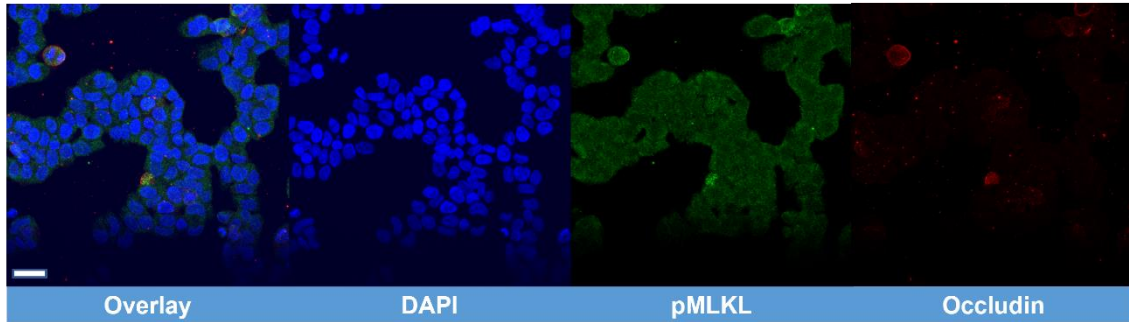
MDA MB 231 unstimuliert



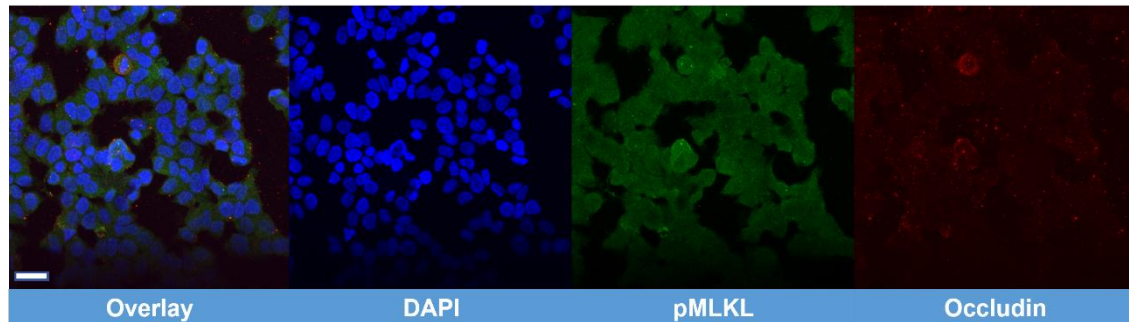
MDA MB 231 stimuliert



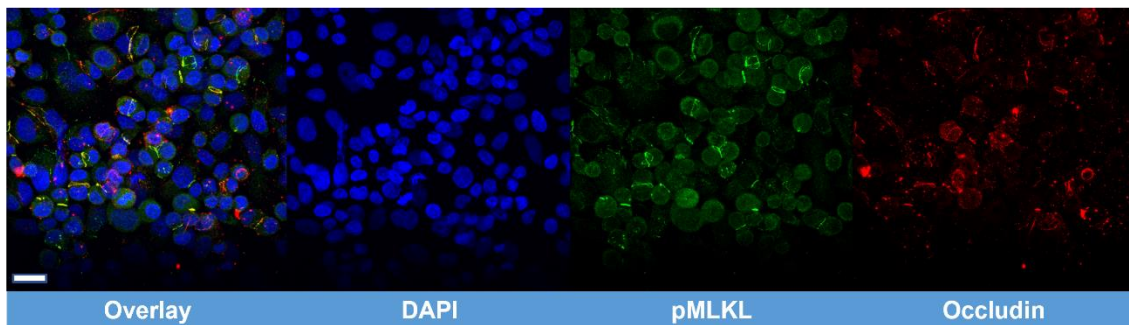
T47D unstimuliert



T47D stimuliert



SK-BR-3 unstimuliert



SK-BR-3 stimuliert

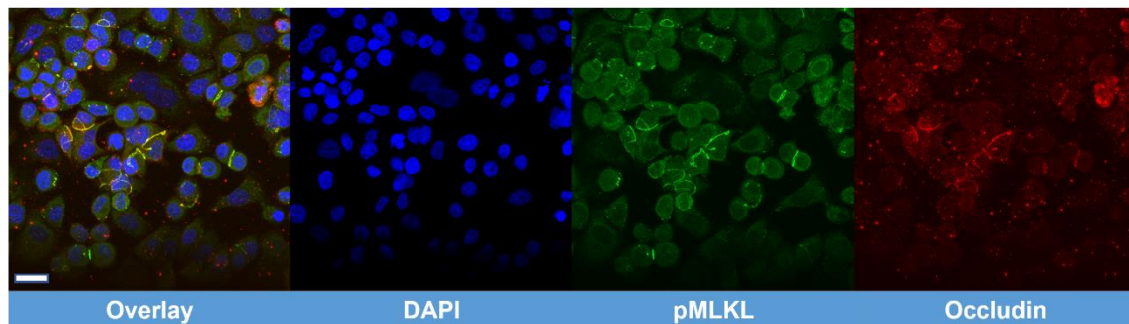


Abbildung 19: Analyse der Lokalisation von pMLKL und Occludin in den Zelllinien HT 29, MCF-7, MDA MB 231, T47D und SK-BR-3

Die Zellen wurden entweder mit dem Nekroptose-Stimulus z-VAD (50 μ M) für 2 Stunden und anschließend mit BV6 (0,6 μ M) und TNF- α (25 ng/ml) für 3 Stunden inkubiert oder lediglich in Wachstumsmedium inkubiert. Die Immunfluoreszenzfärbung der Zellen wurde mit einem anti-pMLKL Antikörper (grün) und anti-Occludin Antikörper (rot) durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Die Auswertung der repräsentativen Bilder erfolgte am Konfokalmikroskop. Der Maßstab entspricht 25 μ m.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Nekroptose-Sensitivität von Mammakarzinom-Zelllinien untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Expression unterschiedlicher Nekroptose-assoziiierter Proteine sowie die Effekte eines Nekroptose-Stimulus auf die Viabilität und Morphologie der Zellen analysiert. Zusätzlich wurden die Effekte einer modulierten Expression von MLKL und RIP3 hinsichtlich der Nekroptose-Sensitivität charakterisiert und die zelluläre Lokalisation von RIP3 und pMLKL mittels Immunfluoreszenz untersucht.

5.1 Expressionsanalyse der Nekroptose-assoziierten Proteine

Zu Beginn dieser Arbeit erfolgte eine Expressions-Analyse der Nekroptose-assoziierten Proteine RIP1, RIP3 und MLKL sowie des TNF- α Rezeptors (TNF R1) in unterschiedlichen Mammakarzinom-Zelllinien (MCF-7, MDA MB 231, T47D und SK-BR-3). Es konnte nachgewiesen werden, dass lediglich die Zelllinien SK-BR-3 und T47D alle untersuchten Proteine exprimierten. Während die Proteine RIP1 und MLKL von allen Zelllinien exprimiert wurden, konnte in den Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 keine Expression von RIP3 nachgewiesen werden (Abbildung 3). Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten aus einer Studie von Khorsandi *et al.* überein, in der ebenfalls niedrige mRNA-Expressionslevel des Nekroptose-assoziierten Proteins RIP3 in der Zelllinie MCF-7 dokumentiert wurden (84).

Bezüglich einer möglichen Regulation von RIP3 konnten Koo *et al.* beobachten, dass in zwei Drittel in der Studie untersuchten Karzinom-Zelllinien das Nekroptose-assoziierte Protein RIP3 nicht exprimiert wurde (85). Der Verlust der RIP3-Expression war auf eine Methylierung in der Promotor-Region des RIP3-Gens und einer damit einhergehenden Inhibierung der Transkription der RIP3-mRNA zurückzuführen (85). Gleichmaßen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine verminderte (MDA MB 231) bzw. fehlende (MCF-7) mRNA-Expression von RIP3 in RIP3-negativen Zelllinien beobachtet werden (Abbildung 4).

5.2 Analyse der Nekroptose-Sensitivität

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Viabilitätsexperimenten die Nekroptose-Sensitivität in den unterschiedlichen Mammakarzinom-Zelllinien untersucht. Als Positiv-Kontrolle diente die Colonkarzinom-Zelllinie HT 29, welche eine deutliche Reaktion mit erhöhtem Zelltod auf den Nekroptose-Stimulus mit z-VAD, BV6 und TNF- α aufwies. Der Verlust der Viabilität konnte durch die gleichzeitige Inhibierung der Nekroptose mit den Inhibitoren Necrostatin und Necrosulfonamid aufgehoben und die nekroptotische Natur des Zelltodes damit bestätigt werden. Gleichermassen konnte in den Zelllinien SK-BR-3 und T47D ein vermindertes zelluläres Überleben nach dem Nekroptose-Stimulus beobachtet werden. Allerdings konnte der Zelltod in der Zelllinie T47D durch die Behandlung mit dem Inhibitoren Necrostatin und Necrosulfonamid nur marginal beeinflusst werden. Auch in der Zelllinie SK-BR-3 konnte die Zytotoxizität des Nekroptose-Stimulus mit den Inhibitoren nur teilweise aufgehoben werden. In diesem Zusammenhang könnte die zytotoxische Wirkung des Stimulus in T47D-Zellen möglicherweise nur partiell auf der Auslösung der Nekroptose beruhen. Diese verminderte Nekroptose-Sensitivität könnte auf die vergleichsweise geringe Expression Nekroptose-assoziiierter Proteine zurückzuführen sein. So wurden in der Zelllinie T47D deutlich geringere Expressionslevel von RIP3 im Vergleich zu den Nekroptose-sensitiven Zelllinien SK-BR-3 und HT 29 beobachtet (Abbildung 3 und 4). Zudem wäre es denkbar, dass höhere Konzentrationen von Necrostatin oder Necrosulfonamid in sowohl T47D- als auch SK-BR-3-Zellen zu einer deutlicheren Inhibierung des nekroptotischen Zelltodes geführt hätten.

Des Weiteren war bei den Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 keine Reaktion auf den Nekroptose-Stimulus in Form einer reduzierten Zellzahl zu sehen (Abbildung 5).

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Reaktion dieser Zelllinien auf den Nekroptose-Stimulus ist die verminderte Expression des RIP3-Proteins in den Zelllinien. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das Protein RIP3 für die programmierte Nekroptose essentiell ist und diese ohne das Protein RIP3 nicht erfolgen kann. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Arbeit von Koo *et al.* welche dem Nekroptose-assoziierten Protein RIP3 eine essentielle Rolle in der programmierten Nekroptose zuspricht (85). So konnte Koo *et al.* in seinen Experimenten zeigen, dass eine Induktion der RIP3-Expression durch

hypomethylierenden Agenzien erfolgen kann. Diese führt wiederum zu einer Sensitivierung der Zellen auf die programmierte Nekroptose (85).

Zur weiteren molekularen Charakterisierung der Nekroptose-Sensitivität wurde eine qualitative Western Blot-Analyse zum Nachweis der phosphorylierten Nekroptose-assoziierten Proteine nach einem Nekroptose-Stimulus durchgeführt. Im Einklang mit den Zellviabilitätsversuchen (Abbildung 5) zeigte sich bei der Kontroll-Zelllinie HT 29 nach Nekroptose-Induktion eine Aktivierung des Signalweges durch die Phosphorylierung von RIP1 und MLKL (Abbildung 6). In den RIP3-defizienten Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 konnte nach dem Nekroptose-Stimulus eine Phosphorylierung der RIP1-Kinase, allerdings keine Phosphorylierung des RIP3-Effektorproteins MLKL beobachtet werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Kinase RIP3 dem MLKL in der Nekroptose-Kaskade vorangeht und ein Fehlen der Kinase zum Ausbleiben der Nekroptose führt (65).

Die RIP3-positiven Zelllinien SK-BR-3 und T47D zeigen im Unterschied zur Zelllinie HT 29 eine geringere Phosphorylierung von MLKL. Diese Phosphorylierung konnte auch in Anwesenheit des Inhibitors Necrostatin beobachtet werden (Abbildung 6). Dies könnte damit erklärt werden, dass MLKL zelllinienabhängig möglicherweise durch eine basale Aktivität von RIP3 auch ohne Nekroptose-Stimulus phosphoryliert werden kann, wobei eine zusätzliche Verstärkung der Phosphorylierung von MLKL durch einen Nekroptose-Stimulus möglich ist. Dies konnte Sun *et al.* ebenfalls in seinen Versuchen zeigen (62).

5.3 Auswirkung eines Nekroptose-Stimulus auf die Morphologie der Tumorzellen

Zhang *et al.* beschreibt die morphologischen Merkmale der Nekroptose als Schwellung der Zellorganellen und Ruptur der Plasmamembran auf elektronenmikroskopischer Sicht (86). Die morphologischen Merkmale der Nekroptose auf elektronenmikroskopischer Ebene beinhalten die Schwellung der Zellorganellen, sowie die Ruptur der Plasmamembran sowie die Freisetzung zellulärer Bestandteile (87). Im Rahmen dieser Arbeit konnte lichtmikroskopisch eine Nekroptose-abhängige Änderung der Zellform beobachtet werden. Die Zellen zeigten ein Abrunden, einen Verlust der Zell-Zell-Kontakte sowie eine

Vergrößerung der Zellen, welche vermutlich auf ein Anschwellen der Zelle zurückzuführen ist, auf (Abbildung 13). Besonders eindrücklich ist dies in der Kontroll-Zelllinie HT 29 nachzuweisen. Diese morphologischen Änderungen sind ebenfalls nach RIP3-Überexpression und Nekroptose-Stimulus in den Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 zu beobachten. Auffällig zeigt sich in dieser Arbeit, dass in den Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 nach RIP3-Überexpression bereits ohne Nekroptose-Stimulus vermehrt abgerundete Zellen vorliegen. Dies könnte durch eine Stimulus-unabhängige basale Aktivität von RIP3 erklärt werden. Im Einklang hierzu stehen die Western Blot-Ergebnisse in den vorangegangenen Versuchen. Es konnte beobachtet werden, dass nach RIP3-Überexpression eine Phosphorylierung von MLKL auch ohne Nekroptose-Stimulus erfolgt (Abbildung 12).

5.4 Auswirkungen eines Nekroptose-Stimulus auf die Lokalisation von RIP3

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Modulation der RIP3-Expression in den Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 konnte bereits die wichtige Bedeutung des Proteins RIP3 für die Nekroptose demonstrieren. Die zuvor RIP3-defizienten Zelllinien konnten nach der stabilen Transfektion mit dem RIP3-Plasmid auf den Nekroptose-Stimulus mit z-VAD, BV6 und TNF- α mit einer adäquaten Zellantwort reagieren. In den Untersuchungen im Phasenkontrastmikroskop fiel ein Verlust des Zellverbundes und ein Anschwellen der Zellen auf. Es stellt sich grundsätzlich die Frage in welchem Kompartiment das Protein RIP3 während der Nekroptose zu finden ist. Weber *et al.* konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die Proteine RIP3 und MLKL nukleozytoplasmatische Shuttle-Proteine darstellen. Nach der Nekroptose-Induktion durch die Aktivierung der Proteine RIP3 und MLKL erfolgt der Transport der Proteine ins Zytosol (88).

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen hinsichtlich der Lokalisation des Protein RIP3 während der Nekroptose durchgeführt. Hierfür wurden die stabil transfizierten Zellklone mit dem Nekroptose-Stimulus mit z-VAD, BV6 und TNF- α behandelt und anschließend Immunfluoreszenzfärbungen mit einem anti-RIP3 Antikörper durchgeführt. Hier zeigt sich in den stabil-transfizierten Zellen der Zelllinie MCF-7 und MDA MB 231 ein verändertes Färbemuster nach

Nekroptose-Induktion (Abbildung 14 und 15). Zum einen konnte wiederholt das Abrunden der Zellen gezeigt werden, zum anderen eine Verstärkung des Färbesignals des RIP3 im Bereich der Zellmembran. Das könnte darauf hindeuten, dass nicht nur das Protein MLKL im phosphorylierten Zustand einen Effekt am Ende der Nekroptose-Kaskade im Bereich der Zellmembran auslöst, sondern bereits das phosphorylierte RIP3. Die Lage des Nekrosoms, welches eine entscheidende Rolle in der Aktivierung des MLKL spielt, scheint zum aktuellen Zeitpunkt noch unklar zu sein (88). Allerdings konnte das verstärkte membranäre Färbemuster in der Zelllinie MDA MB 231 auch ohne Nekroptose-Stimulus beobachtet werden. Das könnte zum einen mit einer alternativen Nekroptose-Aktivierung oder mit einer weiteren Funktion des Proteins RIP3 außerhalb der Nekroptose erklärt werden. Cai *et al.* beschreibt in seiner Forschungsarbeit den Zusammenhang zwischen Calcium Einstrom während der Nekroptose durch die Regulation von MLKL und RIP3 (64). Die gemeinsame Regulation durch RIP3 und MLKL könnte das membranäre Färberegebnis unter dem Nekroptose-Stimulus erklären. Im Gegensatz hierzu beobachtet die Forschungsgruppe Sun *et al.* kein membranäres Färbemuster des RIP3 Proteins nach dem Nekroptose-Stimulus in den verwendeten HeLa-Zellen (62). Eine Hypothese könnte hierbei ein Zelllinien-abhängiges Färbemuster sein, welches sich vor allem in Mammakarzinom-Zelllinien zeigt.

Widersprüchlich zu dieser Hypothese zeigt sich ein ähnliches Färbesignal in der stabil transfizierten Zelllinie MDA MB 231 ohne und mit Nekroptose-Stimulus (Abbildung 14). Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Zelle natürlich in Nekroptose gegangen ist oder das Protein RIP3 nicht nur in der Nekroptose eine Rolle spielt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich mit der aktuellen Studienlage korrelieren, welche das Protein RIP3 als primär zytosolisches Protein beschreibt (88). Im nächsten Schritt sollte nun der Frage der Lokalisation des phosphorylierten MLKL nach Nekroptose-Stimulus nachgegangen werden.

5.5 Auswirkungen eines Nekroptose-Stimulus auf die Lokalisation von pMLKL

In dieser Arbeit konnte bereits ein verstärktes membranäres Färbemuster von RIP3 nach einem Nekroptose-Stimulus beobachtet werden. Analog erfolgte im Anschluss die Lokalisationsanalyse von pMLKL in Abhängigkeit eines Nekroptose-Stimulus. Dabei konnte festgestellt werden, dass in einigen Zelllinien (HT 29, MCF-7 und SK-BR-3) das Protein pMLKL auch ohne Nekroptose-Stimulus in der Plasmamembran nachweisbar war (Abbildung 16). Dies wirft die Frage nach weiteren Nekroptose-unabhängigen Funktionen von MLKL auf. Funktionelle Untersuchungen des Proteins MLKL konnten zeigen, dass es nicht nur eine Rolle in der Nekroptose, sondern auch einen Effekt im endosomalen Transport in der Zelle ausübt (89). Yoon *et al.* konnte in seiner Arbeit demonstrieren, dass der Effekt am endosomalen Transport durch das Protein MLKL unabhängig der Nekroptose und unabhängig des Proteins RIP3 erfolgt. Neben der Funktion als Protein der Nekroptose-Kaskade beschreibt des Weiteren Zhan *et al.* in seiner Arbeit die unterschiedlichen Nekroptose-unabhängigen Funktionen des Proteins MLKL (67). Die Funktionen des MLKL werden in drei Kategorien eingeteilt: 1. Interaktion mit Mediatoren des regulierten Zelltodes, 2. Veränderung der Genexpression am Nukleus nach Translokation und 3. Lipid-Bindung zur Schädigung bakterieller Organismen.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass das membranäre Färbemuster in den Zelllinien MCF-7 und SK-BR-3 mit einer Co-Lokalisation von pMLKL und Occludin, einem Protein der Tight Junctions einherging. In den Zelllinien MDA MB 231 und T47D, bei denen keine Occludin-Positivität an der Plasmamembran nachweisbar war, konnte ebenfalls keine Lokalisation von pMLKL detektiert werden (Abbildung 19). Möglicherweise stellen die Tight Junction-Komplexe und Occludin als denkbarer Bindepartner von pMLKL in diesem Zusammenhang eine notwendige Voraussetzung für die membranäre Lokalisation von pMLKL. Die Funktion des Proteins MLKL am endosomalen Transport könnte wiederum die Co-Lokalisation mit Occludin erklären (Abbildung 19). Tang *et al.* erläutert in seiner Arbeit kleine Ionenkanäle im Bereich der Tight Junctions welche eine grosse Bedeutung für die Homöostase

der Zellen darstellen (90). Man könnte die Hypothese aufstellen, dass pMLKL gerade an diesen Ionenkanälen in der Nekroptose seinen Effekt ausübt.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit ein positives membranäres Färbeergebnis für pMLKL in der RIP3-defizienten Zelllinie MCF-7 beobachtet (Abbildungen 16, 17, 18 und 19). Dies kann im Rahmen der Nekroptose nicht erklärt werden, da in aktuellen Arbeiten die essentielle Bedeutung von RIP3 im Rahmen der Nekroptose-Kaskade immer wieder hervorgehoben wird (91). Ein Erklärungsversuch wäre wiederum die unabhängige Funktion des MLKL außerhalb der Nekroptose-Kaskade.

In den Untersuchungen zeigte sich keine Veränderung des Färbemusters nach einer Nekroptose-Induktion. Eine mögliche Erklärung wäre ein zu früh gewählter Analysezeitpunkt nach dem Nekroptose-Stimulus, sodass eine verstärkte Zellantwort daher nicht sichtbar wäre. Die Phosphorylierung des MLKL ist zwar im Western Blot bereits 3 Stunden nach dem Nekroptose-Stimulus nachweisbar (Abbildung 6), allerdings könnte eine längere Zeitspanne für die Translokation von pMLKL vom Zytoplasma an die Zellmembran notwendig sein. Dafür spricht ebenfalls, dass in den Zellen keine Nekroptose-typischen morphologischen Veränderungen beobachtet wurden (Abbildung 19).

5.6 Klinische Relevanz der Nekroptose

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Nekroptose in RIP3-positiven Mammakarzinom-Zelllinien ausgelöst werden konnte. Hierdurch wäre daher das Potential für eine Nekroptose-induzierende Therapie bei Mammakarzinom-Patienten gegeben. Allerdings haben die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen in der aktuellen Tumor-Therapie bisher keine klinische Anwendung. Metzsig *et al.* konnte in ihrer Arbeit zeigen, dass das in der Tumor-Therapie verwendete 5-FU *in vitro* in Kombination mit einem Caspase-Inhibitor Nekroptose in Colon-Karzinomzellen auslöst (80). Ebenso konnte Han *et al.* in ihren Versuchen eine Nekroptose-Induktion in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 durch den Naturheilstoff Shikonin auslösen (92).

Eine Schwierigkeit in der klinischen Anwendung einer Nekroptose-induzierten Therapie könnte die ausgeprägte RIP3-Defizienz in vielen Mammakarzinomen darstellen. In dieser Arbeit konnte eine RIP3-Defizienz in zwei (MCF-7 und

MDA MB 231) der vier verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien nachgewiesen werden. Gleichmaßen berichten Stoll *et al.* von einer verminderten mRNA-Expression der pro-nekroptotischen Proteine RIP1, RIP3 und MLKL in Geweben einiger Mammakarzinom-Subtypen (93). Koo *et al.* konnte in seinen Versuchen demonstrieren, dass eine Hypermethylierung des RIP3-Promotors zu einer verminderten Expression und dadurch zu einer Unterdrückung der Nekroptose führt (85). Aus therapeutischer Sicht könnte daher eine Gabe von hypomethylierenden Substanzen zur Sensitivierung der Zellen für die Nekroptose eine Option darstellen. Dies würde zu einer erhöhten Expression von RIP3 führen und dadurch die Nekroptose-Sensitivität in den Zellen erhöhen.

Inflammatorische Prozesse, welche durch die Nekroptose ausgelöst werden, könnten ein Problem für die klinische Anwendung darstellen. In diesem Zusammenhang bezeichnet Wang *et al.* die Nekroptose in der Tumorthherapie als zweischneidiges Schwert (94). Die Nekroptose wirkt zum einen anti-tumoral durch die Aktivierung immunologische Prozesse, Inhibierung des Tumorzell-Überlebens und deren Proliferation und die Blockierung der Metastasierung. Zum anderen auch tumor-fördernd durch die inflammatorische Reaktion. In der Arbeit konnte war eine schlechtere Prognose mit einer Expression der Nekroptose-assoziierten Proteinen korreliert. Es besteht die Hypothese, dass die schlechtere Prognose mit der erhöhten Entzündungsreaktion aufgrund der DAMP's Freisetzung, erhöhter ROS-Produktion und Hemmung der tumoralen Immunantwort zusammenhängt (94).

Zusammenfassend scheint die Nekroptose ein vielversprechender Ansatz in der Tumorthherapie zu sein. Möglich wäre vor allem eine Kombinationstherapie mit hypomethylierenden Agenzien um das Mammakarzinom für die Nekroptose zu sensitivieren. Nichtsdestotrotz muss die Eignung einer Nekroptose-basierten Therapieform *in vivo* noch weiter grundlegend untersucht werden. Insbesondere die durch die Nekroptose ausgelöste Inflammation könnte ein potentiell Problem in der klinischen Anwendung darstellen. Nicht zu vernachlässigen ist auch der Tumorprogress der durch die Nekroptose ausgelöst werden könnte und dann ein konträres Ziel zur erwünschten Therapie darstellen würde.

6 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste Tumorentität der Frau und stellt trotz fortschreitender Forschungen aufgrund der häufigen Rezidive und Metastasierungsmuster eine große Herausforderung an die Onkologie.

Ein großer Fortschritt konnte durch die gezielte und individualisierte Therapie erreicht werden. Dennoch zeigt sich im klinischen Alltag trotz aller Bemühungen häufig ein Therapieversagen der konventionellen Therapeutika.

Bei der Suche nach alternativen Therapiekonzepten stellt in diesem Zusammenhang die gezielte Auslösung der Nekroptose, vor allem bei bestehender Apoptose-Resistenz, einen vielversprechenden Forschungsansatz. In der vorliegenden Arbeit wurde die Nekroptose in Mammakarzinom-Zelllinien untersucht. Es zeigte sich, dass die Hälfte der untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien das Protein RIP3, einen zentralen Bestandteil des Nekroptose-Signalweges, nicht exprimierten. Mittels Zellviabilitäts- und Immunoblot-Analysen konnte eine Nekroptose-Resistenz in diesen RIP3-defizienten Zelllinien nachgewiesen werden.

Weiterhin führte die siRNA-vermittelte Verminderung der MLKL- und RIP3-Expression in RIP3-positiven Zelllinien zu einer erhöhten Nekroptose-Resistenz. Gleichermäßen konnte durch die ektopische Überexpression des RIP3-Proteins in RIP3-negativen Zelllinien eine Sensibilisierung für den nekroptotischen Zelltod erreicht werden. Immunfluoreszenzfärbungen verdeutlichen eine erhöhte membranäre Expression von RIP3 im Anschluss an einen Nekroptose-Stimulus. In der Hälfte der untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien konnte ebenfalls eine membranäre Lokalisation von pMLKL festgestellt werden. Diese trat in den entsprechenden Zelllinien allerdings unabhängig vom Nekroptose-Stimulus und RIP3-Expressionsstatus auf. Weitergehende Analysen demonstrierten eine Co-Lokalisation von pMLKL und Occludin, einem zentralen Bestandteil der Tight Junctions.

Die gewonnenen Erkenntnisse stellen eine Grundlage für weitergehende Untersuchungen der grundlegenden Nekroptose-Prozesse dar, wodurch potenzielle neue therapeutische Konzepte in der Tumorforschung erzielt werden könnten.

7 Literaturverzeichnis

1. Bubendorf L, Obermann EC, Feichter GE, Dalquen P. Pathologie - Zytopathologie. 3., neubearbeitete ed: Springer Medizin Verlag; 2011.
2. Lee AH. Why is carcinoma of the breast more frequent in the upper outer quadrant? A case series based on needle core biopsy diagnoses. *The Breast*. 2005;14(2):151-2.
3. Darbre PD. Aluminium and the human breast. *Morphologie : bulletin de l'Association des anatomistes*. 2016;100(329):65-74.
4. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. WHO Classification of Tumours of the Breast: World Health Organization Press; 2012.
5. Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, Peterse JL, Mukai K, Tabár L, Jacquemier J. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. World Health Organization Classification of Tumours. 2003:9-113.
6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
7. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology and Therapy*. 2010;10(10):955-60.
8. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, Shi B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American journal of cancer research*. 2015;5(10):2929-43.
9. Johansen Taber KA, Morisy LR, Osbahr AJr, Dickinson BD. Male breast cancer: Risk factors, diagnosis, and management (Review). *Oncology reports*. 2010;24(5):1115-20.
10. Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Waldeyer-Sauerland M, Waldmann A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J, Klein S, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Treml K, Vollmer G, Weg-Remers S, Barnes B, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Fiebig J, Franke M, Gurung-Schönfeld I, Haberland J, Kraywinkel K, Wienecke A. Gemeinsame Publikation der Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V. Krebs in Deutschland für 2015/2016. Robert Koch Institut. 2019;12.
11. Alberg AJ, Lam AP, Helzlsouer KJ. Epidemiology, prevention, and early detection of breast cancer. *Current opinion in oncology*. 1999;11(6):435.
12. Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Kurth B-M, Wolf U. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland - Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Robert Koch Institut. 2010:77-83.
13. Adaniel C, Kirchhoff T. Introduction to epidemiology of breast and ovarian cancers. *Annals of Oncology*. 2013;24(suppl_8):viii61-viii2.
14. Stratton MR, Rahman N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nature genetics*. 2008;40(1):17-22.
15. Ahn J, Urist M, Prives C. The Chk2 protein kinase. *DNA repair*. 2004;3(8-9):1039-47.

16. Couto E, Banks E, Reeves G, Pirie K, Beral V. Family history and breast cancer tumour characteristics in screened women. *International Journal of Cancer*. 2008;123(12):2950-4.
17. Chen Y, Thompson W, Semenciw R, Mao Y. Epidemiology of Contralateral Breast Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1999;8(10):855-61.
18. Lacey JVJ, Kreimer AR, Buys SS, Marcus PM, Chang S-C, Leitzmann MF, Hoover RN, Prorok PC, Berg CD, Hartge P. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BioMed Center Cancer*. 2009;9:84.
19. Dunn BK, Wickerham DL, Ford LG. Prevention of Hormone-Related cancers: Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(2):357-67.
20. Ewertz M, Duffy SW, Adami H-O, Kvale G, Lund E, Meirik O, Møller H, Soini I, Tulinius H. Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *International journal of cancer*. 1990;46(4):597-603.
21. Gadeyne S, Deboosere P, Vandenheede H, Neels K. Does birth history account for educational differences in breast cancer mortality? A comparison of premenopausal and postmenopausal women in Belgium. *International journal of cancer*. 2012;131(12):2878-85.
22. Di Cello F, Flowers VL, Li H, Vecchio-Pagan B, Gordon B, Harbom K, Shin J, Beaty R, Wang W, Brayton C, Baylin SB, Zahnow CA. Cigarette smoke induces epithelial to mesenchymal transition and increases the metastatic ability of breast cancer cells. *Molecular cancer*. 2013;12:90.
23. Bjerkaas E, Parajuli R, Weiderpass E, Engeland A, Maskarinec G, Selmer R, Gram IT. Smoking duration before first childbirth: an emerging risk factor for breast cancer? Results from 302,865 Norwegian women. *Cancer Causes & Control*. 2013;24(7):1347-56.
24. Forsyth CB, Tang Y, Shaikh M, Zhang L, Keshavarzian A. Alcohol stimulates activation of Snail, Epidermal growth factor receptor signaling, and biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in colon and breast cancer cells. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2010;34(1):19-31.
25. Ronckers CM, Erdmann CA, Land CE. Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Research*. 2005;7(1):21-32.
26. Jacobi CE, de Bock GH, Siegerink B, van Asperen CJ. Differences and similarities in breast cancer risk assessment models in clinical practice: which model to choose? *Breast cancer research and treatment*. 2009;115(2):381-90.
27. Prado A, Andrades P, Parada F. Recent developments in the ability to predict and modify breast cancer risk. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*. 2010;63(10):1581-7.
28. Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch H-G, Gusterson BA, Bender HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of Molecular Medicine (Berl)*. 1997;75(6):429-39.
29. Bürger H, Böcker W. Karzinogenese der Mammakarzinome. In: Klöppel G, Kreipe HH, Remmele W, Dietel M, editors. *Pathologie- Mamma, weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen*. 3., neubearbeitete ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag. p. 73-89.

30. Thompson D, Easton D. The Genetic Epidemiology of Breast Cancer Genes. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2004;9(3):221-36.
31. El-Ashry D, Lippman ME. Molecular biology of breast carcinoma. *World journal of surgery*. 1994;18(1):12-20.
32. Alix-Panabières C, Müller V, Pantel K. Current status in human breast cancer micrometastasis. *Current Opinion in Oncology*. 2007;19(6):558-63.
33. Christiansen P, Al-Suliman N, Bjerre K, Møller S. Recurrence pattern and prognosis in low-risk breast cancer patients--data from the DBCG 89-A programme. *Acta Oncologica*. 2008;47(4):691-703.
34. Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9(4):302-12.
35. Müller V, Jänicke F. Prognostische und prädiktive Faktoren bei Patientinnen mit Mammakarzinom. In: Kreienberg R, Jonat W, Volm T, Möbus V, Alt D, editors. *Management des Mammakarzinoms*. 3rd ed. Berlin: Springer; 2006. p. 184-98.
36. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. *The Lancet*. 2005;365(9472):1727-41.
37. Shien T, Iwata H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *Japanese journal of clinical oncology*. 2020;50(3):225-9.
38. Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *The New England journal of medicine*. 2005;353(16):1652-4.
39. Cuadros M, Cano C, Lopez FJ, Lopez-Castro R, Concha A. Expression profiling of breast tumors based on human epidermal growth factor receptor 2 status defines migration-related genes. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2013;80(1):32-40.
40. Lu Q, Nakmura J, Savinov A, Yue W, Weisz J, Dabbs DJ, Wolz G, Brodie A. Expression of aromatase protein and messenger ribonucleic acid in tumor epithelial cells and evidence of functional significance of locally produced estrogen in human breast cancers. *Endocrinology*. 1996;137(7):3061-8.
41. Blatt NB, Glick GD. Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2001;9(6):1371-84.
42. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*. 2004;16(6):663-9.
43. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Review Molecular Cell Biology*. 2014;15(2):135-47.
44. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*. 2015;517(7534):311-20.
45. Chan FK, Shisler J, Bixby JG, Felices M, Zheng L, Appel M, Orenstein J, Moss B, Lenardo MJ. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(51):51613-21.
46. Maelfait J, Beyaert R. Non-apoptotic functions of caspase-8. *Biochemical pharmacology*. 2008;76(11):1365-73.
47. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research*. 2003;283(1):1-16.

48. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010;11(10):700-14.
49. Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F, Vanden Berghe T. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Science signaling*. 2010;3(115):re4.
50. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972;26(4):239-57.
51. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science (New York, NY)*. 1995;267(5203):1456-62.
52. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.
53. Vucic D, Dixit VM, Wertz IE. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011;12(7):439-52.
54. Grootjans S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell death and differentiation*. 2017;24(7):1184-95.
55. Vanden Berghe T, Kaiser WJ, Bertrand MJ, Vandenabeele P. Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling. *Molecular and Cellular Oncology*. 2015;2(4):e975093.
56. Lawen A. Apoptosis-an introduction. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2003;25(9):888-96.
57. Hardwick JM, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(2).
58. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*. 2013;38(2):209-23.
59. Zhang H, Zhou X, McQuade T, Li J, Chan FK, Zhang J. Functional complementation between FADD and RIP1 in embryos and lymphocytes. *Nature*. 2011;471(7338):373-6.
60. McQuade T, Cho Y, Chan FK. Positive and negative phosphorylation regulates RIP1- and RIP3-induced programmed necrosis. *The Biochemical journal*. 2013;456(3):409-15.
61. Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang LF, Wang FS, Wang X. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Molecular cell*. 2014;54(1):133-46.
62. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, Wang L, Yan J, Liu W, Lei X, Wang X. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*. 2012;148(1-2):213-27.
63. Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, Roelandt R, Goncalves A, Bruggeman I, Hulpiau P, Weber K, Schon CA, Marquis RW, Bertin J, Gough PJ, Savvides S, Martinou JC, Bertrand MJ, Vandenabeele P. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell reports*. 2014;7(4):971-81.
64. Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, Ward Y, Wu LG, Liu ZG. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nature cell biology*. 2014;16(1):55-65.

65. Wallach D, Kang TB, Dillon CP, Green DR. Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules. *Science (New York, NY)*. 2016;352(6281):aaf2154.
66. Murphy James M, Czabotar Peter E, Hildebrand Joanne M, Lucet Isabelle S, Zhang J-G, Alvarez-Diaz S, Lewis R, Lalaoui N, Metcalf D, Webb Andrew I, Young Samuel N, Varghese Leila N, Tannahill Gillian M, Hatchell Esme C, Majewski Ian J, Okamoto T, Dobson Renwick CJ, Hilton Douglas J, Babon Jeffrey J, Nicola Nicos A, Strasser A, Silke J, Alexander Warren S. The Pseudokinase MLKL Mediates Necroptosis via a Molecular Switch Mechanism. *Immunity*. 2013;39(3):443-53.
67. Zhan C, Huang M, Yang X, Hou J. MLKL: Functions beyond serving as the Executioner of Necroptosis. *Theranostics*. 2021;11(10):4759-69.
68. Xie T, Peng W, Yan C, Wu J, Gong X, Shi Y. Structural insights into RIP3-mediated necroptotic signaling. *Cell reports*. 2013;5(1):70-8.
69. Zhang D, Lin J, Han J. Receptor-interacting protein (RIP) kinase family. *Cellular & Molecular Immunology*. 2010;7(4):243-9.
70. Benedict CA, Norris PS, Ware CF. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nature Immunology*. 2002;3(11):1013-8.
71. Vanden Berghe T, Hassannia B, Vandenabeele P. An outline of necrosome triggers. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73(11-12):2137-52.
72. Kearney CJ, Martin SJ. An Inflammatory Perspective on Necroptosis. *Molecular cell*. 2017;65(6):965-73.
73. Smith CCT, Davidson SM, Lim SY, Simpkin JC, Hothersall JS, Yellon DM. Necrostatin: A Potentially Novel Cardioprotective Agent? *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2007;21(4):227-33.
74. Wu J, Huang Z, Ren J, Zhang Z, He P, Li Y, Ma J, Chen W, Zhang Y, Zhou X, Yang Z, Wu SQ, Chen L, Han J. Mlkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mlkl in necroptosis. *Cell research*. 2013;23(8):994-1006.
75. Welz PS, Wullaert A, Vlantis K, Kondylis V, Fernández-Majada V, Ermolaeva M, Kirsch P, Sterner-Kock A, van Loo G, Pasparakis M. FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation. *Nature*. 2011;477(7364):330-4.
76. Nogusa S, Thapa RJ, Dillon CP, Liedmann S, Oguin TH, 3rd, Ingram JP, Rodriguez DA, Kosoff R, Sharma S, Sturm O, Verbist K, Gough PJ, Bertin J, Hartmann BM, Sealfon SC, Kaiser WJ, Mocarski ES, López CB, Thomas PG, Oberst A, Green DR, Balachandran S. RIPK3 Activates Parallel Pathways of MLKL-Driven Necroptosis and FADD-Mediated Apoptosis to Protect against Influenza A Virus. *Cell host & microbe*. 2016;20(1):13-24.
77. Newton K, Sun X, Dixit VM. Kinase RIP3 is dispensable for normal NF-kappa Bs, signaling by the B-cell and T-cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(4):1464-9.
78. Degterev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature chemical biology*. 2008;4(5):313-21.
79. Park H-H, Park S-Y, Mah S, Park J-H, Hong S-S, Hong S, Kim Y-S. HS-1371, a novel kinase inhibitor of RIP3-mediated necroptosis. *Experimental & Molecular Medicine*. 2018;50(9):125.

80. Oliver Metzgi M, Fuchs D, Tagscherer KE, Gröne HJ, Schirmacher P, Roth W. Inhibition of caspases primes colon cancer cells for 5-fluorouracil-induced TNF- α -dependent necroptosis driven by RIP1 kinase and NF- κ B. *Oncogene*. 2016;35(26):3399-409.
81. Castro F, Dirks WG, Fähnrich S, Hotz-Wagenblatt A, Pawlita M, Schmitt M. High-throughput SNP-based authentication of human cell lines. *International journal of cancer*. 2013;132(2):308-14.
82. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.
83. Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical biochemistry*. 1986;159(1):109-13.
84. Khorsandi L, Orazizadeh M, Niazvand F, Abbaspour MR, Mansouri E, Khodadadi A. Quercetin induces apoptosis and necroptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Bratislavske lekarske listy*. 2017;118(2):123-8.
85. Koo GB, Morgan MJ, Lee DG, Kim WJ, Yoon JH, Koo JS, Kim SI, Kim SJ, Son MK, Hong SS, Levy JM, Pollyea DA, Jordan CT, Yan P, Frankhouser D, Nicolet D, Maharry K, Marcucci G, Choi KS, Cho H, Thorburn A, Kim YS. Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. *Cell research*. 2015;25(6):707-25.
86. Zhang Y, Chen X, Gueydan C, Han J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell research*. 2018;28(1):9-21.
87. Golla N, Hong LJ, Chefetz I. Visualization of Necroptotic Cell Death through Transmission Electron Microscopy. In: Alvero AB, Mor GG, editors. *Detection of Cell Death Mechanisms: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer US; 2021. p. 135-47.
88. Weber K, Roelandt R, Bruggeman I, Estornes Y, Vandenabeele P. Nuclear RIPK3 and MLKL contribute to cytosolic necrosome formation and necroptosis. *Communications biology*. 2018;1:6.
89. Yoon S, Kovalenko A, Bogdanov K, Wallach D. MLKL, the Protein that Mediates Necroptosis, Also Regulates Endosomal Trafficking and Extracellular Vesicle Generation. *Immunity*. 2017;47(1):51-65.e7.
90. Tang VW, Goodenough DA. Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophysical journal*. 2003;84(3):1660-73.
91. Liu Y, Liu T, Lei T, Zhang D, Du S, Girani L, Qi D, Lin C, Tong R, Wang Y. RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy (Review). *Int J Mol Med*. 2019;44(3):771-86.
92. Han W, Li L, Qiu S, Lu Q, Pan Q, Gu Y, Luo J, Hu X. Shikonin circumvents cancer drug resistance by induction of a necroptotic death. *Molecular cancer therapeutics*. 2007;6(5):1641-9.
93. Stoll G, Ma Y, Yang H, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Pro-necrotic molecules impact local immunosurveillance in human breast cancer. *Oncoimmunology*. 2017;6(4):e1299302-e.
94. Wang T, Jin Y, Yang W, Zhang L, Jin X, Liu X, He Y, Li X. Necroptosis in cancer: An angel or a demon? *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2017;39(6):1010428317711539.