

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

Funktionelle Charakterisierung der Lokalisation und nekroptose-unabhängigen
Funktion von pMLKL

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

Vorgelegt von

Hanna Marie Schulte
aus Frankfurt am Main

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion: 04. April 2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Ziel der Dissertation.....	1
1.2 Zelltodmechanismen.....	1
1.3 Nekroptose.....	3
1.4 MLKL.....	6
1.5 Tight Junctions.....	8
1.6 Occludin.....	10
2 Material.....	12
2.1 Zelllinien.....	12
2.2 Kulturmedien.....	12
2.2.1 Kulturmedien für adhärent wachsende Zelllinien.....	12
2.2.2 Einfriermedium für adhärent wachsende Zellen.....	14
2.3 Nukleinsäuren.....	14
2.3.1 Oligonukleotide als siRNA für die Transfektion.....	14
2.3.2 Proteingrößenstandard.....	14
2.4 Antikörper.....	15
2.4.1 Primärantikörper für Immunoblot-Analysen und Immunfluoreszenz.....	15
2.4.2 Sekundärantikörper für Immunoblot-Analysen und Immunfluoreszenz.....	15
2.5 Puffer und Lösungen.....	16
2.5.1 Lysepuffer für Proteinlysate.....	16
2.5.2 Puffer und Lösungen für den Immunoblot.....	17
2.5.3 Lösungen für die Immunfluoreszenz.....	20
2.5.4 Lösungen für die Kristallviolett-färbung.....	21
2.6 Reagenzien.....	22
2.7 Apparate, Geräte und Glasware.....	24
2.8 Software.....	27

2.9	Verbrauchsmaterialien	28
3	Methoden	29
3.1	Zellbiologische Methoden	29
3.1.1	Kultivierung und Kryokonservierung von Zelllinien	29
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl.....	30
3.1.3	Transiente Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden	30
3.1.4	Cytotoxassay.....	31
3.1.5	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)	31
3.1.6	Kristallviolett-färbung.....	32
3.1.7	Herstellung von Gesamtzelllysaten.....	33
3.2	Biochemische und molekularbiologische Methoden.....	34
3.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	34
3.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	34
3.2.3	Western-Transfer	35
3.2.4	Immunoblot-Analyse	35
3.2.5	Immunfluoreszenzfärbung.....	36
3.2.6	Statistik.....	37
4	Ergebnisse.....	38
4.1	Untersuchung der membranären Co-Lokalisation von pMLKL und Occludin in verschiedenen Tumorzelllinien	38
4.1.1	Untersuchung der Lokalisation des Nekroptose-assoziierten Proteins pMLKL und des Tight Junction-assoziierten Proteins Occludin in RIP3-positiven und RIP3-negativen Zelllinien	38
4.1.2	Untersuchung der Lokalisation von pMLKL und Occludin in Abhängigkeit von RIP3.....	44
4.2	Analyse des Zusammenhangs der endogenen Expression von pMLKL und Occludin	46
4.2.1	Analyse der endogenen Expression von Occludin in Abhängigkeit von MLKL sowie eines Nekroptose-Stimulus.....	46
4.2.2	Analyse der endogenen Expression von MLKL und pMLKL in Abhängigkeit von Occludin sowie eines Nekroptose-Stimulus.....	48
4.3	Analyse der Lokalisation pMLKL und Occludin in Abhängigkeit voneinander	49

4.4	Analyse des funktionellen Zusammenhangs zwischen pMLKL und Occludin	51
4.4.1	Analyse der Beeinflussung der Nekroptose durch Occludin	51
4.4.2	Auswirkung der Transfektion mit MLKL und Occludin siRNA auf die Integrität der Tight Junctions	53
4.4.3	Auswirkung des MLKL-Inhibitors NSA auf die Integrität der Tight Junctions ..	57
5	Diskussion	62
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	62
5.2	Co-Lokalisation von pMLKL und Occludin	62
5.3	RIP3-unabhängige Phosphorylierung von MLKL	64
5.4	Nekroptoseunabhängige Funktionen von MLKL	65
5.5	Einfluss von MLKL auf Tight Junctions	66
5.6	Klinische Auswirkung	69
6	Zusammenfassung	72
7	Literaturverzeichnis	73
8	Tabellarischer Lebenslauf	80

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁶)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CAMK2/CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
Caspasen	Cysteine aspartic acid-specific proteases
CAT	Kolitisassoziierte Tumorgenese
clAP1/2	Cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2
CYLD	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddH ₂ O	Deionisiertes destilliertes Wasser
ECL	Enhanced chemiluminescence
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
et al.	Und andere
FADD	Fas-associated protein with death domain
FBS/FCS	Fötales Rinderserum / fötales Kälberserum bzw. fetal bovine serum / fetal calf serum

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase
h	Stunde, hour
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
KRV	Kristallviolett
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MEM	Minimum Essential Media
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLKL	Mixed Lineage Kinase Domain-Like Pseudokinase
mRNA	Boten-RNA, messenger RNA
n	Nano (10 ⁻⁹)
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
Nec-1	Necrostatin-1
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain- enhancer of activated B-cells
nm	Nanometer
NSA	Necrosulfonamid
OCLN	Occludin
Ω	Ohm
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Phosphate buffered saline
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
pMLKL	Phosphoryliertes MLKL
pRIP3	Phosphoryliertes RIP3
PRR	Pattern-Recognition-Receptors
PsKD	Pseudokinase-Domäne
RBM6	RNA-bindendes Motivprotein 6
RHIM	RIP homotypisches Interaktionsmotive
RIP1	Receptor-interacting serine/ threonine-protein kinase 1
RIP3	Receptor-interacting serine/ threonine-protein kinase 3
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotation pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat, sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese, sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sek	Sekunde
siRNA	Small interfering RNA
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20, Tris-buffered saline with Tween20
TCR	T-Zell-Rezeptor, T-Cell receptor
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TEMED	N, N,N',N' Tetramethylethylendiamin
TJ	Tight Junction
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha, tumor necrosis factor-alpha
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor

TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1- associated DEATH domain protein
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)
TRAF2/5	TNF receptor-associated factor 2/5
UV	Ultraviolett
V	Volt
WHO	World Health Organization
wt	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
ZO1-3	Zonula occludens 1-3
zVAD	z-VAD(OMe)-FMK

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Apoptose und Nekrose im Vergleich.....	2
Abbildung 2: Der TNF-Signalmechanismus der Nekroptose.....	5
Abbildung 3: Die strukturellen Domänen von MLKL.....	6
Abbildung 4: Modelle für die Wirkung von MLKL	7
Abbildung 5: Schematische vereinfachte Darstellung der grundlegenden strukturellen Komponenten der Tight Junctions.....	9
Abbildung 6: Schematische Darstellung von Occludin und der Lokalisation von potentiellen Phosphorylierungsstellen	11
Abbildung 7: Schematischer Aufbau einer TEER-Messung.....	32
Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung von pMLKL und Occludin in der RIP3-negativen Zelllinie MCF7	40
Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung von pMLKL und Occludin in der Zelllinie MCF	38
Abbildung 10: Analyse der Lokalisation von pMLKL und Occludin in der Zelllinie CaCo2.....	40
Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung von pMLKL und Occludin in den RIP3-positiven Zelllinien HT29, SK-BR3 und T47D.....	41
Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung von pMLKL und Occludin in den RIP3-negativen Zelllinien DU-145, Huh7 und PC3	42
Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung von pMLKL und Occludin in der RIP3-negativen Zelllinie CaCo2.....	43
Abbildung 14: Analyse der pMLKL und RIP3 -Expression in den stabil transfizierten Zellen MCF7 RIP3#6.....	44
Abbildung 15: Co-Lokalisationsanalyse von pMLKL und Occludin in den Zelllinien MCF7 neo und MCF7 RIP3#6 ohne und mit Nekroptose-Stimulus	46
Abbildung 16: Analyse der Occludin-Expression nach Transfektion mit den MLKL- spezifischen siRNAs #1 und #3 in MCF7 und CaCo2.....	47
Abbildung 17: Analyse der Occludin-Expression nach Transfektion mit der MLKL- spezifischen siRNA #1 und #3 in MCF7 neo und MCF7 RIP3#6.....	47
Abbildung 19: Analyse der MLKL- und pMLKL-Expression nach Transfektion mit der Occludin-spezifischen siRNA #1 und #2 in MCF7 neo und MCF7 RIP3#6.....	49
Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung von pMLKL und Occludin in den Zelllinien MCF7 nach Behandlung mit MLKL siRNA #1 und Occludin siRNA #1 und anschließendem Nekroptose-Stimulus	50
Abbildung 21: Cytotoxassay in MCF7 neo und MCF7 RIP3#6 pMLKL-Expression nach Transfektion mit Occludin siRNA #1 und #2.....	52
Abbildung 22: Analyse der Tight Junction-Integrität in MCF7 und CaCo2 behandelt mit Occludin siRNA #1 und #2	54

Abbildung 23: Analyse der Stabilität der siRNA-Transfektion mit MLKL siRNA #1 und MLKL siRNA#3 in MCF7 und CaCo2 an den Tagen 6, 8, 12 und 14	55
Abbildung 24: Analyse der Tight Junction-Integrität in MCF7 nach Transfektion mit MLKL siRNA #1 und #2	56
Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbung von pMLKL und Occludin in MCF7-Zellen und CaCo2-Zellen nach NSA-Behandlung zu den Zeitpunkten 0,5 h, 1 h, 1,5 h und 2 h	58
Abbildung 26: Analyse der Tight Junction-Dynamik mittels TEER-Messung in MCF7 Zellen nach Behandlung mit NSA	60
Abbildung 27: Analyse der Tight Junction-Dynamik mittels TEER-Messung in CaCo2-Zellen nach Behandlung mit NSA	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien	12
Tabelle 2: Kulturmedium für CaCo2 wt	13
Tabelle 3: Kulturmedium für MCF7 wt.....	13
Tabelle 4: Kulturmedium für SK-BR3 wt.....	13
Tabelle 5: Kulturmedium für transfizierte Zelllinien	13
Tabelle 6: Einfriermedium	14
Tabelle 7: Oligonukleotide als siRNA für die Transfektion	14
Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper für die Immunoblot-Analyse und Immunfluoreszenz	15
Tabelle 9: Verwendete Sekundärantikörper für die Immunoblot-Analyse	15
Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz	16
Tabelle 11: PBS 10 x.....	16
Tabelle 12: Lysepuffer für Proteinlysate.....	16
Tabelle 13: Trenngelpuffer für den Immunoblot	17
Tabelle 14: Sammelgelpuffer für den Immunoblot	17
Tabelle 15: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für SDS-PAGE	17
Tabelle 16: SDS-Lösung für SDS-PAGE	17
Tabelle 17: APS-Lösung für SDS-PAGE.....	18
Tabelle 18: SDS-Laufpuffer 1 x für den Immunoblot.....	18
Tabelle 19: Semi-Dry Blot Puffer 10 x für den Immunoblot.....	18
Tabelle 20: Semi-Dry Blot Puffer (1 x) für den Immunoblot.....	18
Tabelle 21: TBS (10 x) für den Immunoblot	19
Tabelle 22: TBST (1 x) für den Immunoblot	19
Tabelle 23: Blocking-Milch für den Immunoblot	19
Tabelle 24: Ponceau S für den Immunoblot.....	19
Tabelle 25: Antikörperlösung für den Immunoblot.....	19
Tabelle 26: ECL-Lösung für den Immunoblot.....	20
Tabelle 27: Chemilumineszenz-Detektierlösung für den Immunoblot.....	20
Tabelle 28: Protein-Probenpuffer (6 x) für den Immunoblot.....	20
Tabelle 29: Blockinglösung für die Immunfluoreszenz	20
Tabelle 30: Sekundärlösung für die Immunfluoreszenz	21
Tabelle 31: Waschlösung für die Immunfluoreszenz.....	21
Tabelle 32: Formaldehydlösung für die Immunfluoreszenz.....	21
Tabelle 33: Kristallviolettlösung.....	21
Tabelle 34: Verwendete Reagenzien	22
Tabelle 35: Verwendete Apparate, Geräte und Glasware	24

Tabelle 36: Verwendete Software	27
Tabelle 37: Verwendete Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 38: p-Wert.....	37

1 Einleitung

1.1 Ziel der Dissertation

Die Pseudokinase Mixed Lineage Kinase Domain-Like (MLKL) ist einer der Hauptakteure in der RIP1/RIP3-vermittelten Nekroptose-Kaskade (1). In vorangegangenen Projekten der Arbeitsgruppe Roth konnte gezeigt werden, dass MLKL, in der RIP3-negativen (2) Zelllinie MCF7 auch ohne vorangegangenen Nekroptosestimulus in phosphorylierter Form an der Zellmembran im Bereich der Tight Junctions (Zonula occludens) vorliegt (3).

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, die Lokalisation und Funktion von pMLKL im Zellmodell systematisch zu untersuchen. Hierzu sollte die Co-Lokalisation von pMLKL und Occludin, einem Schlüsselprotein der Tight Junctions, in RIP3-positiven und RIP3-negativen Zelllinien in Abhängigkeit von Nekroptosestimuli mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Im nächsten Schritt sollten durch eine siRNA-vermittelte Reduktion der MLKL- und Occludin-Expression mögliche Zusammenhänge zwischen der Expression der beiden Proteine mittels Immunoblot-Analysen und konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert werden. Weiterhin sollten funktionellen Auswirkungen einer reduzierten MLKL- und Occludin-Expression auf die Nekroptose sowie die Integrität der Tight Junctions durch Zytotoxizitätsassays und TEER-Messungen (Transepithelialer elektrischer Widerstand) charakterisiert werden.

1.2 Zelltodmechanismen

Zelltodmechanismen sind essenzielle biologische Prozesse zum Beseitigen geschädigter oder entarteter Zellen im menschlichen Körper (4). Störungen im Bereich von Zelltodmechanismen bilden die Grundlage für zahlreiche Erkrankungen wie Tumorleiden und Entzündungen. In der Zelltodforschung gehören zu den beiden klassischen und am besten verstandenen Zelltodmechanismen die Apoptose und die Nekrose (4). Während die Apoptose in diesem Zusammenhang als aktive, programmierte Form des Zelltods angesehen wird, galt die Nekrose als vermeintlich passiver, unregulierter Vorgang in Reaktion auf pathologische Stimuli wie Zytokine, Ischämie, Hitze, Bestrahlung und Krankheitserreger (4). Auch morphologisch unterscheiden sich die Apoptose und die Nekrose (Abbildung 1): Bei der Apoptose lassen sich die Kondensation und Fragmentierung des Kerns, sowie die Fragmentierung des Zytoplasmas und der Organellen beobachten (4,5). Das sind Membranausstülpungen, welche Zellfragmente und Zytoplasma beinhalten, die sogenannten apoptotischen Vesikel. Diese werden im Verlauf von Phagozyten verdaut, weshalb es nicht zu einer Entzündungsreaktion kommt (5,6). Die Nekrose hingegen zeichnet sich durch Anschwellung des Zytoplasmas, der Organellen und der Plasmamembran mit anschließender Ruptur der Plasmamembran durch

Verlust seiner Integrität aus (7). Durch die Membranruptur kommt es zur Freilegung von Zellinhalten und sogenannten Damage-associated Molecular Patterns (DAMPs). Dies sind körpereigene Moleküle, die Entzündungen hervorrufen (8). Mittlerweile ist bekannt, dass es verschiedene weitere Formen des Zelltods gibt, welche ähnliche morphologischen Merkmale wie die Nekrose aufweisen und unter dem Begriff programmierte Nekrose zusammengefasst werden (9). Zu ihnen zählt die Nekroptose.

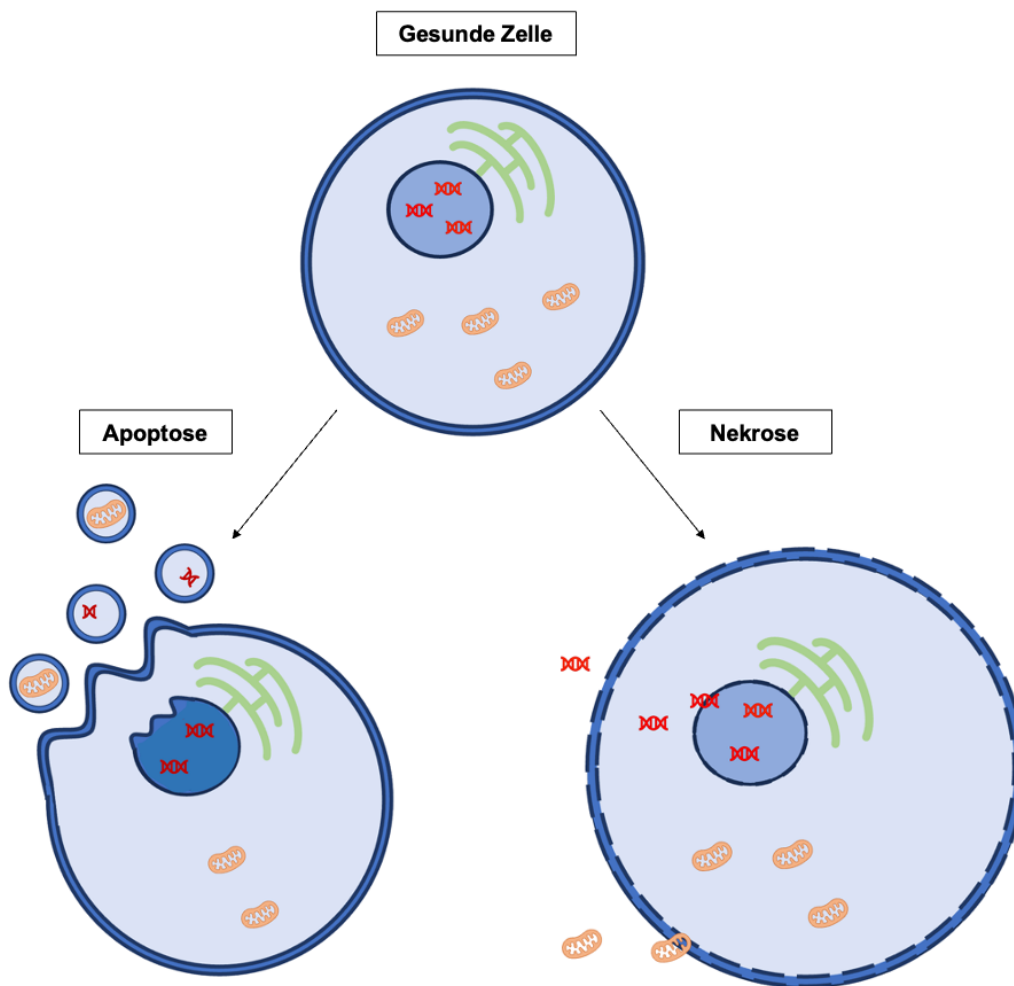


Abbildung 1: Apoptose und Nekrose im Vergleich, modifiziert nach (10).

Die Apoptose zeichnet sich durch das Ausbilden von Membranvesikeln, Zellschrumpfung, Kernfragmentierung und Chromatinkondensation aus. Die Nekroptose hingegen kennzeichnet sich durch das Anschwellen der Zelle, den Integritätsverlust der Plasmamembran und einer dadurch rupturierenden Zellmembran. So kommt es zur Freisetzung von Zellinhalten und DAMPs, die Entzündungsreaktionen auslösen.

1.3 Nekroptose

In den letzten Jahren wurde die Nekroptose als weitere Form des programmierten Zelltods bekannt, die wie die Apoptose ebenfalls über stark regulierte zelluläre Signalkaskaden abläuft, phänotypisch allerdings an die Nekrose erinnert (4). Grundsätzlich können viele verschiedene Stimuli die Nekroptose auslösen und somit zum Zelltod führen. Dazu zählen unter anderem Mitglieder der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie, Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs), T-Zell-Rezeptoren (TCRs), verschiedene Chemotherapeutika und Hypoxie (1). Zu diesen Stimuli gehören auch welche, die die Apoptose über den extrinsischen Weg induzieren können, beispielsweise die Mitglieder der Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie von Zytokinen, einschließlich TNF- α , FAS-Ligand (FASL; CD95) und TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) (6).

Am besten erforscht gilt jedoch das Modell der Nekroptose, welches durch das Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 (TNFR1) / Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) -Rezeptor-Liganden-System induziert wird und in dem die Proteine RIP1 (receptor-interacting protein kinase 1), RIP3 (receptor-interacting protein kinase 3) und MLKL (mixed lineage kinase domain-like pseudokinase) eine zentrale Rolle spielen (Abbildung 2) (1,11).

TNF α bindet extrazellulär an TNFR1 und induziert damit eine Konformationsänderung in TNFR1-Trimeren, wodurch mehrere Proteine rekrutiert werden. Dazu zählen RIP1, TRADD (TNFR-associated death domain), cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1), cIAP2, TRAF2 (TNFR-associated factor 2) und TRAF5. Dies wiederum führt zu der Bildung eines membrangebundenen Proteinkomplexes, welcher als Komplex I bezeichnet wird. Im Bereich dieses Komplexes wird RIP1 durch cIAP1/2 polyubiquitiniert, was zu einer Aktivierung des überlebensfördernden NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B) Signalwegs und der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) führt (1,4).

Kommt es nun allerdings zu einer Deubiquitinierung von RIP1, führt dies zu einer Dissoziation des Proteins aus dem Komplex I und zur Aktivierung von Zelltodsignalwegen. Die Deubiquitinierung von RIP1 erfolgt hierbei durch Deubiquitinasen, einschließlich Cyldromatose (CYLD) und A20 und wird durch die Auto-Ubiquitinierung und den anschließenden Abbau der IAPs initiiert. Die Degradierung der IAPs selbst wird durch den Second Mitochondria-derived Activator of Caspases (SMAC) oder durch niedermolekulare Moleküle, den sogenannten SMAC-Mimetika (auch als IAP-Inhibitoren bekannt), stimuliert (1,4).

Im Anschluss wird ein Komplex aus RIP1, TRADD, Caspase-8 und FADD (FAS-Associated Death Domain) rekrutiert, der sogenannte Komplex II. Dieser Komplex II ist sowohl an der Aktivierung des apoptotischen als auch des nekroptotischen Weges beteiligt. Wird

beispielsweise Caspase-8 aktiviert, spaltet und inaktiviert diese RIP1 und RIP3, was zur Inhibierung der Nekroptose und Induktion der Apoptose führt. Wird Caspase-8 allerdings durch Caspase-Inhibitoren oder einen genetischen Knockout inhibiert, wird der nekroptotische Zelltod eingeleitet (1,4). In Abwesenheit von aktiver Caspase-8 wird RIP1 durch die Autophosphorylierung des Serinrests 161 (S161) an seinen N-Termini phosphoryliert und dadurch aktiviert. Dieses aktivierte RIP1 interagiert mit RIP3 über deren homotypisches RIP-Interaktionsmotiv (RHIMs), was zur Bildung eines Nekrosomkomplexes, einer heterodimeren Amyloidstruktur, führt. Durch Autophosphorylierung des Nekrosomkomplexes wird die Rekrutierung von MLKL herbeigeführt. RIP3 phosphoryliert MLKL an den Resten Threonin 357 und Serin 358 (1,4). Das phosphorylierte MLKL (pMLKL) oligomerisiert, transloziert zur Plasmamembran und leitet die Membranruptur ein. Der genaue Ablauf ist hierbei noch nicht vollständig geklärt (12). Man geht davon aus, dass sich Poren in der Plasmamembran bilden oder das oligomerisierte MLKL als eine Art Ionenkanal fungiert, wodurch die Zelle anschwillt und ihre Zell- und Organellenintegrität verliert und der Zelltod verursacht wird (13,14). Auch hier kommt es zur Freisetzung von Zellinhalten und (DAMPs), welche Entzündungsreaktionen auslösen können (8). Die Nekrosombildung und -aktivierung kann durch den RIP1-Inhibitor Necrostatin-1 (nec-1), den MLKL-Inhibitor Necrosulfonamid (NSA) und mehrere RIP3-Inhibitoren blockiert werden (1,4).

Die Nekroptose hat in den letzten Jahren als eine Form des programmierten Zelltods, der auch bei deaktivierter Apoptose eintreten kann, immer mehr an Aufmerksamkeit gewonnen und sich als ein neuartiges vielversprechendes Ziel für zukünftige Therapieansätze herauskristallisiert (11).

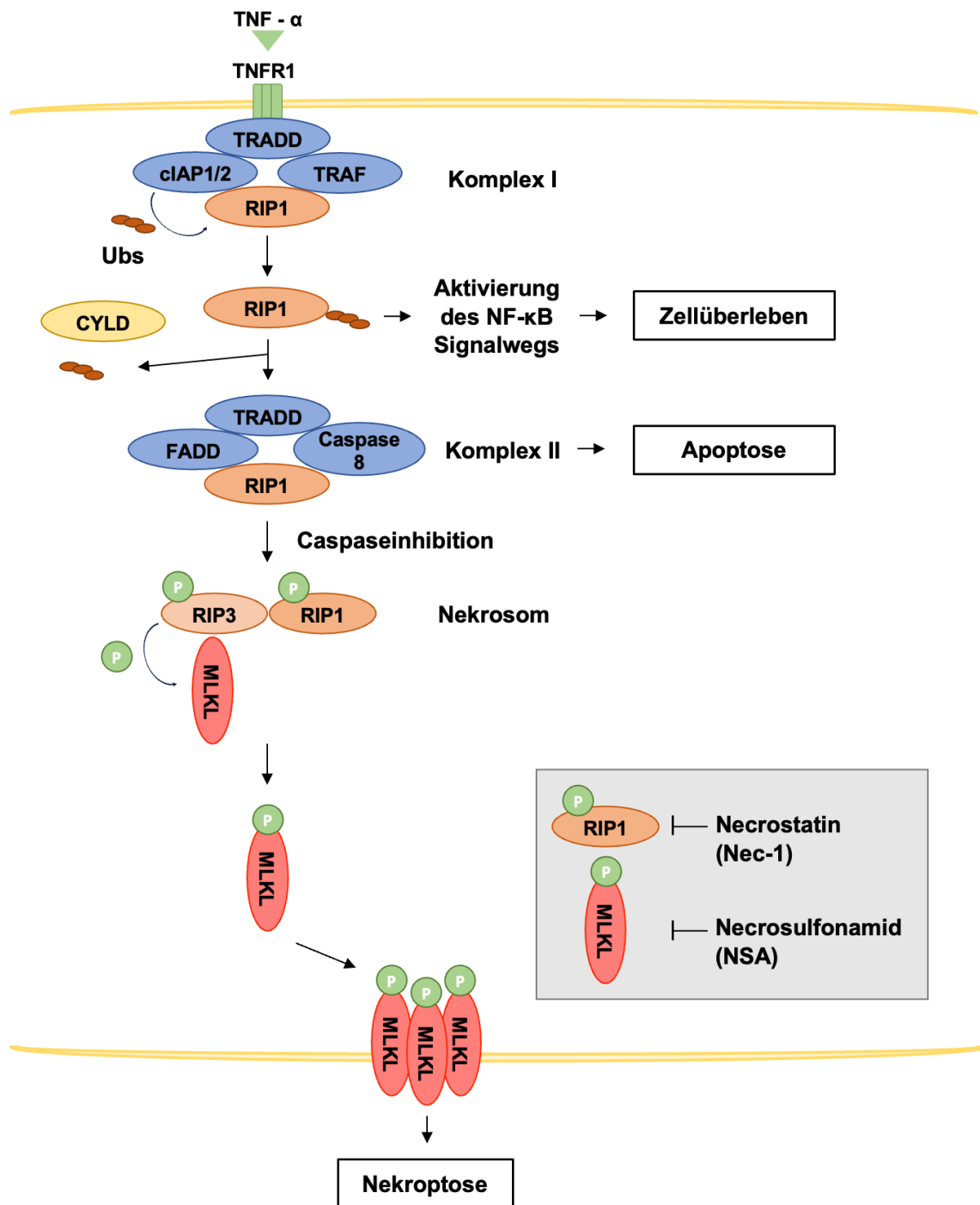


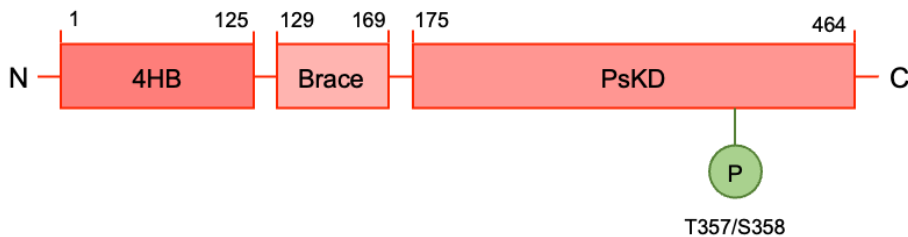
Abbildung 2: Der TNF-Signalmechanismus der Nekroptose, modifiziert nach (1,4).

Bindet TNF α an den TNFR1 Rezeptor, bildet sich der membranständige Komplex I aus. In diesem Komplex wird RIP1 durch cIAP1 und cIAP2 polyubiquitiniert. Dadurch wird der NF- κ B-Signalweg aktiviert, welcher das Zellüberleben unterstützt. Im Falle einer Deubiquitinierung von RIP1 durch CYLD, bildet sich der Komplex II aus. Gemeinsam mit aktiven Caspasen wird dann die Apoptose eingeleitet. Sollte die Caspase allerdings inhibiert sein, wird statt der Apoptose die Nekroptose eingeleitet. Dabei werden RIP1 und RIP3 autophosphoryliert und bilden ein sogenanntes Nekrosom. Anschließend phosphoryliert das Nekrosom MLKL. pMLKL oligomerisiert und führt durch seine Integration in die Zellmembran zum Verlust der Plasmamembranintegrität und so zum Zelltod.

1.4 MLKL

Die Pseudokinase MLKL (Mixed lineage kinase domain-like) ist einer der Hauptakteure in der Kaskade der Nekroptose, besteht aus 471 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 54 kDa (15). Sie vermittelt den letzten Schritt der Nekroptose, die Permeabilisierung der Plasmamembran (1).

MLKL besteht aus zwei funktionalen Domänen (Abbildung 3): einem Vier-Helix-Bündel (4HB) am N-Terminus und einer Pseudokinase (PsKD) am C-Terminus. Diese beiden Domänen sind über Zwei-Helix-Linker (Brace) verbunden. Die letale Aktivität von MLKL wird hauptsächlich durch die 4HB-Domäne vermittelt. Die PsKD selbst weist keine intrinsische Kinaseaktivität auf, erfüllt jedoch eine bedeutende Funktion, indem sie als dynamisches Gerüst und Modulator für die Protein-Protein-Interaktionen fungiert. Die PsKD agiert als Schnittstelle zur Kinasedomäne von RIP3 (16). Durch das Nekrosom, bestehend aus RIP1 und RIP3, wird MLKL an den Stellen Threonin-357 und Serin-358 (S345 im murinen RIP3) von RIP3 im Bereich der PsKD phosphoryliert (9, 10,11). Dies führt zu einer Konformationsänderung in der PsKD von MLKL (16), was zu einer Neuausrichtung sowohl der 4HB-Domäne als auch der Braceregion führt. Diese strukturellen Veränderungen ermöglichen die Ausführung des nekroptotischen Zelltods (5, 8).



4 HB	Brace	PsKD
- „Killer“-Domäne	- Dynamik beim Konformationswechsel - Oligomerisierung von pMLKL	- Interaktion mit RIP3 - Inhibierung von 4HB im unphosphorylierten Stadium - Nukleotidbindung

Abbildung 3: Die strukturellen Domänen von MLKL, modifiziert nach (16).

MLKL besteht aus einem Vier-Helix-Bündel (4HB-Domäne), einem Zwei-Helix-Linker (Brace) und einer Pseudokinase-Domäne (PsKD). Die 4HB-Domäne liegt am N-Terminus des MLKL und wird nach Phosphorylierung im Bereich der PsKD an Threonin-357 und Serin-358 aktiviert. Beide Domänen sind durch den Zwei-Helix-Linker (Brace) miteinander verbunden.

Durch die Konformationsänderung ist es pMLKL möglich, sich in die Zellmembran zu integrieren. Der genaue molekulare Mechanismus ist noch unklar, aktuell werden verschiedene Mechanismen diskutiert (Abbildung 4). So ist es möglich, dass sich pMLKL nur mit seiner 4HB-Domäne in die Plasmamembran integriert. Auch ist es denkbar, dass pMLKL mit transmembranen Ionenkanälen interagiert und deren Permeabilität mitbeeinflusst. Ein weiterer Ansatz ist, dass pMLKL selbst über seine 4HB-Domäne einen Ionenkanal ausbildet. Am ehesten wird allerdings angenommen, dass pMLKL oligomerisiert und Poren in der Plasmamembran bildet. Durch diese Wege schwillt die Zelle an, verliert seine Zell- und Organellenintegrität und verursacht den Zelltod (19). Es kommt somit zur Freisetzung von Zellinhalten und Damage-associated molecular pattern (DAMPs), was Entzündungsreaktionen auslösen kann (8).

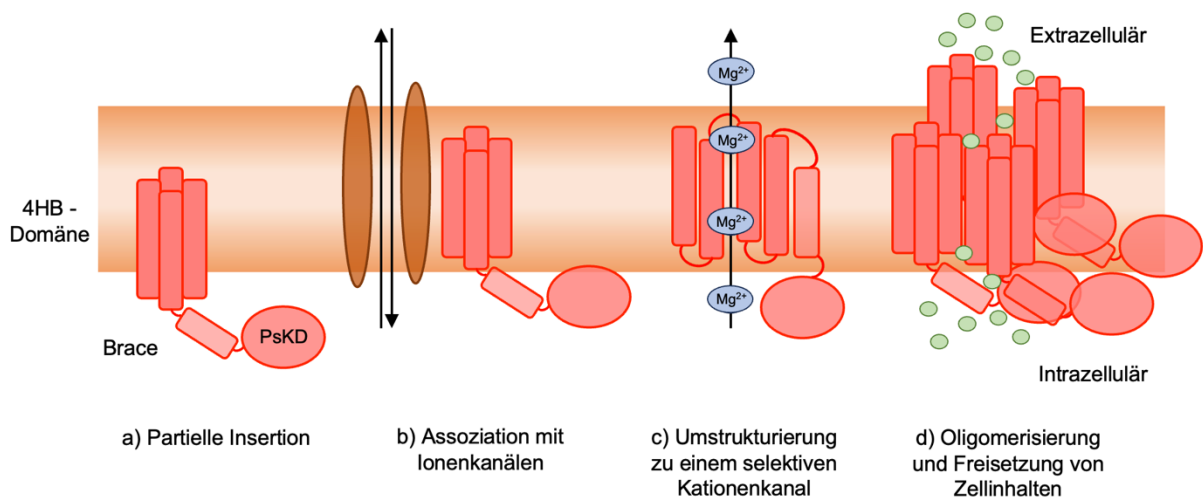


Abbildung 4: Modelle für die Wirkung von MLKL, modifiziert nach (19).

- a) Partielle Insertion der 4HB-Domäne in die Plasmamembran
- b) Assoziation von MLKL mit transmembranen Ionenkanälen, die Osmolyse erleichtern
- c) Umstrukturierung der 4HB-Domäne von MLKL zu einem selektiven Kationenkanal
- d) Oligomerisierung von MLKL durch die Brace-Region, um die Plasmamembran zu unterbrechen und die Freisetzung von Zellinhalten zu ermöglichen

MLKL ist jedoch nicht nur an der Durchführung der Nekroptose beteiligt, sondern spielt auch eine entscheidende Rolle bei verschiedenen weiteren zellulären Prozessen. So ist beispielsweise MLKL mit endosomalem Trafficking assoziiert und kontrolliert den Transport von endozytierten Proteinen. Dadurch wird der Abbau von Rezeptoren und Liganden gefördert, ihre induzierte Signalisierung moduliert und die Bildung von extrazellulären Vesikeln erleichtert. Diese Rolle existiert sowohl grundlegend unabhängig von RIP3 als auch in einer weiterführenden Form durch RIP3 ausgelöst (20).

Des Weiteren gehören zu diesen Prozessen die ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport)-abhängige Reparatur der Plasmamembran, die den nekroptischen Zelltod eingrenzt. MLKL wurde außerdem bei der Geweberegeneration, bei dem Abbau der Myelinscheidenmembran sowie bei der Förderung der Axonregeneration nach Verletzungen und bei Regeneration von Muskelstammzellen nach Muskelverletzungen durch die Induktion von Nekroptose beobachtet. Außerdem ist MLKL bei der Aktivierung von Inflammasomen, möglichen Kernfunktionen wie der Regulation von Endothel-Adhäsionsmolekülen durch Interaktion mit dem RNA-bindenden Motivprotein 6 (RBM6) und der Stabilisierung der mRNA mitbeteiligt (16,20).

Neben den bereits beschriebenen Phosphorylierungsstellen gibt es noch weitere RIP3-abhängige und RIP3-unabhängige Phosphorylierungsstellen, deren Funktionen bisher noch nicht vollständig geklärt sind (17,21). Ferner stellte sich die Ubiquitinierung von MLKL als eine weitere posttranslationale Modifikation heraus. Auch hier ist die Funktion noch weitestgehend unbekannt (22,23). Teilweise werden diese Modifikationen mit Autophagie und dem bereits genannten endosomalem Trafficking oder Myelinscheidenabbau in Verbindung gebracht (24).

Mehrere Studien geben Grund zur Annahme, dass die Nekroptose und somit auch MLKL bei einer Vielzahl von pathologischen Zuständen und Krankheiten wie Tumoren, entzündlichen Erkrankungen oder Infektionen, eine wichtige Rolle spielt (25). Dies macht MLKL zum Gegenstand aktueller Forschung und einem wichtigen potenziellen Ziel für neue Therapieansätze.

1.5 Tight Junctions

Epithelien und Endothelien sind auf eine parazelluläre Abdichtung angewiesen, um einen gerichteten Transport von Ionen und gelösten Stoffen durch die Zellschichten zu ermöglichen. Diese Abdichtung wird durch Tight Junctions (TJ) - oder auch Zonula occludens genannt - gebildet (26). Tight Junctions bilden eine gürtelartige Struktur an der Grenze zwischen der apikalen und basolateralen Membrandomäne in Epithel- und Endothelzellen. Somit stellen sie eine regulierte Diffusionsbarriere für den parazellulären Transportweg dar und trennen Kompartimente in multizellulären Organismen. Daher sind sie entscheidend für den Austausch von Substanzen zwischen der internen und externen zellulären Umgebung (27).

Tight Junctions sind Multiproteinkomplexe und setzen sich aus über 40 identifizierten Proteinen zusammen, wie integralen Transmembranproteinen, peripheren oder Plaque-Verankerungsproteinen und TJ-assoziierten Proteinen (26,27).

Zu den Transmembranproteinen zählt die Claudinfamilie, die drei Proteine der MARVEL-Familie (TAMP-Proteine), Occludin, Tricellulin und MARVELD3 und das Junctional Adhesion Molecule-1 (JAM-1) (28,29). Die Transmembranproteine bilden durch ihre extrazellulären Anteile Kontakt zu benachbarten Zellen aus. Diese dienen somit als Diffusionsbarriere und schließen den parazellulären Raum ab. Über die zytosolischen TJ-assoziierten Proteine Zonulin 1-3 (ZO) und Cingulin werden die Transmembranproteine mit dem Zytoskelett verankert (30).

Zu der Claudinfamilie gehören mindestens 24 verschiedene Mitglieder (31). Über zwei extrazelluläre und einen intrazellulären Loop sind die insgesamt vier Transmembranregionen der Claudine miteinander verbunden. Die N- und C-terminalen Enden liegen im Zytoplasma. Durch die Bildung von homo- und heteromeren Komplexen bestimmen sie funktionell die Barriereeigenschaft der Gewebe mit. Es können barrierebildende und porenbildende Isoformen unterschieden werden (28).

Auch TAMP-Proteine besitzen vier Transmembranregionen mit zwei extrazellulären Loops und einem intrazellulären Loop. Zusammen bilden sie die MARVEL (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link) -Domäne. Die N- und C-Termini enden ebenfalls im Zytoplasma. Sie beeinflussen die Dynamik der Tight Junctions und modulieren so Transportvorgänge und die Stabilität der Tight Junctions. Occludin und MARVELD3 spielen vor allem bei bizellulären Kontakten eine Rolle und Tricellulin bei trizellulären Kontakten (28).

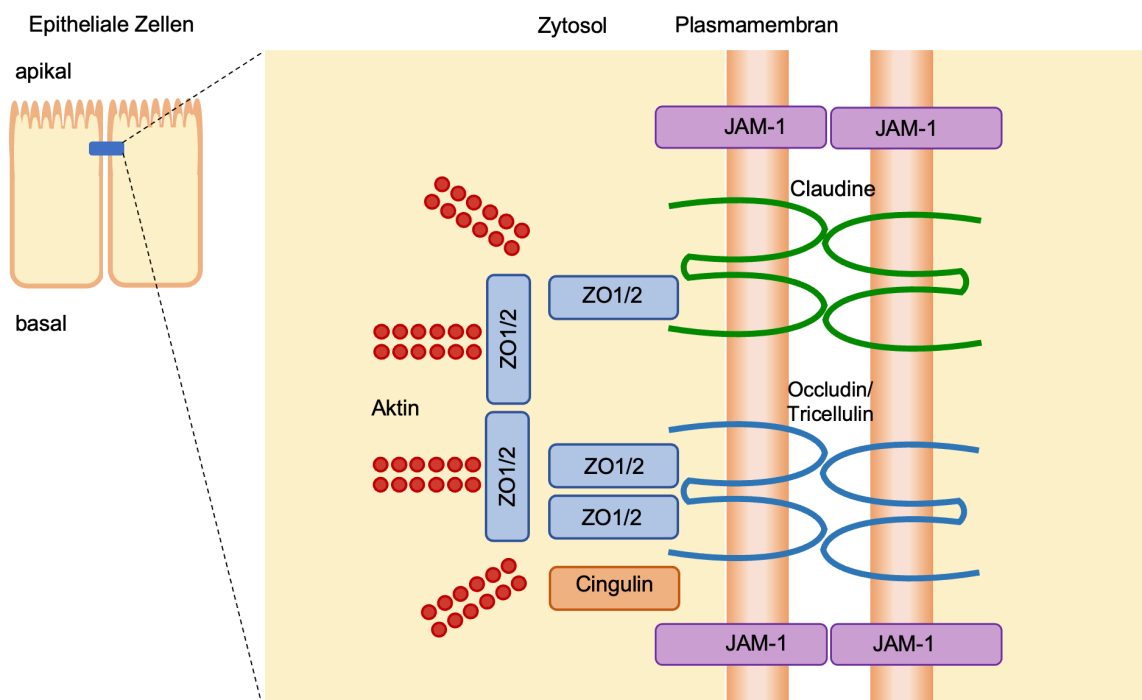


Abbildung 5: Schematische vereinfachte Darstellung der grundlegenden strukturellen Komponenten der Tight Junctions, modifiziert nach (30,32).

Aufgrund ihrer entscheidenden Rolle für die Epithelfunktion werden Funktionsstörungen von Tight Junctions mit mehreren Krankheiten in Verbindung gebracht, wie beispielsweise entzündlichen Darmerkrankungen und Zöliakie. Bei diesen pathologischen Zuständen wird das Epithel in der Regel durchlässiger, so dass es seiner Aufgabe nicht mehr gerecht werden kann (33).

Tight Junctions spielen außerdem eine wichtige Rolle im Rahmen der Metastasierung von Tumorzellen. Zum einen existieren sie zwischen Tumorzellverbänden selbst, zum anderen müssen sie von Tumorzellen passiert werden, wie zum Beispiel beim Eindringen in das Endothel (29).

1.6 Occludin

Das Protein Occludin (OCLN) zählt zu den zentralen Bestandteilen von Tight Junctions und gehört zur Familie der TJ-assoziierten MARVEL-Proteine (Myelin/Lymphozyten- und verwandte Proteine für den Vesikel-Transport und Membran-Link) (34,35).

Mit einer molekularen Masse von ca. 60 kDa und bestehend aus 522 Aminosäuren, ist es durch vier Transmembrandomänen in die Zellmembran integriert, wo es im Komplex mit den anderen Proteinen des Multiproteinkomplexes an der Entstehung der Polarität der Zellen und an der Diffusionskontrolle beteiligt ist (36,37). Occludin ist in fünf Domänen unterteilt (A-E) mit zwei extrazellulären Schleifen und einem intrazellulären Loop. Ihre C- und N-terminalen Domänen befinden sich im Zytoplasma der Zelle (36,38). Die jeweiligen Domänen regulieren verschiedene Funktionen. Die extrazellulären Domänen stellen den engen Kontakt zu den benachbarten Zellen her und sind entscheidend für die Aufrechterhaltung der selektiven parazellulären Permeabilität. (38) Die C-Domäne reguliert den intrazellulären Transport und vermittelt Endozytose. Die E-Domäne interagiert mit dem zytosolisch liegenden Zonulin-1 und beeinflusst den intrazellulären Transport von Occludin an die Plasmamembran und die Verankerung im Zytoskelett. Außerdem moduliert die E-Domäne die Dimerisierung von Occludin.

Occludin kann als wichtiger Bestandteil der Tight Junctions durch unterschiedliche Stimuli wie beispielsweise Zytokine, oxidativen Stress und Wachstumsfaktoren beeinflusst werden. An den zytosolisch liegenden Domänen steht Occludin in enger Verbindung mit verschiedenen zytosolischen Proteinen wie Zonulin-1, Zonulin-2, Zonulin-3, Cingulin und vielen weiteren Faktoren, die als Plaques Occludin mit dem Zytoskelett verbinden (26, 36, 37).

Posttranslationale Modifikationen, insbesondere die Phosphorylierung und Dephosphorylierung, sind entscheidend an der Regulierung der Signalprozesse beteiligt (40).

Abbildung 6 zeigt den schematischen Aufbau von Occludin und Beispiele für Kinasen und deren Bindungsstellen an spezifische Serin-, Threonin- und Tyrosinreste, die die Struktur und die Funktion von Tight Junctions beeinflussen. Im Allgemeinen geht man derzeit davon aus, dass die Tyrosinphosphorylierung die Tight Junctions destabilisiert, während insbesondere die Threoninphosphorylierung die Tight Junctions-Assemblierung fördert. Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Occludin müssen genau aufeinander abgestimmt sein. Über Phosphorylierungsstellen am N-Terminus ist in dieser Hinsicht nur wenig bekannt (40). Aufgrund der vielen Phosphorylierungs- und Splicingprodukte des Occludins finden sich in der Immunoblot Analyse neben 60 kDa Hauptbande zusätzliche Nebenbanden (28).

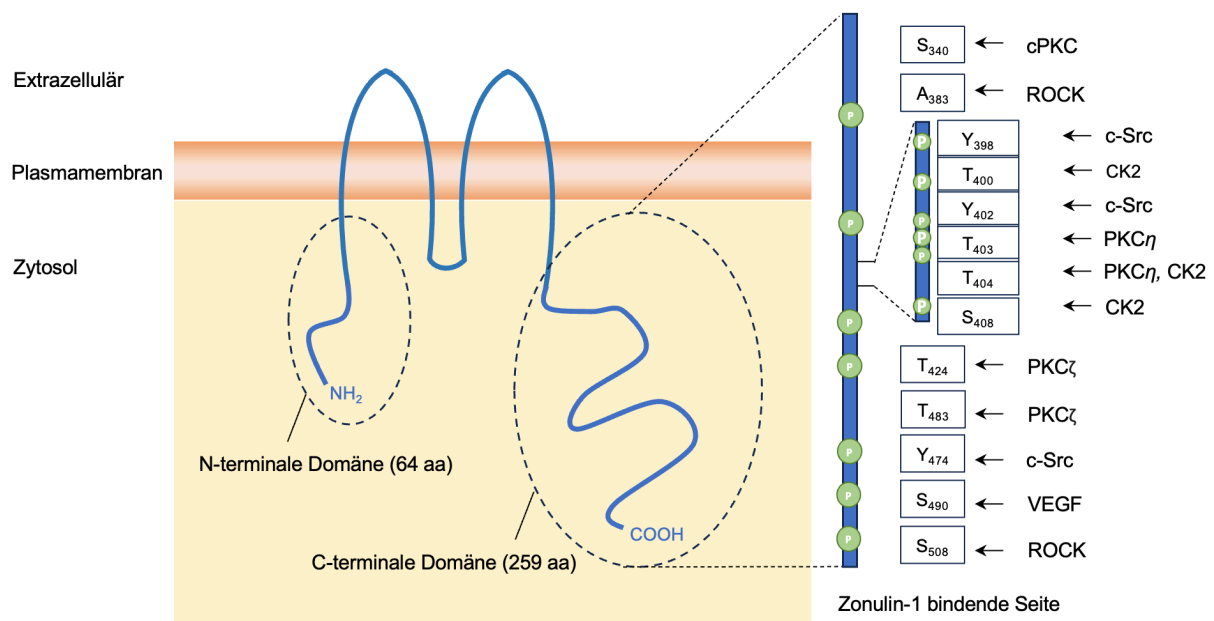


Abbildung 6: Schematische Darstellung von Occludin und der Lokalisierung von potentiellen Phosphorylierungsstellen, modifiziert nach (40).

2 Material

2.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende adhärent wachsende humane Zelllinien verwendet:

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	RIP3-Status
CaCo2	kolorektales Karzinom	negativ (41)
DU-145	Prostatakarzinom	negativ (2)
HT29	kolorektales Karzinom	positiv (2)
Huh7	hepatozelluläres Karzinom	negativ (2)
MCF7	Mammakarzinom	negativ (2)
PC3	Prostatakarzinom	negativ (2)
SK-BR3	Mammakarzinom	positiv (2)
T47D	Mammakarzinom	positiv (2)
MCF7 RIP#6	Mammakarzinom stabil transfiziert mit pcDNA3-RIP3 (3)	positiv
MCF7 neo	Mammakarzinom stabil transfiziert mit pcDNA3-Leervektor (3)	negativ

Die regelmäßige Überprüfung auf Mykoplasmen in allen Zelllinien erfolgte unter Verwendung des MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kits von Lonza (LT07-118, Lonza, Deutschland). Zusätzlich wurde die Authentizität der humanen PCa-Zelllinien durch STR-Profiling von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bzw. über SNP-Typing von Multiplexion (Heidelberg, Deutschland) bestätigt.

2.2 Kulturmedien

2.2.1 Kulturmedien für adhärent wachsende Zelllinien

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C, gesättigter Wasserdampfatosphäre und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 % inkubiert. Die verwendeten Zusätze gewährleisteten ein optimales Zellwachstum und verhinderten mögliche Kontaminationen. G418 wurde dem

Kulturmedium zur Kultivierung stabil transfizierter Zelllinien für Selektionszwecke hinzugegeben.

Tabelle 2: Kulturmedium für CaCo2 wt

CaCo2 wt Kulturmedium	
Konzentration	Komponente
15 %	FCS (nicht hitzeinaktiviert)
1 %	Penicillin-Streptomycin
1 %	nicht essenzielle Aminosäuren (NEAA)
1 %	Pyruvat
1 %	Glutamin
in	MEM

Tabelle 3: Kulturmedium für MCF7 wt

MCF7 wt Kulturmedium	
Konzentration	Komponente
10 %	FCS (nicht hitzeinaktiviert)
1 %	Penicillin-Streptomycin
in	RPMI

Tabelle 4: Kulturmedium für SK-BR3 wt

MCF7 wt Kulturmedium	
Konzentration	Komponente
10 %	FCS (nicht hitzeinaktiviert)
1 %	Penicillin-Streptomycin
in	McCoy5A

Tabelle 5: Kulturmedium für transfizierte Zelllinien

MCF7 neo und RIP3#6	
Kulturmedium für stabil transfizierte Zellen	
Konzentration	Komponente
10 %	FCS (nicht hitzeinaktiviert)
1 %	Penicillin-Streptomycin
4 mg/ml	G418 Sulfat
in	RPMI

2.2.2 Einfriermedium für adhärent wachsende Zellen

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

Tabelle 6: Einfriermedium

Einfriermedium	
Konzentration	Komponente
10 % (v/v)	DMSO
20 % (v/v)	FCS
70 % (v/v)	Kulturmedium

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 Oligonukleotide als siRNA für die Transfektion

Tabelle 7: Oligonukleotide als siRNA für die Transfektion

Zielgen	Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
MLKL	MLKL#1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	141535
MLKL	MLKL#3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	141536
Occludin	OCLN#1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	s56793
Occludin	OCLN#2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	s56794
Kontroll siRNA	scram	Dharmacon, Lafayette, CO, USA	D-001810-10-20

2.3.2 Proteingrößenstandard

Für die Immunoblot-Analysen wurde folgender vorgefärbter und definierter Protein-Größenmarker verwendet: Page Ruler™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 26616).

Als weiterer Proteinstandard wurde folgendes Kälber Serum Albumin verwendet: BSA (10 mg/ml) (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland, B90015).

2.4 Antikörper

2.4.1 Primärantikörper für Immunoblot-Analysen und Immunfluoreszenz

Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper für die Immunoblot-Analyse und Immunfluoreszenz

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Hersteller ^a	Artikelnummer	Methode ^b
GAPDH	Maus	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology	sc-32233	IB
MLKL	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology	14993	IB
OCLN	Maus	1:200	Sigma	33-1500	IB, IF
pMLKL (T357/S358)	Kaninchen	1:1000, 1:250	Abcam	ab187091	IF
pMLKL (T357/S358)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology	91689S	IB
RIP1	Maus	1:1000	BD Transduction Laboratories	610458	IB
RIP3	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology	E1Z1D	IB
RIP3	Kaninchen	1:100	Novus Biologicals	NBP2-24588	IF

^a Hersteller: Abcam, Cambridge, UK; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA; Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA; Novus Biologicals, Wiesbaden, Deutschland; Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX, USA

^b Methode: IB Immunoblot, IF Immunfluoreszenz

2.4.2 Sekundärantikörper für Immunoblot-Analysen und Immunfluoreszenz

Tabelle 9: Verwendete Sekundärantikörper für die Immunoblot-Analyse

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer
Meerrettich-Peroxidase-konjugiert Ziege-anti-Maus IgG (H+L)	1:3000 in 5 % fettfreiem Trockenmilchpulver in TBST	BioRad, München, Deutschland	1706516
Meerrettich-Peroxidase-konjugiert Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)	1:3000 in 5 % fettfreiem Trockenmilchpulver in TBST	BioRad, München, Deutschland	1706515

Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer
Alexa Fluor® 488 Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)	1:500 in Sekundärlösung	Invitrogen, Karlsbad, USA	A11008
Alexa Fluor® 546 Ziege-anti-Maus IgG (H+L)	1:500 in Sekundärlösung	Invitrogen, Karlsbad, USA	A11030

2.5 Puffer und Lösungen

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 eine nicht-sterile PBS-Lösung angesetzt.

Tabelle 11: PBS 10 x

PBS (10 x)	
Konzentration	Komponente
140 mM	NaCl
8 mM	$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$
2 mM	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
in	ddH ₂ O

2.5.1 Lysepuffer für Proteinlysate

Tabelle 12: Lysepuffer für Proteinlysate

Lysepuffer (1 ml)	
Konzentration	Komponente
10 %	Lysepuffer (10 x) (9803S, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA)
2 %	Protease- und Phosphataseinhibitor-Cocktail (100 x) (78440, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA)
in	ddH ₂ O

2.5.2 Puffer und Lösungen für den Immunoblot

Tabelle 13: Trenngelpuffer für den Immunoblot

Trenngelpuffer	
Konzentration	Komponente
1,5 M	Tris-base
in pH 8,8	ddH ₂ O unter Verwendung von HCl

Tabelle 14: Sammelgelpuffer für den Immunoblot

Sammelgelpuffer	
Konzentration	Komponente
0,5 M	Tris-base
in pH 6,8	ddH ₂ O unter Verwendung von HCl

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

Tabelle 15: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für SDS-PAGE

	Trenngel		Sammelgel
Chemikalien	10 %	15 %	5 %
ddH ₂ O	2 ml	1,2 ml	1,15
Rotiphorese® Gel 30	1,7 ml	2,5 ml	330 µl
Sammgelpuffer	-	-	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

Tabelle 16: SDS-Lösung für SDS-PAGE

SDS	
Konzentration	Komponente
10 %	SDS
in	ddH ₂ O

Tabelle 17: APS-Lösung für SDS-PAGE

APS	
Konzentration	Komponente
10 %	APS
in	ddH ₂ O

Tabelle 18: SDS-Laufpuffer 1 x für den Immunoblot

SDS-Laufpuffer (1 x)	
Konzentration	Komponente
25 mM	Tris-base
190 mM	Glycerin
0,1 %	SDS
in	ddH ₂ O

Tabelle 19: Semi-Dry Blot Puffer 10 x für den Immunoblot

Semi-Dry Blot Puffer (10 x)	
Konzentration	Komponente
480 mM	Tris-base
390 mM	Glycerin
0,375 % (w/v)	SDS
in	ddH ₂ O

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

Tabelle 20: Semi-Dry Blot Puffer (1 x) für den Immunoblot

Semi-Dry Blot Puffer (1 x)	
Konzentration	Komponente
10 % (v/v)	Semi-Dry Blot Puffer 10 x
20 % (v/v)	Methanol
in	ddH ₂ O

Tabelle 21: TBS (10 x) für den Immunoblot

TBS (20 x)	
Konzentration	Komponente
200 nM	Tris
1,38 M	NaCl
in pH 7,6	ddH ₂ O unter Verwendung von HCl

Tabelle 22: TBST (1 x) für den Immunoblot

TBST (1 x)	
Konzentration	Komponente
0,1 % (v/v)	Tween 20
in	TBS (1 x)

Tabelle 23: Blocking-Milch für den Immunoblot

Blocking-Milch	
Konzentration	Komponente
5 % (w/v)	Magermilchpulver
in	TBST (1 x)

Tabelle 24: Ponceau S für den Immunoblot

Ponceau S	
Konzentration	Komponente
0,5 % (w/v)	Ponceau S
1 % (v/v)	Konzentrierte Essigsäure
in	ddH ₂ O

Tabelle 25: Antikörperlösung für den Immunoblot

Antikörperlösung	
Konzentration	Komponente
5 %	BSA
0,5 %	NaN ₃ (10 %)
in	TBST (1 x)

Tabelle 26: ECL-Lösung für den Immunoblot

ECL-Lösung	
Konzentration	Komponente
10mM	Tris-base
in	ddH ₂ O
pH 8,5	unter Verwendung von HCl

Tabelle 27: Chemilumineszenz-Detektierlösung für den Immunoblot

Chemilumineszenz-Detektierlösung	
Konzentration	Komponente
50 µl	Luminol (250 mM in 100 % DMSO)
25 µl	Cumarinsäure (90 mM in 100 % DMSO)
4 µl	H ₂ O ₂ (30 %-ig v/v)
in 10 ml	ECl (100 mM, pH 8,5)

Tabelle 28: Protein-Probenpuffer (6 x) für den Immunoblot

Protein-Probenpuffer (6 x)	
Konzentration	Komponente
350 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
10,28 % (v/v)	SDS
36 % (v/v)	Glycerin
600 mM	DTT
Spatelspitze	Bromphenolblau
in	ddH ₂ O

2.5.3 Lösungen für die Immunfluoreszenz

Tabelle 29: Blockinglösung für die Immunfluoreszenz

Blockinglösung	
Konzentration	Komponente
10 % (v/v)	PBS
10 % (v/v)	FCS
0,1 % (v/v)	Triton X-100
in	ddH ₂ O

Tabelle 30: Sekundärlösung für die Immunfluoreszenz

Sekundärlösung	
Konzentration	Komponente
10 % (v/v)	PBS
1 % (v/v)	FCS
0,1 % (v/v)	Triton X-100
in	ddH ₂ O

Tabelle 31: Waschlösung für die Immunfluoreszenz

Waschlösung	
Konzentration	Komponente
0,1 % (v/v)	Triton X-100
in	PBS

Tabelle 32: Formaldehydlösung für die Immunfluoreszenz

Formaldehydlösung (3,7 %)	
Konzentration	Komponente
10 % (v/v)	Formaldehyd (37 %)
in	PBS

2.5.4 Lösungen für die Kristallviolett färbung

Tabelle 33: Kristallviolettlösung

Kristallviolettlösung	
Konzentration	Komponente
0,1 % (w/v)	Kristallviolett
10 % (v/v)	Ethanol
in	ddH ₂ O

Die Kristallviolettlösung wurde nach Herstellung filtriert.

2.6 Reagenzien

Tabelle 34: Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller ^a	Sonstiges
Acrylamid-Lösung	Roth	30 %
Accutase	Sigma	
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth	
Bradford-Reagenz Protein-Assay-Dye	Bio-Rad	
Bromphenolblau	Roth	
BSA Albumin Fraction V proteasefrei	Roth	
BSA Purified	New England Biolabs	100 x (10 mg/ml)
BV6	Selleckchem	Zielstruktur cIAP, XIAP Artikelnr.: S7597
DAPI	Sigma-Aldrich	Artikelnr. D9542
ddH ₂ O		
Disulfid Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	
DMEM	Gibco	
Dodecylsulfate-Na-salt in pellets	SERVA	
Dodecylsulfat-Na-Salz (SDS)	SERVA	
DTT	New England Biolabs	10 x (0,1 M)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) without calcium chloride and magnesium chloride	Sigma-Aldrich	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with calcium chloride and magnesium chloride	Sigma-Aldrich	
Ethanol	Honeywell Research Chemicals	100 %
Essigsäure	Roth	100 %
FCS Nicht-Hitzeinaktiviert	Sigma-Aldrich	
Formaldehyd	Sigma-Aldrich	37 %

GlutaMAX I	Gibco	100 x
Glycerin	Sigma-Aldrich AppliChem	
Glycin	Roth	
Isopropanol	Thermo Fisher Scientific	
Immersionsöl	Leica	Typ F
Kristallviolett	Merck	
L-Glutamin	Gibco	100 x
Lipofectamin®2000	Invitrogen	Artikelnr.: 11668019
Luminol	Sigma-Aldrich	≥ 97 %
Lysepuffer	Cell Signaling Technology	10 x
Magermilchpulver	AppliChem	
MEM-Non-Essential Amino Acid Solution	PAN-Biotech	100 x
Methanol	Honeywell Research Chemicals	≥ 99,8 %
Minimum Essential Medium Eagle (MEM)	Sigma-Aldrich	
Mowiol	Calbiochem	
Natriumacetat	Merck	
Natriumazid	AppliChem	
Natrium-Chlorid	Sigma-Aldrich	
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	SERVA	
Natriumpyruvat	Gibco	100 x
Necrostatin-1	ENZO Life Science	Zielstruktur: RIP1 Artikelnr.: BML-AP309-0020
Necrosulfonamid	Merck	Zielstruktur: MLKL Artikelnr.: 480073
Penicillin-Streptomycin	Gibco / Sigma-Aldrich	

Peroxid	WesternBright	
Ponceau S	Roth	
Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific	Artikelnr.: 78440
RPMI-Medium	Gibco	
Salzsäure (HCl)	Roth	37 %
Stickstoff		
TBS	AppliChem	20 x
TEMED	Roth	≥ 99 %
TNF α	ImmunoTool	Zielstruktur: TNF α -Rezeptor Artikelnr.: 11343017
Transfektionsmedium	Gibco	Optimem
Triton X-100	Sigma-Aldrich	
Trypsin-EDTA Solution	Sigma-Aldrich	
Tween 20	AppliChem	10 %
VE-Wasser		
z-VAD(OMe)-FMK	ENZO Life Sciences	Zielstruktur: Caspasen Artikelnr.: BML-P4160001

^a Hersteller: AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Calbiochem (USA), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA), ImmunoTools (Germany), Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Selleckchem (USA), Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)

2.7 Apparate, Geräte und Glasware

Tabelle 35: Verwendete Apparate, Geräte und Glasware

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Abzug	Wesemann	
Analysenwaage	Satorius	Handy
Autoklav	HP-Labortechnik	Varioklav

Material

Becherglas	SIMAX	100 ml
Becherglas	SIMAX	250 ml
Becherglas	SIMAX	500 ml
Chemilumineszenzimager	Vilber Lourmat	Fusion Solo S
Chopstick Elektrode	World Precision Instruments	STX2
Eismaschine	Scotsman Ice Systems	AF 124
Fluoreszenzmikroskop	Leica	DMi8
Gefrierschrank	Liebherr	-20 °C
Gefrierschrank	EWALD V86.830.1	-80 °C
Gießstand Immunoblot	Bio-Rad	Mini-PROTEAN Tetra System
Handpumpe	INTEGRA Biosciences	Vacunsafe comfort
Heizblock	TECHNE DRI-BLOCK	DB.2D
Heizblock	EPPENDORF SE	ThermoMixer C
Inkubator	HERAcell	150
Konfokalmikroskop	Leica	SP8
Kühlzentrifuge	EPPENDORF SE	5427 R
Laufstand Immunoblot	Bio-Rad	PowerPacHC
Leica Steuerungselement	Leica	CTR advanced
Lichtmikroskop	Nikon	Eclipse TS2
Magnet- und Heizplatte	IKAMAG	RET-GS
Messbecher	Fisherbrand	100 ml
Messbecher	Fisherbrand	500 ml
Messbecher	VITLAB	5000 ml
Mikrowelle	Bosch	
Minizentrifuge	Roth	
Minizentrifuge	Biozym	

Material

Multipette	EPPENDORF SE	M4
Multiphotonensystem	Leica	TSC SP8
pH-Meter	inoLab	WTW series pH 730
Pinzette	Dumont	
Pipette	EPPENDORF SE	10 µl
Pipette	EPPENDORF SE	100 µl
Pipette	EPPENDORF SE	200 µl
Pipette	EPPENDORF SE	1000 µl
Pipette-Boy	INTEGRA Biosciences	Pipetboy 2
Plattenzentrifuge	PEQLAB	PerfectSpinP
PowerPac Immunoblot	Bio-Rad	Power Pac HC
Reaktionsgefäßständer	eBioscience	1,5 ml
Reaktionsgefäßständer	eBioscience	2 ml
Reaktionsgefäßständer	Scienceware	15 ml
Reaktionsgefäßständer	Scienceware	50 ml
Rührfisch		
Schott-Glas	Schott	50 ml
Schott-Glas	Schott	250 ml
Schott-Glas	Schott	1000 ml
Skalpell		
Spektralphotometer	Tecan Group	Tecan Spark 10M
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments	LaminAir HB 2448
Stickstofftank	Worthington Industries	Labs 20
Transfersystem	Bio-Rad	Trans-Blot Turbo
Voltohmometer	World Precision Instruments	EVOM
Vortexer	Scientific Industries	vortex-genie 2

Waage	Aarotrius	AX623
Wärmeschrank	Thermo Fisher Scientific	HERAtherm Incubator
Zählkammer	BRAND	Neubauer Improved 0,1 mm/0,0025 mm ²
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific	Biofuge stratos

2.8 Software

Tabelle 36: Verwendete Software

Software	Version	Entwickler ^a	Gerät	Anwendung
EvolutionCapt	Solo 6 17.04a	Vilber Lourmat	Fusion Solo S	Digitale Detektion von Western Blot Chemilumineszenz
Image J	1.53e	NIH		Auswertung von Bilddateien
Office Professional mit den Programmen Excel, PowerPoint, Word	2016	Microsoft [®]		zur Datenanalyse und Erstellung von Diagrammen
NIS-Elements	5.20.00	Nikon Laboratory Imaging	Nikon Eclipse Ts2	Bildaufnahmen am Nikon Eclipse Ts2 Mikroskop
Photoshop	CS5	Adobe [®]		Erstellen von Abbildungen
Prism	10.2.0	GraphPad Software		zur Datenanalyse und Erstellung von Diagrammen
SPARKCONTROL Method Editor	V 3.1	TECAN	Tecan SPARK 10M	Photometrische Messungen (Bradford-Assay)
Leica Application Suite X	3.1.5.16308	Leica Microsystems	Leica DMI8	Fluoreszenzmikroskopie

^a Entwickler: Adobe[®] Photoshop CS5 (San José, CA, USA), GraphPad Software (Boston, MA, USA), Leica Biosystems Imaging (Wetzlar, Deutschland), Microsoft[®] (Redmont, WA, USA), Nikon Laboratory Imaging (Tokio, Japan), NHI National Institute of Health (Maryland, USA), Tecan (Zürich, Schweiz), Vilber Lourmat (Eberhardzell, Deutschland)

2.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 37: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Bezeichnung
6-Well	Greiner Bio-One	PS, TC, steril
12-Well	Greiner Bio-One	Cellstar, 12-Well
96-Well	Greiner Bio-One	96-Well
Combitips	EPPENDORF SE	Advanced 5 ml
Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific	1,8 ml
Deckgläser	VWR	10 mm
Deckgläser	Roth	20 x 20 mm
Filter	Thermo Fisher Scientific	0,45 µm
Filterspitzen	Biozym	SurPhob 10 µl
Filterspitzen	Biozym	SurPhob 100 µl
Filterspitzen	Biozym	SurPhob 200 µl
Filterspitzen	Biozym	SurPhob 1250 µl
Leukosilk	Leukosilk S	2,5 cm x 9,2 m
Nitrozellulosemembran	Amersham	Protan 0,45 um NC
Objektträger	Thermo Fisher Scientific	Superfrost plus
Parafilm	Parafilm	
Pipettenspitzen	Biozym	SurPhob 10 µl
Pipettenspitzen	Biozym	SurPhob 100 µl
Pipettenspitzen	Biozym	SurPhob 200 µl
Pipettenspitzen	Biozym	SurPhob 1250 µl
Reaktionsgefäß	EPPENDORF SE	1,5 ml
Reaktionsgefäß	EPPENDORF SE	2 ml
Reaktionsgefäß	EPPENDORF SE	5 ml
Reaktionsgefäß	Greiner Bio-One	15 ml
Reaktionsgefäß	Greiner Bio-One	50 ml
Serologische Pipette	Greiner Bio-One	Cellstar 5 ml
Serologische Pipette	Greiner Bio-One	Cellstar 10 ml

Serologische Pipette	Greiner Bio-One	Cellstar 25 ml
Serologische Pipette	Greiner Bio-One	Cellstar 50 ml
Spritze	BD Discardit II	10 ml
Wägeschale	Roth	100 ml
Wägeschale	Roth	300 ml
Whatman-Filter	GE Healthcare Life Science	Whatman
Zellkultureinsätze Transwell	Costar	12-Well, Porengröße von 0,4 µm
Zellkulturflasche	Greiner Bio-One	Cellstar 250 ml, 75 cm ²
Zellkulturschale	Greiner Bio-One	Cellstar 6 cm
Zellkulturschale	Greiner Bio-One	Cellstar 10 cm
Zellschaber	Sarstedt	25 cm

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Zelllinien

Alle genutzten Zelllinien wurden im Inkubator bei 37 °C, mit einem CO₂-Anteil von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Zur Zellkultivierung wurden 250 ml Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm² verwendet. Um Kontaminationen zu vermeiden, erfolgte das Arbeiten mit den Zelllinien unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank. Aufgrund des konfluenten Wachstums wurden die Zelllinien für optimale Wachstumsbedingungen zweimal wöchentlich passagiert. Das Splittingverhältnis wurde je nach Konfluenz zwischen 1:2 und 1:10 gewählt, wobei nach jeder dritten Ausdünnung eine neue Zellkulturflasche verwendet wurde.

Hierzu wurden die Zellen nach Absaugen des alten Mediums mittels Vakuumpumpe mit 10 ml auf 37 °C vorgewärmtem PBS (ohne Mg²⁺/Ca²⁺) gewaschen. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und die Zell-Zell-Kontakte und die Adhäsionsverbindung der Zellen zur Kulturflasche mit Trypsin bzw. Accutase für 5 bzw. 10 min bei 37 °C gelöst. Nach erfolgreicher Lösung der Zellen erfolgte die Resuspendierung der Zellen im jeweiligen Kulturmedium nach dem vorher bestimmten Splittingverhältnis. Die resuspendierten Zellen wurden in einem Verhältnis zwischen 1:2 und 1:10 in die Zellkulturflasche und auf für die verschiedenen weiteren Vorhaben zu nutzenden 6 cm bzw. 10 cm Zellkulturschalen oder 6-, 12- und 96- Well Platten ausgesät. Bei dem Aussäen wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der Zellen

geachtet. Das Wachstumsmedium wurde regelmäßig gewechselt, um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten.

Die Kryokonservierung der Zelllinien ist in flüssigem Stickstoff erfolgt, um Zelllinien langfristig konservieren und nutzen zu können. Hierfür wurden die Zellen wie zuvor beschrieben mit Trypsin oder Accutase gelöst und in dem jeweiligen Kulturmedium resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen bei 4 °C für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde mit 1 ml passendem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. In einer speziellen Einfrierhilfe wurden die Zellen bei -80 °C für zwei Tage heruntergekühlt. Anschließend kamen die Zellen bei -196 °C in den Stickstofftank. Die Einfrierhilfe sorgt für eine kontinuierliche Temperatursenkung von 1 °C pro Minute, um eine hohe Überlebensrate der Zellen zu gewährleisten. Das DMSO in dem Einfriermedium verhindert das Entstehen von Eiskristallen, die die Zellen schädigen würden.

Es wurden alle drei Monate frische Zellen für die Versuche aufgetaut, kultiviert und verwendet. Für diesen Zweck wurden die gefrorenen Kryoröhren aus dem Stickstofftank entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden dann in eine Zellkulturflasche, in welcher bereits das passende Medium vorgelegt war, überführt. Auch hier wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der Zellen geachtet. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellkulturflaschen mit neuem Medium befüllt. Anschließend wurden die Zellen wie zuvor beschrieben weiter kultiviert.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Um die genaue Zellzahl zu ermitteln und so eine Vergleichbarkeit in den Versuchen zu schaffen, wurde eine Neubauer-Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,1 mm verwendet. Nach oben beschriebener Gewinnung der Zellsuspension wurden 10 µl dieser Suspension in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop ausgezählt. Dazu wurden vier Großquadrate ausgezählt und aus der vierten Zehnerpotenz der durchschnittlichen Zellzahl aller vier Großquadrate ließ sich die Anzahl der Zellen je ml bestimmen.

3.1.3 Transiente Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden

Mithilfe von siRNA-Oligonukleotiden erfolgte die vorübergehende Suppression der Expression endogener Proteine, wodurch die Funktion des Zielproteins in anschließenden Versuchen weiter untersucht werden kann. Die Translation des Zielproteins wurde durch die RNA-

Interferenz verhindert. Als Kontrolle wurde ebenfalls eine Kontroll-siRNA transfiziert, welche als scram bezeichnet wird.

Zunächst wurden die zu transfizierenden Zellen in 6 cm Zellschalen ausgesät und unter Standardbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS (mit Mg^{2+}/Ca^{2+}) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit dem Transfektionsgemisch inkubiert. Das Transfektionsgemisch enthielt 6 μ l Lipofectamin @2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 11668019) als Transfusionsreagenz, 500 μ l Opti-MEM als Transfektionsmedium und 1 nM der jeweiligen siRNA (Stockkonzentration 20 μ M). Nach 6 h wurde die gleiche Menge des entsprechenden Standardwachstumsmediums der Zellen zu den transfizierten Zellen hinzugegeben.

3.1.4 Cytotoxassay

Im Rahmen des Cytotoxassays wurden Zellen mit Nekroptosestimulanzien und Nekroptoseinhibitoren behandelt. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit dem Pan-Caspase-Inhibitor zVAD (50 μ M) behandelt. Durch zVAD wurde die Einleitung der Apoptose blockiert (42). Nach zwei Stunden Inkubation wurden die Zellen zusätzlich mit den Nekroptosestimulanzien TNF α (25 ng/ml) und dem SMAC-Mimetik BV6 (0,6 μ M) für 48 Stunden inkubiert (43). Als Nekroptoseinhibitoren wurden Necrostatin-1 (Nec-1, 20 μ M) und Necrosulfonamid (NSA, 2 μ M) eingesetzt (10). Im Anschluss wurde eine Kristallviolettffärbung durchgeführt.

3.1.5 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)

Bei der transepithelialen bzw. transendothelialen elektrischen Widerstandsmessung (TEER) handelt es sich um eine quantitative Methode zur Bestimmung der Tight Junction Dynamik in Monolayern von Zellen in der Zellkultur. Diese Messungen wurden durchgeführt, um den funktionellen Zusammenhang zwischen MLKL und der Dichte von Tight Junctions zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellen in sogenannte Transwells mit einer Membran (Artikelnummer: CLS3401, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit einer Porengröße von 0,4 μ m in einer 12-Well Platte ausgesät. Die 12-Well Platte enthielt hierbei 1,5 ml Medium und das Transwell 0,5 ml Medium. Pro Transwell wurden 110.000 Zellen der Zelllinie MCF7 wt und 150.000 Zellen der Zelllinie CaCo2 wt ausgesät. Zuvor wurde in Versuchen die optimale Zellzahl für einen konfluenten Zellteppich ermittelt. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt. Die TEER-Messungen erfolgten an den Tagen 8, 10, 12 und 14 nach Aussaat.

Die Messung des Widerstands im Zellteppich wurde mittels Voltohmmeter über eine Elektrode ermittelt, wie in Abbildung 7 dargestellt. Hierfür wurden jeweils drei Messungen pro Transwell durchgeführt und gemittelt. Der TEER-Wert gilt dabei als Messgröße für die Dichte der zellulären Barriere. Der Widerstand eines leeren Transwells diente als Nullwert. An den Tagen der TEER-Messung wurden anschließend die gemessenen Transwells aus der Versuchsreihe entnommen und mit Kristallviolett eingefärbt. Somit konnte die Aussagekraft des Messwerts kontrolliert werden, indem sichergestellt wurde, dass ein gleichmäßiges und dichtes Zellwachstum vorliegt.

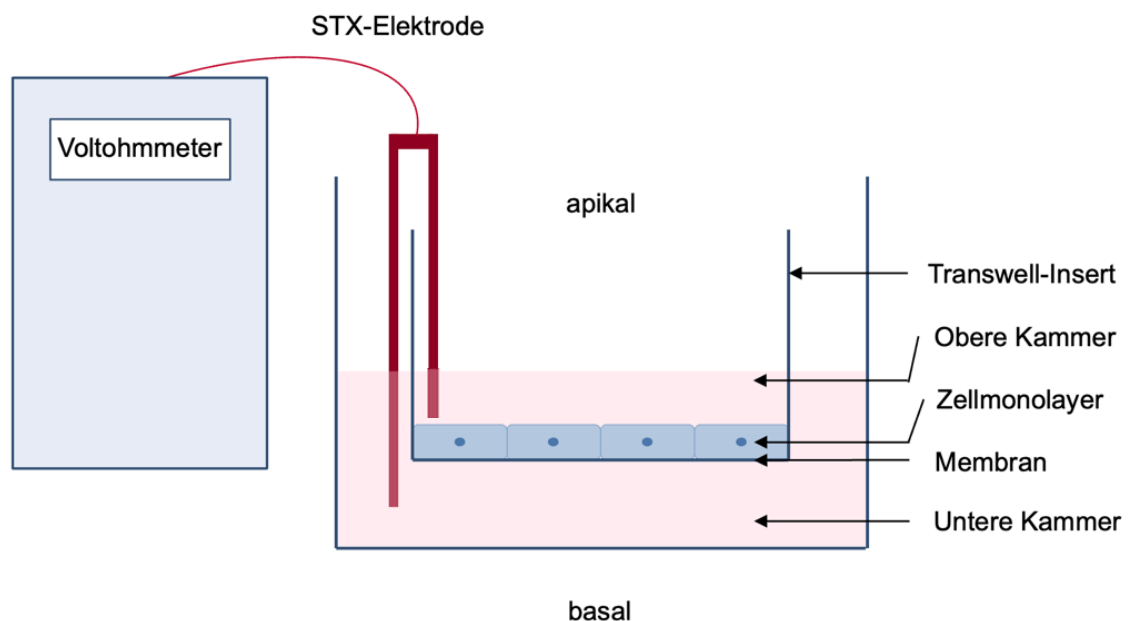


Abbildung 7: Schematischer Aufbau einer TEER-Messung, modifiziert nach (44).

3.1.6 Kristallviolett-färbung

Bei der Kristallviolett-färbung nach Gillies handelt es sich um ein quantitatives Verfahren zur Zellzahlbestimmung mittels spektralphotometrischen Nachweises (45). In dieser Arbeit wurde die Kristallviolett-färbung zum Ermitteln der Zellviabilität im Cytotoxassay verwendet und um die Dichte des Zellteppichs in Anschluss an die TEER-Messungen zu kontrollieren.

Bei der Ermittlung der Zellviabilität wurde eine definierte Zellzahl in 100 μl /Well in eine 96-Well Platte ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation unter Standardbedingungen wurden die Zellen mit den jeweiligen Substanzen des Cytotoxassays behandelt. Nach dieser Zeit wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS (mit $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$) gewaschen. Dies wurde ebenfalls entfernt und anschließend wurden die Zellen mit einem Methanol-Ethanol-Lösung (2:1) mit 100 μl /Well fixiert. Nach 15 min wurde das Methanol-Ethanol-Lösung (2:1) wieder entfernt und die Zellen nochmal mit PBS (mit $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$) gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Färbung

mit einer verdünnten Kristallviolettlösung (0,1 %) für 30 min unter konstanter Bewegung. Der Farbstoff bindet sich an die negativ geladenen Gruppen von Proteinen und der DNA.

Nach Ablauf der Zeit wurde das überschüssige Kristallviolett verworfen und die Platten mit vollentsalztem Wasser abgespült, somit verblieben nur die vital gefärbten Zellen in den Platten. Diese Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden die Wells mit je 100 µl/Well 33 %iger Essigsäure für 30 min unter konstanter Bewegung inkubiert. Abschließend wurde die Absorption mit einer Wellenlänge von 550 nm in einem Spektralphotometer gemessen.

Bei der Kontrolle der Dichte des Zellteppichs nach der TEER-Messung erfolgte lediglich eine Färbung der Transwells nach oben beschriebenem Vorgehen. Die Integrität des Zellteppichs in den Transwelleinsätzen wurde anschließend unter dem Mikroskop beurteilt.

3.1.7 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Bei der Herstellung von Gesamtzelllysaten werden Zellen biochemisch aufgeschlossen, wodurch man an die intrazellulären Biomoleküle gelangt, welche für analytische und präaparative Zwecke genutzt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gesamtzelllysate für die Durchführung von Immunoblot-Analysen verwendet.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst in 6 cm bzw. 6-Well Zellkulturschalen ausgesät. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis, um einen hohen Zellaufschluss erreichen zu können. Das Medium wurde abgesaugt und Zellen wurden mit PBS gewaschen und erneut abgesaugt. Anschließend wurde 50 - 100 µl Lysepuffer auf die Zellkulturschalen gegeben und die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte abgelöst. Der Lysepuffer enthielt Protease- und Phosphataseinhibitoren, welche eine Degradation verhindern sollten. Die Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 15 min auf Eis gestellt. Nach dieser Zeit wurden die Zellen in dem Reaktionsgefäß für 20 min bei 4 °C und 12.700 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Das Zellsediment wurde verworfen.

3.2 Biochemische und molekularbiologische Methoden

3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Zelllysaten zu gewährleisten, müssen die Proben mit einer gleichen Proteinmenge auf das Gel aufgetragen werden. Dafür wurde mittels der Bradford-Methode die Proteinkonzentration der Zelllysate bestimmt. Die Bradford-Methode ist eine photometrische Untersuchung zur quantitativen Bestimmung des Gesamtproteins. Der Nachweis beruht auf einer Komplexbildung zwischen dem verwendeten Farbstoff Coomassie® Brillantblau G-250 und dem vorliegenden Protein, wodurch eine Änderung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm hervorgerufen wird.

Für die Testung wurden 2 µl des Zelllysats mit 798 µl ddH₂O und 200 µl Bradfordfarbreagenz vermischt. Anschließend wurden 200 µl dieser Proben in 96-Well Platten pipettiert und spektrophotometrisch bei einer Welllänge von 595 nm gemessen.

Als Eichkurve zur Referenz dienten Proben mit einer festen vorbestimmten Proteinkonzentration. Hierfür wurden Proben aus Rinderserum-Albumin (BSA) verwendet mit den Konzentrationen von 0, 1, 5, 10 und 15 µg/µl BSA. Anhand dieser Proben wurde eine Standardgerade erstellt und der Proteingehalt der unbekanntenen Proben über diese Gerade ermittelt. Mit Hilfe der Verwendung von Protein-Probenpuffer (6 x) und Lysepuffer wurde die Proteinkonzentration auf 30 µg/20 µl eingestellt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C erhitzt und daraufhin bei -20° C gelagert oder direkt im Anschluss für die weiteren Versuche verwendet.

3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zum Auftrennen von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld. Das Trennmedium besteht aus zwei Gelen auf Polyacrylamidbasis, und zwar aus einem Sammelgel (pH 6,8) und einem Trenngel (pH 8,8). Durch Anlegen der elektrischen Spannung wandern die Proteine abhängig von ihrem Molekulargewicht durch das Gel. Das Sammelgel führt dazu, dass die Proben zeitgleich in das Trenngel eintreten. Die verwendete Acrylamidkonzentration im Gel sorgt für die Gittergröße. Wenn Proteine mit einem geringen Molekulargewicht detektiert werden sollen, empfiehlt sich eine höhere Acrylamidkonzentration und andersherum. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 10 %ige Polyacrylamidgele eingesetzt.

Bei der Herstellung der SDS-Polyacrylamidgelen wurde zuerst das Trenngel in die entsprechende Vorrichtung gegossen und mit Isopronanol umschlossen. So entstand eine gerade Grenze und die Polymerisation konnte ohne Lufteinschlüsse erfolgen. Nach der

Polymerisierung wurde das Isopronanol entfernt und das 5 %ige Sammelgel eingefüllt. In diese wurden außerdem die Probenkämme eingesetzt. Durch die Probenkämme entstanden die Aussparungen im Sammelgel, in welche später die Proben befüllt wurden. War die Polymerisation vollständig abgeschlossen, konnte der Probenkamm entfernt werden. Das Gel wurde mit VE-Wasser gespült und in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Nachdem die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer befüllt wurde, konnten die Proben in die Taschen des Gels pipettiert werden. Als Proteingrößenmarker, welche ebenfalls in eine Tasche beladen wurde, wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte im Anschluss in 1x SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 120 V für ca. 90 min.

3.2.3 Western-Transfer

Durch den Western-Transfer können die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine von dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Diese Übertragung erfolgt im elektrischen Feld. Hierbei werden die Proteine nach der exakten Aufteilung im Trenngel transferiert. In dieser Arbeit wurden die Proteine mittels Semi-Dry-Blot-Verfahren auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurden zur Vorbereitung pro Gel sechs Lagen Whatman-Papier, die Nitrozellulosemembran und das Gel in einem Semi-Dry-Blot-Puffer gegeben. Anschließend wurden drei Schichten Whatman-Papier, die Nitrozellulosemembran, das Trenngel und erneut drei Schichten Whatman-Papier luftblasenfrei zwischen zwei Plattenelektroden in das Trans Blot® Turbo™ Blotting System von BioRad eingespannt. Der Transfer erfolgte für 30 min bei einer konstanten Spannung von 25 V und einer Stromstärke von ca. 300 mA pro Gel.

3.2.4 Immunoblot-Analyse

Nach dem Western-Transfer konnte die Proteinübertragung mittels reversibler Färbung durch den Farbstoff Ponceau S kontrolliert werden. Der Farbstoff lässt die Proteinbanden durch Anfärbung der Aminogruppen sichtbar werden. Ponceau S konnte im Anschluss mit Wasser wieder ausgewaschen werden.

Die Detektion der Proteine erfolgte indirekt über spezifische Antikörper. Unspezifische Antikörperbindestellen auf der Nitrozellulosemembran wurden hierfür zunächst in 5 %iger Milch in TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurde die Membran mehrfach in TBST gewaschen und über Nacht bei 4 °C in der Primärantikörperlösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min erneut mit TBST gewaschen.

Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Da der Sekundärantikörper an eine Peroxidase gekoppelt ist, kann dieser mittels einer Chemilumineszenzreaktion durch einen Chemilumineszenz-Detektor erkannt werden. Für diese Detektion wurde entweder die selbst hergestellte Coumarinsäure-Luminol-H₂O₂-Lösung (ECL) oder das sensitivere WesternBright™Sirius™ Detection Kit verwendet.

Zur qualifizierten Beurteilung der Ergebnisse wurden ebenfalls Ladekontrollen detektiert. Als Ladekontrollen wurden Proteine verwendet, die in den zu untersuchenden Zellen ein hohes Expressionsniveau aufweisen. Dabei ist es wichtig, dass die Ladekontrollen ein anderes Molekulargewicht haben als das zu untersuchende Protein. In dieser Arbeit wurde GAPDH als Ladekontrolle verwendet.

3.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung diente in dieser Arbeit zur Visualisierung der Lokalisation von den Proteinen pMLKL und Occludin in verschiedenen Zelllinien unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Hierfür wurden immunfluoreszenzmakierte Antikörper verwendet. Zunächst wurden die Zellen in mit 10 mm großen Coverslips bestückten 12-Well Platten ausgesät. Um die Zellen zu fixieren, wurde das Medium nach der Kultivierung und Durchführung der jeweiligen für den Versuch notwendigen Behandlung abgesaugt und die Wells mit 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3,7 %iger Formaldehydlösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Zu der Blockierung unspezifischer Bindungszellen, wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C mit je 1 ml Blockinglösung inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper in Blockingslösung verdünnt. 50 µl der Primärantikörperlösung wurden auf eine saubere und glatte Unterlage vorgelegt. Der Coverslip wurde mit Hilfe einer Pinzette aus der 12-Well Platte entnommen, mit der mit Zellen bedeckten Seite in die Primärantikörperlösung gelegt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Mittels einer Waschlösung wurden im Anschluss die Coverslips sorgfältig gewaschen. Daraufhin erfolgte die lichtgeschützte Inkubation mit den Sekundärantikörperlösung und dem Kernfarbstoff DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, D9542, 1:100) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erfolgter Inkubation wurden die Coverslips erneut mit der Waschlösung gewaschen und somit von Antikörperresten befreit. Mit 10 µl Mowiol wurden die fertig gefärbten Coverslips lichtgeschützt auf Objektträgern fixiert und über Nacht bei 4 °C getrocknet. Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzbilder erfolgte an dem Konfokalmikroskop Leica SP8.

3.2.6 Statistik

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde ein zweiseitig gepaarter t-Test durchgeführt. Es wurden p-Werte mit $p < 0.05$ als signifikant betrachtet.

Tabelle 38: p-Wert

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

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der membranären Co-Lokalisation von pMLKL und Occludin in verschiedenen Tumorzelllinien

4.1.1 Untersuchung der Lokalisation des Nekroptose-assoziierten Proteins pMLKL und des Tight Junction-assoziierten Proteins Occludin in RIP3-positiven und RIP3-negativen Zelllinien

In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe Roth konnte eine membranäre Lokalisation von pMLKL sowohl unabhängig von einem Nekroptose-Stimulus als auch von dem RIP3-Expressionsstatus in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 festgestellt werden. Zudem konnte eine Co-Lokalisation von pMLKL und Occludin, einem zentralen Bestandteil der Tight Junctions, beobachtet werden (3).

Diese Beobachtung sollte in dieser Arbeit initial bestätigt werden. Dazu wurden Co-Färbungen mit pMLKL und Occludin durchgeführt und diese mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Hierbei konnte eine Co-Lokalisation von MLKL und Occludin in den apikalen Membranbereichen (Ebene 1-4) bestätigt werden (Abbildung 8,9).

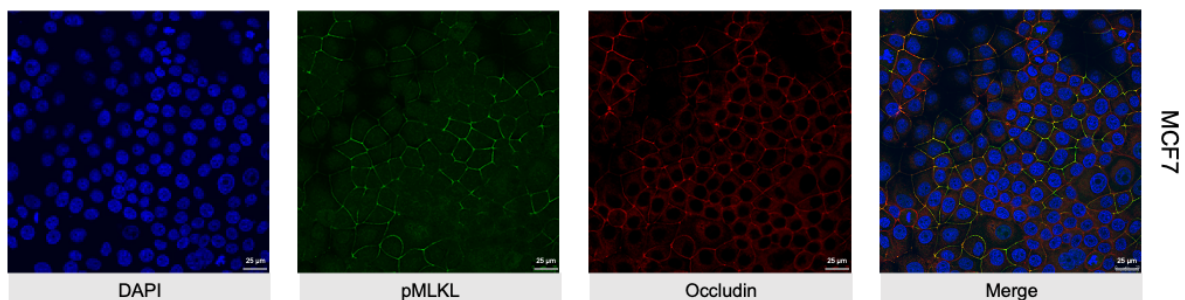


Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung von pMLKL und Occludin in der Zelllinie MCF7

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem anti-pMLKL Antikörper (grün) und einem anti-Occludin Antikörper (rot) durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Es wurden jeweils 8 Bilder entlang der Z-Achse aufgenommen. Gezeigt sind die einzelnen Farbkanäle einer repräsentativen Ebene entlang der Z-Achse, sowie die Überlagerung dieser (Merge). Die Färbungen wurden in Triplikaten durchgeführt, die Auswertung der Bilder erfolgte am Konfokalmikroskop und es wurden repräsentative Bilder ausgewählt. Der Maßstab entspricht 25 µm.

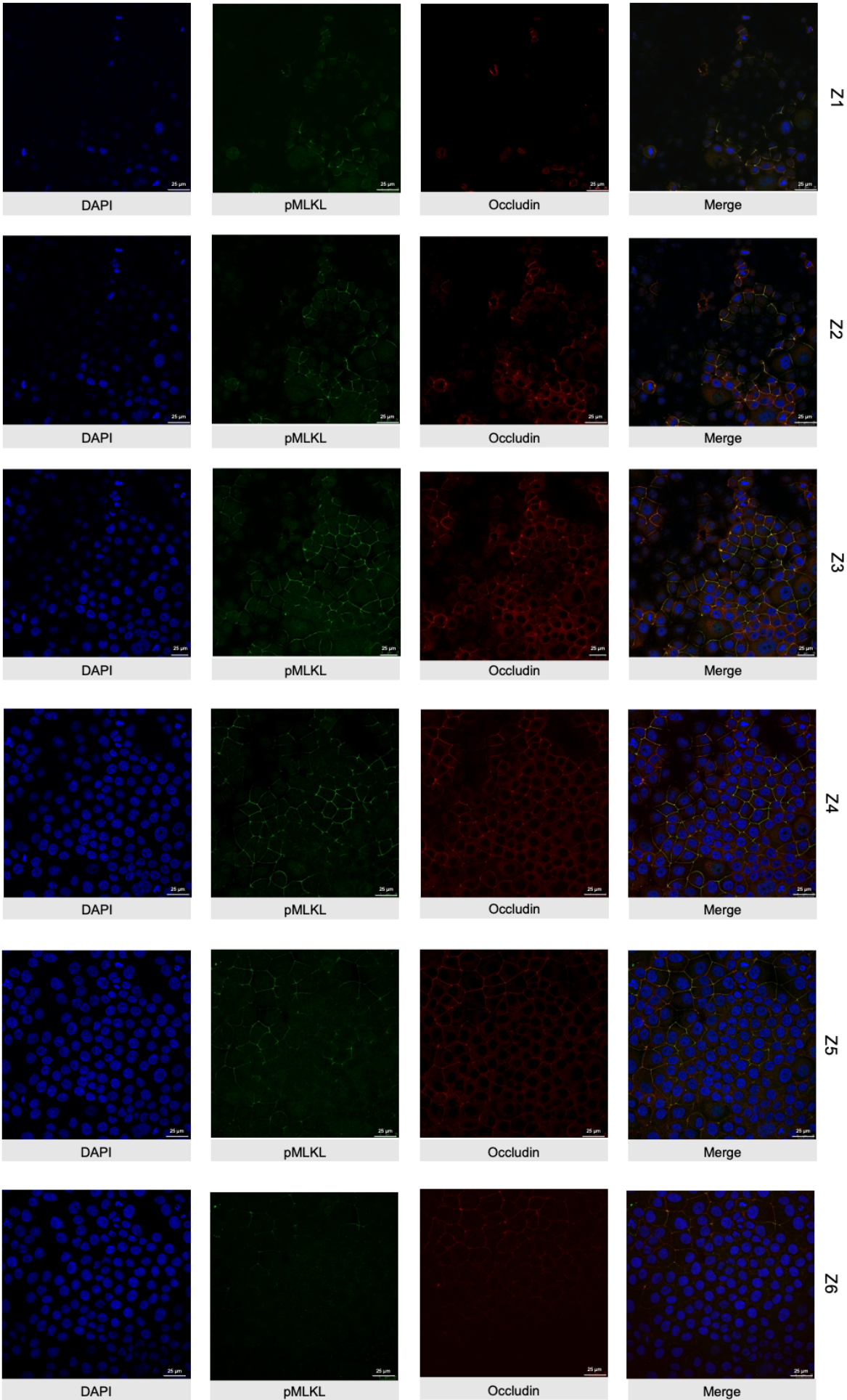


Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung von pMLKL und Occludin in der RIP3-negativen Zelllinie MCF7.

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem anti-pMLKL Antikörper (grün) und einem anti-Occludin Antikörper (rot) durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Gezeigt sind die einzelnen Farbkanäle, sowie die Überlagerung dieser (Merge). Jeder Bildausschnitt wurde aus 6 Bildern entlang der Z-Achse aufgenommen und hier ist die Überlagerung der einzelnen Ebenen dargestellt (Z1-Z6). Die Färbungen wurden in Triplikaten durchgeführt, die Auswertung der Bilder erfolgte am Konfokalmikroskop und es wurden repräsentative Bilder ausgewählt. Der Maßstab entspricht 25 µm.

Zur weiteren funktionellen Analyse der Co-Lokalisation sollten in einem nächsten Schritt weitere Zelllinien identifiziert werden, in denen diese Co-Lokalisation unabhängig von einem Nekroptose-Stimulus auftritt. Um gleichzeitig den potenziellen Einfluss der RIP3-Expression auf die pMLKL-Lokalisation zu untersuchen, wurden sowohl RIP3-positive als auch -negative Zelllinien ausgewählt. Zu den in dieser Arbeit verwendeten RIP3-positiven Zelllinien zählten HT29, SK-BR3, T47D (2) und zu den RIP3-negativen Zelllinien zählten CaCo2, DU-145, Huh7, MCF7 und PC3 (2,41). Hierfür wurden ebenfalls Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen pMLKL und Occludin durchgeführt und diese mittels konfokaler Mikroskopie analysiert.

In den Zelllinien MCF7 und CaCo2, welche beide kein RIP3 exprimieren, konnte sowohl pMLKL als auch Occludin retikulär an den Zellmembranen nachgewiesen werden (Abbildung 8, 9, 10). Zudem lässt sich eine Co-Lokalisation der beiden Proteine in den beiden Zelllinien erkennen (Abbildung 9,10). In den Zelllinien HT29, SK-BR3 und T47D, welche RIP3 exprimieren (2), ließ sich keine pMLKL- und Occludin-Positivität an der Zellmembran detektieren (Abbildung 11). Auch in den Zelllinien DU-145, Huh7 und PC3, welche kein RIP3 exprimieren (2), ließ sich weder eine pMLKL-, noch eine Occludin-Positivität an der Zellmembran feststellen (Abbildung 12).

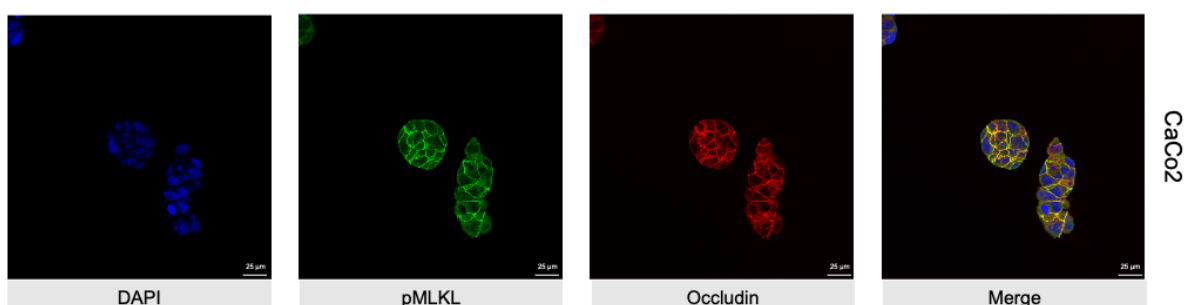


Abbildung 10: Analyse der Lokalisation von pMLKL und Occludin in der Zelllinie CaCo2.

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem anti-pMLKL Antikörper (grün) und einem anti-Occludin Antikörper (rot) durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Es wurden jeweils 8 Bilder entlang der Z-Achse aufgenommen. Gezeigt sind die einzelnen Farbkanäle einer repräsentativen Ebene entlang der Z-Achse, sowie die Überlagerung dieser (Merge). Die Färbungen wurden in Triplikaten

durchgeführt, die Auswertung der Bilder erfolgte am Konfokalmikroskop und es wurden repräsentative Bilder ausgewählt. Der Maßstab entspricht 25 µm.

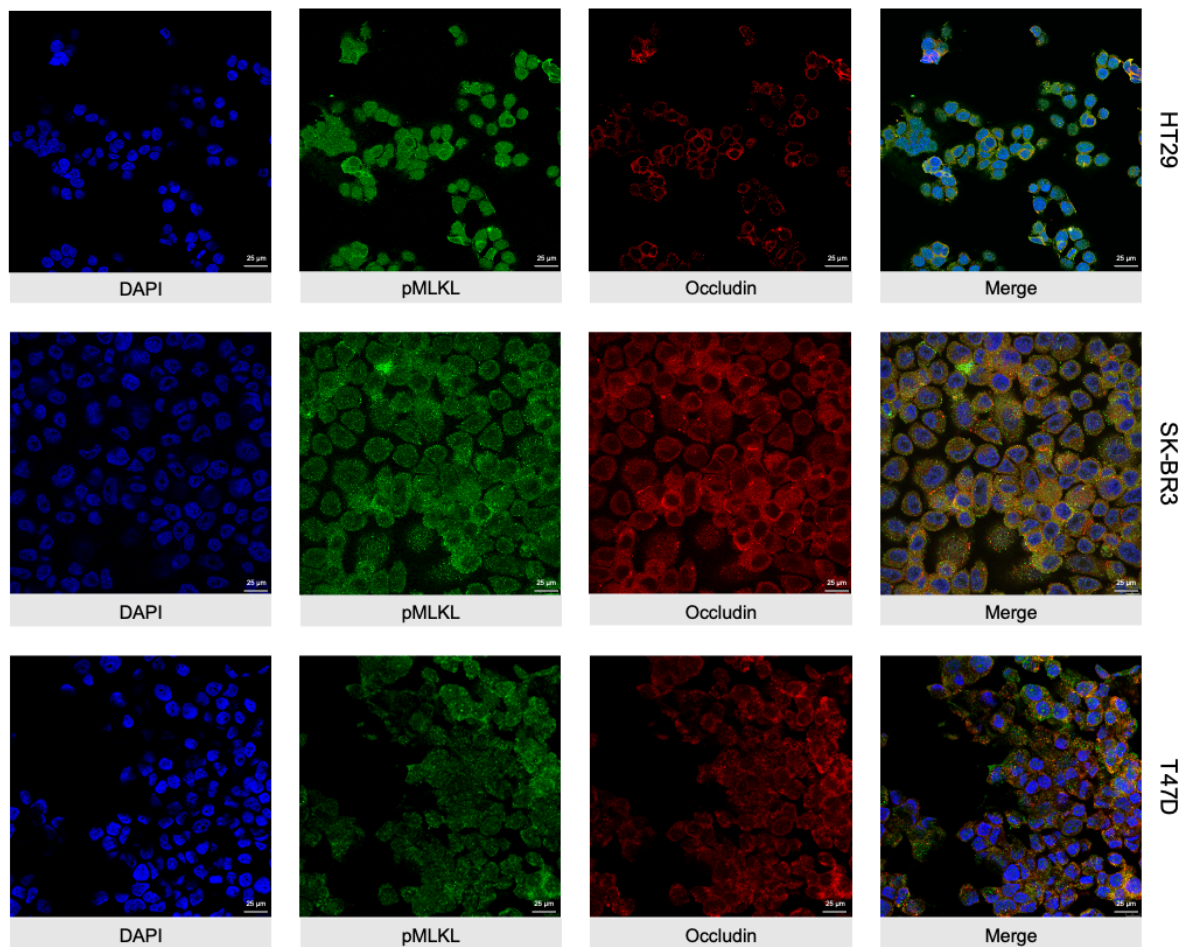


Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung von pMLKL und Occludin in den RIP3-positiven Zelllinien HT29, SK-BR3 und T47D.

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem anti-pMLKL Antikörper (grün) und einem anti-Occludin Antikörper (rot) durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Es wurden jeweils 8 Bilder entlang der Z-Achse aufgenommen. Gezeigt sind die einzelnen Farbkanäle einer repräsentativen Ebene entlang der Z-Achse, sowie die Überlagerung dieser (Merge). Die Färbungen wurden in Triplikaten durchgeführt, die Auswertung der Bilder erfolgte am Konfokalmikroskop und es wurden repräsentative Bilder ausgewählt. Der Maßstab entspricht 25 µm.

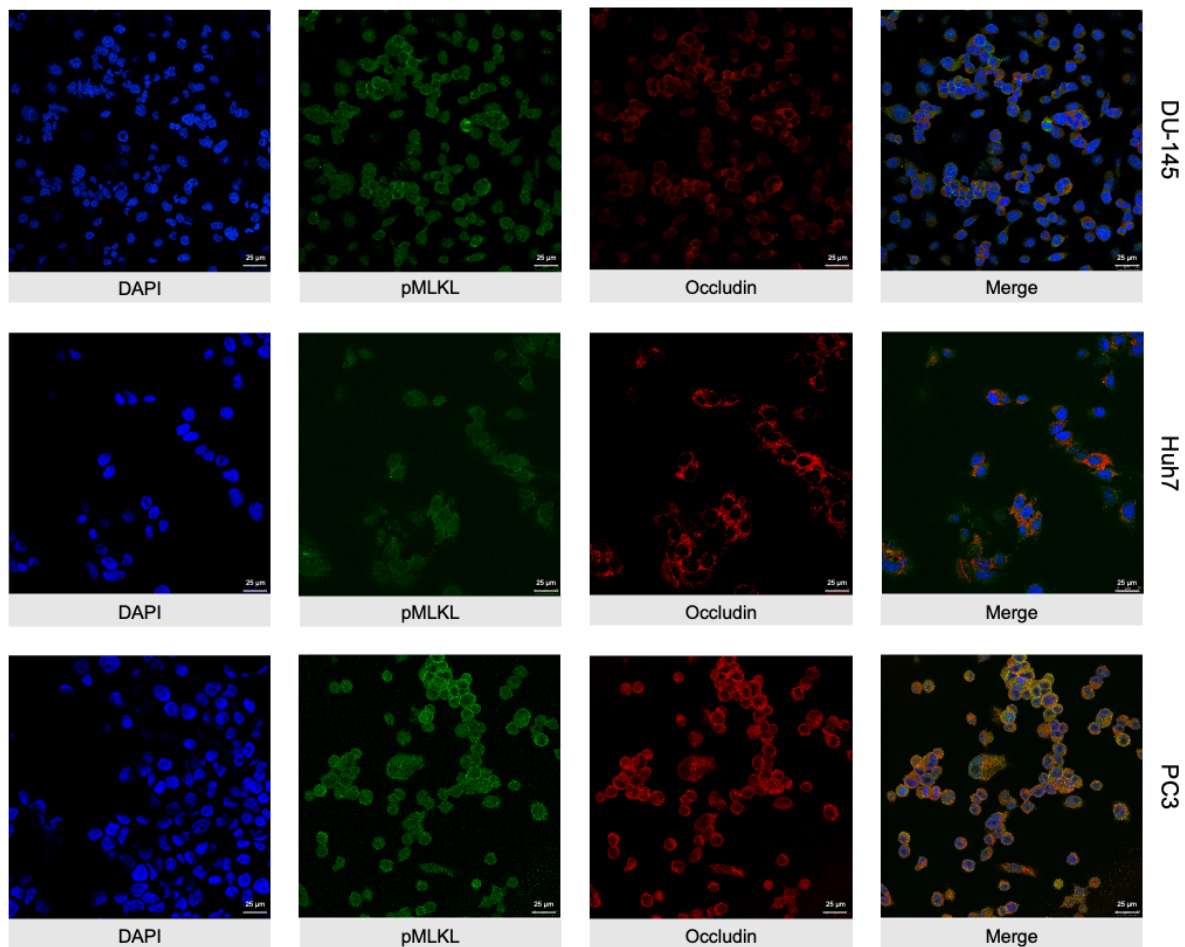


Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung von pMLKL und Occludin in den RIP3-negativen Zelllinien DU-145, Huh7 und PC3.

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem anti-pMLKL Antikörper (grün) und einem anti-Occludin Antikörper (rot) durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Es wurden jeweils 8 Bilder entlang der Z-Achse aufgenommen. Gezeigt sind die einzelnen Farbkanäle einer repräsentativen Ebene entlang der Z-Achse, sowie die Überlagerung dieser (Merge). Die Färbungen wurden in Triplikaten durchgeführt, die Auswertung der Bilder erfolgte am Konfokalmikroskop und es wurden repräsentative Bilder ausgewählt. Der Maßstab entspricht 25 µm.

Da in der RIP3-negativen Zelllinie CaCo2 eine deutliche membranäre Co-Lokalisation von pMLKL und Occludin beobachtet werden konnte, wurden diese Zellen im Anschluss nochmals konfokalmikroskopisch untersucht und die Lokalisation der beiden Proteine entlang der Z-Achse analysiert. In der Betrachtung entlang der Z-Achse zeigte sich eine apikale Lokalisation von pMLKL und Occludin passend zu der apikalen Lokalisation von Tight Junctions (Abbildung 13).

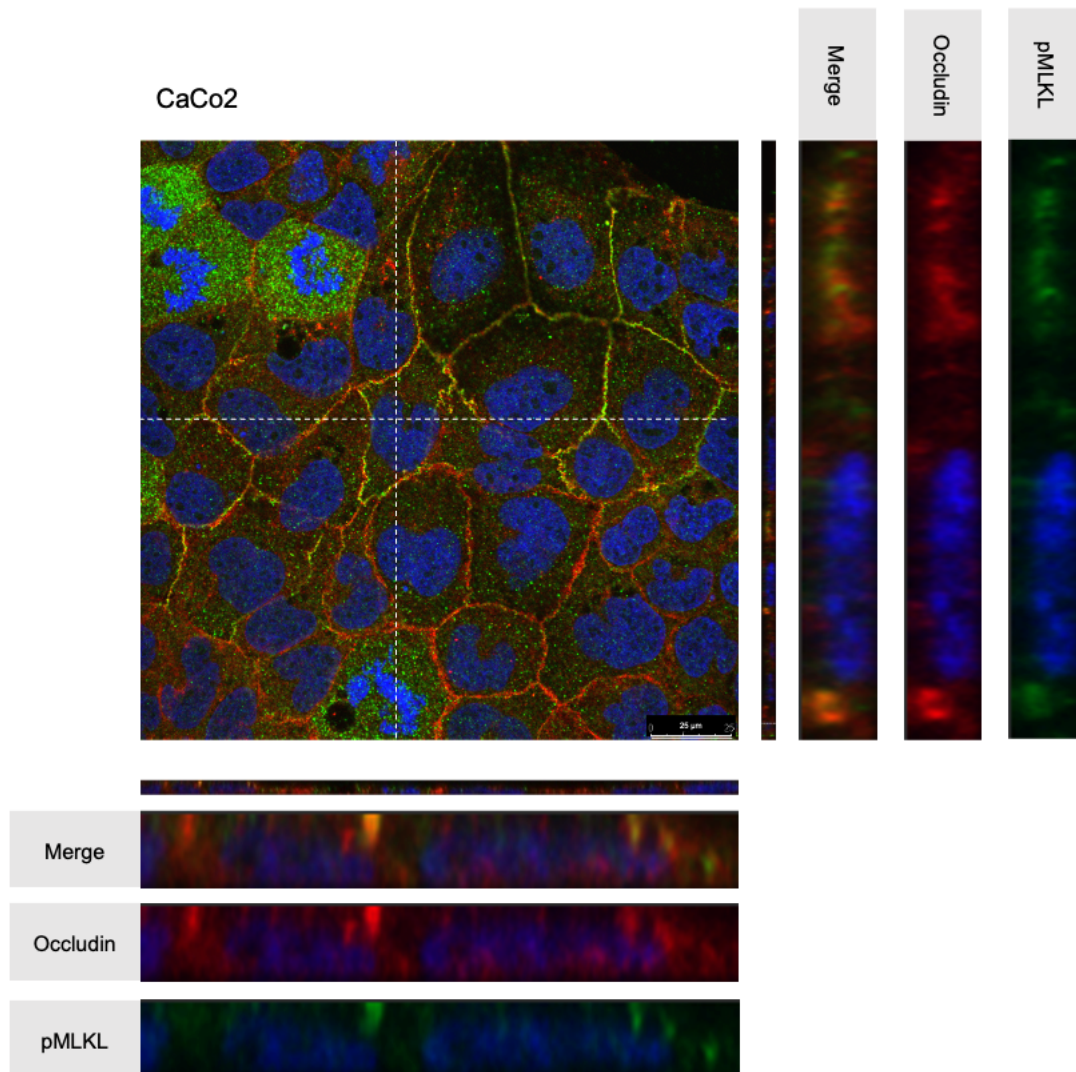


Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung von pMLKL und Occludin in der RIP3-negativen Zelllinie CaCo2.

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem anti-pMLKL Antikörper (grün) und einem anti-Occludin Antikörper (rot) durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Gezeigt sind die einzelnen Farbkanäle entlang der Z-Achse, sowie die Überlagerung dieser (Merge). Es wurden jeweils 16 Bilder entlang der Z-Achse aufgenommen. Die Färbungen wurden in Triplikaten durchgeführt, die Auswertung der Bilder erfolgte am Konfokalmikroskop und es wurden repräsentative Bilder ausgewählt. Der Maßstab entspricht 25 µm.

4.1.2 Untersuchung der Lokalisation von pMLKL und Occludin in Abhängigkeit von RIP3

Als nächstes wurde in MCF7 Zelllinien untersucht, ob die Expression von RIP3 bzw. ein Nekroptose-Stimulus eine Auswirkung auf die Lokalisation von pMLKL und Occludin haben. Dazu wurde eine mit dem Überexpressionsplasmid pcDNA-RIP3 stabil transfizierte MCF7-Zelllinie (MCF7 RIP3#6) verwendet. Als Kontrolle dienten stabil mit dem Leervektor pcDNA3 transfizierte MCF7-Zellen (MCF7 neo) (3). Zunächst wurde der Einfluss eines Nekroptosestimulus auf die Expression von RIP3 und pMLKL mittels Immunoblot-Analyse in MCF7 RIP3#6-Zellen überprüft (Abbildung 14). Hier zeigte sich sowohl ohne als auch mit Nekroptose-Stimulus eine stabile RIP3-Expression sowie die leichte Zunahme der pMLKL Expression unter Nekroptosestimulus (Abbildung 14).

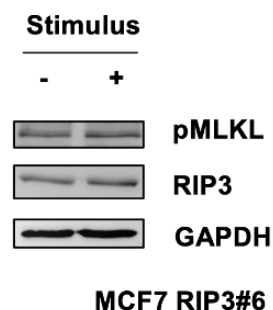


Abbildung 14: Analyse der pMLKL und RIP3 -Expression in den stabil transfizierten Zellen MCF7 RIP3#6.

Die Abbildungen zeigen eine repräsentative qualitative Immunoblot-Analyse nach stabiler Transfektion mit pcDNA-RIP3. Die Ansätze wurden außerdem mit dem Nekroptose-Stimulus zVAD (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 Zellen wurden im Anschluss an den Stimulus lysiert. Es wurden 30 μ g Protein-Lysat auf einem 10 %igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Anschließend wurde die Lokalisation von pMLKL und Occludin in Abhängigkeit der RIP3-Expression mittels Immunfluoreszenz-Analysen genauer untersucht. Die alleinige Überexpression von RIP3 ohne einen Nekroptose-Stimulus veränderte nichts an der Lokalisation von pMLKL oder Occludin in den MCF7-Zellen (Abbildung 15).

Um zusätzlich die Rolle von phosphoryliertem und damit aktiven RIP3 in diesem Zusammenhang zu untersuchen, wurden die Zellen einem Nekroptose-Stimulus ausgesetzt. Hierzu wurden beide Zelllinien mit zVAD, BV6 und TNF α behandelt. Mittels Konfokalmikroskopie konnte im Anschluss an die Färbung mit einem pMLKL- und einem Occludin-Antikörper die beiden Proteine in Abhängigkeit der RIP3-Expression und des Nekroptose-Stimulus analysiert werden.

In der mit dem RIP3- Überexpressionsplasmid transfizierten MCF7-Zelllinie zeigte sich unter dem Nekroptose-Stimulus das morphologisch charakteristische Herauslösen einzelner Zellen aus dem Zellverbund. In diesen abgekugelten Zellen konnte keine membranäre Co-Lokalisation von pMLKL und Occludin detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte in den adhärennten Zellen weiterhin eine membranäre Lokalisation von pMLKL und Occludin beobachtet werden (Abbildung 15).

In den Zellen, welche den Leervektor enthielten, konnte auf Grund der fehlenden RIP3-Expression nach Nekroptose-Stimulus kein Herauslösen von Zellen aus dem Zellverbund erzielt werden. Hier zeigten sich pMLKL und Occludin weiterhin membranär und in einer Co-Lokalisation (Abbildung 15).

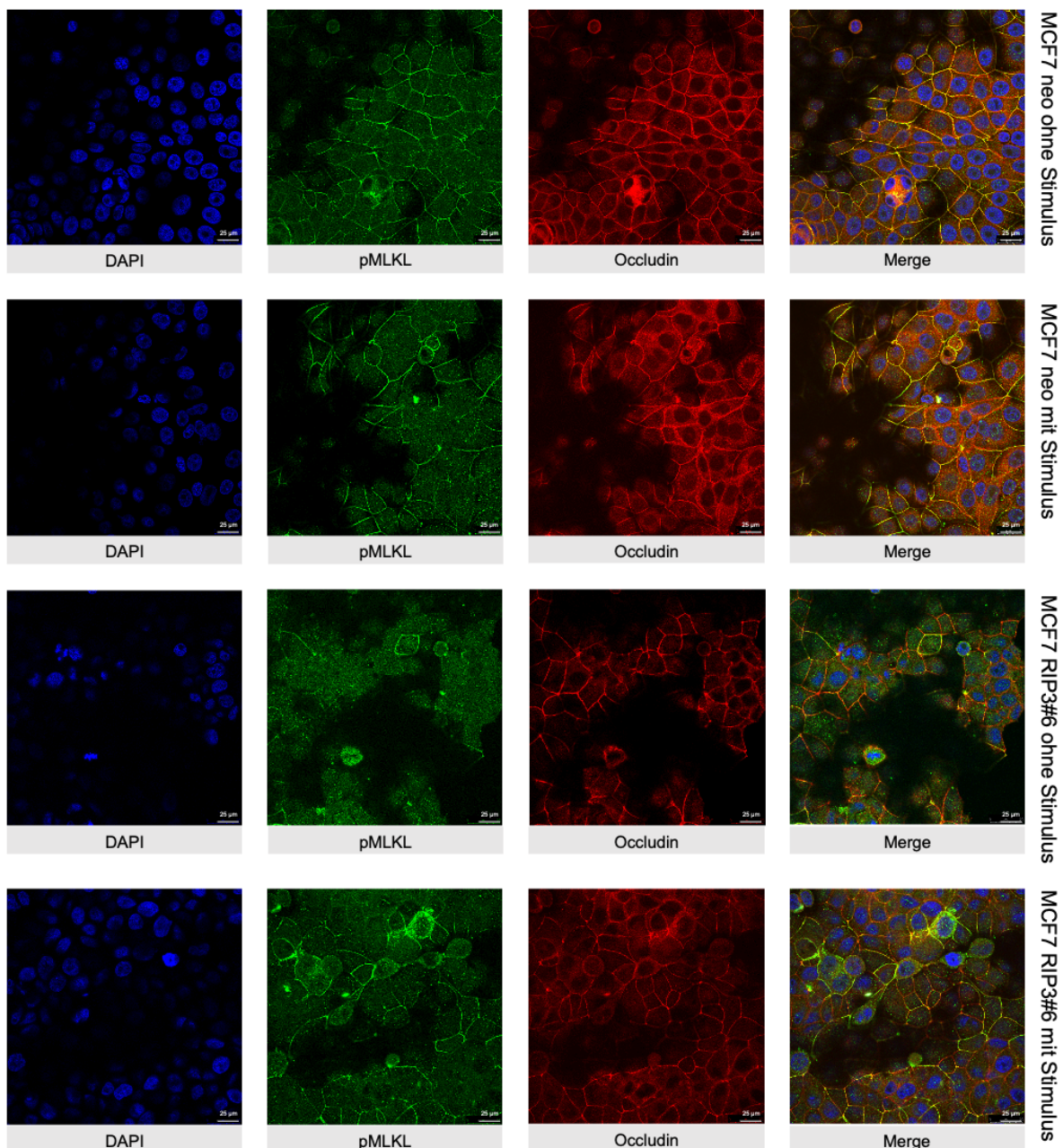


Abbildung 15: Co-Lokalisationsanalyse von pMLKL und Occludin in den Zelllinien MCF7 neo und MCF7 RIP3#6 ohne und mit Nekroptose-Stimulus.

Die Ansätze wurden mit dem Nekroptose-Stimulus zVAD (50 μ M) für 2 Stunden und anschließend mit einer Kombination aus BV6 (0,6 μ M) und TNF- α (25 ng/ml) für weitere 3 Stunden inkubiert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem anti-pMLKL Antikörper (grün) und einem anti-Occludin Antikörper (rot) durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Es wurden jeweils 8 Bilder entlang der Z-Achse aufgenommen. Gezeigt sind die einzelnen Farbkanäle einer repräsentativen Ebene entlang der Z-Achse, sowie die Überlagerung dieser (Merge). Die Färbungen wurden in Triplikaten durchgeführt, die Auswertung der Bilder erfolgte am Konfokalmikroskop und es wurden repräsentative Bilder ausgewählt. Der Maßstab entspricht 25 μ m.

4.2 Analyse des Zusammenhangs der endogenen Expression von pMLKL und Occludin

In Anbetracht der Co-Lokalisation von pMLKL und Occludin in den RIP3-negativen Zelllinien MCF7 und CaCo2 stellte sich die Frage, ob es einen funktionellen Zusammenhang zwischen diesen beiden Proteinen gibt. Hierfür wurde zunächst der Zusammenhang der endogenen Expression von MLKL bzw. pMLKL und Occludin in Abhängigkeit voneinander untersucht.

4.2.1 Analyse der endogenen Expression von Occludin in Abhängigkeit von MLKL sowie eines Nekroptose-Stimulus

Zur Analyse der Occludin-Expression in Abhängigkeit von MLKL wurden die Zelllinien MCF7 und CaCo2 sowie die stabil transfizierten Zelllinien MCF7 neo und MCF7 RIP3#6 verwendet. Zur Modulation der MLKL-Expression wurden die Zelllinien mit zwei MLKL-spezifischen siRNAs (siRNA MLKL#1, siRNA MLKL#3), sowie eine Kontroll-siRNA (scram) transfiziert. Um außerdem die Auswirkungen eines Nekroptose-Stimulus auf die Occludin-Expression zu untersuchen, wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit zVAD, BV6 und TNF α behandelt und anschließend eine Immunoblot-Analyse durchgeführt.

In allen untersuchten Zelllinien konnte eine deutliche Verminderung der MLKL-Expression durch die siRNAs erzeugt werden. Des Weiteren konnte in allen Proben durch den Nekroptose-Stimulus eine Phosphorylierung von RIP1 induziert werden (Abbildung 16, Abbildung 17).

Bezüglich Occludin konnte in keiner Zelllinie eine konsistente Veränderung der endogenen Expression durch die verminderte Expression von MLKL oder durch den Nekroptose-Stimulus beobachtet werden (Abbildung 16, Abbildung 17).

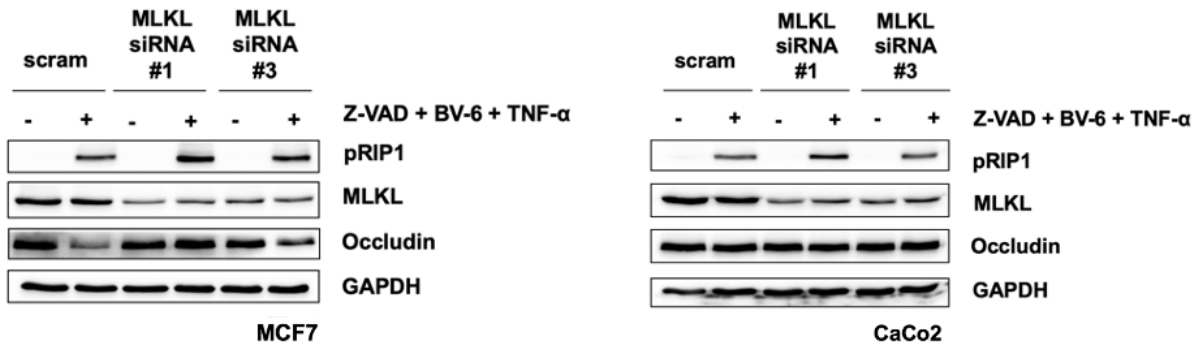


Abbildung 16: Analyse der Occludin-Expression nach Transfektion mit den MLKL-spezifischen siRNAs #1 und #3 in MCF7 und CaCo2.

Die Abbildungen zeigen eine repräsentative qualitative Immunoblot-Analyse nach siRNA-induzierter Verminderung der Proteinlevel. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Zelllinien MCF7 und CaCo2 wurden mit 1 nM einer unspezifischen Kontroll-siRNA (scram) oder 1 nM einer spezifischen siRNA (si MLKL#1, si MLKL #3) transfiziert. Die Ansätze wurden 48 Stunden nach der Transfektion mit dem Nekroptose-Stimulus zVAD (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. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert. Es wurden 30 μ g Protein-Lysat auf einem 10 %igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. GAPDH diente als Ladekontrolle.

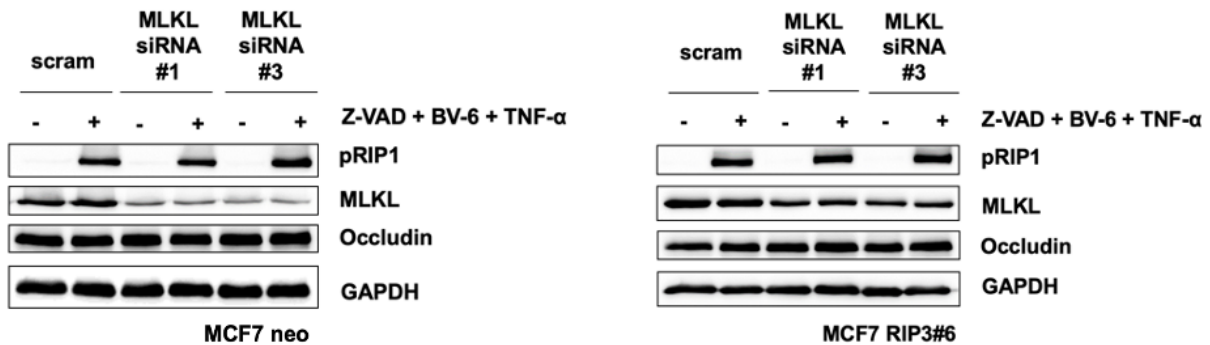


Abbildung 17: Analyse der Occludin-Expression nach Transfektion mit der MLKL-spezifischen siRNA #1 und #3 in MCF7 neo und MCF7 RIP3#6.

Die Abbildungen zeigen eine repräsentative qualitative Immunoblot-Analyse nach siRNA-induzierter Verminderung der Proteinlevel. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Zelllinien MCF7 neo und MCF7 RIP3#6 wurden mit 1 nM einer unspezifischen Kontroll-siRNA (scram) oder 1 nM einer spezifischen siRNA (si MLKL#1, si MLKL #3) transfiziert. Die Ansätze wurden 48 Stunden nach der Transfektion mit dem Nekroptose-Stimulus zVAD (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. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert. Es wurden 30 μ g Protein-Lysat auf einem 10 %igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. GAPDH diente als Ladekontrolle.

4.2.2 Analyse der endogenen Expression von MLKL und pMLKL in Abhängigkeit von Occludin sowie eines Nekroptose-Stimulus

Als nächstes wurde die Expression von MLKL und pMLKL in Abhängigkeit der Occludin-Expression untersucht. Dazu wurde die Expression von Occludin in den Zelllinien MCF7, CaCo2, sowie in den stabil transfizierten Zelllinien MCF7 neo und MCF7 RIP3#6 durch zwei Occludin-spezifische siRNAs (siRNA OCLN#1, siRNA OCLN#2) reduziert und die Expression von MLKL und pMLKL mittels Immunoblot analysiert. Als Kontrolle diente die unspezifische siRNA (scram). Um ebenfalls die Auswirkungen eines Nekroptose-Stimulus auf die MLKL- und pMLKL-Expression zu untersuchen, wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit zVAD, BV6 und TNF α behandelt.

In allen untersuchten Zelllinien konnte eine deutliche Verminderung der Occludin-Expression durch die Occludin-spezifische siRNA erzeugt werden. Des Weiteren konnte in den Proben durch den Nekroptose-Stimulus eine Phosphorylierung von RIP1 induziert werden (Abbildung 18).

Bezüglich MLKL konnte in keiner Zelllinie eine konsistente Veränderung der endogenen Expression durch die verminderte Expression von Occludin oder durch den Nekroptose-Stimulus beobachtet werden. Lediglich in den nekroptosesensitiven Zellen MCF7 RIP3#6 konnte eine erhöhte Phosphorylierung von MLKL nach dem entsprechenden Nekroptose-Stimulus nachgewiesen werden. Auch hier konnten keine Unterschiede in Abhängigkeit der Occludin-Expression beobachtet werden (Abbildung 18, Abbildung 19).

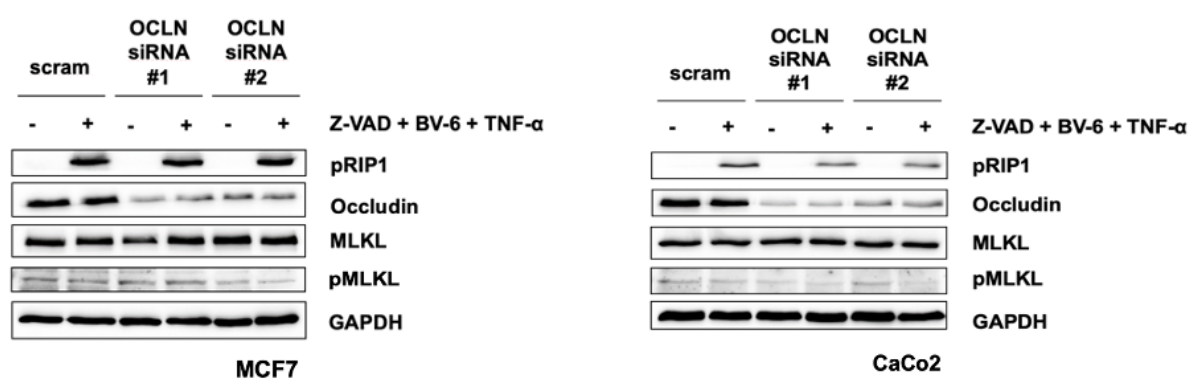


Abbildung 18: Analyse der MLKL- und pMLKL-Expression nach Transfektion mit den Occludin-spezifischen siRNAs #1 und #2 in MCF7 und CaCo2.

Die Abbildungen zeigen eine repräsentative qualitative Immunoblot-Analyse nach siRNA-induzierter Verminderung der Proteinlevel. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Zelllinien MCF7 und CaCo2 wurden mit 1 nM einer unspezifischen Kontroll-siRNA (scram) oder 1 nM einer spezifischen siRNA (si OCLN #1, si OCLN #2) transfiziert. Die Ansätze wurden 48 Stunden nach der Transfektion mit dem Nekroptose-Stimulus zVAD (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. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert. Es

wurden 30 µg Protein-Lysat auf einem 10 %igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. GAPDH diente als Ladekontrolle.

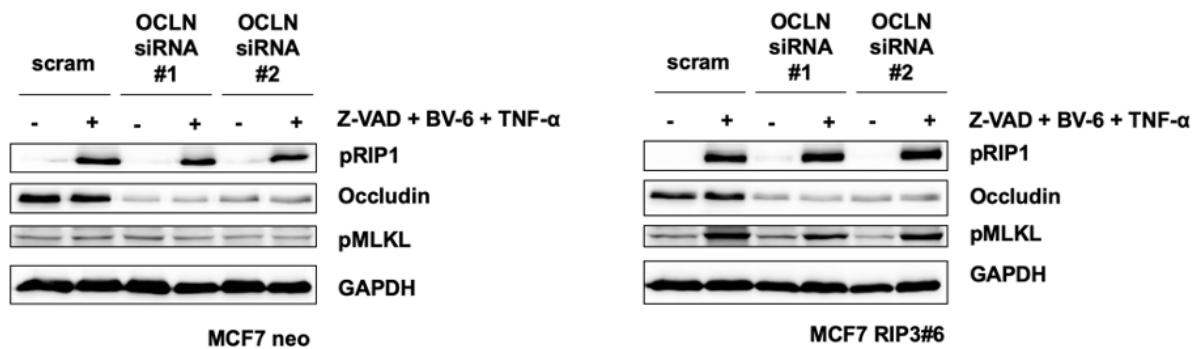


Abbildung 19: Analyse der MLKL- und pMLKL-Expression nach Transfektion mit der Occludin-spezifischen siRNA #1 und #2 in MCF7 neo und MCF7 RIP3#6.

Die Abbildungen zeigen eine repräsentative qualitative Immunoblot-Analyse nach siRNA-induzierter Verminderung der Proteinlevel. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Zelllinien MCF7 neo und MCF7 RIP3#6 wurden mit 1 nM einer unspezifischen Kontroll-siRNA (scram) oder 1 nM einer spezifischen siRNA (si OCLN #1, si OCLN #2) transfiziert. Die Ansätze wurden 48 Stunden nach der Transfektion mit dem Nekroptose-Stimulus zVAD (50 µM) für 2 Stunden und anschließend mit einer Kombination aus BV6 (0,6 µM) und TNF-α (25 ng/ml) für 3 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert. Es wurden 30 µg Protein-Lysat auf einem 10 %igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. GAPDH diente als Ladekontrolle.

4.3 Analyse der Lokalisation pMLKL und Occludin in Abhängigkeit voneinander

In den vorangegangenen Experimenten konnte kein Zusammenhang zwischen den endogenen Expressionsspiegeln von pMLKL und Occludin in der Immunoblot-Analyse beobachtet werden. Daher wurde anschließend untersucht, ob eine verminderte Expression von MLKL bzw. Occludin eine veränderte Lokalisation von Occludin bzw. pMLKL bedingt.

Hierfür wurde erneut die Expression von MLKL und von Occludin in der Zelllinien MCF7 reduziert. Dazu wurden die MLKL- und Occludin spezifischen siRNAs (siRNA MLKL#1 und siRNA OCLN #1) verwendet. Als Kontrolle diente eine unspezifische siRNA (scram). Anschließend wurden die Zelllinien mit den Antikörpern pMLKL und Occludin gefärbt und mit Hilfe von Immunfluoreszenz im Konfokalmikroskop mikroskopiert (Abbildung 20).

Mittels Konfokalmikroskopie konnte in den MCF7 scam Zellen eine retikuläre, membranäre Lokalisation von sowohl pMLKL als auch Occludin beobachtet werden (Abbildung 20). In den Zellen, die mit einer Occludin spezifischen siRNA behandelt wurden, ist lediglich bei einer stark reduzierten Anzahl eine membranäre Lokalisation von sowohl Occludin als auch pMLKL feststellbar. Dies spricht für eine deutliche Reduktion der membranären Expression von Occludin und pMLKL in einer Vielzahl der Zellen (Abbildung 20). Zudem konnte beobachtet werden, dass sich pMLKL in diesen Zellen nur noch dort an den Membranen detektieren ließ, an denen man auch eine minimale Occludin-Expression finden kann (Abbildung 20). Dieser Effekt zeigt sich nach Transfektion mit einer MLKL-spezifischen siRNA nicht so deutlich ausgeprägt. Nach Transfektion der MLKL siRNA konnte immer noch in einer Vielzahl der Zellen ein membranäres Färbemuster mit dem pMLKL-Antikörper und Occludin-Antikörper beobachtet werden, ähnlich wie es in den MCF7 scam Zellen zu sehen war.

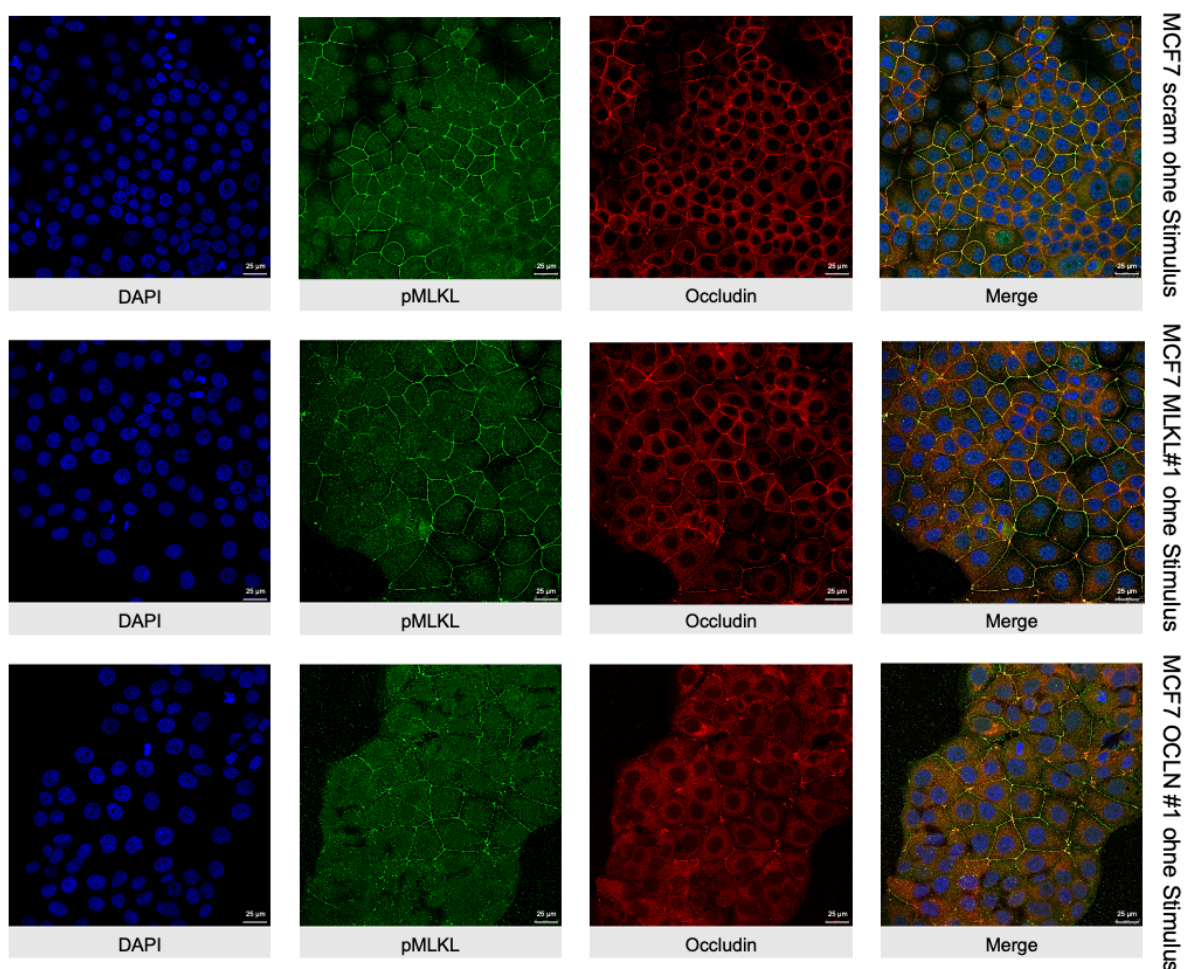


Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung von pMLKL und Occludin in den Zelllinien MCF7 nach Behandlung mit MLKL siRNA #1 und Occludin siRNA #1 und anschließendem Nekroptose-Stimulus.

Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Zelllinie MCF7 wurde mit 1 nM einer unspezifischen Kontroll-siRNA (scram) oder 1 nM einer spezifischen siRNA (si MLKL#1, si OCLN #1)

transfiziert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem anti-pMLKL Antikörper (grün) und einem anti-Occludin Antikörper (rot) durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Es wurden jeweils 8 Bilder entlang der Z-Achse aufgenommen. Gezeigt sind die einzelnen Farbkanäle einer repräsentativen Ebene entlang der Z-Achse, sowie die Überlagerung dieser (Merge). Die Färbungen wurden in Triplikaten durchgeführt, die Auswertung der Bilder erfolgte am Konfokalmikroskop und es wurden repräsentative Bilder ausgewählt. Der Maßstab entspricht 25 μm .

4.4 Analyse des funktionellen Zusammenhangs zwischen pMLKL und Occludin

4.4.1 Analyse der Beeinflussung der Nekroptose durch Occludin

Aufgrund der festgestellten Co-Lokalisation von Occludin und dem Nekroptose-assoziiertem pMLKL stellte sich die Frage, ob beide Proteine sich funktionell beeinflussen könnten. Es wurde daher untersucht, ob die Expression von Occludin einen Einfluss auf die Nekroptose haben könnte. Hierfür wurde die Nekroptose-Sensitivität der RIP3-Überexpressionsklone MCF 7 RIP3#6 mittels eines Zytotoxassays analysiert. Als Kontrollen dienten die Nekroptose-resistenten MCF7 neo Zellen. Zur Untersuchung des Einflusses von Occludin auf die Nekroptose wurde dessen Expression mittels Occludin-spezifischer siRNA (siRNA OCLN#1 und siRNA OCLN#2) vermindert. Als Kontrolle diente eine unspezifische siRNA (scram). Sowohl in der Zelllinie MCF7 neo als auch in MCF7 RIP3#6 konnte eine deutliche Verminderung der Occludin-Expression mittels Transfektion der siRNAs erzeugt werden (Abbildung 17).

Sowohl in den MCF7 neo als auch in den MCF7#RIP3 Zelllinien konnten nach der alleinigen Behandlung mit den Stimuli $\text{TNF}\alpha$ sowie der Kombination aus $\text{TNF}\alpha$ und dem SMAC-Mimetikum BV6 eine deutliche Verminderung in der Zellviabilität beobachtet werden. Bezüglich der Nekroptose-Sensitivität zeigte sich in der Zelllinie MCF7 RIP3#6 nach dem Nekroptose-Stimulus bestehend aus $\text{TNF}\alpha$, BV6 und zVAD eine deutliche Verminderung der Viabilität im Vergleich zur MCF7 neo Kontrolle. Dieser Effekt konnte durch die gleichzeitige Behandlung mit den Nekroptose-Inhibitoren Necrostatin-1 und Necrosulfonamid in MCF7 RIP3#6-Zellen wieder abgehoben werden.

Bezüglich des Einflusses der Occludin-Expression auf das zelluläre Überleben, zeigte sich in der Zelllinie MCF7 neo ein deutlicher und signifikanter Unterschied in der Zelltod-Sensitivität bei der alleinigen Behandlung mit BV6 in der Zelllinie MCF 7 neo siRNA OCLN#2 im Vergleich zur scram-Kontrolle. Außerdem konnte nach Behandlung mit zVAD, BV6, $\text{TNF}\alpha$ und NSA ein marginaler, allerdings signifikanter Unterschied in der Nekroptose-Sensitivität in der Zelllinie MCF7 neo siRNA OCLN#1 im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Allerdings ließen

sich diese Effekte mit der jeweiligen anderen siRNA (siRNA OCLN#2) nicht reproduzieren (Abbildung 21).

In der Zelllinie MCF7 RIP3#6 zeigte sich nur bei der Behandlung mit zVAD, BV6 und TNF α ein marginaler, allerdings signifikanter Unterschied in der Nekroptose-Sensitivität in der Zelllinie MCF7 RIP3#6, die mit der siRNA OCLN#1 behandelt wurde. Auch dieser Effekt konnten mit der anderen siRNA (siRNA OCLN#2) nicht reproduziert werden (Abbildung 21).

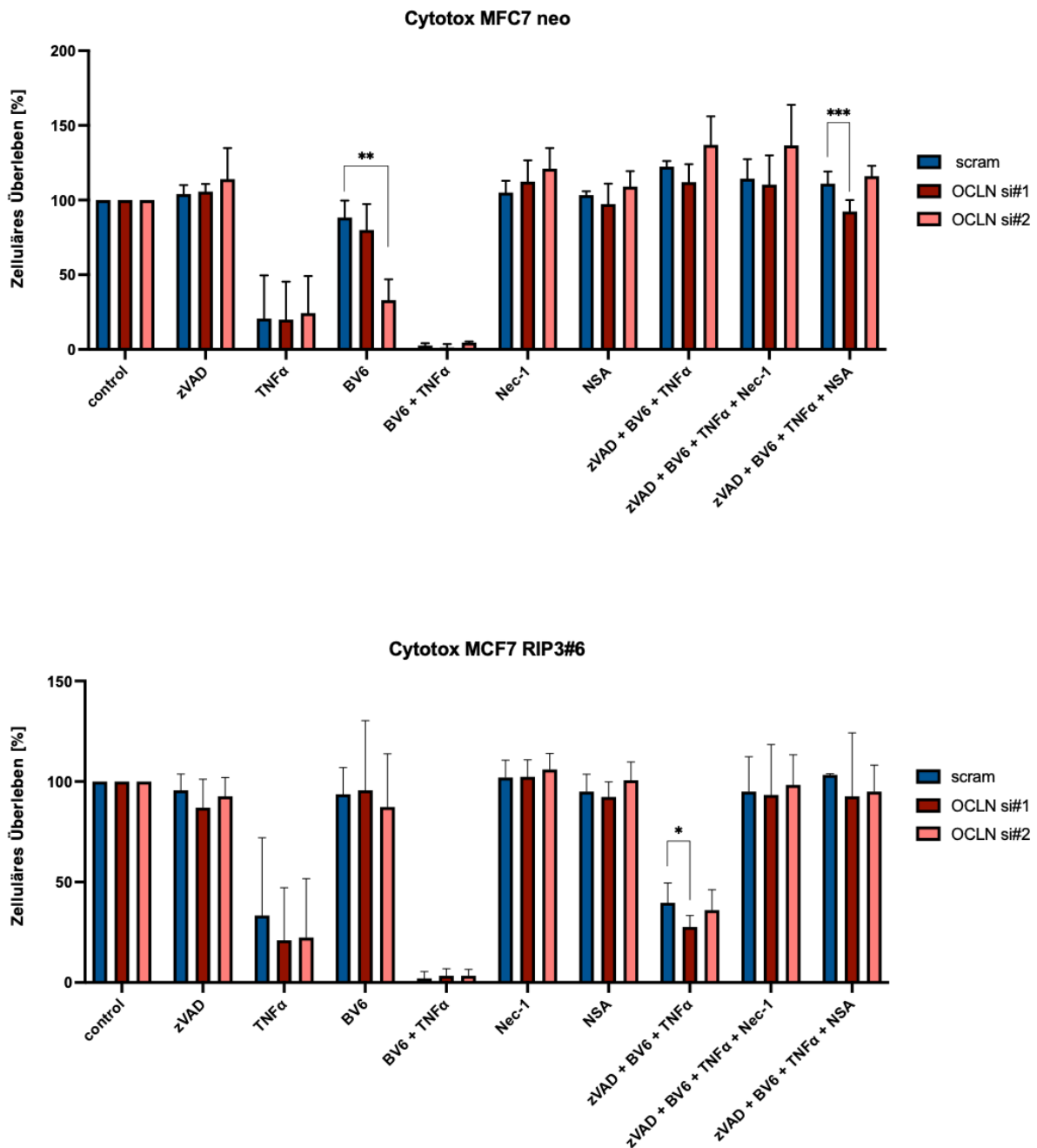


Abbildung 21: Cytotoxassay in MCF7 neo und MCF7 RIP3#6 pMLKL-Expression nach Transfektion mit Occludin siRNA #1 und #2.

Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Zelllinien MCF7 neo und MCF7 RIP3#6 wurden mit 1 nM einer unspezifischen Kontroll-siRNA (scram) oder 1 nM einer spezifischen siRNA (si OCLN #1, si OCLN #2) transfiziert. Die Ansätze wurden außerdem mit den jeweiligen Substanzen behandelt (zVAD 50 μ M, BV6 0,6 μ M, TNF- α 25 ng/ml, NSA 2 μ M und Necrostatin-1 20 μ M). Zunächst wurden die Zellen für 2 Stunden mit zVAD inkubiert, anschließend wurden die Zellen entsprechend der Abbildung mit den jeweiligen anderen Substanzen für 48 Stunden inkubiert. Die Überlebensrate wurde mittels einer Kristallviolett-Färbung ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, deren Signifikanz mittels gepaartem t-Test berechnet wurde: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.2 Auswirkung der Transfektion mit MLKL und Occludin siRNA auf die Integrität der Tight Junctions

Da sich keine konsistenten signifikanten Auswirkungen einer modulierten Occludin-Expression auf die Nekroptosesensitivität zeigen ließen, wurde anschließend untersucht, ob pMLKL bzw. MLKL wiederum funktional im Zusammenhang mit Tight Junctions stehen könnten. Zur Analyse der Integrität der Tight Junctions wurde daher der transepitheliale/transendotheliale elektrische Widerstand (TEER) der Zell-Monolayer bestimmt. Um hierbei stabile Messwerte zu erzielen, mussten mehrere Tage vergehen, bis sich eine konfluente Zellschicht ausbildete. Daher wurde die Effizienz der siRNA-vermittelten Expressionsreduktion parallel über diesen Zeitraum ermittelt. Um die Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen siRNAs zu gewährleisten, wurde im Anschluss an die TEER-Messungen mit Hilfe von Kristallviolett-Färbungen die Konfluenz der ausgesäten Zellen ermittelt.

Zunächst wurde initial ermittelt, welche Auswirkungen eine verminderte Occludin-Expression auf die Integrität der Tight Junctions hat. Hierfür wurde die Occludin-Expression in MCF7- und CaCo2-Zellen mittels siRNA vermindert. Der transepitheliale/transendotheliale elektrische Widerstand wurde nach 8-12 Tagen nach der Transfektion gemessen, da sich in diesem Zeitraum die Konfluenz der Monolayer stabil zeigte. Sowohl in der Zelllinie MCF7 als auch in der Zelllinie CaCo2 vermindert sich der TEER-Wert in den mit der Occludin siRNA transfizierten Zelllinien signifikant zu allen Zeitpunkten. Eine Veränderung der TEER-Werte spricht daher für einen Verlust der Tight Junction-Integrität (Abbildung 22).

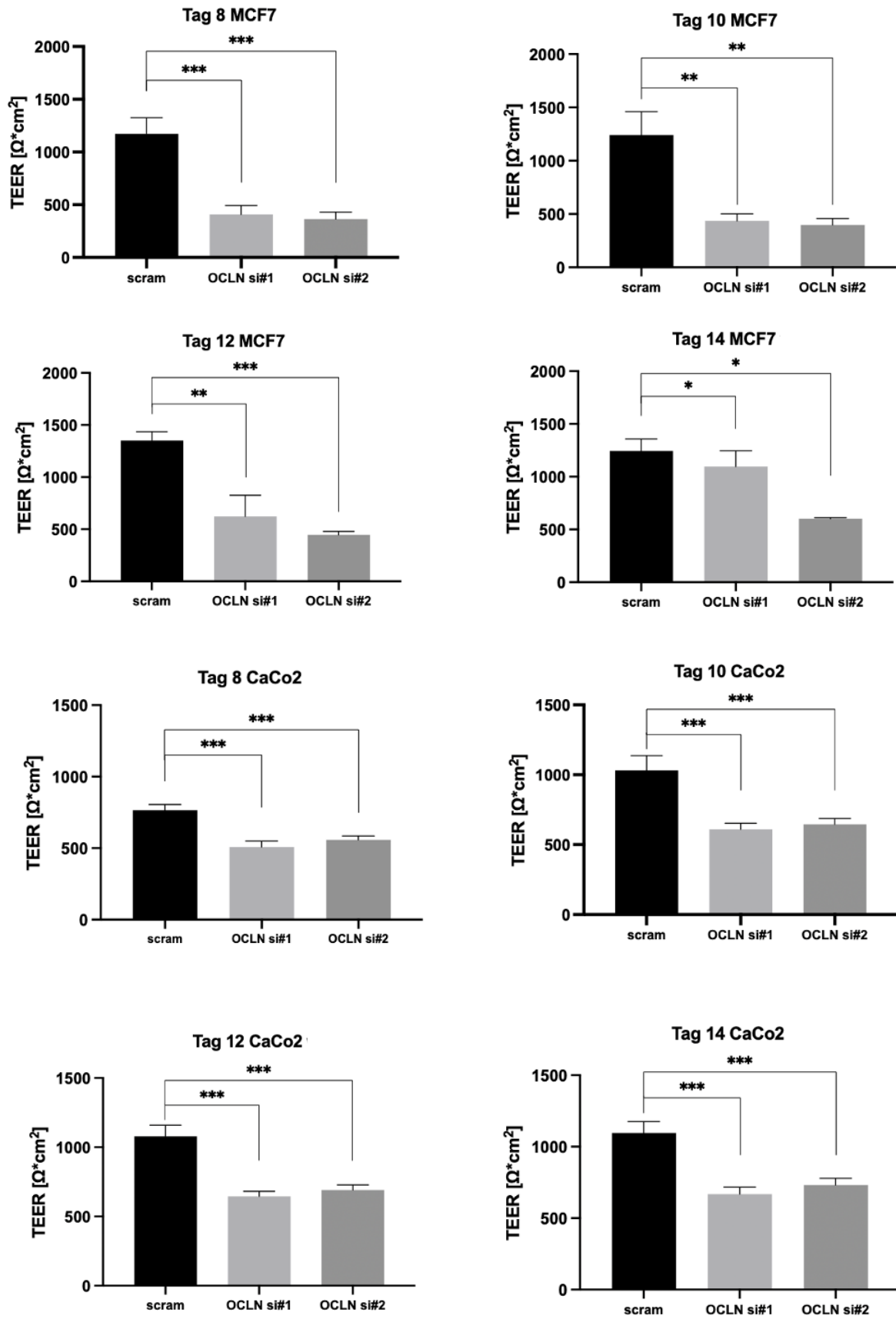


Abbildung 22: Analyse der Tight Junction-Integrität in MCF7 und CaCo2 behandelt mit Occludin siRNA #1 und #2.

Analyse der Tight Junction-Dynamik mittels TEER-Messung in MCF7 und CaCo2 nach Behandlung mit Occludin-spezifischer siRNA (1 nM si OCLN #1, 1 nM si OCLN #2) zu Verminderung der endogenen Occludin-Expression. Die Einzelmessungen erfolgten über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die Konfluenz des Zelllayers wurde mittels Kristallviolett färbung kontrolliert. Als Kontrolle diente eine unspezifische Kontroll-siRNA (1 nM scram). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde in einem zweiseitigen gepaartem t-Test bestimmt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Zur Analyse der Auswirkung einer verminderten MLKL-Expression auf die Integrität der Tight Junctions wurde in den Zelllinien MCF7 und CaCo2 die MLKL-Expression mittels MLKL-spezifischer siRNA (siRNA MLKL#1 und MLKL#3) vermindert. Als Kontrolle diente eine unspezifische siRNA (scram). Im Gegensatz zu CaCo2-Zellen konnte in MCF7-Zellen die Reduktion MLKL-Expression bis Tag 8 aufrechterhalten werden, so dass für weitere Analysen nur die MCF7-Zellen verwendet wurden (Abbildung 23).

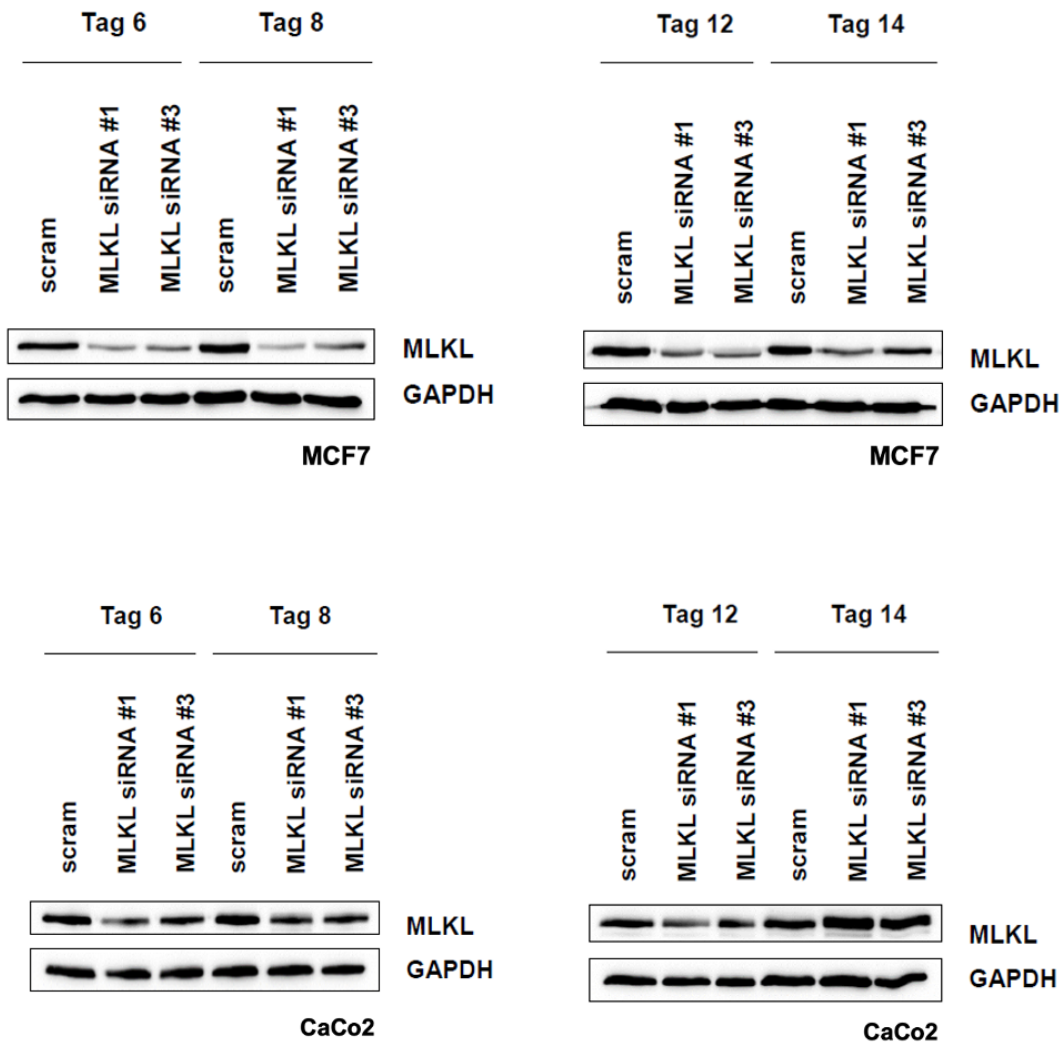


Abbildung 23: Analyse der Stabilität der siRNA-Transfektion mit MLKL siRNA #1 und MLKL siRNA#3 in MCF7 und CaCo2 an den Tagen 6, 8, 12 und 14.

Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Abbildung zeigt eine repräsentative qualitative Immunoblot-Analyse nach siRNA-induzierter Verminderung der Proteinlevel. Die Zelllinien MCF7 und CaCo2 wurden mit 1 nM einer unspezifischen Kontroll-siRNA (scram) oder 1 nM einer spezifischen siRNA (si MLKL#1, si MLKL #3) transfiziert. Die Zellen wurden an Tag 6, 8, 12 und 14 nach der Transfektion lysiert. Es wurden 30 µg Protein-Lysat auf einem 10 %igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. GAPDH diente als Ladekontrolle.

In der Zelllinie MCF7 konnte ab Tag 8 die Ausbildung einer konfluenten Zellschicht beobachtet werden, sodass ab diesem Zeitpunkt die TEER-Messungen durchgeführt werden konnten. Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der TEER-Werte bei den siRNAs MLKL#1 und MLKL#3 im Vergleich zur scram-Kontrolle (Abbildung 23). An Tag 12 und 14 konnte keine signifikante Veränderung in den TEER-Werten gefunden werden (Abbildung 24). Dies zeigt sich passend zu der Immunoblot-Analyse zur Stabilität der siRNAs, in der man sehen konnte, dass die Effizienz des Knockdowns an diesen Tagen bereits wieder zurückgegangen ist (Abbildung 23).

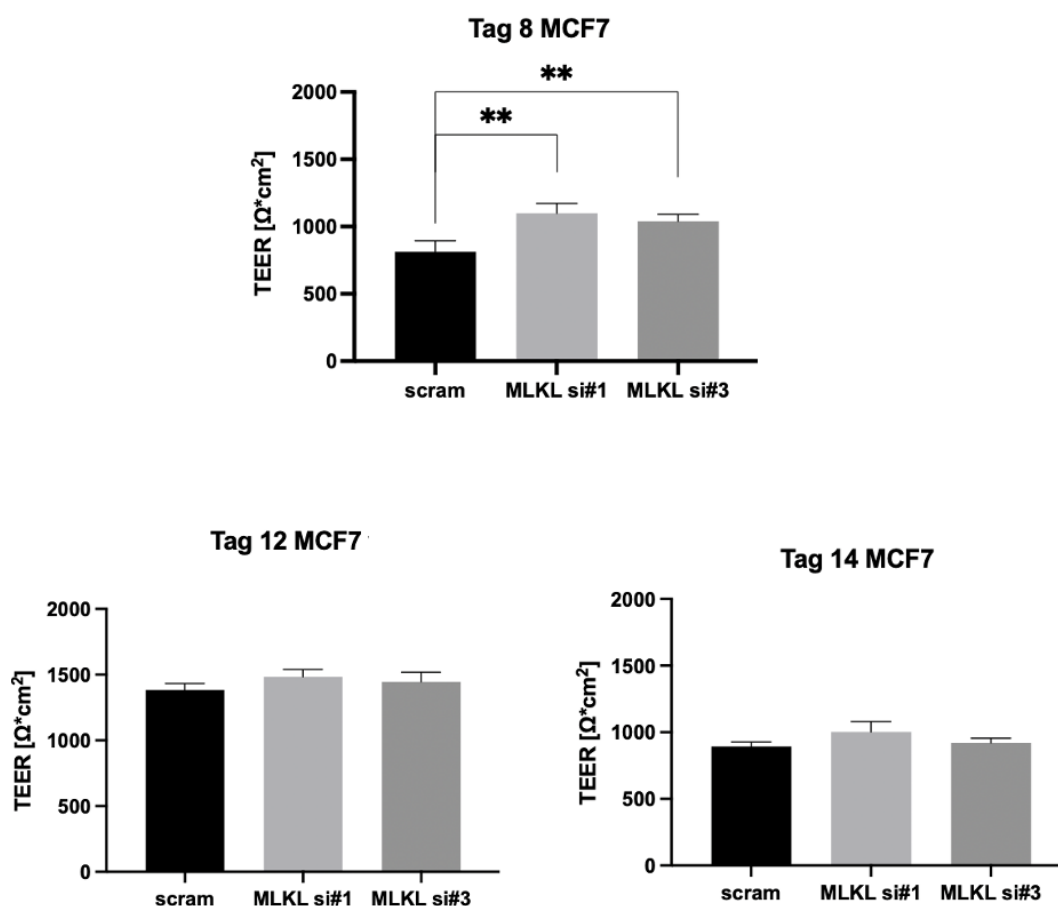


Abbildung 24: Analyse der Tight Junction-Integrität in MCF7 nach Transfektion mit MLKL siRNA #1 und #3.

Analyse der Tight Junction-Dynamik mittels TEER-Messung in MCF7 Zellen nach Transfektion mit MLKL-spezifischen siRNAs (1 nM si MLKL#1, 1 nM si MLKL#3) zu Verminderung der endogenen MLKL-

*Expression. Die Einzelmessungen erfolgten über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die Konfluenz des Zelllayers wurde mittels Kristallviolett färbung kontrolliert. Als Kontrolle diente eine unspezifische Kontroll-siRNA (1 nM scram). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde in einem zweiseitigen gepaartem t-Test bestimmt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.*

4.4.3 Auswirkung des MLKL-Inhibitors NSA auf die Integrität der Tight Junctions

Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurde eine weitere Methode genutzt, um die Lokalisation von pMLKL an der Plasmamembran zu vermindern und somit den Einfluss von MLKL auf Tight Junctions zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurde Necrosulfonamid (NSA), ein MLKL- und Nekroptose-Inhibitor, verwendet. NSA bindet an die N-terminale Domäne von MLKL, ohne eine mögliche Phosphorylierung durch RIP3 zu beeinträchtigen, und verhindert so die Translokation von pMLKL an die Membranen (13).

Zunächst wurde in einem Vorversuch der Zeitpunkt ermittelt, zu dem pMLKL nach Behandlung mit NSA nicht mehr an der Plasmamembran lokalisiert ist, sondern im Zytoplasma vorliegt. Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit den Antikörpern pMLKL in MCF7-Zellen und CaCo2-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach NSA-Behandlung durchgeführt (Abbildung 25).

Hier konnte in den MCF7-Zellen nach 30 Minuten nach der NSA-Behandlung noch eine membranäre Lokalisation von pMLKL beobachtet werden. Diese zeigte sich nach einer Stunde bereits deutlich verringert und nach 1,5 Stunden konnte das Maximum an zytoplasmatischer Lokalisation beobachtet werden. Nach 2 Stunden nahm die membranäre Lokalisation von pMLKL wieder zu (Abbildung 25).

In den CaCo2-Zellen zeigte konnte nach 30 Minuten nach der NSA-Behandlung ebenfalls noch eine membranäre Lokalisation von pMLKL detektiert werden. Das Maximum des zytoplasmatischen Signals erreichten die CaCo2-Zellen 2 Stunden nach NSA-Behandlung (Abbildung 25).

Morphologisch zeigten sich zudem im Zeitverlauf nach NSA-Behandlung die MCF7-Zellen kleiner und dichter beieinander, während bei den CaCo2-Zellen die Zell-Zell-Kontakte aufgelockert wirkten (Abbildung 25).

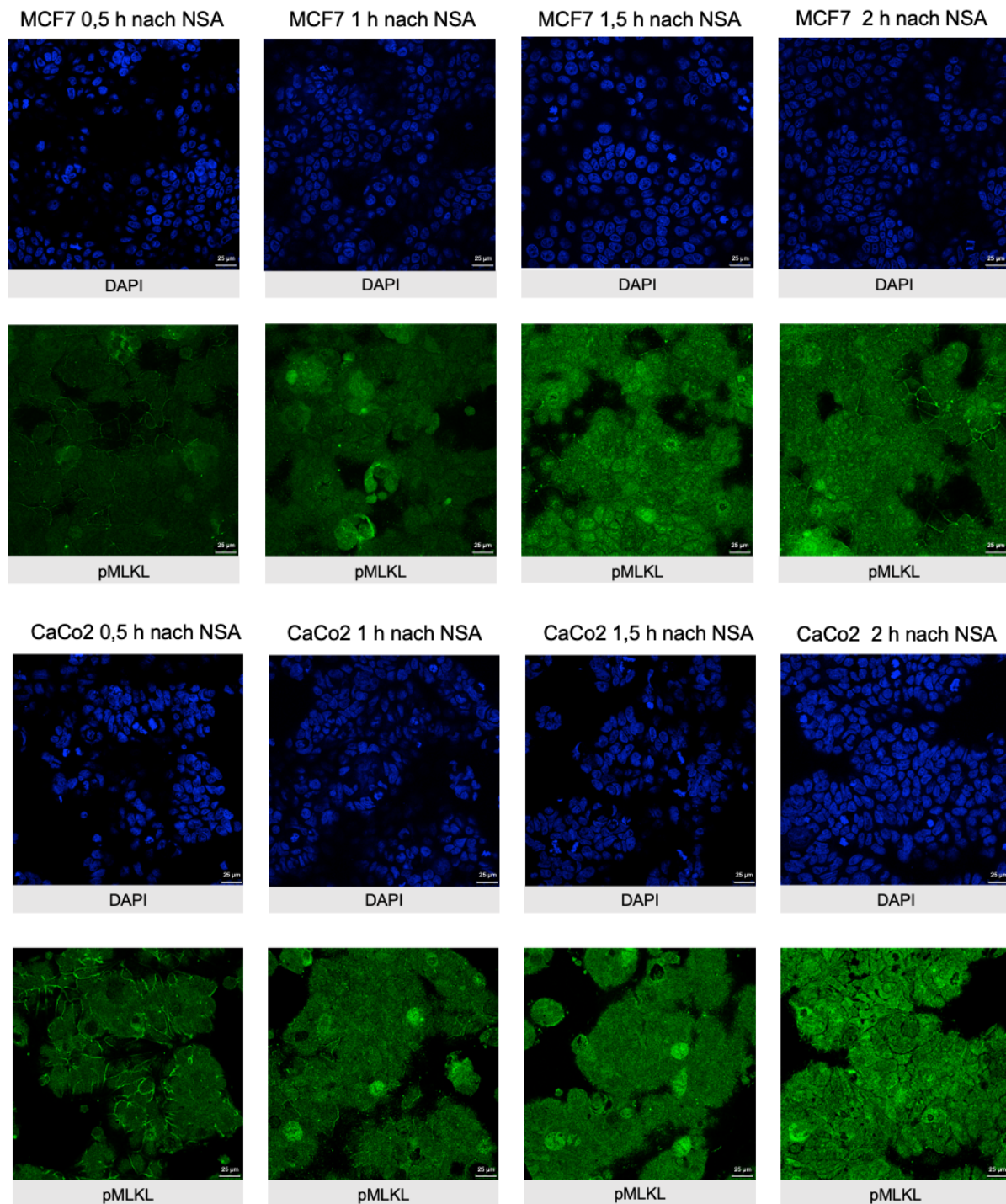
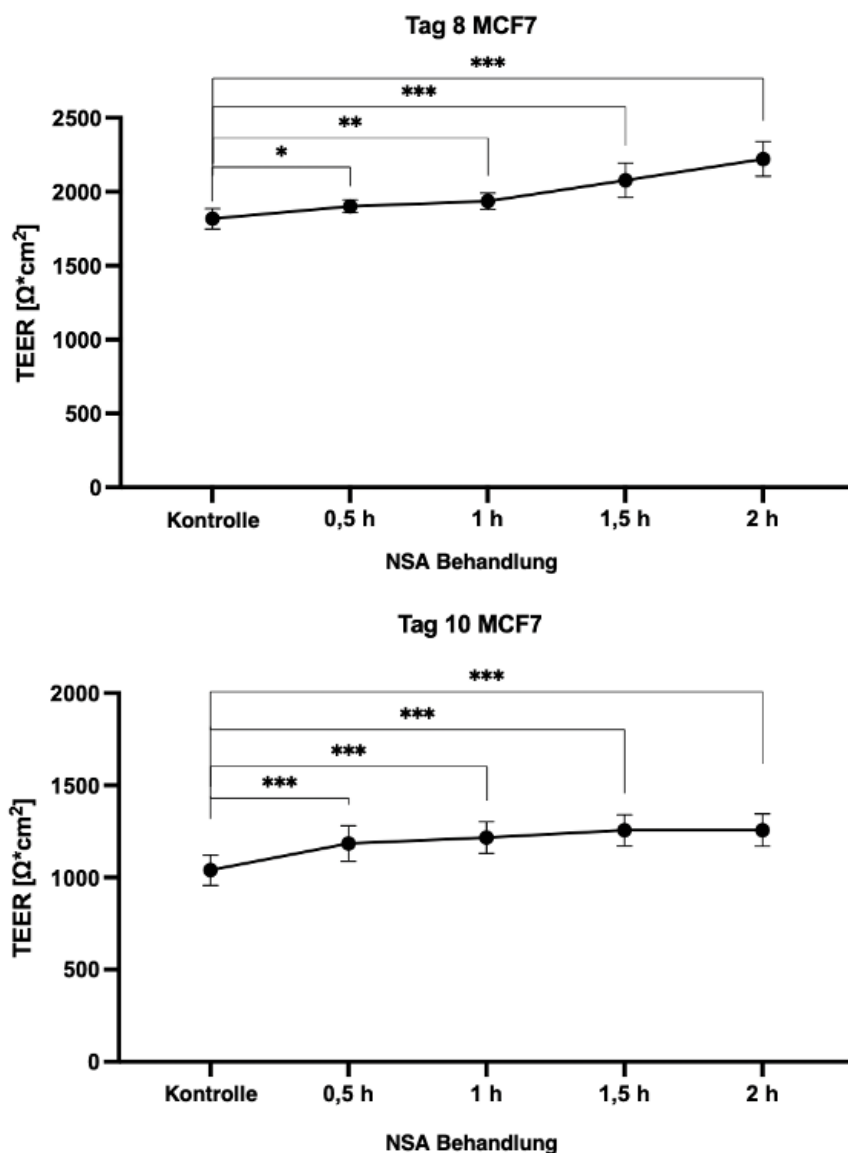


Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbung von pMLKL und Occludin in MCF7-Zellen und CaCo2-Zellen nach NSA-Behandlung zu den Zeitpunkten 0,5 h, 1 h, 1,5 h und 2 h.

Die Zellen wurden zunächst für 0,5 h, 1 h, 1,5 h oder 2 h mit NSA (2 μM) behandelt. Anschließend wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem anti-pMLKL Antikörper (grün) durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Es wurden jeweils 8 Bilder entlang der Z-Achse aufgenommen. Gezeigt sind die einzelnen Farbkanäle einer repräsentativen Ebene entlang der Z-Achse, sowie die Überlagerung dieser (Merge). Die Färbungen wurden in Triplikaten durchgeführt, die Auswertung der Bilder erfolgte am Konfokalmikroskop und es wurden repräsentative Bilder ausgewählt. Der Maßstab entspricht 25 μm.

Zur Überprüfung des Einflusses von NSA auf die Integrität der Tight Junctions wurden MCF7- und CaCo2-Zellen in Transwells ausgesät und regelmäßig TEER-Messungen durchgeführt, bis eine konfluente Zellschicht gegeben war. Dies konnte bei MCF7-Zellen an Tag 8, 10 und 12 nach der Zellaussaat und bei den CaCo2-Zellen an Tag 12 und 14 beobachtet werden. Die Zellen wurden an diesen Tagen mit NSA behandelt und die TEER-Werte 0,5 h, 1 h, 1,5 h und 2 h nach der Behandlung gemessen (Abbildung 24). In der Zelllinie MCF7 ließ sich nach NSA-Behandlung eine signifikante Erhöhung der TEER-Werte an Tag 8, 10, 12 sehen. Diese Ergebnisse sind in einem Einklang mit der TEER-Werterhöhung, die in den Versuchen mit der MLKL siRNA beobachtet werden konnte (Abbildung 24). In den CaCo2-Zellen ließ sich der gegenteilige Effekt zu den MCF7-Zellen beobachten, denn es zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der TEER-Werte an Tag 12 und 14 (Abbildung 24).



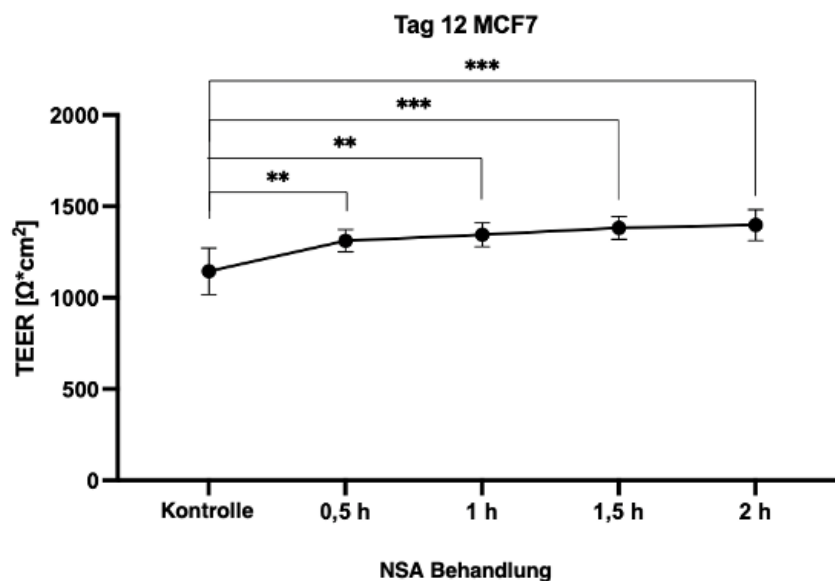
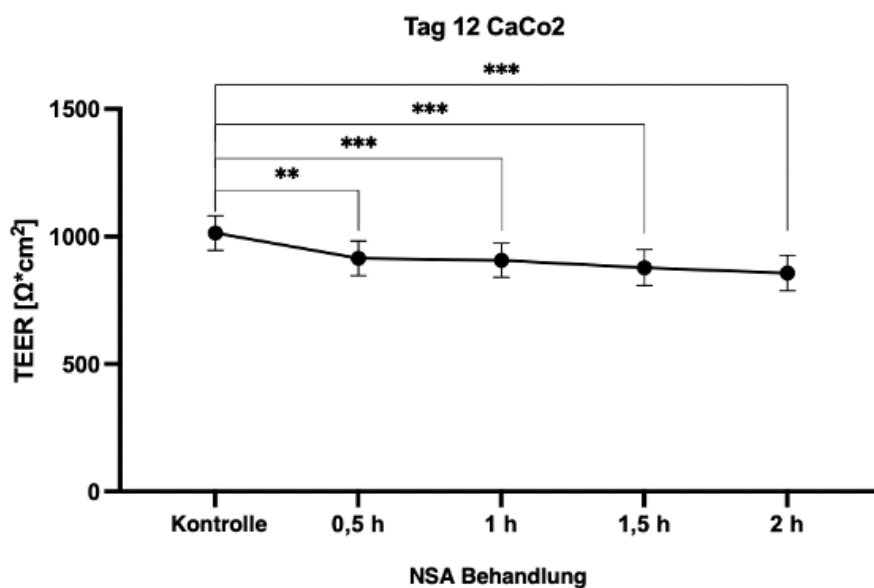


Abbildung 26: Analyse der Tight Junction-Dynamik mittels TEER-Messung in MCF7 Zellen nach Behandlung mit NSA.

Die Einzelmessungen erfolgten an Tag 8, 10 und 12 nach Aussaat und zu den Zeitpunkten 0,5 h, 1 h, 1,5 h und 2 h nach NSA-Behandlung (2 μ M). Die Konfluenz des Zelllayers wurde mittels Kristallviolett färbung kontrolliert. Als Kontrolle dienten MCF7-Zellen, die nur mit ihrem entsprechenden Medium ohne NSA-Zusatz behandelt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde in einem zweiseitigen gepaartem t-Test bestimmt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



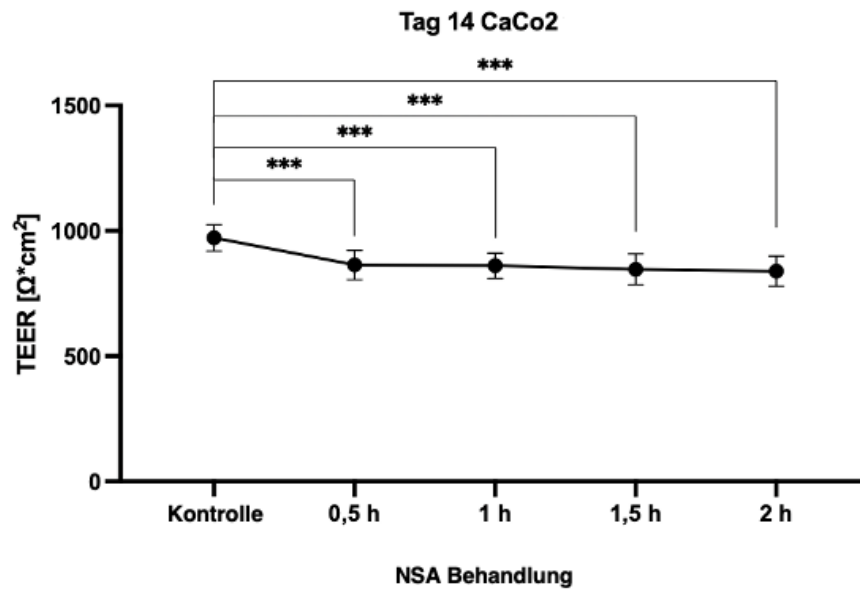


Abbildung 27: Analyse der Tight Junction-Dynamik mittels TEER-Messung in CaCo2-Zellen nach Behandlung mit NSA.

Die Einzelmessungen erfolgten an Tag 12 und 14 nach Aussaat und zu den Zeitpunkten 0,5 h, 1 h, 1,5 h und 2 h nach NSA-Behandlung (2 μM). Die Konfluenz des Zelllayers wurde mittels Kristallviolett färbung kontrolliert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Als Kontrolle dienten CaCo2-Zellen, die nur mit ihrem entsprechenden Medium ohne NSA-Zusatz behandelt wurden. Die Signifikanz wurde in einem zweiseitigen gepaartem t-Test bestimmt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In vorangegangenen Versuchen wurde in der humanen Tumorzelllinie MCF7 eine Co-Lokalisation von pMLKL, dem Hauptmediator des Nekroptosesignalwegs und Occludin, einem zentralen Element der Tight Junctions an der Zellmembran beobachtet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit CaCo2 eine weitere Zelllinie identifiziert, in welcher beide Proteine eine membranäre Lokalisation aufweisen. In weiterführenden Versuchen wurde der Einfluss von RIP3 auf die Co-Lokalisation untersucht. In funktionellen Analysen wurden zudem die Auswirkungen einer verminderten Expression von Occludin auf die MLKL-Expression sowie die Nekroptose-Sensitivität ermittelt. Gleichmaßen wurde der Einfluss einer verminderten MLKL-Expression auf die Expression von Occludin sowie die Integrität der Tight Junctions untersucht.

5.2 Co-Lokalisation von pMLKL und Occludin

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Roth konnte in der Zelllinie MCF7 eine membranäre Co-Lokalisation von pMLKL und Occludin beobachtet werden (3). Um dies weiter funktionell zu untersuchen, wurden zu Beginn dieser Arbeit zunächst weitere Zelllinien auf eine potentielle Co-Lokalisation der beiden Proteine untersucht. In den RIP3-positiven Zelllinien HT29, SK-BR3 und T47D konnte weder ein membranäres Expressionsmuster von pMLKL noch von Occludin beobachtet werden. Gleichmaßen verhielt es sich in den RIP3-negativen Zelllinien DU-145, Huh7 und PC3. Allerdings konnte in der RIP3-negativen Zelllinie CaCo2 sowohl eine membranäre Expression von pMLKL als auch von Occludin nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie ließ sich lediglich eine Aussage über die Morphologie und somit die Lokalisation der genannten Proteine treffen. Eine visuelle Quantifizierung der Expression war nur eingeschränkt möglich. Dies lässt allerdings dennoch vermuten, dass pMLKL und Occludin im Rahmen von Tight Junctions miteinander kolokalisieren könnten. Das Protein pMLKL wurde mittels Z-Achsen-Analyse im Rahmen der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie apikal lokalisiert. Tight Junctions selbst liegen ebenfalls apikal vor, wo sie eine gürtelartige Struktur mit engen Verbindungen zu den benachbarten Zellen bilden (46). Dies bekräftigt somit die Annahme, dass pMLKL und Occludin kolokalisieren könnten.

Bislang wurde eine Translokation von pMLKL an Tight Junctions nur während der Nekroptose beschrieben (12). Samson *et al.* (2020) zeigten eine Co-Lokalisierung zwischen an S358 phosphoryliertem MLKL und den drei Tight Junction-Proteinen JAM-A, Occludin und Zonulin-

1 während der Nekroptose und deuten zudem darauf hin, dass Zonulin-1, ein Bindungspartner von Occludin, und MLKL im Zytoplasma dieselben Transportwege an die Plasmamembran nutzen (39). Diese Ergebnisse sprechen somit ebenfalls für einen räumlichen Zusammenhang von MLKL bzw. pMLKL und den Tight Junctions. Es wäre denkbar, dass pMLKL nicht nur dieselben Transportwege zur Membran wie Zonulin-1 nutzt, sondern über Zonulin-1 mit den Tight Junctions interagiert oder selbst wie Zonulin-1 ein Bindungspartner von Occludin ist. Dies wäre ein möglicher Mechanismus, wie es zu der Co-Lokalisation zwischen pMLKL und Occludin kommen könnte, der auch nekroptoseunabhängig stattfinden könnte.

In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass MLKL über seine 4HB-Domäne in die Membran integrieren kann (47). Ein Bereich positiv geladener Aminosäuren auf der Oberfläche der 4HB-Domäne bindet an Phosphatidylinositolphosphate und ermöglicht so die Rekrutierung von MLKL an die Plasmamembran (48). Dabei ist MLKL nicht statisch, sondern kann seine Konformation wechseln (47). Der genannte Mechanismus zur Integration in die Plasmamembran könnte so auch RIP3- und Nekroptose-unabhängig stattfinden und eine Integration von pMLKL in die Membran in RIP3-negativen Zelllinien erklären.

In weiteren Versuchen wurde diese Co-Lokalisation in Abhängigkeit der RIP3-Expression sowie eines Nekroptosestimulus näher untersucht. Da die beiden humanen Tumorzelllinien MCF7 und CaCo2 kein RIP3 exprimieren und folglich nekroptoseresistent sind, wurde zu diesem Zweck die Überexpressionszelllinie MCF7 RIP3 verwendet. Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie konnte auch in diesen Zelllinien eine Co-Lokalisation zwischen pMLKL und Occludin beobachtet werden. Es scheint daher so, als ob die Expression von RIP3 allein keinerlei Auswirkung auf die Lokalisation von pMLKL in dieser Zelllinie hat. Eine potentielle funktionelle Rolle von pMLKL an den Tight Junctions könnte daher RIP3-unabhängig sein.

Gleichermaßen sind bereits einige weitere RIP3-unabhängige Funktionen von MLKL bekannt. So trägt MLKL beispielsweise unabhängig von RIP1 oder RIP3 zur Bildung extrazellulärer Vesikel bei (25). In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, wie bei der Verletzung des Ischiasnervs die MLKL-Expression in Schwann-Zellen, eine RIPK3-unabhängige Phosphorylierung von MLKL an S441 und die Translokation von MLKL zu Myelinscheidenmembranen induziert (25).

Nach Behandlung der RIP3-überexprimierenden Zellen mit dem Nekroptosestimulus konnte mittels Immunfluoreszenz beobachtet werden, wie sich die nekroptotischen Zellen aus dem Zellverbund herauslösten. In diesen Zellen ließ sich kaum Occludin detektieren. In apoptotischen Zellen ist bereits beschrieben, dass die Proteine der Tight Junctions proteolytisch gespalten werden und die Tight Junctions dadurch unterbrochen werden (49). Die Arbeit von Cai *et al.* (2016) zeigt, dass der nekroptotische Stimulus die Proteolyse von E-

Cadherin durch Zelloberflächenproteasen der Familie der A-Disintegrin- und Metalloproteasen (ADAM) induziert (50). Dies lässt vermuten, dass diese proteolytischen Prozesse auch während der Nekroptose bei Occludin stattfinden könnten.

5.3 RIP3-unabhängige Phosphorylierung von MLKL

Bei der Nekroptose wird MLKL durch die Kinase RIP3 an den Stellen T357 und S358 phosphoryliert (15). Die in dieser Arbeit beobachtete, RIP3-unabhängige Lokalisation von pMLKL an der Plasmamembran legt nahe, dass es weitere Kinasen geben muss, die MLKL phosphorylieren.

Wang und Gong (2022) beschreiben, dass die Kinase CAMK2/CaMKII (Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II) MLKL an demselben Aminosäurerest phosphorylieren kann wie RIP3 (24). Eine weitere Arbeit zeigt, dass CAMK2/CaMKII die MLKL-Phosphorylierung als Reaktion auf Serum- und Aminosäureentzug aus dem Kulturmedium unabhängig von RIPK3 fördert und so die Zellen vor dem Zelltod schützt (51). Da CAMK2/CaMKII wie RIP3 ebenfalls T357 und S358 phosphoryliert, ist es denkbar, dass diese Kinase MLKL auch in Abwesenheit von RIP3 phosphorylieren kann. Zudem ist CAMK2/CaMKII als ein Regulator der Barrierefunktion von Tight Junctions bekannt (52). Die Hemmung von CaMKII führt dabei zu einer verstärkten der Barrierefunktion der Tight Junctions (52). In diesem Zusammenhang könnte eine erhöhte Integrität der Tight Junctions mit einer verminderten Phosphorylierung von MLKL in Verbindung stehen.

Es wäre außerdem denkbar, dass die Phosphorylierung von MLKL an einem anderen Aminosäurerest als T357 und S358 durch beispielsweise Tyrosinkinase eine nötige Grundvoraussetzung für die RIP3-unabhängige Phosphorylierung von T357 und S358 darstellen. In diesem Zusammenhang könnten Kinasen, die Occludin phosphorylieren aufgrund der räumlichen Nähe auch MLKL phosphorylieren. Ein Beispiel wäre in diesem Fall die Tyrosinkinase cSrc (40), die ebenfalls Caspase 8, die in der Apoptose eine wichtige Rolle spielt, phosphorylieren kann (53). Es sind zudem weitere Phosphorylierungsstellen von MLKL beschrieben. Ein Beispiel für eine nekroptoseunabhängige Phosphorylierung ist die bereits erwähnte Phosphorylierung an S441, die zum Myelinabbau führt. (24,25). Die Kinase, die MLKL an Serin 441 von MLKL direkt phosphoryliert, ist derzeit allerdings unbekannt (54). Eine weitere Phosphorylierungsstelle von MLKL ist Y376, welche bei Phosphorylierung durch T.A.M.-Kinasen zu einer Oligomerisierung von MLKL an der Plasmamembran führt, allerdings im Zusammenhang mit der Nekroptose steht (24). Es wäre denkbar, dass die Phosphorylierung von MLKL an einem anderen Aminosäurerest als T357 und S358 durch

besagte Tyrosinkinasen eine nötige Grundvoraussetzung für die RIP3-unabhängige Phosphorylierung von T357 und S358 darstellt.

Bei MLKL spielt neben der Phosphorylierung auch die Ubiquitinierung eine Rolle. Die Ubiquitinierung von MLKL scheint eine funktionelle Assoziation mit der Förderung des endosomalen Transports und bei der Unterstützung der Immunabwehr zu haben (24). Für die Ubiquitinierung von MLKL im murinen System sind eine RIP3-Assoziation und eine Phosphorylierung nicht zwingend erforderlich. Solange MLKL oligomerisieren kann, kann es anscheinend auch in RIP3-defizienten Zellen unter Umgehung der S345-Phosphorylierung ubiquitiniert werden (24). MLKL wird überwiegend im zytosolischen Kompartiment ubiquitiniert, bevor es zu anderen Membranstrukturen wie Plasmamembranen oder Endosomen transloziert wird (24). Es wäre denkbar, dass MLKL zunächst ubiquitiniert werden muss, bevor es durch eine andere Kinase bzw. andere Kinasen neben RIP3 phosphoryliert werden kann.

Zusammenfassend sind mehrere Kinasen denkbar, die MLKL phosphorylieren könnten. In diesem Zusammenhang könnte gegebenenfalls eine vorausgehende Ubiquitinierung oder Phosphorylierung von MLKL an anderen Aminosäure-Resten eine notwendige Voraussetzung für die RIP3-unabhängige Phosphorylierung von T357/S358 darstellen. Gleichmaßen könnte MLKL entweder bereits vor der Translokation an die Zellmembran phosphoryliert werden oder aber auch erst an der Zellmembran.

5.4 Nekroptoseunabhängige Funktionen von MLKL

Die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass MLKL eine nekroptoseunabhängige Funktion im Zusammenhang mit der Integrität der Tight Junctions besitzt. Bislang wurden bereits einige andere nekroptoseunabhängige Funktionen von MLKL beschrieben. Yoon *et al.* (2017) zeigten beispielsweise, dass MLKL eine RIP3-unabhängige Funktion beim endosomalen Transports hat, dessen Wirkung aber durch RIP3 verstärkt werden kann (20). Darüber hinaus beleuchtet die Veröffentlichung von Wu *et. al.* (2020) eine Signalübertragung, die von MLKL abhängt, aber unabhängig von RIP3 verläuft. Dabei trägt MLKL durch Hemmung der Autophagie zur Schädigung der Leber bei (55). Zudem ist beschrieben, wie MLKL die Myelinscheidenmembran von Schwann-Zellen angreift und so den Myelinabbau fördert. Der Prozess erfordert die Phosphorylierung von Serin 441, ein Aktivierungssignal, das sich wiederum von der Nekroptose-induzierenden Phosphorylierung durch die RIP3-Kinase unterscheidet (54).

Wie Zhan *et al.* (2021) beschreiben, sind allerdings viele bisherigen Studien über MLKL auf die Rolle von MLKL in der Nekroptose fokussiert, während die nicht-nekroptotischen Funktionen nur wenig untersucht sind. Die Literatur gibt aber Grund zur Annahme, dass einige

nicht-nekroptotischen Funktionen von MLKL von seiner Affinität zu bestimmten Membranstrukturen wie zum Beispiel Phosphatidylinositol, abhängen (56). Beispielsweise kann pMLKL an die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) binden, um die Insulin-stimulierte Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃)-Produktion an der Plasmamembran in Hepatozyten zu hemmen (56). Phosphorylierte Lipide wie PIP₂ und PIP₃ sind an Zellmembranen lokalisiert und tragen zur Rekrutierung und Aktivierung verschiedener Signalkomponenten bei (57). So können Proteine mit einer PH-Domäne an PIP₃ binden und somit in räumliche Nähe von weiteren Proteinen gelangen und diese gegebenenfalls modifizieren (58). Die Produktion von PIP₃ durch die Phosphorylierung von PIP₂ wird durch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) katalysiert und ist an Zellüberlebenswegen, der Regulierung der Genexpression und dem Zellstoffwechsel sowie der Umstrukturierung des Zytoskeletts beteiligt (57). Durch die Bindung an PIP₂ und der nachfolgenden Hemmung der PIP₃-Produktion könnte die nicht-nekroptotische Funktion von MLKL somit mit einer Inhibierung des PI3K-Signalwegs im Zusammenhang stehen.

Die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit zeigen zudem, dass Occludin die Nekroptose nicht aktiv zu beeinflussen scheint. In den durchgeführten Versuchen konnte keine Occludin-abhängige Änderung der endogenen MLKL-Expression, der Nekroptosesensitivität sowie der Lokalisation von pMLKL beobachtet werden. Auch dies spricht für einen nekroptoseunabhängigen Zusammenhang von MLKL und Occludin.

5.5 Einfluss von MLKL auf Tight Junctions

Die Versuche dieser Arbeit haben gezeigt, dass die endogene Expression von MLKL und Occludin nicht miteinander im Zusammenhang zu stehen scheinen. Jedoch deuten weitere Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Expression von MLKL offenbar funktionell mit der Zell-Zell-Kontakt Dichte in den Zelllinien MCF7 und CaCo2 zusammenhängt.

Während in der Zelllinie MCF7 eine verminderte Expression von MLKL zu einer erhöhten Tight Junctions-Dichte führte, zeigte sich in den CaCo2 Zellen der gegenteilige Effekt. Es lässt sich somit annehmen, dass MLKL die Funktionalität von Tight Junctions moduliert und MLKL ein weiteres Protein in dem Tight Junction Proteinkomplex darstellen könnte.

Tight Junctions sind für die Bildung und das Funktionieren der epithelialen und endothelialen Barrieren von entscheidender Bedeutung (59). Sie regulieren die selektive parazelluläre Diffusion von Ionen und gelösten Stoffen und beschränken die apikal/basolaterale Intramembrandiffusion von Lipiden (59). Tight Junctions bestehen aus einem komplexen Netzwerk von Proteinen, die eng miteinander kommunizieren und so die epitheliale Proliferation, Differenzierung und Polarisierung steuern (59).

MLKL könnte über verschiedene Wege die Funktion von Tight Junctions modulieren. Wie bereits im vorherigen Teil erläutert, könnte MLKL direkt mit Proteinen wie Occludin oder Zonulin-1 an der Membran interagieren oder die Transportwege der Proteine an die Membran beeinflussen, da, MLKL und Zonulin-1 sich die Transportwege an die Plasmamembran teilen (12). Wie in der Publikation von Samson *et al.* (2020) außerdem beschrieben ist, besteht eine echte Co-Regulation zwischen MLKL und den Proteinen der Tight Junction während der Nekroptose in Epithelzellen (12). Dies könnte auch in nicht nekroptosefähigen Zellen möglich sein.

Auch ist es denkbar, dass MLKL indirekt Tight Junctions moduliert, indem es andere Proteine beeinflusst, die wiederum Tight Junctions regulieren. Die PsKD spielt eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Dynamik von MLKL und dient zudem als Proteininteraktionsdomäne. Neben der Assoziation mit der RIP3-Kinasedomäne wurden bereits weitere Interaktionspartner von MLKL identifiziert wie Hsp90 und Proteinkinase-Co-Chaperon CDC37 (19,60). Die Hsp90-Proteinfamilie ist an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt. Hsp90 und seine Co-Chaperone koordinieren dabei entscheidende physiologische Prozesse wie das Überleben der Zelle, die Steuerung des Zellzyklus, die Hormonsignalisierung und die Apoptose (61). Man geht ebenfalls davon aus, dass Hsp90-Proteine die Bildung von epithelialen und endothelialen Barrieren und den Aufbau interzellulärer Verbindungen mitregulieren (62). Die Aktivität von HSPC/Hsp90-Chaperonen kann dabei auch negative Auswirkungen auf die Integrität der Gewebebarriere haben und somit deren Störung unter entzündlichen, ischämischen und anderen pathologischen Bedingungen fördern (62). Es konnte beispielsweise in Untersuchungen gezeigt werden, dass die Hemmung von Hsp90-Proteinen die Phosphorylierung von Occludin unterdrückt, indem es seine Assoziation mit p38 und PI3K hemmt (63). Eine Interaktion von MLKL mit Proteinen der Tight Junctions oder Tight Junctions regulierenden Proteinen wie Hsp90 könnte somit über die PsKD stattfinden.

Denkbar ist auch eine weitere indirekte MLKL-abhängige Modulation der Tight Junctions durch PI3K, die ebenfalls mit Occludin interagieren könnte (64). In diesem Zusammenhang wurde die Aktivierung von PI3K durch oxidativen Stress und ihre Rolle bei der Störung von Tight Junctions in CaCo2-Zellmonolayern untersucht (64). Die Hemmung von PI3K verminderte die durch oxidativen Stress verursachte Tyrosinphosphorylierung von Occludin und somit dessen Dissoziation, was mit einer geringeren Abnahme des elektrischen Widerstands einherging (64). Möglicherweise könnten in diesem Zusammenhang durch die PI3K-abhängige Phosphorylierung von PIP2 zur PIP3 (20, 21) membranäre Andockstellen für weitere Kinasen entstehen, die im Anschluss die Tyrosinphosphorylierung von Occludin initiieren und damit zum Integritätsverlust der Tight Junctions beitragen. Da MLKL durch die Bindung an PIP2 die PI3K-abhängige PIP3-Bindung inhibieren kann (56), könnte MLKL auf diese Weise die Tyrosin-Phosphorylierung von Occludin und die Verminderung der Integrität der Tight

Junctions verhindern. Dieser Mechanismus wäre eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit beschriebene TEER-Abnahme in den CaCo2 Zelllinien bei Verminderung der MLKL-Expression.

Eine weitere Möglichkeit der Tight Junction-Modulation durch MLKL könnte auf nuklearer Ebene liegen. Dies wurde bereits für die Nekroptose beschrieben, bei der MLKL nach einem nekroptotischen Stimulus gemeinsam mit RIP1 und RIP3 in den Zellkern transloziert, bevor es sich die Plasmamembran integriert (65). Hierbei ist eine Phosphorylierung von MLKL erforderlich, um das Kernlokalisierungssignal (NLS, AA 224-256) in der C-terminalen Domäne freizulegen (16). Es wurden allerdings auch nekroptoseunabhängige Translokationen von MLKL in Zellkern beschrieben. MLKL scheint so die Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen zu regulieren (66,67). MLKL kann über die Expression von Endothelzelladhäsionsmolekülen wie ICAM1, VCAM1 und E-Selectin vaskuläre Entzündungen fördern. Durch die direkte Interaktion mit dem RNA-bindenden Motivprotein 6 (RBM6) stabilisiert es die mRNA und steigert die Expression dieser Adhäsionsmoleküle, die für die Interaktion der Endothelzelle mit Leukozyten notwendig sind (67). Aufgrund dieser Fähigkeit von MLKL wäre es folglich möglich, dass MLKL Tight Junctions auch bereits auf DNA-Ebene moduliert und reguliert, obwohl die Co-Lokalisation eher für eine räumlich nähere Regulation spricht.

In den Versuchen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die verminderte Expression von MLKL in MCF7- und CaCo2-Zellen unterschiedliche Dichten der Zell-Zell-Kontakte zur Folge hat. Während eine verminderte Expression von MLKL in MCF7 zu erhöhten TEER-Werten führte, zeigte sich in CaCo2 das Gegenteil. Dies kann verschiedene Gründe haben. Bei den beiden Zelllinien handelt es sich um zwei Zelllinien aus verschiedenen Tumorentitäten. Die Zelllinie MCF7 wurde 1970 aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Frau mit metastasierendem invasivem Brust-Adenokarzinom gewonnen (68). Die Zelllinie CaCo2 wurde 1974 aus dem primären Dickdarmtumor (Adenokarzinom) eines 72-jährigen Mannes gewonnen (69). Die unterschiedlichen Effekte von MLKL könnte an gewebespezifischen Unterschieden der zwei Zelllinien liegen.

Außerdem sind für die Zelllinie CaCo2 unterschiedliche Phosphorylierungsstellen des Occludins beschrieben, die innerhalb des Occludins unterschiedliche Effekte hervorrufen. Beispielsweise führen die vermehrte Phosphorylierung von Occludin durch die Kinase cSrc an den Stellen Y398 und Y402 oder auch die Inhibition von nPKC η , die ebenfalls Occludin phosphorylieren kann, zu verminderten TEER-Werten, also einer verminderten Tight Junctions Dichte (40). Eine Inhibition von CK2 hingegen führte zu erhöhten TEER-Werten in CaCo2 Zellen (40). Innerhalb eines Proteins, in diesem Fall des Occludins, können durch unterschiedliche Phosphorylierungsstellen und unterschiedliche Kinasen gegenteilige Effekte

erzielt werden. Es könnte folglich sein, dass MLKL in diesem Zusammenhang zelllinienabhängig unterschiedliche Phosphorylierungen des Occludins bedingt und somit die Dichte der Tight Junctions unterschiedlich moduliert. Dies könnte dadurch begründet sein, dass in den unterschiedlichen Zelllinien das Expressionslevel der verschiedenen Kinasen variieren könnte.

Diese vorliegende Arbeit zeigt, dass MLKL in einem funktionellen Zusammenhang mit Tight Junctions zu stehen scheint. Zusammenfassend sind verschiedene Wege der Modulation von Tight Junctions durch MLKL denkbar und bieten Hypothesen zur weiteren Untersuchung dieses potentiellen funktionellen Zusammenhangs.

5.6 Klinische Auswirkung

MLKL ist als Hauptmediator der Nekroptose bereits länger Gegenstand aktueller Forschung und ein potentieller Angriffspunkt für neue therapeutische Entwicklungen (70). MLKL ist zudem bekannt dafür, im Rahmen der Nekroptose mit verschiedenen Erkrankungen im Zusammenhang zu stehen. Dazu zählen entzündliche Prozesse, verschiedene neurologische, pulmonale, kardiovaskuläre, renale, gastrointestinale und autoimmune Erkrankungen, sowie Infektionen und Tumorerkrankungen (71). Bislang wurde der Einfluss von MLKL zu den verschiedenen Erkrankungen vor allem im Zusammenhang mit der Nekroptose betrachtet.

Interzelluläre Verbindungen wie Tight Junctions sind entscheidend für die Entwicklung, den Erhalt und die Funktion von Organen und Geweben. Eine Deregulierung und Störung der Zellverbindungen steht mit Krankheiten in Verbindung, die von genetischen Störungen über chronische Entzündungen und Infektionen bis hin zu Tumorerkrankungen reichen (72). Tight Junctions regulieren die parazelluläre Diffusion und senden Signale in das Zellinnere, die das Zellverhalten und die Differenzierung durch die Regulierung von Transkriptionswegen steuern. Sie bilden zudem eine Barriere für Zellen, die versuchen, Epithel- und Endothelgewebe zu durchqueren. So müssen beispielsweise Krebszellen Tight Junctions überqueren, um sich an einer neuen Stelle anzusiedeln und dadurch Metastasen auszubilden (72). Der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion und das verankerungsunabhängige Wachstum gehören zu den Krebsmerkmalen (73). Aufgrund der Relevanz von Tight Junctions bei beispielsweise Krebserkrankungen, sind die Bestandteile der Tight Junctions interessante Ziele für die Einschätzung der Prognose, der Erkennung und vor allem die Behandlung von Tumorerkrankungen (28).

Da in dieser Arbeit MLKL als möglicher Modulator von Tight Junctions gefunden wurde, scheint MLKL auch klinisch und vor allem nekroptoseunabhängig ein interessanter Angriffspunkt für Therapieansätze im Rahmen von Tight Junctions-assoziierten Erkrankungen zu sein.

Tight Junctions können sich unterschiedlich auf die Zellmigration auswirken. Zum einen wirken sie einer Zellmigration durch das Aufrechterhalten der Zellkontakte zu benachbarten Zellen entgegen, andererseits verbinden sie die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett und tragen so zur Bewegungsfähigkeit bei der Migration bei (74). Da diese Arbeit zeigen konnte, dass MLKL einen Einfluss auf die Dichte von Tight Junctions zu haben scheint, wäre es möglich das MLKL an der Zellmigration und Metastasierung von Tumorzellen beteiligt ist. MLKL könnte in MCF7-Zellen der Zellmigration durch eine Stärkung der Zell-Zell-Kontakt-Dichte entgegenwirken, während es in CaCo2 die Zellmigration fördern könnte. Auch in der bisherigen Literatur wird die Rolle von MLKL bei Krebserkrankungen und bei der Metastasierung diskutiert (16). In der Publikation von Cai *et al.* (2016) konnte gezeigt werden, dass MLKL durch das Aktivieren von Zelloberflächen-Proteasen der Familie der A-Desintegrin- und Metalloproteasen (ADAM) an Zellmigration beteiligt ist. Durch diese Aktivierung spalten sich Zelloberflächenproteine ab, die Zelladhäsion wird unterbrochen, die Nekroptose beschleunigt und Entzündungsreaktionen werden durch die gespaltenen Proteine ausgelöst (50). Da bereits beschrieben ist, dass MLKL an Metastasierungsprozessen beteiligt ist, sind auch weitere Mechanismen der Beteiligung wie die Modulation von Tight Junctions denkbar.

Die Funktion von MLKL auf Tumorerkrankungen lässt sich dabei insgesamt jedoch nicht vereinheitlichen. Studien zeigten, dass Patient*innen mit einem reseziertem Adenokarzinom des Pankreas und einer niedrigen MLKL-Expression geringere Gesamtüberlebensraten zeigten als Patient*innen mit höheren MLKL-Expressionsleveln (75,76). Ähnliche Zusammenhänge wurden auch beim Colonkarzinom, Zervixkarzinom, Magenkarzinom, und Ovarialkarzinom beschrieben (77–81). Auf der anderen Seite wird eine erhöhte MLKL-Expression in Patient*innen mit Ösophaguskarzinom und Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses mit einem geringeren Gesamtüberleben in Verbindung gebracht (82–84). Zudem kann MLKL zu einer entzündlichen Mikroumgebung führen, was das Tumorstadium fördern kann (85,86). Eine weitere Publikation beschrieb, wie eine Reduktion von MLKL in Krebszellen zu einer verminderten Metastasierung im Brustkrebsmodell führt (87). Ähnliches konnte in einem Modell bei Nasopharynxkarzinomen beobachtet werden (88). Eine Metaanalyse hingegen zeigte, dass eine niedrige MLKL-Expression mit einer stärkeren Lymphknotenmetastasierung verbunden sein könnte (89). Dies deckt sich mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit, in der die verminderte Expression von MLKL in der einen Zelllinie zu einer erhöhten Widerstandsmessung der Zell-Zell-Kontakte führte und in der anderen Zelllinie gegenteilige Effekte zeigte.

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich die Hypothese aufstellen, dass MLKL Tumorerkrankungen und Metastasierung nicht nur im Rahmen von Nekroptose mitbeeinflusst, sondern auch über seine mögliche Rolle als Modulator von Tight Junctions. Die Funktion von MLKL lässt sich dabei nicht vereinheitlichen. Es gibt viele gewebe- und

erkrankungsspezifische Unterschiede, die berücksichtigt werden müssen. Dies ist insbesondere dann von Relevanz, wenn man sich potentiellen Therapieansätzen widmet. Eine genaue Charakterisierung der Funktion von MLKL in den jeweiligen Geweben muss erfolgt sein, bevor MLKL als Therapieansatzpunkt in Frage kommt.

MLKL spielt nicht nur bei Tumorerkrankungen eine relevante Rolle sondern auch bei Entzündungsreaktionen im Allgemeinen (90). Die Publikation von Zhao *et al.* (2019) beobachtete die Rolle von MLKL bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase und dem Schutz vor Kolitis und Tumorentstehung. In den durchgeführten Versuchen waren MLKL-defiziente Mäuse sehr anfällig für Kolitis und kolitisassoziierte Tumorgenese (CAT), was mit einer massiven Leukozyteninfiltration und erhöhten Entzündungsreaktionen einherging (90). Eine Hypothese ist, dass der MLKL-Verlust in diesen Mäusen zu einer verminderten Tight Junctions-Integrität geführt hat. Hierdurch ergäbe sich ein ähnliches Bild wie bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, die sich durch Veränderungen des Gehalts und der Zusammensetzung der Tight Junction-Proteine kennzeichnen (91). MLKL wäre damit nicht nur für die Therapie von Tumorerkrankungen, sondern auch für die Behandlung anderer Erkrankungen wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen ein interessantes therapeutisches Ziel.

6 Zusammenfassung

MLKL ist bislang vor allem als einer der Hauptakteure in der Nekroptose bekannt, in der es durch RIP3 phosphoryliert wird und anschließend eine bedeutende Rolle im letzten Schritt der Nekroptosekaskade spielt (15). Hinzu kommen jedoch mittlerweile auch einige weitere nekroptoseunabhängige Funktionen (16). Insgesamt scheint MLKL in zahlreichen pathologischen Prozessen beteiligt zu sein (71), weshalb MLKL als ein potentieller Angriffspunkt für neue Therapieansätze in Frage kommt (16). Dennoch ist bislang nicht viel über die genauen Regulationsmechanismen von MLKL bekannt.

Tight Junctions zählen zu den Zell-Zell-Kontakten, die die Homöostase, Integrität von Gewebe und die parazellulären Permeabilität bzw. Barriere und die Zellpolarität aufrechterhalten (92). Auch sie sind an zahlreichen pathologischen Prozessen, wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Infektionen und Tumoren mitbeteiligt (93).

In vorangegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe Roth konnte eine Co-Lokalisation zwischen pMLKL und Occludin, einem zentralen Element der Tight Junctions erstmals beobachtet werden (3). In dieser Arbeit konnte die Co-Lokalisation von pMLKL und Occludin in der humanen Tumorzelllinie MCF7 bestätigt werden und zudem ebenfalls in der humanen Zelllinie CaCo2 gefunden werden. Versuche mit MLKL-spezifischen und Occludin-spezifischen siRNAs zeigten keinen Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen auf Ebene der endogenen Proteinexpression. Auch scheint Occludin die Nekroptose funktionell nicht zu beeinflussen. Es konnte jedoch in weiteren Versuchen dieser Arbeit, in der die Expression von MLKL und Occludin siRNA-vermittelt reduziert wurde, ein bislang nicht bekannter funktioneller Zusammenhang zwischen MLKL und Tight Junctions gefunden werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass es neben RIP3 weitere Kinasen geben muss, die MLKL phosphorylieren, da es sich bei MCF7 und CaCo2 um RIP3-negative Zelllinien handelt.

Die gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit stellen eine Grundlage für die weitergehende Untersuchung des Zusammenhangs von MLKL und Tight Junctions und dessen klinischer Relevanz dar. Hierdurch könnten zudem neue therapeutische Ansätze für zielgerichtete Therapien gefunden werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Gong Y, Fan Z, Luo G, Yang C, Huang Q, Fan K, u. a. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Mol Cancer*. 23. Mai 2019;18:100.
2. Morgan MJ, Kim YS. The serine threonine kinase RIP3: lost and found. *BMB Rep*. 30. Juni 2015;48(6):303–12.
3. Wyss K. Nekroptose im Mammakarzinom - Expression und Funktion der Nekroptose assoziierten Proteine MLKL und RIP3. 9. Juni 2023;
4. Chen D, Yu J, Zhang L. Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1. April 2016;1865(2):228–36.
5. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*. 1. Dezember 2004;16(6):663–9.
6. Blatt NB, Glick GD. Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. *Bioorg Med Chem*. Juni 2001;9(6):1371–84.
7. Hanson B. Necroptosis: A new way of dying? *Cancer Biol Ther*. 19. Juli 2016;17(9):899–910.
8. Murao A, Aziz M, Wang H, Brenner M, Wang P. Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis*. 2021;26(3):152–62.
9. Berghe TV, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Februar 2014;15(2):135–47.
10. Dai W, Cheng J, Leng X, Hu X, Ao Y. The potential role of necroptosis in clinical diseases (Review). *Int J Mol Med*. 26. März 2021;47(5):89.
11. Fulda S. Therapeutic exploitation of necroptosis for cancer therapy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 1. November 2014;35:51–6.
12. Samson AL, Zhang Y, Geoghegan ND, Gavin XJ, Davies KA, Mlodzianoski MJ, u. a. MLKL trafficking and accumulation at the plasma membrane control the kinetics and threshold for necroptosis. *Nat Commun*. 19. Juni 2020;11(1):3151.
13. Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang LF, u. a. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell*. 10. April 2014;54(1):133–46.
14. Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, u. a. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol*. Januar 2014;16(1):55–65.
15. Zhang J, Yang Y, He W, Sun L. Necrosome core machinery: MLKL. *Cell Mol Life Sci*. Juni 2016;73(11–12):2153–63.

16. Martens S, Bridelance J, Roelandt R, Vandenabeele P, Takahashi N. MLKL in cancer: more than a necroptosis regulator. *Cell Death Differ.* Juni 2021;28(6):1757–72.
17. Rodriguez DA, Weinlich R, Brown S, Guy C, Fitzgerald P, Dillon CP, u. a. Characterization of RIPK3-mediated phosphorylation of the activation loop of MLKL during necroptosis. *Cell Death Differ.* Januar 2016;23(1):76–88.
18. Davies KA, Tanzer MC, Griffin MDW, Mok YF, Young SN, Qin R, u. a. The brace helices of MLKL mediate interdomain communication and oligomerisation to regulate cell death by necroptosis. *Cell Death Differ.* September 2018;25(9):1567–80.
19. Petrie EJ, Hildebrand JM, Murphy JM. Insane in the membrane: a structural perspective of MLKL function in necroptosis. *Immunology & Cell Biology.* 2017;95(2):152–9.
20. Yoon S, Kovalenko A, Bogdanov K, Wallach D. MLKL, the Protein that Mediates Necroptosis, Also Regulates Endosomal Trafficking and Extracellular Vesicle Generation. *Immunity.* 18. Juli 2017;47(1):51-65.e7.
21. Najafov A, Mookhtiar AK, Luu HS, Ordureau A, Pan H, Amin PP, u. a. TAM Kinases Promote Necroptosis by Regulating Oligomerization of MLKL. *Mol Cell.* 8. August 2019;75(3):457-468.e4.
22. Liu Z, Dagley LF, Shield-Artin K, Young SN, Bankovacki A, Wang X, u. a. Oligomerization-driven MLKL ubiquitylation antagonizes necroptosis. *EMBO J.* 1. Dezember 2021;40(23):e103718.
23. Yoon S, Bogdanov K, Wallach D. Site-specific ubiquitination of MLKL targets it to endosomes and targets *Listeria* and *Yersinia* to the lysosomes. *Cell Death Differ.* Februar 2022;29(2):306–22.
24. Wang W, Gong YN. MLKL ubiquitylation: more than a makeover. *Cell Death Differ.* Februar 2022;29(2):269–71.
25. Martinez-Osorio V, Abdelwahab Y, Ros U. The Many Faces of MLKL, the Executor of Necroptosis. *International Journal of Molecular Sciences.* Januar 2023;24(12):10108.
26. Van Itallie CM, Anderson JM. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* Dezember 2014;36:157–65.
27. Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol.* Juli 2008;130(1):55–70.
28. Dörfel MJ, Huber O. A phosphorylation hotspot within the occludin C-terminal domain. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2012;1257(1):38–44.
29. Martin TA. The role of tight junctions in cancer metastasis. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* Dezember 2014;36:224–31.
30. Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* September 2016;17(9):564–80.
31. Suzuki T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions.

- Animal Science Journal. Januar 2020;91(1):e13357.
32. Niessen CM. Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. *Journal of Investigative Dermatology*. 1. November 2007;127(11):2525–32.
 33. Tervonen A, Ihalainen TO, Nymark S, Hyttinen J. Structural dynamics of tight junctions modulate the properties of the epithelial barrier. Koval M, Herausgeber. *PLoS ONE*. 9. April 2019;14(4):e0214876.
 34. Yaffe Y, Shepshelovitch J, Nevo-Yassaf I, Yeheskel A, Shmerling H, Kwiatek JM, u. a. The MARVEL transmembrane motif of occludin mediates oligomerization and targeting to the basolateral surface in epithelia. *J Cell Sci*. 1. August 2012;125(Pt 15):3545–56.
 35. Wang S, Li Y, Han F, Hu J, Yue L, Yu Y, u. a. Identification and characterization of MARVELD1, a novel nuclear protein that is down-regulated in multiple cancers and silenced by DNA methylation. *Cancer Lett*. 8. September 2009;282(1):77–86.
 36. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*. 2. Dezember 1993;123(6):1777–88.
 37. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol*. 2. Dezember 1994;127(6):1617–26.
 38. Feldman G, Mullin J, Ryan M. Occludin: Structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 25. April 2005;57(6):883–917.
 39. Cummins PM. Occludin: one protein, many forms. *Mol Cell Biol*. Januar 2012;32(2):242–50.
 40. Dörfel MJ, Huber O. Modulation of Tight Junction Structure and Function by Kinases and Phosphatases Targeting Occludin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012;2012:1–14.
 41. Yang C, Li J, Yu L, Zhang Z, Xu F, Jiang L, u. a. Regulation of RIP3 by the transcription factor Sp1 and the epigenetic regulator UHRF1 modulates cancer cell necroptosis. *Cell Death Dis*. Oktober 2017;8(10):e3084–e3084.
 42. Wu YT, Tan HL, Huang Q, Sun XJ, Zhu X, Shen HM. zVAD-induced necroptosis in L929 cells depends on autocrine production of TNF α mediated by the PKC–MAPKs–AP-1 pathway. *Cell Death Differ*. Januar 2011;18(1):26–37.
 43. El-Mesery M, Shaker ME, Elgaml A. The SMAC mimetic BV6 induces cell death and sensitizes different cell lines to TNF- α and TRAIL-induced apoptosis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 1. Dezember 2016;241(18):2015–22.
 44. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom*. April 2015;20(2):107–26.

45. Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem.* 15. November 1986;159(1):109–13.
46. Rusu AD, Georgiou M. The multifarious regulation of the apical junctional complex. *Open Biol.* 19. Februar 2020;10(2):190278.
47. Yang C, He X, Wang H, Lin Z, Hou W, Lu Y, u. a. Single-Molecule Monitoring of Membrane Association of the Necroptosis Executioner MLKL with Discernible Anchoring and Insertion Dynamics. *Nano Lett.* 14. Juni 2023;23(11):4770–7.
48. Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, Roelandt R, Goncalves A, Bruggeman I, u. a. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell Rep.* 22. Mai 2014;7(4):971–81.
49. Bojarski C, Weiske J, Schöneberg T, Schröder W, Mankertz J, Schulzke JD, u. a. The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells. *Journal of Cell Science.* 15. April 2004;117(10):2097–107.
50. Cai Z, Zhang A, Choksi S, Li W, Li T, Zhang XM, u. a. Activation of cell-surface proteases promotes necroptosis, inflammation and cell migration. *Cell Res.* August 2016;26(8):886–900.
51. Zhan Q, Jeon J, Li Y, Huang Y, Xiong J, Wang Q, u. a. CAMK2/CaMKII activates MLKL in short-term starvation to facilitate autophagic flux. *Autophagy.* 18(4):726–44.
52. Shiomi R, Shigetomi K, Inai T, Sakai M, Ikenouchi J. CaMKII regulates the strength of the epithelial barrier. *Sci Rep.* 18. August 2015;5:13262.
53. Diao Y, Ma X, Min W, Lin S, Kang H, Dai Z, u. a. Dasatinib promotes paclitaxel-induced necroptosis in lung adenocarcinoma with phosphorylated caspase-8 by c-Src. *Cancer Letters.* 28. August 2016;379(1):12–23.
54. Ying Z, Pan C, Shao T, Liu L, Li L, Guo D, u. a. Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Breaks Down Myelin following Nerve Injury. *Mol Cell.* 1. November 2018;72(3):457-468.e5.
55. Wu X, Poulsen KL, Sanz-Garcia C, Huang E, McMullen MR, Roychowdhury S, u. a. MLKL-dependent signaling regulates autophagic flux in a murine model of non-alcohol-associated fatty liver and steatohepatitis. *J Hepatol.* September 2020;73(3):616–27.
56. Zhan C, Huang M, Yang X, Hou J. MLKL: Functions beyond serving as the Executioner of Necroptosis. *Theranostics.* 2021;11(10):4759–69.
57. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 31. Mai 2002;296(5573):1655–7.
58. Park WS, Heo WD, Whalen JH, O'Rourke NA, Bryan HM, Meyer T, u. a. Comprehensive Identification of PIP3-Regulated PH Domains from *C. elegans* to *H. sapiens* by Model Prediction and Live Imaging. *Molecular cell.* 9. Mai 2008;30(3):381.
59. Aijaz S, Balda MS, Matter K. Tight Junctions: Molecular Architecture and Function. In:

- International Review of Cytology [Internet]. Academic Press; 2006 [zitiert 29. Februar 2024].S.261–98.Verfügbar unter:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769606480050>
60. Zhao XM, Chen Z, Zhao JB, Zhang PP, Pu YF, Jiang SH, u. a. Hsp90 modulates the stability of MLKL and is required for TNF-induced necroptosis. *Cell Death Dis.* 11. Februar 2016;7(2):e2089–e2089.
61. Hoter A, El-Sabban ME, Naim HY. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 29. August 2018;19(9):2560.
62. Lechuga S, Marino-Melendez A, Naydenov NG, Zafar A, Braga-Neto MB, Ivanov AI. Regulation of Epithelial and Endothelial Barriers by Molecular Chaperones. *Cells.* Januar 2024;13(5):370.
63. Poulaki V, Iliaki E, Mitsiades N, Mitsiades CS, Paulus YN, Bula DV, u. a. Inhibition of Hsp90 attenuates inflammation in endotoxin-induced uveitis. *FASEB J.* Juli 2007;21(9):2113–23.
64. Sheth P, Basuroy S, Li C, Naren AP, Rao RK. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in oxidative stress-induced disruption of tight junctions. *J Biol Chem.* 5. Dezember 2003;278(49):49239–45.
65. Yoon S, Bogdanov K, Kovalenko A, Wallach D. Necroptosis is preceded by nuclear translocation of the signaling proteins that induce it. *Cell Death Differ.* Februar 2016;23(2):253–60.
66. Cai F, Wang JL, Wu YL, Hu YW, Wang Q. Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein Promotes Human Monocyte Cell Adhesion to Human Umbilical Vein Endothelial Cells Via Upregulation of Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression. *Med Sci Monit.* 13. August 2020;26:e924242-1-e924242-7.
67. Dai J, Zhang C, Guo L, He H, Jiang K, Huang Y, u. a. A necroptotic-independent function of MLKL in regulating endothelial cell adhesion molecule expression. *Cell Death Dis.* 24. April 2020;11(4):1–16.
68. Leibniz Institute DSMZ: Details [Internet]. [zitiert 29. Februar 2024]. Verfügbar unter: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-115>
69. Leibniz Institute DSMZ: Details [Internet]. [zitiert 29. Februar 2024]. Verfügbar unter: https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-169?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192
70. Chen J, Kos R, Garssen J, Redegeld F. Molecular Insights into the Mechanism of Necroptosis: The Necrosome As a Potential Therapeutic Target. *Cells.* 21. November 2019;8(12):1486.
71. Khoury MK, Gupta K, Franco SR, Liu B. Necroptosis in the Pathophysiology of Disease. *Am J Pathol.* Februar 2020;190(2):272–85.

72. Balda MS, Matter K. Tight junctions in health and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Dezember 2014;36:147–8.
73. Janiszewska M, Primi MC, Izzard T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J Biol Chem*. 21. Februar 2020;295(8):2495–505.
74. Kolchakova D, Moten D, Batsalova T, Dzhambazov B. Tight Junction Protein Claudin-12 Is Involved in Cell Migration during Metastasis. *Biomolecules*. 25. April 2021;11(5):636.
75. Colbert LE, Fisher SB, Hardy CW, Hall WA, Saka B, Shelton JW, u. a. Pronecrotic mixed lineage kinase domain-like protein expression is a prognostic biomarker in patients with early-stage resected pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*. 1. September 2013;119(17):3148–55.
76. Seldon CS, Colbert LE, Hall WA, Fisher SB, Yu DS, Landry JC. Chromodomain-helicase-DNA binding protein 5, 7 and pronecrotic mixed lineage kinase domain-like protein serve as potential prognostic biomarkers in patients with resected pancreatic adenocarcinomas. *World J Gastrointest Oncol*. 15. April 2016;8(4):358–65.
77. Li X, Guo J, Ding AP, Qi WW, Zhang PH, Lv J, u. a. Association of Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein Expression With Prognosis in Patients With Colon Cancer. *Technol Cancer Res Treat*. August 2017;16(4):428–34.
78. Ertao Z, Jianhui C, Kang W, Zhijun Y, Hui W, Chuangqi C, u. a. Prognostic value of mixed lineage kinase domain-like protein expression in the survival of patients with gastric cancer. *Tumour Biol*. Oktober 2016;37(10):13679–85.
79. Li L, Yu S, Zang C. Low Necroptosis Process Predicts Poor Treatment Outcome of Human Papillomavirus Positive Cervical Cancers by Decreasing Tumor-Associated Macrophages M1 Polarization. *Gynecol Obstet Invest*. 2018;83(3):259–67.
80. Ruan J, Mei L, Zhu Q, Shi G, Wang H. Mixed lineage kinase domain-like protein is a prognostic biomarker for cervical squamous cell cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(11):15035–8.
81. He L, Peng K, Liu Y, Xiong J, Zhu FF. Low expression of mixed lineage kinase domain-like protein is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1539–43.
82. Liu X, Zhou M, Mei L, Ruan J, Hu Q, Peng J, u. a. Key roles of necroptotic factors in promoting tumor growth. *Oncotarget*. 19. April 2016;7(16):22219–33.
83. Dong Y, Sun Y, Huang Y, Dwarakanath B, Kong L, Lu JJ. Upregulated necroptosis-pathway-associated genes are unfavorable prognostic markers in low-grade glioma and glioblastoma multiforme. *Transl Cancer Res*. Juni 2019;8(3):821–7.
84. Li J, Huang S, Zeng L, Li K, Yang L, Gao S, u. a. Necroptosis in head and neck squamous cell carcinoma: characterization of clinicopathological relevance and in vitro

- cell model. *Cell Death Dis.* 22. Mai 2020;11(5):391.
85. Seifert L, Werba G, Tiwari S, Giao Ly NN, Allothman S, Alqunaibit D, u. a. The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression. *Nature.* 14. April 2016;532(7598):245–9.
86. Ando Y, Ohuchida K, Otsubo Y, Kibe S, Takesue S, Abe T, u. a. Necroptosis in pancreatic cancer promotes cancer cell migration and invasion by release of CXCL5. *PLoS One.* 30. Januar 2020;15(1):e0228015.
87. Jiao D, Cai Z, Choksi S, Ma D, Choe M, Kwon HJ, u. a. Necroptosis of tumor cells leads to tumor necrosis and promotes tumor metastasis. *Cell Res.* August 2018;28(8):868–70.
88. Dong Y, Sun Y, Huang Y, Fang X, Sun P, Dwarakanath B, u. a. Depletion of MLKL inhibits invasion of radioresistant nasopharyngeal carcinoma cells by suppressing epithelial-mesenchymal transition. *Ann Transl Med.* Dezember 2019;7(23):741.
89. Hu B, Shi D, Lv X, Chen S, Huang Q, Xie M, u. a. Prognostic and clinicopathological significance of MLKL expression in cancer patients: a meta-analysis. *BMC Cancer.* 13. Juli 2018;18(1):736.
90. Zhao Q, Yu X, Li M, Liu Y, Han Y, Zhang X, u. a. MLKL attenuates colon inflammation and colitis-tumorigenesis via suppression of inflammatory responses. *Cancer Lett.* 10. September 2019;459:100–11.
91. Schulzke JD, Ploeger S, Amasheh M, Fromm A, Zeissig S, Troeger H, u. a. Epithelial Tight Junctions in Intestinal Inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2009;1165(1):294–300.
92. Nehme Z, Roehlen N, Dhawan P, Baumert TF. Tight Junction Protein Signaling and Cancer Biology. *Cells.* 6. Januar 2023;12(2):243.
93. Sawada N. Tight junction-related human diseases. *Pathol Int.* Januar 2013;63(1):1–12.

8 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Hanna Marie Schulte

Geburtsdatum: 12. August 1997

Geburtsort: Frankfurt am Main

Praktische Ausbildung

seit 08/2023	Assistenzärztin in der Hämatologie und Onkologie, Medizinische Klinik 2, Universitätsklinikum Frankfurt, Frankfurt/Main
12/2022 bis 04/2023	Universitätsklinikum Frankfurt, Frankfurt/Main – III. Tertial des praktischen Jahres, Zentrum der Chirurgie
09/2022 bis 12/2022	Universitätsklinikum Frankfurt, Frankfurt/Main – II. Tertial des praktischen Jahres, Medizinische Klinik 2, Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
05/2022 bis 09/2022	Markus Krankenhaus, Frankfurt/Main – I. Tertial des praktischen Jahres, Palliativmedizin

Studium und Schulbildung

05/2024	Abschluss des dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung (M3) und Approbation
05/2022	Goethe-Universität, Frankfurt/Main – Studium der Humanmedizin
10/2016 – 05/2022	Johannes Gutenberg-Universität, Mainz – Studium der Humanmedizin
2007 – 2015	Heinrich-von-Gagern Gymnasium, Frankfurt/Main – Allgemeine Hochschulreife