

Die Rolle der Nekroptose bei der Entstehung der Pulmonalarteriellen Hypertonie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Schellbach, Laura
aus Borna

Gießen (2024)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System

Innere Medizin II

Gutachter: Prof. Dr. Ralph Schermuly

Gutachterin: PD Dr. Barbara Ahlemeyer

Tag der Disputation: 08.05.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	1
1.1. Pulmonale Hypertonie und Pulmonal arterielle Hypertonie	1
1.1.1. Definition.....	1
1.1.2. Klassifikation	2
1.1.3. Pathogenese der PAH	5
1.2.4. Symptome, Diagnostik und Therapie	6
1.2. Nekroptose.....	7
1.2.1. Signalweg der Nekroptose	8
1.2.2. Nekroptose als ein pathophysiologischer Mechanismus von Erkrankungen	10
1.2.3. Die Nekroptose als Mechanismus in der Entstehung der PAH	11
1.3. Death-associated Protein Kinase 1	12
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden	15
2.1. Material.....	15
2.1.1. Labortechnische Apparaturen und Instrumente	15
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3. Reagenzien, Chemikalien und Lösungen	18
2.1.4. Zellen, Zellkulturmedien und weitere Substanzen.....	20
2.1.5. Antikörper und siRNA	21
2.1.6. Primer	22
2.1.7. Kits.....	23
2.2. Methoden	24
2.2.1. Tierexperimente	24
2.2.2. Zellkultorexperimente	30

2.2.3. Proteinisolation und Western Blot.....	38
2.2.4. Statistische Auswertung	42
3. Ergebnisse	43
3.1. mRNA und Proteinexpression von Nekroptose-assoziierten Proteinen in SuHx-Rattenlungen	43
3.1.1. Expression von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf RNA-Ebene	43
3.1.2. Expression und Phosphorylierung bzw. Spaltung von RIPK3, MLKL und Caspase 8 auf Proteinebene	44
3.2. Expression von und Phosphorylierung der Nekroptosemarker nach Knockdown von DAPK in hPAECs und hPASCs	46
3.3. Einfluss des Knockdowns von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf Zellzyklus, Apoptose und Zellviabilität.....	48
3.3.1. Einfluss auf die Expression von DAPK1 und weiterer ausgewählter Proteine der Apoptose und des Zellzyklus	48
3.3.2. Einfluss des Knockdown von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf die Zellviabilität	50
3.4. Medikamentöse Induktion der Nekroptose in hPAECs mithilfe von Kombinationen der Wirkstoffe ZVAD, BV-6 und TNF-α.....	50
3.4.1. Die isolierte Wirkung von Z-VAD-FMK und von BV-6 in verschiedenen Konzentrationen auf hPAECs	51
3.4.2. Induktion von Nekroptose durch die kombinierte Behandlung mit Z-VAD-FMK und BV-6 beziehungsweise TNF- α	52
3.5. Die Wirkung von GSK-872 auf die Zellviabilität von hPAECs	54
4. Diskussion.....	55
4.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	55
4.2. Methodendiskussion.....	57
4.2.1 Die Wahl des Tiermodells.....	57
4.2.2. Das Zellkulturmodell	59
4.3. Ergebnisdiskussion	60
4.3.1. mRNA- und Proteinexpression von nekroptoseassoziierten Proteinen in SuHx-Rattenlungen.....	60

4.3.2. Expression und Phosphorylierung der Nekroptosemarker nach Knockdown von DAPK in hPAECs und hPASCs	62
4.3.3. Einfluss des Knockdowns von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf Zellzyklus, Apoptose und Zellviabilität	63
4.3.4. Medikamentöse Induktion der Nekroptose in hPAECs mithilfe von Kombinationen der Wirkstoffe ZVAD, BV-6 und TNF- α	64
4.3.5. Die Wirkung von GSK-872 auf die Zellviabilität von hPAECs	67
4.4. Fazit	68
4.5. Ausblick	70
Zusammenfassung	72
Summary	73
Abkürzungsverzeichnis	74
Abbildungsverzeichnis	78
Tabellenverzeichnis	79
Literaturverzeichnis	80
Erklärung zur Dissertation	87
Danksagung	88
Lebenslauf	88

1. Einleitung

1.1. Pulmonale Hypertonie und Pulmonal arterielle Hypertonie

1.1.1. Definition

Die pulmonale Hypertonie ist eine chronische Erkrankung, die hämodynamisch durch eine Erhöhung des mittleren pulmonal arteriellen Drucks (mPAP) definiert wird. Die genaue Definition unterliegt ständiger Überarbeitung durch die WSPH (World Symposium on Pulmonary Hypertension) sowie durch die European Society of Cardiology (ESC) und die European Respiratory Society (ERS). Von einer pulmonalen Hypertonie spricht man bei einem mPAP von ≥ 20 mmHg, gemessen mittels Rechtsherzkatheter und in Ruhe. Dieser Schwellenwert wurde erstmals vom 6. WSPH in Nizza (Frankreich) 2018 definiert und im August 2022 in die aktuelle Leitlinie der ESC und ERS übernommen, bis dahin lag die Grenze bei ≥ 25 mmHg . [56, 38, 41].

Die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) ist eine chronisch-progressive Lungengefäßerkrankung, assoziiert mit einer Erhöhung des Widerstandes der kleineren Lungenarterien durch strukturellen Gefäßwandumbau („Remodeling“), was durch die Erhöhung der kardialen Nachlast unbehandelt zu einer kompensatorischen Hypertrophie der rechten Herzkammern, dem Cor Pulmonale, und schließlich zur Insuffizienz mit letalem Ausgang führen kann [75]. Sie entspricht in der klinischen Klassifikation der PH der Gruppe 1 von 5 Gruppen und ist neben dem mPAP ≥ 20 mmHg durch einen pulmonal-arteriellen Verschlussdruck (PAWP) von ≤ 15 mmHg, sowie einen pulmonalvaskulären Widerstand (PVR) von ≥ 3 WU charakterisiert, was ebenfalls der

PAH

- Idiopathic PAH
- Heritable PAH
- Drug- and toxin-induced PAH (Table 2)
- PAH associated with
 - Connective tissue disease
 - HIV infection
 - Portal hypertension
 - Congenital heart disease
 - Schistosomiasis
- PAH long-term responders to calcium channel blockers
- PAH with overt features of venous/capillaries (PVOD/PCH) involvement
- Persistent PH of the newborn syndrome
- PH due to left heart disease
 - PH due to heart failure with preserved LVEF
 - PH due to heart failure with reduced LVEF
 - Valvular heart disease
 - Congenital/acquired cardiovascular conditions leading to post-capillary PH
- PH due to lung diseases and/or hypoxia
 - Obstructive lung disease
 - Restrictive lung disease
 - Other lung disease with mixed restrictive/obstructive pattern
 - Hypoxia without lung disease
 - Developmental lung disorders
- PH due to pulmonary artery obstructions
 - Chronic thromboembolic PH
 - Other pulmonary artery obstructions
 - Sarcoma (high or intermediate grade) or angiosarcoma
 - Other malignant tumours
 - Renal carcinoma
 - Uterine carcinoma
 - Germ cell tumours of the testis
 - Other tumours
 - Non-malignant tumours: uterine leiomyoma
 - Arteritis without connective tissue disease
 - Congenital pulmonary artery stenoses
 - Parasites
- PH with unclear and/or multifactorial mechanisms
 - Haematological disorders: chronic haemolytic anaemia, myeloproliferative disorders
 - Systemic and metabolic disorders: pulmonary Langerhans cell histiocytosis, Gaucher disease, glycogen storage disease, neurofibromatosis, sarcoidosis
 - Others: chronic renal failure with or without hemodialysis, fibrosing mediastinitis
 - Complex congenital heart disease
 - Segmental pulmonary hypertension: isolated pulmonary artery of ductal origin, absent pulmonary artery, pulmonary atresia with ventricular septal defect and major aorto-pulmonary collateral arteries, hemitruncus, other
 - Single ventricle: unoperated, operated
 - Scimitar syndrome

PAH, pulmonary arterial hypertension; PVOD, pulmonary veno-occlusive disease; PCH, pulmonary capillary haemangiomas; LVEF, left ventricular ejection fraction.

Table 1: klinische Klassifikation der PH, gemäß des 6. WSPH in Nizza 2018, aus Sahay S, 2019 [88]

Definition einer präkapillären PH (siehe unten) entspricht [92, 67]. Für die Diagnostizierung einer PAH müssen allerdings andere Formen der präkapillären PH ausgeschlossen werden [39].

1.1.2. Klassifikation

Die Formen der PH werden anhand von pathophysiologischen, prognostischen, klinischen und labor- bzw. medizintechnisch messbaren Merkmalen sowie therapeutischen Möglichkeiten in fünf Gruppen eingeteilt [92, 25]:

1. Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)
2. PH infolge von Linksherzerkrankungen
3. PH infolge von Lungenerkrankungen
4. Chronisch-thromboembolische PH
5. PH infolge systemischer Erkrankungen und PH multifaktorieller Genese

Die vollständige Zusammensetzung der Gruppen entsprechend des 6. WSPH ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Abgesehen von dieser Klassifikation lässt sich die PH hämodynamisch unterteilen in eine präkapilläre PH, zu finden bei den klinischen Gruppen 1, 3, 4 und 5, eine isolierte postkapilläre PH und eine kombinierte prä- und postkapilläre PH, wobei die beiden letzteren in den klinischen Gruppen 2 und 5 auftreten. Die präkapilläre PH ist charakterisiert durch einen mPAP von > 20 mmHg, einen pulmonal-arteriellen Verschlussdruck (PAWP) von ≤ 15 und einen pulmonalen vaskulären Widerstand (PVR) von ≥ 3 WU. Die isolierte postkapilläre PH wird definiert durch einen mPAP von ≥ 20 mmHg, einen PAWP

von 15 mmHg und einen PVR von < 3 WU und die kombinierte prä- und postkapilläre PH ist gekennzeichnet durch einen mPAP von > 20 mmHg, einen PAWP von > 15 mmHg und einen PVR von ≥ 3 WU [92]. Da die PAH im Rahmen dieser Arbeit eine besondere Rolle einnimmt, soll hier noch einmal etwas genauer auf die Gruppe 1 und ihre Untergruppen eingegangen werden.

Idiopathische und hereditäre PAH

Die Idiopathische PAH ist dadurch definiert, dass weder Risikofaktoren, noch eine familiäre Prädisposition für die Entwicklung dieser Erkrankung identifiziert werden kann. Besteht hingegen eine familiäre Prädisposition, wird die Erkrankung der zweiten Untergruppe, der hereditären PAH, zugeordnet [75]. Besonders häufig ist hierbei eine Keimbahnmutation im BMPR2-Gen mit einer Häufigkeit von 70 % innerhalb der Untergruppe der hereditären PAH, das für einen speziellen Rezeptor der TGF- β -Familie, den Bone Morphogenic Protein Receptor 2 (BMPR2), codiert [61, 101].

PAH assoziiert mit Medikamenten und Toxinen

Bei der Entstehung einer PAH durch den Einfluss von Medikamenten und Toxinen werden verschiedene Risikogruppen unterschieden. Eine vollständige Übersicht über diese Faktoren bietet Tabelle 2.

Zu den definitiven Risikofaktoren gehören unter anderen die Anorektika (Appetitzügler) Aminorex, Fenfluramin, Dexfenfluramin und Benfluorex, welche in ihrer Struktur den Amphetaminen ähneln. Nachdem die PAH-induzierende Wirkung dieser Medikamente bekannt wurde, wurden sie vom Markt genommen [31, 22, 2, 32, 76].

Definitive Risikofaktoren	Mögliche Risikofaktoren
Aminorex	Alkylierende Agenzien
Benfluorex	Amphetamine
Fenfluramin	Bosutinib
Dexfenfluramin	Direkt antivirale Substanzen gegen Hepatitis B
Dasatinib	Indirubin
Metamphetamine	Interferon- α und $-\beta$
Toxisches Rapsöl	Kokain
	Leflunomid
	L-Tryptophan
	Phenylpropanolamine, Johanniskraut

Tabelle 2: Risikofaktoren für die Entstehung einer medikamenten-induzierten PAH, Chen J-J, 2007 (6)

PAH assoziiert mit Bindegewebserkrankungen

Die vierte Untergruppe bildet die PAH, assoziiert mit Bindegewebserkrankungen, HIV-Infektion, portaler Hypertonie, kongenitalen Herzfehlern oder Schistosomiasis (siehe Tabelle 1). Die PAH mit gutem Ansprechen auf Kalzium-Kanal-Blocker wurde beim 6. WSPH erstmals als eigene Untergruppe in die Klassifikation aufgenommen [25].

PAH mit offensichtlichen Hinweisen auf eine pulmonalvenöse/kapilläre Beteiligung

Bei der 6. Untergruppe, der PAH mit offensichtlichen Hinweisen auf eine pulmonalvenöse/kapilläre Beteiligung, wird zwischen der pulmonalen veno-okklusiven Erkrankung (PVOD) und der pulmonalen kapillären Hämangiomatose (PCH) unterschieden. Typisch für diese Formen der PAH ist ein obstruktiver Remodeling - Prozess, der entweder von den Venolen und kleinen Venen der Lunge (bei der PVOD) oder dem alveolären Kapillarbett (bei der PCH) ausgeht. In beiden Fällen kommt es infolge des gesteigerten pulmonal-venösen bzw. -kapillären Drucks zu einer Erhöhung des mPAP, was in den Arteriolen zu einem Remodeling-Prozess führt, durch den es zur Hypertrophie in den betroffenen Arteriolen und infolge dessen zur Dilatation des Truncus Pulmonalis und schließlich der Hypertrophie des rechten Ventrikels, bedingt durch die gesteigerte Nachlast, kommt [23].

Persistierende PH des Neugeborenen

Die persistente PH des Neugeborenen (PPHN) ist gekennzeichnet durch einen erhöhten PVR und einen dadurch bedingten extrapulmonalen Rechts-Links-Shunt, z. B. durch das Foramen Ovale oder den Ductus Arteriosus Botalii. Nach der Geburt findet normalerweise der Übergang vom fetalen Kreislauf, bei dem die Lunge noch nicht entfaltet, der Widerstand der pulmonalen Gefäße sehr hoch und die Lunge kaum durchblutet ist, zum postnatalen Kreislauf statt. Dazu entfaltet sich die Lunge, es kommt zu einer drastischen Reduktion der PVR, wodurch die Durchblutung der Lunge um das 8- bis 10-fache ansteigt. Aufgrund der vermehrten Durchblutung kommt es zum Anstieg der Vorlast und somit auch des Blutdrucks im linken Ventrikel, was die Druckverhältnisse des kleinen und des großen Kreislaufs umkehrt. Dadurch werden das Foramen ovale und der Ductus Arteriosus Botalii verschlossen. Findet diese Reduktion des PVR nicht statt, führt dies zur PPHN. Dies kann z.B. infolge einer Lungenhyperplasie, einer Parenchymerkrankung oder auch idiopathisch auftreten [26].

1.1.3. Pathogenese der PAH

Trotz intensiver Forschung zur Entstehung und der Therapie der PAH bleiben viele Aspekte der genauen Pathophysiologie noch bis heute unklar, man hat jedoch einige Mechanismen in der Entstehung der PAH identifizieren können. Auslöser können unterschiedlichste Risikofaktoren wie z. B. genetische Prädisposition, medikamentöse oder toxische Risikofaktoren, typischerweise mit PAH assoziierte Erkrankungen (siehe oben), eine dysregulierte Inflammation oder Autoimmunität sein. Inflammation mit gesteigerter Einwanderung von Immunzellen und vermehrter Sekretion von Entzündungsmediatoren wie IL-6, IL-8, IL12 und TNF- α und DAMPs wie HMGB1 führt zum vaskulären Remodeling der kleinen Lungengefäße, einer gesteigerten Thromboseneigung und Vasokonstriktion, wobei das Remodeling, welches alle drei Schichten der Gefäßwand betrifft, eine besonders wichtige Rolle einnimmt [42, 30, 115, 96, 110, 1]. Es kommt zur Intimahyperplasie, Mediahypertrophie und zum fibrotischen Umbau der Adventitia [30, 75]. Die Intimahyperplasie wird bedingt durch den Sensitivitätsverlust der Endothelzellen gegenüber proapoptischer Signale, der Proliferation der Endothelzellen und dem Verlust der üblichen endothelialen Differenzierung, wobei stattdessen vermehrt eine mesenchymale Differenzierung erfolgt. In der Media kommt es, bedingt durch veränderte Zellkommunikation via Zytokinen und durch oxidativen Stress, zur Proliferation und Dysfunktion von glatten Muskelzellen. Außerdem findet eine Migration von Fibroblasten aus der Adventitia in die Media statt, in

einigen Fällen mit Ausbildung einer sogenannten Neointima, einer Schicht aus Extrazellulärmatrix und Myofibroblasten, die zwischen der Lamina elastica interna und dem Endothel entsteht [30, 75, 42]. In der Adventitia ist eine Neovaskularisierung der Vasa vasorum zu beobachten [75]. Plexiforme Läsionen beschreiben ein Remodeling der Intima, das in einigen Formen der PAH auftritt. Diese plexiformen Läsionen bestehen größtenteils aus Endothelzellen, aber auch aus Fibroblasten und Matrixproteinen. Letztendlich führt das gesamte beschriebene Remodeling zur Obstruktion und Widerstandserhöhung der betroffenen Gefäße [75, 10].

1.2.4. Symptome, Diagnostik und Therapie

Zu Krankheitsbeginn zeigen die Patienten häufig wenige oder nur unspezifische Symptome wie Belastungsdyspnoe, Fatigue und Müdigkeit, wodurch die Krankheit oft erst spät erkannt wird. Diese Symptome nehmen im Krankheitsverlauf weiter zu und es kommen neue Symptome wie Thoraxschmerzen, Bendopnoe und Synkopen, besonders während oder nach körperlicher Belastung, hinzu. Treten die Synkopen zunehmend häufiger auf, spricht dies bereits für eine steigende Rechtsherzbelastung. Im Stadium der kardialen Dekompensation sind dann vermehrt typische Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz zu beobachten, wie Aszites, Ödeme oder Jugularvenenstauung [40, 81, 39].

Typische Befunde bei der körperlichen Untersuchung sind zum Beispiel eine zentrale oder periphere Zyanose, welche am ehesten bei Belastung auftritt, tastbare Pulsationen links parasternal und evtl. auskultatorische Zeichen einer Pulmonal- oder Trikuspidalklappeninsuffizienz. Sind ebenso Ödeme, Aszites und Jugularvenenstauung, eine tastbar vergrößerte Leber und kühle livide Extremitäten als Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz zu eruieren, spricht dies für eine kardiale Dekompensation und eine somit schlechte Prognose. Im EKG können ebenso Zeichen einer Rechtsherzbelastung wie ein Rechtstyp oder überdrehter Rechtstyp, ein P-pulmonale, Erregungsrückleitungsstörungen oder ein Rechtsschenkelblock erkennbar sein. Im Röntgen-Thorax gelten erweiterte Pulmonalarterien und verminderte periphere Gefäßfüllung oder ein vergrößertes rechtes Herz mit verlängerter sternaler Kontaktfläche als typische Zeichen einer PAH [39, 40, 81].

Die Echokardiografie kann ebenso wichtige Hinweise liefern, da sich durch ein Dopplergestütztes Verfahren der PAP abschätzen lässt, welcher besonders bedeutsam für die Diagnosestellung der PAH ist. Außerdem können auch hier erweiterte Pulmonalvenen oder eine Rechtsherzhypertrophie erkannt werden. Im Lungenfunktionstest ist am

ehesten eine leichte kombinierte Ventilationsstörung mit Einschränkung der Diffusionskapazität sichtbar. In der Blutgasanalyse sind sowohl das arterielle CO₂ als auch der arterielle Sauerstoff typischerweise erniedrigt. Bei der Rechtsherzkatheteruntersuchung spricht ein mPAP \geq 20 in Kombination mit einem PAWP \leq 15 mmHg für eine PAH [81, 39, 40].

Eine kurative Therapie ist bei der PAH leider noch nicht möglich. Primäres Therapieziel ist daher stattdessen die Erhöhung der Lebenserwartung durch Verzögerung des Krankheitsprozesses, Symptomlinderung und Verbesserung der Lebensqualität der Patienten. Derzeit gibt es mehrere Medikamente, die nachgewiesenermaßen zur gezielten Therapie der PAH geeignet sind. Zu diesen Medikamenten gehören hochdosierte Kalziumantagonisten, Prostazykline oder Prostazyklin-Derivate, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, Phosphodiesterase-Inhibitoren und Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase. Unterstützend ist bei der IPAH und der FPAH allgemein eine Antikoagulation und bei Rechtsherzinsuffizienz die Gabe von Diuretika induziert, außerdem kann bei Dyspnoe eine Sauerstofftherapie nötig sein. Fällt die Sauerstoffsättigung nachts auch bis auf unter 85 % ab, ist allgemein eine Langzeit-Sauerstofftherapie zu erwägen [40, 81].

Neben der medikamentösen Therapie sind auch invasive Eingriffe möglich, wie zum Beispiel die Atrioseptostomie, welche die Prognose verbessern kann, wenn sie frühzeitig zu Beginn der Erkrankung durchgeführt wird. Als Ultima ratio kann eine Lungen- oder eine Herz-Lungen-Transplantation die Prognose erheblich verbessern [81, 40].

1.2. Nekroptose

Die Nekroptose, oft auch als regulierte Nekrose bezeichnet, ist eine Form des Zelltodes, welche Merkmale der Apoptose und der Nekrose vereint. Ähnlich der Apoptose läuft sie reguliert, durch die Aktivierung einer Signalkaskade, ab und kann durch die Bindung der entsprechenden Liganden an Todesrezeptoren wie z. B. Fas, TNF- α -Rezeptor, IFN- γ -Rezeptor, CD4 oder TLRs initiiert werden. Das Ergebnis dieser Signalkette ist allerdings wie bei der Nekrose eine Porenbildung in der Zellmembran, wodurch es zur Zellschwellung und Freisetzung von DAMPs (damage associated molecular patterns) aus dem Zellinneren kommt, was schließlich zum Tod der Zelle und führt und eine Inflammation auslöst [89, 104, 18].

Die Nekroptose läuft besonders dann bevorzugt ab, wenn Caspase-8 und IAPs (inhibitors of apoptosis protein) in der Zelle inhibiert oder abwesend sind, sodass die Apoptose nicht stattfinden kann und der Zelltod zeitgleich durch endogene oder exogene

Auslöser, wie z. B. die Aktivierung des TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) induziert wird [89]. Somit stellt die Nekroptose einen regulierten Zelltod dar, der alternativ zur Apoptose ablaufen kann, wenn diese blockiert ist.

1.2.1. Signalweg der Nekroptose

Im folgenden Abschnitt soll der molekulare Ablauf des Signalwegs der Nekroptose beispielhaft bei Aktivierung durch TNF- α beschrieben werden. Dieser Signalweg wird schematisch durch die Abbildung 1 verdeutlicht.

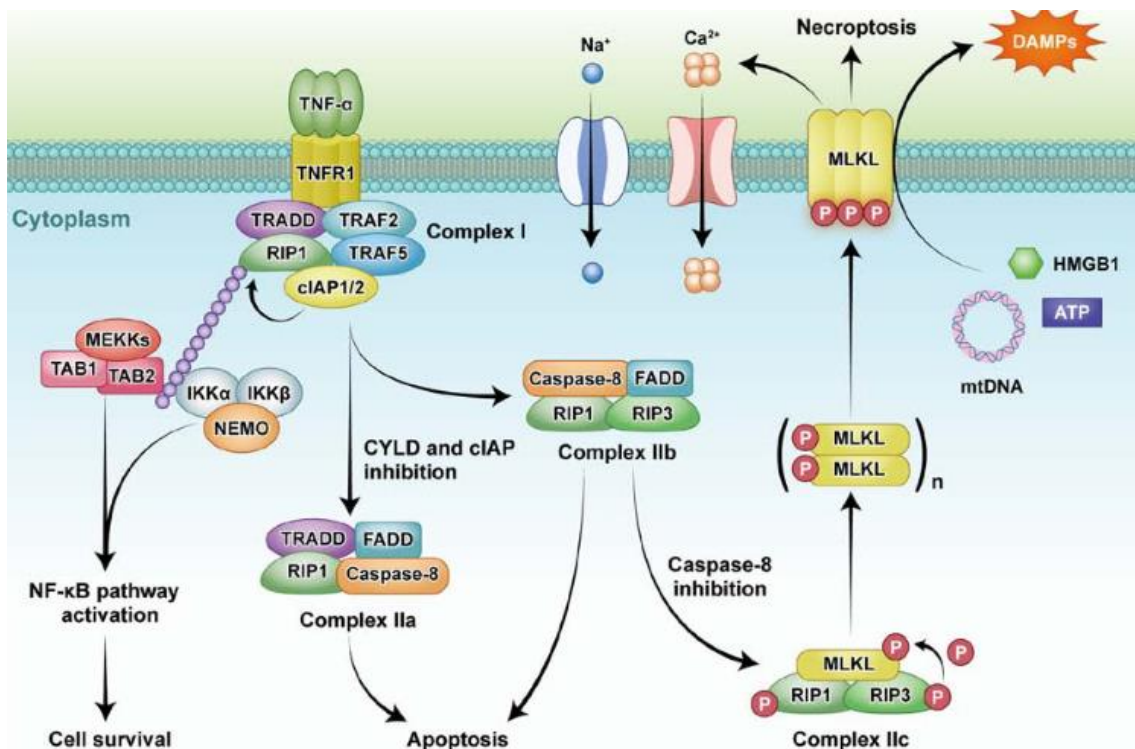


Abbildung 1: Schematische Darstellung der TNF- α -abhängigen Nekroptose. Dargestellt sind die beteiligten Signalproteine und Komplexe. Deren Interaktionen und Wirkungen sind durch Pfeile gekennzeichnet. aus Dai W, Cheng J et al, 2021 [11]

Durch Bindung von TNF- α am TNFR1 wird die Bildung des Komplex I initiiert, ein kurzlebiger Membrankomplex, welcher durch die Zusammenlagerung von TRADD (TNF receptor associated death domain), TRAF2 (TNF receptor associated factor 2), TRAF5 (TNF receptor associated factor 5), RIPK1 (receptor interacting protein kinase 1), cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1) und cIAP2 entsteht. Dieser Signalkomplex ist nun maßgeblich an der Entscheidung bezüglich des Überlebens der Zelle beteiligt. Durch Komplex I kann, abhängig von den intrazellulären Rahmenbedingungen, sowohl

der Zelltod via Apoptose oder Nekroptose, als auch der MAPK-Signalweg induziert werden, welcher zur Aktivierung von NF κ B und zum Überleben der Zelle führt [18, 68, 33, 105, 78].

In Anwesenheit der cIAPs wird RIPK1 ubiquitiniert und damit in seiner Aktivität inhibiert, sodass weder Apoptose noch Nekroptose stattfinden können. Stattdessen wird der MAPK-Signalweg und dadurch NF κ B aktiviert, was zur Inflammation, Proliferation und zum Wachstum der Zelle beiträgt. In Abwesenheit oder bei Inhibierung der cIAPs wird RIPK1 hingegen deubiquitiniert und bildet mit TRADD, Caspase 8, FADD (FAS-associated death domain) und FLIPs (FLICE-like inhibitory proteins) einen Signalkomplex, welcher als Komplex IIa bezeichnet wird.

Durch eine Interaktion von FLIP_L, der langen Isoform von FLIPs, mit Caspase 8 wird RIPK1 gespalten und inaktiviert und die Nekroptose somit inhibiert. Durch diese Interaktion mit RIPK1 wird auch Caspase 8 gespalten und aktiviert, was die Caspasen-Kaskade initiiert, welche im apoptotischen Zelltod endet.

Ist Caspase 8 allerdings inhibiert oder abwesend, rekrutiert RIPK1 RIPK3 und es bildet sich Komplex IIb, auch Ripoptosom genannt. RIPK1 und RIPK3 interagieren nun miteinander über ihre RHDs (receptor homology domains) und formen durch gegenseitige Aktivierung und Vernetzung das sogenannte Nekrosom (Komplex IIc). Im Nekrosom wird MLKL (mixed lineage kinase domain-like pseudokinase) durch RIPK1 phosphoryliert, pMLKL bildet daraufhin durch Oligomerisierung einen porenförmigen Komplex in der Zellmembran. Dadurch schwillt die Zelle an und es werden DAMPs wie z. B. HMGB1 und Zytokine wie IL-18, und IL-1 β in den Extrazellulärraum freigesetzt, die eine Inflammation bewirken. Über den Verlust der Integrität der Plasmamembran und der Zellorganellen kommt es schließlich zu einem Zelltod, der in seiner Morphologie der Nekrose ähnelt [79, 89, 104, 27, 98, 77, 116, 35, 5, 8].

Unter bestimmten Umständen kann RIPK3 auch unabhängig von RIPK1 aktiviert werden. Dies geschieht zum Beispiel durch die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren oder unter dem Einfluss von Interferonen über die Aktivierung von DAI (DNA-dependent factor of interferon) [89, 50, 100, 103].

Seit der Entdeckung der Nekroptose wurden bisher mehrere Inhibitoren identifiziert, die auf den eben beschriebenen Nekroptose-Signalweg Einfluss nehmen können. Einer der ersten dieser Inhibitoren war Necrostatin-1, ein allosterischer selektiver Inhibitor, der die Kinasenaktivität von RIPK1 in vivo blockieren und somit auch die Anfälligkeit der Zelle gegenüber der Nekroptose vermindern kann. Ähnliche Wirkungen zeigen auch GSK2982772 und andere Nekrostatine wie Necrostatin-3 und Necrostatin-5 [13, 34, 55].

Neben den RIPK1-Inhibitoren wurden auch einige selektive RIPK3-Inhibitoren entdeckt, wie z.B. GSK-872, GSK-840, GSK-843 und Dabrafenib [50, 58, 55]. GSK-872, GSK-840, GSK-843, zeigen allerdings neben der hochpotenten Inhibition von RIPK3 auch eine dosisabhängige proapoptotische Wirkung [62, 55].

GSK-074 zeigt diese proapoptotischen Eigenschaften nicht und inhibiert die Nekroptose und die damit assoziierte Inflammation durch die Hemmung von RIPK1 und RIPK3 [117]. Es sind bisher nur wenige MLKL-spezifische Inhibitoren bekannt, Necrosulfamide (NSA) ist der prominenteste dieser MLKL-Inhibitoren [98].

1.2.2. Nekroptose als ein pathophysiologischer Mechanismus von Erkrankungen

In der Forschung besteht seit der Entdeckung dieses regulierten Zelltodes ein vermehrtes Interesse an der Rolle der Nekroptose bei der Entstehung verschiedenster Krankheiten und an ihrem Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Anhand von Krankheitsmodellen für die jeweiligen Erkrankungen und den Knockdown oder die medikamentöse Inhibition der Schlüsselproteine in der Signalkaskade der Nekroptose, ließ sich eine Beteiligung der Nekroptose an der Entstehung und Progression von Erkrankungen unterschiedlichster Organsysteme eruieren, welche meist besonders mit der pro-inflammatorischen Wirkung der Nekroptose in Verbindung steht. So wurde z. B. anhand von Tiermodellen festgestellt, dass Tiere, bei denen die Nekroptose aufgrund von genetischer Modifikation oder medikamentöser Inhibition blockiert war, weniger anfällig für z. B. Alzheimer [111, 4], Multiple Sklerose [114], COPD [73, 82], Schlaganfall [14, 112], Herzinfarkt [94, 80], Pankreatitis [108, 60] und viele andere Erkrankungen sind. Auf einige pulmonale Erkrankungen soll im folgenden Abschnitt genauer eingegangen werden.

COPD (chronic obstructive pulmonary disease) ist eine progressive Lungenerkrankung, bei der es durch chronische Inflammation der Lunge zur Obstruktion der kleinen Bronchien und zur zunehmenden Zerstörung der alveolären Strukturen kommt, wodurch die Gasaustauschfläche der Lunge abnimmt. Die zerstörte Alveolarstruktur bedingt zusätzlich den Kollaps kleinster Bronchioli, was die Ausatmung weiter erschwert und zu einer Überblähung der Lunge beiträgt. Diese überblähten Areale zerstörter Bronchialstruktur werden als Emphysem bezeichnet. Der wohl wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung einer COPD ist Zigarettenrauch, so ist im Tiermodell für COPD die Symptomatik dieser Erkrankung durch die anhaltende Exposition der Tiere mit Zigarettenrauch replizierbar [70, 84]. Die Rolle der Nekroptose in der Pathogenese von COPD wurde schon in zahlreichen Studien thematisiert. So konnte in den Lungen von Mäusen solcher COPD-Tiermodelle eine gesteigerte Expression von RIPK3 sowie eine

erhöhte Konzentration von DAMPs und Neutrophilen festgestellt werden, die sich durch die Behandlung der Mäuse mit Necrostatin-1 reduzieren ließ [73, 83]. Ähnliche Hinweise fand man auch bei der idiopathischen Lungenfibrose (IPF). Die IPF ist eine chronisch-progressive Lungenerkrankung, ausgelöst durch wiederholte Schädigung von alveolären Endothelzellen, was zu einer chronischen Inflammation führt. Dadurch kommt es zum progressiven fibrotischen Umbau des Lungengewebes, was letztendlich eine Restriktion zur Folge hat [90, 91]. Im Tiermodell und im Zellkulturmodell kann dieser Effekt unter anderen durch die Behandlung mit Bleomycin (BLM) repliziert werden [90]. In IPF-Lungen wurde in einer Studie von Lee et al. eine erhöhte Expression von RIPK3 festgestellt. Auch in Mauslungen war die Expression von RIPK3 nach Behandlung mit Bleomycin erhöht, außerdem fand man auch ein gesteigertes Level von IL-1 β und HMGB1. Diese Effekte ließen sich durch Knockout von RIPK3 und mittels Einsatz von Necrostatin-1 reduzieren [57].

Die Nekroptose stellt auch einen wichtigen Mechanismus des Immunsystems bei der Bekämpfung viraler Infektionen zur Einschränkung der Virusreplikation durch die Eliminierung infizierter Zellen dar, da einige Viren imstande sind, die Apoptose in den infizierten Zellen zu inhibieren [51]. So bilden zum Beispiel Vacciniaviren in infizierten Zellen mehrere antiapoptotische Proteine, die unter anderen die Apoptose via Inhibition von Caspase 8 und Caspase 1 blockieren können [36, 54, 19]. In einer Studie von Cho et al. konnte bei RIPK3-Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp eine gesteigerte Anfälligkeit gegenüber Vaccinia-Viren festgestellt werden [8]. Einige Viren haben allerdings Wege entwickelt, auch den nekroptotischen Zelltod zu umgehen. So kann zum Beispiel das CMV (Zytomegalie-Virus) in den infizierten Zellen Proteine bilden, welche sowohl RIPK3 als auch Caspase 8 blockieren können, sodass hier auch bei Wildtyp-Mäusen kein Vorteil bei einer CMV-Infektion gegenüber den RIPK3-defizienten Mäusen zu erkennen war [51, 74, 102].

1.2.3. Die Nekroptose als Mechanismus in der Entstehung der PAH

Wie oben beschrieben spielen Endothelschäden und Inflammation mit erhöhter Sekretion von Entzündungsmediatoren, Einwanderung von Immunzellen und Freisetzung von DAMPs wie HMGB1 bei dem Prozess des vaskulären Remodelings in der Entstehung der PAH eine wichtige Rolle. Der Mechanismus, welcher zur Inflammation und damit auch zum Remodeling führt, ist bisher noch nicht vollständig bekannt und obwohl der Zusammenhang zwischen Nekroptose und PAH noch weitgehend unerforscht ist, gibt es einige wenige Studien, die darauf hindeuten, dass die Nekroptose an diesem Mechanismus beteiligt ist. In einer Studie von Xiao et al. (2020)

wurden anhand des MCT-Rattenmodells (Monocrotalin-Rattenmodell), einem etablierten Tiermodell für die PAH, die Signalwege untersucht, welche zur Inflammation in den pulmonalen Arterien und Arteriolen führen. Neben einer gesteigerten Aktivität der TLR- (Toll-like receptor) und NLR- (Nod-like receptor) Signalwege und einer pathologisch veränderten und erhöhten Expression und Sekretion von DAMPs wurde mittels Pathview, Morpheus und PCR eine gesteigerte Expression von RIPK3, MLKL und FADD sowie eine Verringerung der Expression von Caspase 8 festgestellt [110]. In einer aktuellen Studie von Jarabicova et al. (2022) wurden in Tierversuchen mithilfe des MCT-Rattenmodells erhöhte Plasmalevel von phosphoryliertem RIPK3 beobachtet, welche mit der Schwere der PAH-Symptomatik korrelierten [48].

1.3. Death-associated Protein Kinase 1

DAPK1 (Death-associated Protein Kinase 1) gehört zur Familie der Serin-Threonin-Kinasen und wurde zum ersten Mal 1995 in Verbindung mit dem INF- γ -induzierten Zelltod bei HeLa-Zellen beschrieben [16]. Sie nimmt eine wichtige Rolle in der Regulierung von Apoptose und Autophagie innerhalb der Zelle ein, wird im Zusammenhang mit ihren proapoptischen Eigenschaften auch zu den Tumor-Suppressoren gezählt und ist in zahlreichen Arten von Tumorzellen stark supprimiert [24, 29, 69]. DAPK1 bewirkt beim Auftreten tumorspezifischer Vorgänge wie dem Verlust von Zell-Matrix-Kontakten, der erhöhten Expression von Onkogenen, aber auch z. B. bei ER-Stress oder der Aktivierung zellulärer Rezeptoren durch Zytokine wie TNF- α oder IGF- β eine Erhöhung der p53-Konzentration innerhalb der betroffenen Zelle [28, 44, 47, 86, 106]. Des Weiteren kann DAPK1 mit FADD interagieren und in T-Lymphozyten deren Aktivierung via Inhibierung des NF κ B-Signalweg entgegenwirken [37, 9, 109]. Bisher gibt es nur sehr wenige Studien, die sich mit dem Zusammenhang zwischen DAPK1 und der Nekroptose oder der PAH befassen. In vorangegangenen Untersuchungen unserer Forschungsgruppe wurde die Expression von DAPK1 in PAH-Lungen anhand von Gewebeproben aus Patientenlungen und anhand des Normoxie-Hypoxie- und des Monocrotalin-Modells untersucht. Dabei hat man eine verminderte Expression von DAPK1, sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene, im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe feststellen können. Besonders deutlich war dieser Effekt in den pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen zu beobachten [93]. In einer Studie von Wu et al. konnte festgestellt werden, dass im Maus-Modell durch den Knockout von DAPK1 die Anfälligkeit von BMDM-Zellen (Bone marrow-derived macrophages) gegenüber der Nekroptose deutlich erhöht war, was als Hinweis auf eine antinekroptische Stellung

von DAPK1 neben der proapoptotischen Rolle innerhalb dieser Zellen gedeutet werden kann [109].

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die Rolle der Nekroptose in der Entstehung von Krankheiten, die pathophysiologisch mit dysregulierten, chronisch-entzündlichen Prozessen und einem veränderten Proliferationsverhalten in Verbindung stehen, wurde bisher in zahlreichen Studien thematisiert [112, 114, 91, 90, 57, 60, 52, 59]. Obwohl nun erstmals Hinweise darauf gefunden wurden, dass die Nekroptose auch bei der Pathogenese der PAH beteiligt sein könnte [110, 48], bleibt dieser Zusammenhang bis jetzt noch weitgehend unerforscht. Daher soll im ersten Teil dieser Arbeit anhand des Sugen-Hypoxie(SuHx)-Rattenmodells, einem etablierten Modell für die experimentelle Simulation der PAH, die Veränderung der Expression und Aktivierung von am Nekroptose-Signalweg beteiligten Proteinen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eruiert werden. Zur Untersuchung dieses Sachverhaltes wurden PCR- und Western Blot-Analysen durchgeführt.

Die antiapoptotische Rolle von DAPK1 wurde bisher in zahlreichen Studien thematisiert, ebenso wie der nekroptotische Signalweg und die Wechselbeziehung zwischen Apoptose und Nekroptose mit gegenseitiger Hemmung bei Aktivierung des jeweiligen anderen Signalweges. Neue Erkenntnisse deuten nun auf eine Beteiligung der Nekroptose in der Pathogenese der PAH hin [110, 48]. Da anhand früherer Untersuchungen unserer Forschungsgruppe sowohl im Rattenmodell als auch in Lungenlysaten von an PAH erkrankten Patienten eine Runterregulation von DAPK1 festgestellt wurde [93] und in Experimenten von Wu et al. eine pro-nekroptotische Wirkung von DAPK1 in BMDM-Zellen beobachtet werden konnte [109], könnte auch bei der Pathogenese der PAH ein kausaler Zusammenhang zwischen der verminderten Expression von DAPK1 und der gesteigerten Nekroptose vermutet werden. Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob eine Reduktion der Expression von DAPK1 in humanen pulmonalarteriellen Endothelzellen (hPAECs) und humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (hPASCs) einen Anstieg der Nekroptoseaktivität der betroffenen Zellen zur Folge hat. Als Methode wurde die Transfektion von siRNA zum Knockdown von DAPK1 in Donorzellen mit anschließender Proteinisolierung und Western Blot-Analyse gewählt. Hierbei wurde vor allem die Auswirkung des DAPK1-Knockdowns auf die Expression und Aktivierung bedeutender Akteure des Nekroptose-Signalweges RIPK1, RIPK3, MLKL und FADD eruiert.

Der dritte Teil dieser Arbeit fokussiert sich auf die Wirkung der Nekrosom-Proteine RIPK1, RIPK3 und MLKL auf die Expression von DAPK1 und ausgewählter Apoptosemarker. Des Weiteren sollte der Einfluss dieser Nekrosom-Proteine auf den Zellzyklus in hPAECs untersucht werden. Somit sollte eruiert werden, ob eine Inhibierung der Nekroptose mittels Suppression der Synthese von RIPK1, RIPK3 und MLKL diese Prozesse beeinflusst. Dazu wurde zum Knockdown des jeweiligen Proteins eine siRNA-Transfektion an hPAECs durchgeführt, das Protein aus diesen Zellen isoliert und anschließend die Expression von DAPK1, p53 und Cyclin D1 mittels Western Blot-Analysen untersucht. Außerdem wurde die Zell-Viabilität von den mit siRNAs vorbehandelten hPAECs mithilfe des CellTiter Glo Assays gemessen, um herauszufinden, ob der Knockdown dieser Gene die Zell-Viabilität beeinflusst.

Ziel des vierten Abschnitts dieser Arbeit war die Entwicklung einer experimentellen Methode zur medikamentösen Induktion der Nekroptose in hPAECs. Somit sollte ein Zellkulturmodell für die Simulation der PAH in hPAECs entworfen werden. Als Anhaltspunkt für das Vorgehen diente hierbei eine Studie von Wu et al., in welcher die Nekroptose mithilfe von Kombinationen der Wirkstoffe Z-VAD-FMK, BV-6, TNF- α und AT-406 in BMDMs induziert werden konnte [109]. Hierfür wurden hPAECs mit verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen dieser Medikamente behandelt und die Zell-Viabilität anschließend mittels CellTiter Glo Assay gemessen.

Wie bereits erwähnt, sind bisher schon mehrere Inhibitoren des Nekroptose-Signalweges bekannt, welche zum Teil auch in vivo Wirkung gezeigt haben. Da die Nekroptose an der Pathogenese zahlreiche Erkrankungen beteiligt ist, bieten solche Inhibitoren einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige Therapiemöglichkeiten für die entsprechenden Erkrankungen. GSK-872, ein selektiver RIPK3-Inhibitor, ist ein solcher Wirkstoff, der im Falle einer Beteiligung der Nekroptose an der Entstehung und Progredienz der PAH möglicherweise zur Therapie dieser Erkrankung beitragen könnte. Allerdings wurde bei der Behandlung der Zellreihen SVEC, L929, 3T3SA und MEF neben der antinekroptotischen Wirkung auch eine dosisabhängige zytotoxische Wirkung festgestellt, welche für eine Therapie von Nachteil wäre [62]. Darum wurde im letzten Teil dieser Arbeit untersucht, ob die dosisabhängige Zytotoxizität von GSK-872 auch an hPAECs zu beobachten ist. Dafür wurde die Zellviabilität der hPAECs nach Behandlung mit GSK-872 mittels CellTiter Glo Assay gemessen.

1. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Labortechnische Apparaturen und Instrumente

Terminus	Herkunft
Becherglas 250 ml	Duran, Wertheim, Deutschland
CELLGARD NU-480	ibs tecnomara, Fernwald
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
Direct-Q® Wasseraufbereitungssystem	Merck KGaA, Darmstadt
Eiswanne 4 L	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eiswanne 9 L	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen, DE
Entwicklungsmaschine Agfa CP1000	Agfa, Mortsel, Belgien
Eppendorf Research® plus, 12-Kanal, 10 – 100 µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus (10 µl- Pipette)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus (100 µl- Pipette)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus (1000 µl- Pipette)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heidolph MR Hei-Standard Magnetrührer	Heidolph-Instruments, Schwabach, Deutschland
Heracell™ 150i (5% CO ₂ , 21% O ₂ , 37°)	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Leica DM IL Mikroskop	Leica, Wetzlar, DE
Magnetrührer VWR Advanced Series	VWR International, Radnor, USA
Magnetstäbchen	Carl Roth, Karlsruhe
Messzylinder 100 ml	VITLAB, Grossostheim, Deutschland
Messzylinder 250 ml	VITLAB, Grossostheim, Deutschland
Messzylinder 1000 ml, Glas graduiert	iDL, Nidderau, Deutschland

Mikroplatten Lesegerät Infinite M200	TECAN, Männedorf, Schweiz
Mini PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik GmbH
Perfect Western, Western Blot Containers, black	GenHunter, Nashville, USA
pH-Meter 766	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
ROTINA 420R Refrigerated Tabletop Centrifuge	Hettich, Kirchlingern, Deutschland
Shaker WT16	Biometra GmbH, Göttingen
Sicherheits-Absaugsystem VACUSAFE Comfort	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Thermomixer F 1.5	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage (Präzisionswaage)	KERN & SOHN GmbH, Balingen
Water Bath SWB24D	Stone, Staffordshire, UK
XCell SureLock™ Electrophoresis Cell	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
Zentrifuge Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Fresco Biofuge	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA

Tabelle 3: Labortechnische Apparaturen und Instrumente

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Terminus	Herkunft
3mm CHR Blotting Paper Sheets 46 x 57cm	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
Alufolie	Carl Roth, Karlsruhe
Amersham Hypersensitive Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
Cell Culture Plate 6 well	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Cell Culture Plate 96 well	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Röhrchen, konischer Boden, 15 ml	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Röhrchen, konischer Boden, 15 ml, braun	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Röhrchen, konischer Boden, 50 ml	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Röhrchen, konischer Boden, 50 ml, braun	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Corning® 1-200 µL Round 0.5 mm Thick Gel-Loading Tips	Corning, New York USA
Handschuhe nitril Gr. S	Ansell, Richmond, Australien
Hypercassette	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
Multiplate PCR Plates, 96 well, clear	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
NuPage 4-12% Bis-Tris Gel, 1.5mm x 10 wells	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
Petrischale 100 mm rund	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischale 60 mm rund	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten serologisch 10 ml 25er Pack	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Pipetten serologisch 10 ml einzeln steril	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Pipetten serologisch 25 ml 25er Pack	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Pipetten serologisch 25 ml einzeln steril	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Pipetten serologisch 5 ml 25er Pack	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Pipetten serologisch 5 ml einzeln steril	Greiner, Kremsmünster, Österreich

Pipetten serologisch 50 ml einzeln steril	Greiner, Kremsmünster , Österreich
Pipettenspitze blau (1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze gelb (100 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze weiß (10 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Platte aus Polystyrol 96 Wells, Farbe weiß, Boden weiß, nicht steril	Greiner, Kremsmünster , Österreich
Sarogold 300 mm x 300 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Supported Nitrocellulose Membrane	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
Reagiergefäße 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber, klein 16 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber, normal 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

2.1.3. Reagenzien, Chemikalien und Lösungen

Terminus	Herkunft
2-Propanol (Isopropanol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
BSA	Serva, Heidelberg, Deutschland
BV-6	Selleckchem, Houston, USA
Destilliertes Wasser	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
DPBS, w/o: Ca and Mg	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Ethanol 70%	Fischar Otto GmbH & Co. KG, Deutschland
Ethanol 96%	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethanol >99,8%	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Gelatin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
GSK'872	Selleckchem, Houston, USA
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massechusetts, USA
HCL	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Milchpulver (Blotting Grade, pulv., fettarm)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid $\geq 99,5$ %, p.a., ACS, ISO	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massechusetts, USA
NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massechusetts, USA
NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massechusetts, USA
pH Puffer 4,0; 7,0; 9,2	Mettler Toledo, Ohio, USA
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massechusetts, USA
Quick Start Bovine Serum Albumin Standard	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massechusetts, USA
RIPA Lysis and Extraction Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massechusetts, USA
SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
TNF Alpha recombinant human	PeproTech, Rocky Hill, USA
Tris BASE >99% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Unimatic-D Röntgenentwickler für Tischmaschinen	Calbe Chemie, Calbe, Deutschland
Unimatic-F Röntgenfixierer für Tischmaschinen	Calbe Chemie, Calbe, Deutschland
Z-VAD-FMK (Caspase-inhibitor)	Selleckchem, Houston, USA

Tabelle 5: Reagenzien, Chemikalien und Lösungen

2.1.4. Zellen, Zellkulturmedien und weitere Substanzen

Terminus	Herkunft
DPBS	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Endothelial Cell Growth Medium 2 SupplementMix (EGM-2)	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Endothelial Cell Basal Medium 2	Promocell, Heidelberg, Deutschland
FCS	Biowest, Nuaille, Frankreich
Gentamicin sulfate-Amphotericin (GA-1000)	Lonza, Basel, Schweiz
hPAEC (human pulmonary artery endothelial cells)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
hPASCs (human pulmonary artery smooth muscle cells)	Lonza, Basel, Schweiz
Medium 199 Earles Salts	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Trypsin/EDTA (10x)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
SmGMTM- 2 Smooth Muscle Cell Growth Medium -2 BulletKit	Lonza, Basel, Schweiz
SmBM- 2 Smooth Muscle Cell Basal Medium -2	Lonza, Basel, Schweiz

Tabelle 6: Zellen, Zellkulturmedien und weitere Substanzen

2.1.5. Antikörper und siRNA

Terminus	Herkunft
AK-Mouse Ig-G whole Ab (from sheep)	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
AK-Rabbit Ig-G whole Ab (from donkey)	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
Caspase-3 Antibody (Rabbit)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Caspase-8 (1C12) Mouse mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Caspase 3 Cleaved (Asp 175)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Cleaved Caspase 8 Antibody (Rabbit)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Cyclin B1 Antibody (Rabbit)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Cyclin D1 Antibody (Mouse)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
DAP Kinase (Clone 17)	BD, Franklin Lakes, USA
FADD Antibody (Human Specific)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MLKL (D2I6N) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
p-53 Antibody (Mouse)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Pan-Actin Antibody	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Phospho-MLKL (Ser358) (D6H3V) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Phospho-RIP (Ser166) (D1L3S) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Phospho-RIPK 3 Antibody (Rabbit)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA

Purified Mouse Anti-Human DAP Kinase	BD, Franklin Lakes USA
siRNA DAPK	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
siRNA MLKL	Qiagen, Hilden, Deutschland
siRNA RIPK 1	Qiagen, Hilden, Deutschland
siRNA RIPK 3	Qiagen, Hilden, Deutschland
siRNA scr.	Qiagen, Hilden, Deutschland
siRNA scr.	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Monoklonaler Anti-Vinculin-Antikörper (Maus)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
RIP (D94C12) XP® Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
RIP3 (E1Z1D) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA

Tabelle 7: Antikörper und siRNAs

2.1.6. Primer

Primer	Sequenz	Reaktivität
MLKL Forward	GCA CCT GAA CTC CAC GGA AA	Mensch
MLKL Reverse	AAT CCT GCA AGC TTC ACT TGG	Mensch
RIPK1 Forward	AGA GTG CAG AAC TGG ACA GC	Mensch
RIPK1 Reverse	GGG CCC CTT GTA CAC TGT TT	Mensch
RIPK3 Forward	CAG TGT GCA ACA GGC AGA AC	Mensch
RIPK3 Reverse	TCA GTC CTT CTA AGC CGG GA	Mensch

Tabelle 8: Primer

2.1.7. Kits

Terminus	Herkunft
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Madison, USA
DC™ Protein Assay Kit II	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA

Tabelle 9: Kits

2.2. Methoden

2.2.1. Tierexperimente

Die Durchführung dieses Tierexperimentes sowie die Gewinnung der für diese Arbeit verwendeten Lungenlysate erfolgte bereits 2018 durch Carina Lepper im Rahmen eines anderen Forschungsprojektes. Im Vorfeld der Experimente wurden die Versuche vom Regierungspräsidium Gießen unter dem Aktenzeichen GI 20/10 Nr. G 82/2018 genehmigt.

Sugen-Hypoxie-Rattenmodell

Das Sugén-Hypoxie-Rattenmodell (SuHx) ist ein etabliertes Modell zur Simulation einer PAH bei Ratten.

Dabei werden die Versuchstiere der Interventionsgruppe über drei Wochen normobarer Hypoxie, bei einem Sauerstoffgehalt von 10%, ausgesetzt und bekommen anfangs einmalig Sugén 5416 subkutan injiziert. Nach Ende der drei Wochen unter hypoxischen Bedingungen werden die Ratten weiterhin bei Normoxie gehalten. Anders als beim reinen Hypoxie-Modell entsteht aufgrund der Hemmung des VEGF-Rezeptors durch Sugén 5416 nicht nur eine Mediaverdickung der Pulmonalarterien aufgrund vermehrter Proliferation der glatten Muskelzellen sondern auch die als plexiforme Läsion bezeichnete Endothelzellproliferation. Die so induzierten Veränderungen sind auch durch die zwei-wöchige Normoxie-Phase nicht reversibel. Es kommt zur vollen Ausprägung des klassischen Bildes einer PAH, wie sie auch bei betroffenen Patienten zu beobachten ist. Daher stellt das SuHx-Rattenmodell ein sehr zuverlässiges Tiermodell, auch für die Erforschung von Behandlungsmöglichkeiten der PAH bei Menschen dar. [3]

Isolierung der RNA aus Lungengewebe der SuHx-Ratten

Die RNA-Isolation wurde ebenfalls 2018 bereits von Carina Lepper nach einem hausinternen Protokoll vorgenommen.

Die Lungen wurden entnommen, in eisgekühltes PBS gegeben und zwei Mal in PBS gewaschen. Nach Entfernen des restlichen PBS wurden die Lungen in 1 ml Trizol mittels Ultra Turrax Homogenisierer homogenisiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Material für 10 Minuten mit 12.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Probe erneut

5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt, die Mischung 15 Sekunden kräftig geschüttelt, bei Raumtemperatur ca. 2 Minuten inkubiert und für 15 Minuten bei 4 °C mit 12.000 rpm zentrifugiert. Die 550 µl der wässrigen Phase, in denen die RNA enthalten war, wurden in ein neues Eppendorfggefäß überführt, nach Hinzufügen von 500 µl Isopropanol 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin 10 Minuten bei 4 °C mit 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend entfernt, der Rückstand in 1 ml 75-prozentigem Ethanol gewaschen und 5 Minuten bei 4 °C mit 7.500 rpm zentrifugiert. Nun wurde der Überstand ein weiteres Mal entfernt, der Rückstand für ca. 10 Minuten luftgetrocknet und die gewonnene RNA schließlich in RNase-freiem Wasser aufgelöst.

cDNA-Synthese und Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur gezielten Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnitts mit zumindest teilweise bekannter Sequenz, dies ermöglicht die weitere Verwendung der vervielfältigten DNA zu Analysezwecken. Für dieses Verfahren werden neben der DNA zwei DNA-Primer benötigt, die am 5'-Ende der Zielsequenz an einem der DNA-Stränge binden können, diese Primer werden als Forward- und Reverse-Primer bezeichnet. Zusätzlich werden eine Mischung aus einzelnen Nukleosidtriphosphaten und eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) benötigt. Die PCR wird in einer Abfolge von temperaturgesteuerten Schritten durchgeführt, die zusammen einen Amplifikationszyklus bilden. Dieser Zyklus kann so oft wiederholt werden, bis die gewünschte Menge an DNA synthetisiert wurde.

Die Reverse-Transkriptase-PCR ist eine Methode, bei der RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt wird. Das Prinzip ähnelt der PCR, jedoch wird anstelle der herkömmlichen Taq-Polymerase eine reverse Transkriptase verwendet und statt der herkömmlichen DNA-Primer kommen entweder Oligo-dT-Primer oder Random-Hexamer-Primer zum Einsatz.

In dieser Studie wurde die PCR eingesetzt, um die Expression von Nekroptose-spezifischen Proteinen in den Lungen von Ratten im Sugen-Hypoxie-Modell zu untersuchen, dabei wurden RIPK1, RIPK3 und MLKL betrachtet. Für diesen Teil der Experimente wurde die cDNA verwendet, die im Jahr 2018 im Rahmen eines anderen Projektes von David Dippel aus der RNA der Rattenlungen amplifiziert wurde. Die Menge der amplifizierten DNA-Abschnitte während der PCR, die das gesuchte Gen enthalten, korreliert annähernd proportional zur Expression des jeweiligen Gens innerhalb der Ursprungszellen.

Synthese der cDNA

Die Synthese der cDNA wurde gemäß einem hausinternen Protokoll durchgeführt.

Zuerst erfolgte die Normalisierung der RNA-Proben. Nach Bestimmung der Konzentration der einzelnen Proben am Spektrophotometer wurde die niedrigste Konzentration als Referenz festgelegt und 14 µl dieser Probe in ein Eppendorfgefäß gefüllt. Die restlichen Proben wurden ebenfalls auf 14 µl mit RNase-freiem Wasser normalisiert, um die Konzentration aller Proben der zuvor ermittelten Referenz anzugleichen, anschließend wurde der Mastermix 1 aus jeder der Proben individuell angesetzt.

Reagenz	Menge	Firma
dNTP (10 mM)	2 µl	Thermo Fisher
Random Hexamer Primer (100 µM)	4 µl	Thermo Fisher
Probe (RNA)	14 µl	-

Tabelle 10: Mastermix 1

Dieser Mastermix 1 wurde erst 5 Minuten bei 70°C, dann eine Minute auf Eis inkubiert und im Anschluss abzentrifugiert. Nun wurden zum Mastermix 1 folgende Reagenzien hinzugefügt um den Mastermix 2 zu erhalten.

Reagenz	Menge	Firma
5x First Strand Buffer	8 µl	Thermo Fisher
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)	2 µl	Thermo Fisher
RNase-freies Wasser	10 µl	GE Healthcare

Tabelle 11: Mastermix 2

Der Mastermix 2 wurde zunächst für eine Minute bei Raumtemperatur und 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren 10 Minuten Inkubationszeit bei 80 °C wurden die Proben abzentrifugiert, auf Eis gestellt und schließlich bei -80 °C eingefroren.

Polymerase-Kettenreaktion

Zur Vorbereitung der PCR wurden die zuvor bei -80 °C gelagerten c-DNA-Proben auf Eis aufgetaut. Um die Temperaturanfälligkeit dieser Proben zu berücksichtigen, wurden alle für die PCR benötigten Reagenzien sowie die PCR-Platte (96-well Multiplate PCR Plate) im Vorfeld auf Eis gekühlt. Des Weiteren wurde für jede der zu untersuchenden Gene ein Eppendorfgefäß auf Eis gestellt und beschriftet. Auch die Herstellung des PCR-Mix sowie der Transport der Proben und Reagenzien erfolgten auf Eis, um eine kontinuierliche Kühlung zu gewährleisten.

Aus jeder cDNA-Probe wurde der entsprechende PCR-Mix individuell hergestellt. Die genaue Zusammensetzung ist Tabelle 12 zu entnehmen.

Reagenz	Menge	Firma
SYBR Green Supermix	5 µl	Bio-Rad Laboratories
RNAse-freies Wasser	3,5 µl	GE Healthcare
Primer Forward (10 µM)	0,25 µl	-
Primer Backward (10 µM)	0,25 µl	-
cDNA-Probe	1 µl	-

Tabelle 12: PCR-Mix

Die Reagenzien für den PCR-Mix wurden in das jeweilige Eppendorfgefäß gegeben und sorgfältig gemischt und anschließend gemäß Abbildung 2 in die PCR-Platten übertragen. Dabei wurde jeweils für zwei der zu untersuchenden Gene eine Platte verwendet. Neben den zu untersuchenden Genabschnitten für RIPK1, RIPK3 und MLKL wurde auch der Genabschnitt für HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) zu Kontrollzwecken amplifiziert.

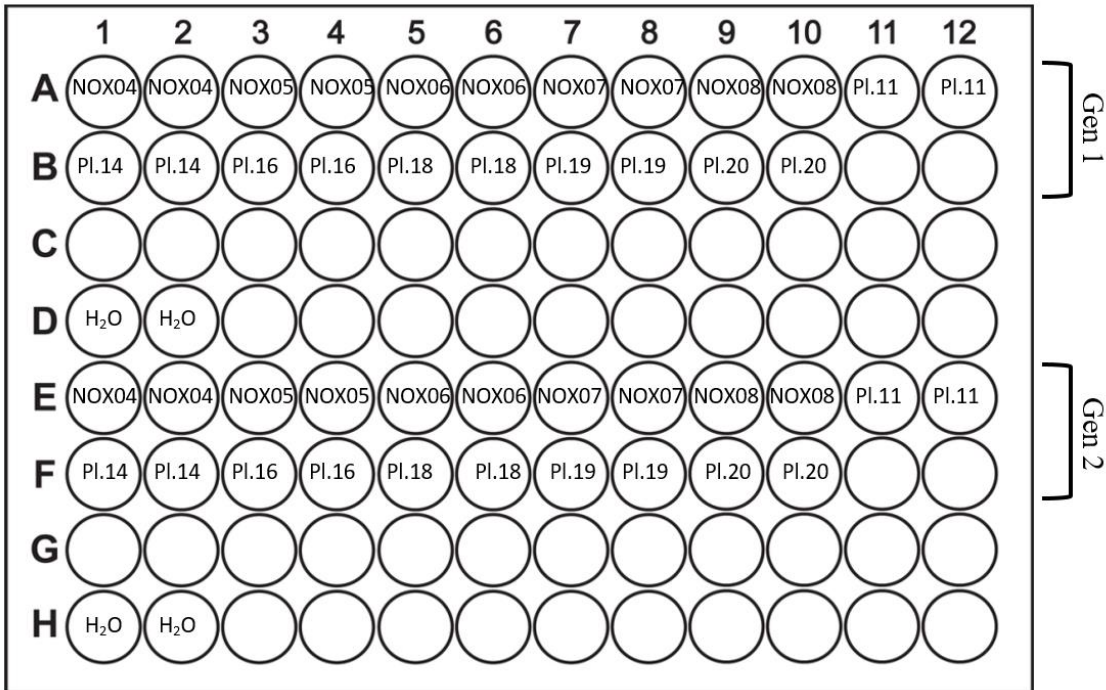


Abbildung 2: Anordnung der Proben für die PCR. Die Proben von Ratten, welche im SuHx-Modell der Normoxie-Gruppe (Kontrolle) angehört hatten, sind durch die Abkürzung NOX und die Nummer des Versuchstiers dargestellt. Die Proben von Ratten, welche im SuHx-Modell der mit Sugen und Hypoxie behandelten Gruppe angehört hatten, sind durch die Abkürzung Pl. und die Nummer des Versuchstiers dargestellt.

Zuerst wurde je 1 µl des cDNA-Gemischs oder des RNase-freien Wassers in die jeweiligen Wells pipettiert. Für eine erhöhte Genauigkeit wurden hierfür eine 2,5 µl-Pipette und oberflächenoptimierte 10µl-Pipettenspitzen verwendet. Nach kurzer Zentrifugation (ca. 10 Sekunden) mit 6000 rpm bei Raumtemperatur wurden 9 µl des vorbereiteten PCR-Mixes zum jeweiligen Well hinzugefügt und erneut wie zuvor zentrifugiert. Die 96-Well-Platte wurde anschließend versiegelt und die PCR am vollautomatischen PCR-Gerät CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System gemäß des in Tabelle 13 dargestellten Schemas gestartet. Dabei wurden 40 Zyklen aus Anlagerung der Primer und Elongation durchlaufen.

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturierung	95 °C	5 min	1
Primer Anlagerung und Elongation	95 °C	10 s	40
	59 °C	30 s	
	72 °C	30 s	
Schmelzkurve	95 °C	30 s	1
	65 °C	31 s	
	+ 0,5°C bis zu einer Temperatur von 95 °C	50 s	

Tabelle 13: Ablauf der PCR

2.2.2. Zellkulturexperimente

Für die Zellkulturexperimente wurden etablierte Zellreihen von humanen pulmonalarteriellen Endothelzellen (hPAECs) der Firma PromoCell und von humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (hPASMs) der Firma Lonza verwendet.

Sämtliche Arbeiten an den Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank mit sterilen Utensilien und Reagenzien durchgeführt. Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte in einem Inkubator bei einer konstanten Temperatur von 37 °C, einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 % und einem Sauerstoffgehalt von 21 %. Reagenzien und Wachstumsmedien, die bei der Kultivierung der Zellen Anwendung fanden, wurden zuvor in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 37 °C erwärmt.

Auftauen und Kultivieren der humanen pulmonalarteriellen Endothelzellen

Zur Vorbereitung der Zellkultivierung wurde zunächst das Endothelial Cell Growth Medium 2 (EC GM2) von PromoCell verwendet. Hierfür wurden 0,5 Liter des Basalmediums 2 (BM2) mit der dazugehörigen Mischung von Wachstumsfaktoren des GM2 Supplement Mix versetzt, sodass sich folgende Endkonzentrationen im fertigen EC GM2 ergaben: fetales Kälberserum (0,02 ml/ml), humaner epidermale Wachstumsfaktor (5 ng/ml), humaner basaler Fibroblasten-Wachstumsfaktor (10 ng/ml), Insulin-like Growth Factor (20 ng/ml), humaner vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (0,5 ng/ml), Ascorbinsäure (1 µg/ml), Heparin (22,5 µg/ml) und Hydrocortison (0,2 µg/ml).

Um die Kultivierung der hPAECs durchzuführen, wurden die Phiolen, welche bei -120 °C in flüssigem Stickstoff kryokonserviert waren, vorsichtig in der Hand aufgetaut. Anschließend wurden sie unter sterilen Bedingungen auf einer 10 cm-Petrischale mit 9 ml des zuvor hergestellten Zellkulturmediums gemischt. Durch sanftes Schwenken der Petrischale wurde eine gleichmäßige Verteilung der hPAECs auf der Oberfläche gewährleistet. Danach wurden die Petrischalen zur weiteren Kultivierung in den Zellinkubator überführt.

Um ein optimales Wachstum der hPAECs zu gewährleisten, wurde das Zellkulturmedium etwa alle 3 Tage gewechselt. Dieser Prozess wurde zügig durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Zellen kontinuierlich mit ausreichenden Nährstoffen versorgt wurden.

Splitting und Einfrieren der humanen pulmonalarteriellen Endothelzellen

Um die hPAECs zu splitten, wurde die Petrischale mit der Zellkultur zuerst entleert und zügig mit etwa 1 ml Trypsin bei einer Temperatur von 37 °C gewaschen. Anschließend wurde die Petrischale mit 1 ml Trypsin im Zellinkubator für etwa 2 bis 3 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde unter dem Mikroskop überprüft, ob die Zellen sich gut ablösten. Sobald dies der Fall war, wurden die Zellkulturplatten mit Endothelial Cell Growth Medium 2 gewaschen und das Medium mit den Zellen in einen 50-ml Falcon-Röhrchen pipettiert und bei 1000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand, bestehend aus Trypsin und Endothelial Cell Growth Medium 2 (EC GM2), vorsichtig abgesaugt. Frisches EC GM2 wurde hinzugefügt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit den Zellen gründlich vermischt. Anschließend wurde die Zellzahl mithilfe einer Zählplatte unter dem Mikroskop bestimmt. Je nach Zellzahl wurde das Medium mit den Zellen gegebenenfalls mit demselben Medium verdünnt und nach gründlichem Mischen auf neue Zellkulturplatten oder Petrischalen übertragen. Die Zellen wurden durch Schwenken der Schale oder Platte gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt und dann zur weiteren Kultivierung in den Zellinkubator gestellt.

Um die Zellen einzufrieren, wurde zuerst das Freezing-Medium mit folgender Zusammensetzung vorbereitet: 70% Endothelial Cell Growth Medium 2, 20% FCS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid).

Die ersten Arbeitsschritte wurden entsprechend dem oben beschriebenen Splitting durchgeführt, einschließlich der Entfernung des Überstands nach der Zentrifugation. Anschließend wurde den Zellen 1 ml des zuvor hergestellten Freezing-Mediums zugegeben und vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Das Freezing-Medium mit den Zellen wurde dann in die zuvor beschriftete Phiolen überführt. Die Phiolen wurden für 24 bis 48 Stunden bei einer Temperatur von -80 °C eingefroren und anschließend bei einer Temperatur von -196 °C in flüssigem Stickstoff konserviert.

Auftauen, Einfrieren, Splitten und Kultivieren der humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen

Zur Kultivierung der humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen wurde das Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 (Sm GM2) vorbereitet. Hierzu wurde das Smooth Muscle Basal Medium der Firma Lonza mit Fetalem Kälberserum (25 ml), Insulin (0,5 ml), humanem Endotheliales Wachstumsfaktor (0,5 ml) und humanen Fibroblasten-

Wachstumsfaktor (1 ml) aus dem SmGM2 Supplement Pack von Lonza versetzt. Das enthaltene Gentamycin/Amphotericin B (GA-1000) aus dem Supplement Pack wurde hierbei nicht verwendet.

Das Auftauen, Einfrieren, Splitten und Kultivieren der glatten Muskelzellen erfolgte analog zum oben beschriebenen Umgang mit den Endothelzellen. Dabei wurde jedoch das Sm GM2 in allen Arbeitsschritten anstelle des EC GM2 verwendet. Zudem erfolgte der Mediumwechsel während der Kultivierung aufgrund des schnelleren Wachstums der glatten Muskelzellen etwa alle 2 Tage.

Transfektion von siRNA

Die siRNA (small interfering RNA) ist eine kurze doppelsträngige RNA mit einer Länge von 20 bis 25 Basenpaaren, die spezifisch an einen ausgewählten Abschnitt der mRNA bindet. Dies führt zur vorübergehenden Blockierung dieses mRNA-Abschnitts und somit zur temporären oder auch dauerhaften Abschaltung der Translation des entsprechenden Proteins. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Genabschnitte der Proteine DAPK1, MLKL, RIPK1 und RIPK3 ausgewählt. RIPK1, RIPK3 und MLKL sind Bestandteile des Nekrosoms und nehmen daher eine wichtige Rolle bei der Nekroptose ein. DAPK1 ist ein Protein, das durch frühere Studien als Initiator der Apoptose in humanen pulmonalarteriellen Endothelzellen und glatten Muskelzellen identifiziert wurde. Im Vergleich zu gesunden Lungen ist es bei PAH (pulmonale arterielle Hypertonie) reduziert vorhanden [93].

Durch den Einsatz von siRNA wurde ein sogenanntes Knockdown-Experiment durchgeführt, bei dem die Auswirkungen des Fehlens der jeweiligen blockierten Proteinsynthese im Vergleich zur Anwesenheit des Proteins auf die Zellvitalität und die Anfälligkeit der Zellen für Apoptose und Nekroptose untersucht werden konnten. Zur Vorbereitung wurden zwei Tage vor der Transfektion die Zellen von der Petrischale auf 6-Well-Platten gesplittet und die Platten beschriftet. Pro Well wurden 140.000 bzw. 180.000 Zellen und 2 ml des vorbereiteten GM (Endothelial Cell Growth Medium 2 oder Smooth Muscle Growth Medium 2, siehe oben) verwendet. Am Abend vor der Transfektion wurde das Medium in den Wells abgesaugt und durch serumfreies Medium ersetzt. Hierbei wurde das jeweilige Basalmedium, je nach Zellart das Endothelial Cell Basal Medium oder das Smooth Muscle Cell Basal Medium, verwendet. Analog zur Transfektion der Ziel-siRNA erfolgte die Transfektion einer Kontroll-siRNA.

Für die Transfektion der siRNA für DAPK wurden das EC GM2 und das Opti-MEM I Reduced Serum Medium im Wasserbad auf ca. 37°C und Lipofectamin RNAimax auf Raumtemperatur aufgewärmt. Die siRNA wurde auf Eis aufgetaut. Danach wurden pro Well 2 Eppendorfgefäße vorbereitet, im ersten Eppendorfgefäß wurden 203 µl 0,15 µM siRNA in Opti-MEM und im zweiten Eppendorfgefäß 203 µl 1,5 %iges Lipofectamin in Opti-MEM angesetzt.

Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Inhalt beider Eppendorfgefäße zusammengefügt und gründlich durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Während dieser Inkubationszeit wurde das Medium in den Wells gewechselt. Statt 2 ml GM2 wurde nun 1,5 ml des frischen GM2 in jedes Well gegeben. Nach erneuter 20-minütiger Inkubation wurde die vorbereitete siRNA tropfenweise zu den entsprechenden Wells gegeben und durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die Wells bei 37 °C im Zellinkubator für 24 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnte die Proteinisolation durchgeführt werden.

Für die Transfektion der siRNA für MLKL, RIPK1 und RIPK3 wurde das Protokoll leicht angepasst, um einen erfolgreichen Knockdown zu gewährleisten. Pro Well wurden 5 µl der 20 µM siRNA und entsprechend 5 µl Lipofectamin verwendet. Die Transfektion fand in den Wells mit Basalmedium statt. Sechs Stunden nach Zugabe der siRNA zu den Wells wurde das Basalmedium abgesaugt und durch Wachstumsmedium ersetzt. Die Proteinisolation erfolgte 48 h nach der Transfektion. Neben der siRNA-Transfektion auf den 6-Well-Platten für die spätere Proteinisolation wurde auch eine Transfektion aller beschriebenen siRNAs nach dem oben genannten Protokoll auf 96-Well-Platten durchgeführt. Diese Platten wurden später zur Messung der Zellviabilität mittels CellTiter Glo verwendet. Für die Transfektion auf den 96-Well-Platten wurden die gleichen Konzentrationen von siRNA, Opti-MEM und Lipofectamin wie im oben genannten Protokoll verwendet. Die Mengen wurden entsprechend auf 3 x 100 µl pro Kondition angepasst, da jeweils 3 Wells pro Kondition vorhanden waren.

Medikamentöse Induktion von Nekroptose durch Behandlung der Zellkulturen mit verschiedenen Wirkstoff-Kombinationen

Durch vorangegangene Studien zum Thema Nekroptose ist bekannt, dass die Nekroptose als alternativer regulierter Zelltod ablaufen kann, wenn die Apoptose, zum Beispiel durch Inhibierung der Caspasenkaskade, gehemmt ist. Die Initiierung der

Nekroptose kann dann durch verschiedene Stimuli, wie in etwa die Aktivierung des TNF- α -Rezeptors (TNFR) oder des Toll-Like-Rezeptors (TLR) ausgelöst werden.

Ziel dieses Experimentes war es, Nekroptose in den hPAECs auszulösen, indem mithilfe verschiedener Wirkstoffe gleichzeitig die Apoptose inhibiert und dann bei inhibiertem Apoptose-Signalweg die Nekroptose initiiert wird. Die Inhibierung der Apoptose erfolgte mithilfe von Z-VAD-FMK (Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketone), einem membrangängigen, irreversiblen Pan-Caspase-Inhibitor. Zur Initiierung der Nekroptose wurden TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) und BV-6 ausgewählt. TNF- α aktiviert über den TNFR1 die RIPK1, die wiederum RIPK3 phosphoryliert und mit RIPK3 und MLKL das Nekroptosom bildet, wobei MLKL phosphoryliert wird und infolge dessen polymerisiert. Durch die Translokation der MLKL-Polymere zur Zellmembran werden Poren gebildet, was zu einer Störung der Zellmembranintegrität, Zellschwellung und Freisetzung von DAMPs (damage-associated molecular patterns) in die extrazelluläre Umgebung führt. Diese RIPK1-abhängige Nekroptose kann auch in Anwesenheit von Caspase-Inhibitoren wie Z-VAD-FMK, durch BV6, einem cIAP- (Cellular Inhibitor of Apoptosis) und xIAP- (x-linked Inhibitor of Apoptosis) Inhibitor oder TNF- α , klassisch über die Aktivierung des TNF- α -Rezeptors, ausgelöst werden [89, 15, 109, 115].

Da einige der oben genannten Wirkstoffe in DMSO gelöst waren, wurde zusätzlich zur Negativkontrolle eine Kontroll-Kondition mit DMSO in die Experimente integriert. Vor den eigentlichen Experimenten wurden mehrere Versuche mit verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe durchgeführt, um diejenige Konzentration zu ermitteln, bei der eine nachweisbare Wirkung auftritt. Diese Erkenntnisse wurden dann auf die nachfolgenden Experimente übertragen. Der hier beschriebene Versuchsaufbau repräsentiert die endgültige Version dieser Experimente.

Tag 1

Am Morgen wurden die hPAECs auf eine 96-Well-Zellkulturplatte mit einer Dichte von ca. 5.500 bis 6.000 Zellen pro Well gesplittet. Je nach verfügbarem Zellmaterial, wurden drei bis vier Wells pro Kondition vorbereitet. Nach dem Splitten der Zellen wurde die 96-Well-Platte bis zum Abend im Zellinkubator kultiviert, um eine adäquate Anhaftung der Zellen zu gewährleisten und am Abend das zuvor verwendete EC GM2 abgesaugt und durch serumfreies Basalmedium ersetzt. Dieser Schritt diente dazu, den Zellen Nährstoffe zu entziehen und die spätere Aufnahme der Wirkstoffe zu verbessern. Durch den Einsatz von serumfreiem Basalmedium wurde des Weiteren sichergestellt, dass die Zellen keinen externen Einflüssen von Serumkomponenten unterliegen, welche die Wirkung der später eingesetzten Wirkstoffe beeinflussen könnten.

Tag 2

Die Durchführung des eigentlichen Experimentes erfolgte etwa 24 Stunden nach dem Splitten der Zellen. Zur Vorbereitung hierfür wurde das Endothelial Cell Basal Medium auf 37°C im warmen Wasserbad aufgewärmt und die bei -80°C gelagerten Wirkstoffe Z-VAD-FMK, BV-6, und TNF- α auf Eis aufgetaut. Bei der Handhabung dieser Wirkstoffe wurde deren Lichtempfindlichkeit berücksichtigt um mögliche Degradation zu vermeiden. Pro Kondition wurde jeweils ein Eppendorfgefäß mit Basalmedium und den jeweiligen Wirkstoffen vorbereitet und beschriftet. Zusammensetzung und Konzentration sind der folgenden Listen zu entnehmen.

Konditionen:

1. Negativkontrolle: 1ml Basal Medium
2. 2 μ l DMSO in 1ml Basal Medium
3. 0,5 μ M Z-VAD-FMK in 1ml Basal Medium
4. 1 μ M Z-VAD-FMK in 1 ml Basal Medium
5. 5 μ M Z-VAD-FMK in 1 ml Basal Medium
6. 10 μ M Z-VAD-FMK in 1 ml Basal Medium
7. 0,5 μ M BV-6 in 1ml Basal Medium
8. 1 μ M BV-6 in 1ml Basal Medium
9. 2 μ M BV-6 in 1ml Basal Medium
10. 15 ng TNF- α in 1 ml Basal Medium
11. 0,5 μ M Z-VAD-FMK und 1 μ M BV-6 in 1 ml Basal Medium
12. 1 μ M Z-VAD-FMK und 1 μ M BV-6 in 1 ml Basal Medium
13. 0,5 μ M Z-VAD-FMK und 15 ng TNF- α in 1 ml Basal Medium
14. 1 μ M Z-VAD-FMK und 15 ng TNF- α in 1 ml Basal Medium

Da die antiapoptotische Wirkung von Z-VAD-FMK schon vor dem Einsatz der anderen Stoffe vorhanden sein sollte, wurde Z-VAD-FMK 45 min vor den anderen Wirkstoffen hinzugefügt. Dafür wurden zusätzlich zwei bis drei Eppendorfgefäße mit je 1 μ M und 0,5 μ M Z-VAD-FMK in 1ml Basal Medium vorbereitet.

Zunächst wurde aus den Wells das Medium abgesaugt und in den Wells, die für die Konditionen mit Z-VAD-FMK bestimmt waren, durch jeweils 100 µl des Basalmediums mit Z-VAD-FMK ersetzt. Die restlichen Wells wurden mit Basalmedium ohne Z-VAD-FMK gefüllt. Anschließend wurde die 96-Well-Platte erneut für 45 min in den Zellinkubator gestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium aus allen Wells abgesaugt. Nun wurde aus den für die verschiedenen Konditionen vorbereiteten Eppendorfgeläße je 100 µl in die entsprechenden Wells pipettiert. Die 96-Well Platte wurden dann für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Um die Konzentrationen und Kombinationen der Wirkstoffe zu ermitteln, bei denen der gewünschte Effekt auftritt, wurden im Vorfeld zahlreiche weitere Kombinationen untersucht, zum Beispiel wurden 10 µM Z-VAD-FMK mit 0,5 µM BV-6, 5 ng TNF-α oder 1,2 µM AT406 kombiniert.

Tag 3

Nach 24 Stunden Inkubation im Zellinkubator bei 36 °C wurde die Viabilität der Zellen mittels CellTiter Glo Assay gemessen.

Behandlung von hPAECs mit GSK-872

GSK-872 ist, wie oben bereits erwähnt, ein selektiver RIPK-3-Inhibitor, der allerdings in vorangegangenen Studien bei mehreren Zellreihen eine dosisabhängige pro-apoptische und damit zytotoxische Wirkung gezeigt hat. Ziel der folgenden Versuchsreihe war es, zu untersuchen, ob diese zytotoxische Wirkung auch bei hPAECs auftritt.

Tag 1

Am ersten Tag wurden die hPAECs auf eine 96-Well-Platte mit einer Dichte von ca. 5500 Zellen Pro Well gesplittet. Für jede der 11 Konditionen wurden Triplikate vorbereiten.

Tag 2

Am Abend des zweiten Tages wurde das Medium in den Wells abgesaugt, durch je 100 µl des auf 36 °C erwärmten EC Basal Medium 2 ersetzt und über Nacht inkubiert.

Tag 3

Im warmen Wasserbad wurde EC Basal Medium 2 und FCS auf 37°C erwärmt und unter der Sterilbank in 11 Eppendorfgeläßen die Verdünnungen für folgende Konditionen vorbereitet und beschriftet.

Konditionen:

1. 1 µl DMSO in 0,5 ml Basal Medium
2. 0,5 ml Basal Medium
3. 5 nM GSK-872 in 0,5 ml Basal Medium
4. 10 nM GSK-872 in 0,5 ml Basal Medium
5. 20 nM GSK-872 in 0,5 ml Basal Medium
6. 50 nM GSK-872 in 0,5 ml Basal Medium
7. 100 nM GSK-872 in 0,5 ml Basal Medium
8. 500 nM GSK-872 in 0,5 ml Basal Medium
9. 1 µM GSK-872 in 0,5 ml Basal Medium
10. 5 µM GSK-872 in 0,5 ml Basal Medium
11. 10 µM GSK-872 in 0,5 ml Basal Medium

Die 96-Well-Platte wurde für 90 Minuten bei einer Inkubationstemperatur von 36 °C im Zellinkubator belassen. Währenddessen wurde eine Mischung aus 500 µl FCS und 5 ml Basalmedium hergestellt, welche zur Herstellung neuer GSK-872-Verdünnungen für die Konditionen 1 bis 11 verwendet wurde. Dabei wurde in den Konditionen 2-11 anstelle des Basalmediums das frisch hergestellte FCS-Basalmedium-Gemisch verwendet, während Kondition 1 unverändert blieb. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und durch die entsprechenden Mischungen gemäß den jeweiligen Konditionen ersetzt. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation bei 36 °C im Zellinkubator über einen Zeitraum von 24 Stunden.

Tag 4

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellviabilität mittels CellTiter Glo Assay gemessen.

CellTiter Glo Assay

Die Messung der Zellviabilität mittels CellTiter Glo Assay wurde gemäß des Protokolls des Herstellers durchgeführt.

Aus dem bei -20 °C gelagerten Kit wurde je eine Flasche des CellTiter Glo Puffers und des CellTiter Glo Substrates entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Auch die 96-Well-Platte wurde aus dem Zellinkubator entnommen und bei Raumtemperatur für ca. eine halbe Stunde belassen. Anschließend wurden 10 ml des Puffers dem Substrat hinzugefügt und durch behutsames Schwenken im Puffer gelöst, um den CellTiter Glo Reagent anzumischen. Pro Well wurden 100 µl des Reagents zum sich dort befindenden Medium hinzugegeben und für zwei Minuten auf dem Orbitalschüttler gemischt, um eine effektive Zellyse zu gewährleisten. Die 96-Well-Platte wurde nun bei Raumtemperatur für 10 Minuten zur Stabilisierung des Lumineszenz-Signals inkubiert. Anschließend wurden 180 µl des Inhalts der Wells von der transparenten 96-Well-Platte auf eine weiße 96-Well-Platte übertragen und die Lumineszenz mithilfe des Mikroplatten-Lesegerätes Infinite M200 von Tecan bestimmt.

2.2.3. Proteinisolation und Western Blot

Unter dem Begriff Western Blot versteht man eine Nachweismethode für Proteine, die zum Beispiel zuvor aus Zellen oder Gewebe isoliert wurden. Dazu wird zunächst das isolierte Proteingemisch durch eine Gelelektrophorese nach Molekülgröße aufgetrennt und anschließend beim Blotting-Verfahren auf eine Trägermembran übertragen. Nun kann durch Zugabe eines proteinspezifischen Primärantikörpers das jeweilige Zielprotein gebunden und die Bande auf der Trägermembran durch fluoreszierende Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden, welcher am Primärantikörper bindet und durch seine fluoreszierende Eigenschaft eine spezifische Bande auf dem Röntgenfilm hinterlässt.

Für diese Arbeit wurden je nach Experiment DAPK1, die pronekroptotischen bzw. proapoptotischen Proteine RIPK1, RIPK3 und MLKL jeweils in ihrer phosphorylierten und nicht phosphorylierten Form, FADD, Caspase 8 und Caspase 3, in ihrer gespaltenen und nicht gespaltenen Form, p53 und die Zellzyklusmarker Cyclin B1 und Cyclin D1 nachgewiesen. Anhand dieser Nachweise konnte beurteilt werden, in welchem Ausmaß Nekroptose bzw. Apoptose in den betrachteten Zellkulturen stattfanden.

Proteinisolation

Zur Vorbereitung der Proteinisolation wurden zunächst Eppendorfggefäße, der RIPA-Buffer und das Protein Inhibitor Cocktail x100 (PIC) auf Eis gestellt. In das erste Eppendorfggefäß wurden nun PIC mit dem RIPA-Puffer im Verhältnis 1:100 vermischt.

Das GM2 wurde von der Zellkulturplatte abgesaugt, diese anschließend mit DPBS ohne Ca und Mg gut gespült und das DPBS gut abgesaugt. Nun wurde der vorbereitete Lysepuffer, bestehend aus PIC und RIPA-Buffer auf die Zellkultur gegeben und die Zellen nach 30 Minuten Inkubationszeit auf Eis mithilfe eines Zellschabers vom Boden des Gefäßes abgelöst. Das Lysat wurde in die vorgekühlten Eppendorfggefäße überführt, 15 Minuten bei 4 °C mit 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand nach der Zentrifugation in neue vorgekühlte Eppendorfggefäße überführt.

Proteinquantifizierung und -normalisation

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Proben wurden insgesamt 4 Eppendorfggefäße für die Standards vorbereitet sowie ein Eppendorfggefäß für jede Proteinprobe. Die Gefäße wurden entsprechend beschriftet, dabei wurden für die Standards folgende Abkürzungen verwendet: S0 (0 µl), S1 (0,5 µl), S2 (1 µl) und S3 (2 µl). Bei der Befüllung der Eppendorfggefäße wurden der BSA-Standard mit einer Konzentration von 2 µg/ml von Bio-Rad und der RIPA-Puffer verwendet. Die genaue Zusammensetzung ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Standard /Probe	BSA (2mg/ml)	RNase-freies Wasser	Lysispuffer (RIPA)
S0 (0 µg/µl)	0 µl	5 µl	5 µl
S1 (0,5 µg/µl)	1,25 µl	3,75 µl	5 µl
S2 (1 µg/µl)	2,5 µl	2,5 µl	5 µl
S3 (2 µg/µl)	5 µl	0 µl	5 µl
Probe	0 µl	5 µl	0 µl

Tabelle 14: Zusammensetzung der Standards für die Proteinquantifizierung

Anschließend wurden zu jedem der Eppendorfgefäße 25 µl Reagent A und 200 µl Reagent B aus dem DC Protein Assay Kit gegeben und sorgfältig gemischt. Von jedem Gefäß wurden 200 µl in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert und die Platte wurde für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Protein-Konzentration der Proben wurde dann mithilfe fotometrischer Messungen am Mikroplatten-Lesegerätes Infinite M200 bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt.

Für die Proteinnormalisierung wurde die niedrigste Konzentration als Zielwert festgelegt und die Proben mit höheren Konzentrationen entsprechend mit Wasser verdünnt. Anschließend wurde zu den Proben das vierfachkonzentrierte Loading Dye in einem Verhältnis von 1:4 und der zehnfach konzentrierte Sample Reducing Agent im Verhältnis von 1:10 hinzugefügt. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Danach wurden die Proben über Nacht bei -80 °C eingefroren.

Gelelektrophorese

Für den Gelelektrophorese wurde das Fertigel NuPAGE Bis-Tris (4-12 %), der MOPS-Puffer (20x) und der Marker Precision Plus Protein Dual Color Standards verwendet. Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurde der MOPS-Puffer gemäß den Packungsangaben 20-fach mit destilliertem Wasser verdünnt und das Gel mit destilliertem Wasser gründlich gewaschen und in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Proben, der Marker und die Elektrophoresekammer wurden auf Eis gestellt und sowohl Gelhalter als auch Gelkammer mit MOPS-Puffer gefüllt. Nach Entfernen des Kamms wurden die Taschen mit einer 10 µl-Pipette durch Auf- und Abpipettieren gründlich gespült. Anschließend wurde die erste Tasche mit 6 µl Marker befüllt. Die restlichen Taschen wurden mit je einer der Proteinproben befüllt. Dabei wurde das verwendete Volumen der Proben in Abhängigkeit zu ihrer Proteinkonzentration gewählt, sodass jede Tasche mindestens 25 µg Protein enthielt. Um für den Immunassay ein adäquates Signal zu erhalten, wurden für einige Experimente ggf. Proteinmengen von bis zu 120 µg pro Tasche verwendet, da einige Proteine weniger gut detektierbar waren. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V gestartet. Nachdem die Lauffront ca. ein Drittel des Gels passiert hatte, wurde die Spannung auf 120 V erhöht und die Elektrophorese nach etwa 2 bis 3 Stunden gestoppt, sobald die Lauffront das Gel komplett durchlaufen hatte.

Western Blot

Zur Vorbereitung des Western Blots wurde zunächst der Blotting-Puffer mit folgender Zusammensetzung angesetzt: 12g Tris Base, 6 g Glycin und 400 ml Methanol, aufgefüllt auf 2 Liter mit doppelt destilliertem Wasser. Die Membran (Supported Nitrocellulose Membrane) und 4 Stücke Filterpapier (CHR Blotting Paper Sheets) wurden zu 9 mal 7,5 cm großen Rechtecken zurechtgeschnitten und anschließend gemeinsam mit den Schwämmen in Blot-Puffer gelegt. Das Blotting-Sandwich wurde nun zusammengebaut und in die zuvor gewaschene Gelkammer gegeben. Das Blotten erfolgte für 90 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt, wobei die Gelkammer auf Eis gestellt wurde, um eine hitzebedingte Denaturierung der Proteine zu vermeiden.

Immunassay

Für den Immunassay wurde TBST bestehend aus 48,8 g Tris Base, 160 g Natriumchlorid und Tween 20 0,1%, aufgefüllt auf 1 l mit destilliertem Wasser und die Blocking-Lösung (5 % Milchlösung) bestehend aus 5 g Milchpulver in 100 ml TBST angesetzt. Der Primärantikörper wurde entsprechend dem Data Sheet in 5 % BSA von Serva und der zum Primärantikörper passende Sekundärantikörper entsprechend dem Data-Sheet in 5 % Milchlösung verdünnt. In der Handhabung des Sekundärantikörpers wurde dessen Lichtempfindlichkeit berücksichtigt, so fanden z. B. braune statt der durchsichtigen Röhren beim Ansetzen der Antikörperverdünnung Anwendung. Die Membran wurde bei Raumtemperatur in der Blocking-Lösung für eine Stunde inkubiert, nach Entfernen der Blocking-Lösung mit der Antikörperlösung bedeckt und auf dem Schwenker über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Nach Abpipettieren der Antikörper-Lösung wurde die Membran 3 mal 5 Minuten in TBST gewaschen und danach die Sekundärantikörper-Lösung hinzugegeben und eine Stunde auf dem Schwenker bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut 6 mal 10 Minuten in TBST gewaschen.

Entwickeln der Röntgenfilme

Nach dem Waschen wurde die Membran auf Saranfolie platziert, mit der zuvor nach Herstellerangaben angesetzten Entwicklungslösung ECL Prime Western Blot Detection Kit bedeckt und 5 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde die Membran in eine Kassette gelegt und mit Saranfolie faltenfrei bedeckt. Im

Dunkelraum wurde der Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm) in der Kassette einige Sekunden bis Minuten belichtet und schließlich im Agfa CP1000 Röntgenfilm-Entwickler entwickelt.

Strippen der Membran

Um die Membran für weitere Immunassays vorzubereiten, war es erforderlich, die zuvor gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen. Hierfür wurde die Membran mit dem Restore Western Blot Stripping Buffer bedeckt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit TBST für 30 bis 60 Minuten unter Schwenken, um Rückstände zu entfernen. Danach wurde die Membran erneut mit der Blocking-Lösung (5 % Milch) behandelt und für 30 bis 60 Minuten unter Schwenken blockiert.

2.2.4. Statistische Auswertung

Die Auswertung der erhobenen Daten und Erstellung der Grafiken erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism 6.00. Dabei wurden die Werte als Mittelwerte mit Standardfehlern dargestellt. Um die beobachteten Unterschiede zweier Stichproben auf ihre statistische Signifikanz zu prüfen, wurde der t-Test angewendet, für den Vergleich mehrerer Stichproben mit einer Kontrollkondition wurde ANOVA angewendet, wobei jeweils ein Signifikanzniveau α von 0,05 festgelegt wurde. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollkondition wurden mit * gekennzeichnet, je nach Signifikanzniveau wurden bis zu drei * verwendet ($p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$). Wurde ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu einer anderen Kondition als der Kontrollkondition ermittelt, so wurde statt des * ein # verwendet ($p \leq 0,05 = \#$; $p \leq 0,01 = \#\#$; $p \leq 0,001 = \#\#\#$), die Referenz ist dann der Bildbeschreibung zu entnehmen. Bei Unterschieden mit einem p-Wert von über 0,05 wurden diese nicht als signifikant gewertet. Die Anzahl „n“ der Versuche ist ebenso in der Bildbeschreibung angegeben.

2. Ergebnisse

3.1. mRNA und Proteinexpression von Nekroptose-assoziierten Proteinen in SuHx-Rattenlungen

Um den Zusammenhang zwischen der Nekroptose und der Entstehung der PAH zu untersuchen, wurde mithilfe des SuHx-Tiermodells die PAH bei Ratten imitiert. Aus den Lungenhomogenaten dieser Versuchstiere wurden sowohl mRNA als auch Proteine isoliert, um dann die Veränderung der Expression von Schlüsselproteinen der Nekroptose auf RNA- und Proteinebene im Vergleich zur Kontrollgruppe (Normoxie) zu eruieren.

3.1.1. Expression von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf RNA-Ebene

Zur Untersuchung der Expression von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf RNA-Ebene kamen nach Synthese von cDNA PCR-Analysen mit HPRT als Kontrollgen zum Einsatz. Dabei konnte eine signifikante Erhöhung der Expression von RIPK1- und MLKL-mRNA in den Lungen der SuHx-Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Eine Erhöhung der Expression von RIPK3 auf RNA-Ebene war allerdings nicht nachweisbar (siehe Abb.3).

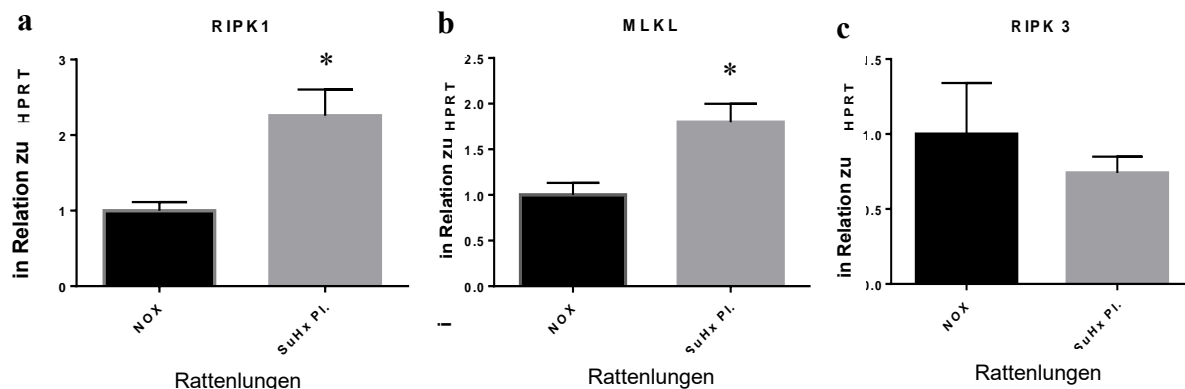


Abbildung 3: RIPK1, RIPK3 und MLKL-Expression auf RNA-Ebene im SuHx-Rattenmodell

a. relative mRNA-Expression von RIPK1 in Relation zu HPRT in Lungenlysaten von Ratten des SuHx-Modells im Vergleich zur Lungenlysaten von Ratten der gesunden Kontrollgruppe (n = 6)

b. relative mRNA-Expression von MLKL in Relation zu HPRT in Lungenlysaten von Ratten des SuHx-Modells im Vergleich zur Lungenlysaten von Ratten der gesunden Kontrollgruppe (n = 6)

c. relative mRNA-Expression von RIPK3 in Relation zu HPRT in Lungenlysaten von Ratten des SuHx-Modells im Vergleich zur Lungenlysaten von Ratten der gesunden Kontrollgruppe (n = 6)

Signifikante Unterschiede wurden im Vergleich zur Nox-Kondition wurden bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ mit * gekennzeichnet

3.1.2. Expression und Phosphorylierung bzw. Spaltung von RIPK3, MLKL und Caspase 8 auf Proteinebene

Zur Eruierung der Expression und Phosphorylierung von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf Proteinebene wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Mit derselben Methode wurde auch die Expression und Spaltung von Caspase 8 untersucht, um neben der Nekroptose- auch die Apoptose-Aktivität zu betrachten. Da RIPK1 mit der verwendeten Methodik nicht zu detektieren war, konnten keine Aussagen über die Expression oder Phosphorylierung von RIPK 1 getroffen werden. Die Daten zu RIPK3 und p-RIPK3 wurden bereits im Vorfeld von Carina Lepper erhoben.

In den SuHx-Lungenlysaten war eine erhöhte Expression von RIPK3 und MLKL auf Proteinebene erkennbar, die allerdings nur für RIPK3 eine Signifikanz aufwies. Auch die Phosphorylierung von RIPK3 war in den SuHx-Konditionen gesteigert, interessanterweise war dieser Effekt bei MLKL aber nicht zu beobachten (siehe Abb. 4 und Abb. 5).

Für Caspase 8 ließ sich kein Unterschied in der Proteinexpression zwischen beiden Gruppen feststellen, aber die Konzentration der gespaltenen und damit aktivierten Caspase 8 war in den SuHx-Lungen signifikant erniedrigt (siehe Abb. 5).

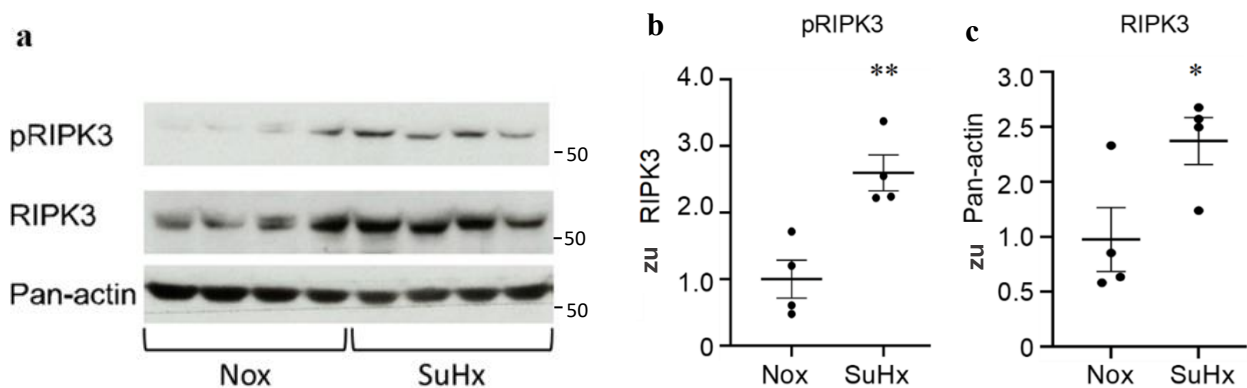


Abbildung 4: Expression auf Proteinebene und Phosphorylierung von RIPK3 im SuHx-Rattenmodell (Datenerhebung erfolgte 2019 durch Carina Lepper)

a. Westernblots für die Expression und Phosphorylierung von RIPK3 in Lungenlysaten von Ratten des SuHx-Modells im Vergleich zur Lungenlysaten von Ratten der Normoxie-Kondition (n = 4)

b. relative Phosphorylierung von RIPK3 in Relation zur RIPK3-Expression in Lungenlysaten von Ratten des SuHx-Modells im Vergleich zur Lungenlysaten von Ratten der gesunden Kontrollgruppe (n = 4)

c. relative Expression von RIPK3 in Relation zu Pan-actin in Lungenlysaten von Ratten des SuHx-Modells im Vergleich zur Lungenlysaten von Ratten der gesunden Kontrollgruppe (n = 4)

Signifikante Unterschiede wurden im Vergleich zur Nox-Kondition wurden je nach Signifikanzniveau wie folgt gekennzeichnet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$

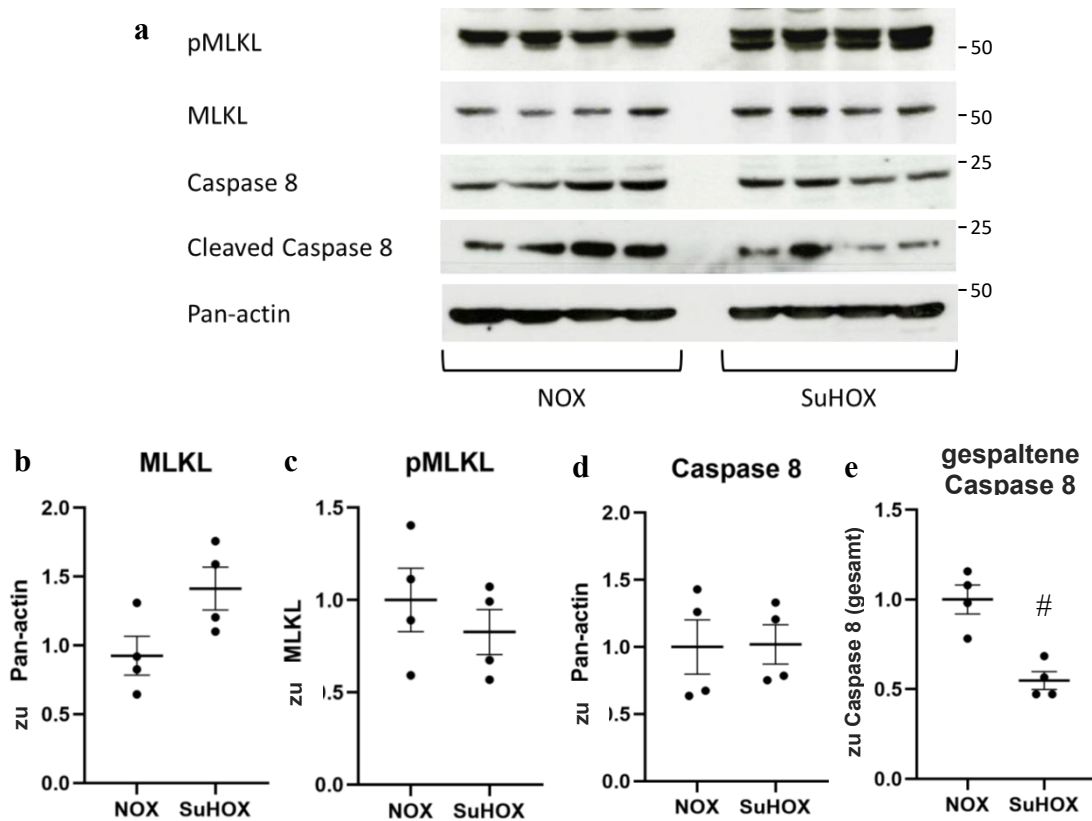


Abbildung 5: Expression auf Proteinebene und Phosphorylierung bzw. Spaltung von MLKL und Caspase 8 im SuHx-Rattenmodell

- a.** Westernblots für die Expression und Phosphorylierung bzw. Spaltung von MLKL und Caspase 8 in Lungenlysaten von Ratten des SuHx-Modells im Vergleich zur Lungenlysaten von Ratten der gesunden Kontrollgruppe ($n = 4$)
- b.** relative Expression von MLKL in Relation zu Pan-actin in Lungenlysaten von Ratten des SuHx-Modells im Vergleich zur Lungenlysaten von Ratten der gesunden Kontrollgruppe ($n = 4$)
- c.** relative Phosphorylierung von MLKL in Relation zur MLKL-Expression in Lungenlysaten von Ratten des SuHx-Modells im Vergleich zur Lungenlysaten von Ratten der gesunden Kontrollgruppe ($n = 4$)
- d.** relative Expression von Caspase 8 in Relation zu Pan-actin in Lungenlysaten von Ratten des SuHx-Modells im Vergleich zur Lungenlysaten von Ratten der gesunden Kontrollgruppe ($n = 4$)
- e.** relative Spaltung von Caspase 8 in Relation zur Caspase 8-Expression in Lungenlysaten von Ratten des SuHx-Modells im Vergleich zur Lungenlysaten von Ratten der gesunden Kontrollgruppe ($n = 4$), die Kennzeichnung # steht für ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Caspase ungespaltenen Caspase 8

3.2. Expression von und Phosphorylierung der Nekroptosemarker nach Knockdown von DAPK in hPAECs und hPASCs

In früheren Untersuchungen unserer Forschungsgruppe konnte sowohl in Tiermodellen für PAH, als auch in den Lungen von PAH-Patienten eine Runterregulation des proapoptotischen DAPK1 nachgewiesen werden. In Zellkulturexperimenten zeigte sich außerdem bei Silencing von DAPK1 eine Veränderung des Proliferationsverhaltens der hPASCs [93]. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der DAPK1-Expression und der Nekroptoseeignung von hPAECs und hPASCs zu eruieren, wurde in Zellkulturen (hPAECs und hPASCs) die Expression von DAPK1 via siRNA gehemmt und die Proteine aus den behandelten Zellkulturen isoliert. Anschließend wurde die Expression und Phosphorylierung ausgewählter Proteine des Nekroptosesignalweges mittels Westernblot untersucht. Betrachtet wurden hierbei die Expression von FADD auf Proteinebene und die Phosphorylierung von RIPK1, RIPK2 und MLKL. Vinculin diente hierbei als Ladekontrolle.

In den hPASCs zeigt sich trotz erfolgreichem Knockdown von DAPK1 bei keinem der untersuchten Proteine eine signifikante Veränderung der Expression oder Phosphorylierung, was anhand der in Abbildung 6a dargestellten repräsentativen Westernblots deutlich zu erkennen ist.

Bei den hPAECs hingegen war die Konzentration der aktiven Proteine pRIPK1, pRIPK3 und pMLKL im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöht. Am deutlichsten war dies bei pRIPK3 zu beobachten (siehe Abbildung 6 b - e). Die Konzentration von FADD war hingegen tendenziell vermindert, allerdings ist diese Veränderung bei einem p-Wert von $> 0,05$ als nicht signifikant zu bewerten (siehe Abbildung 6 f).

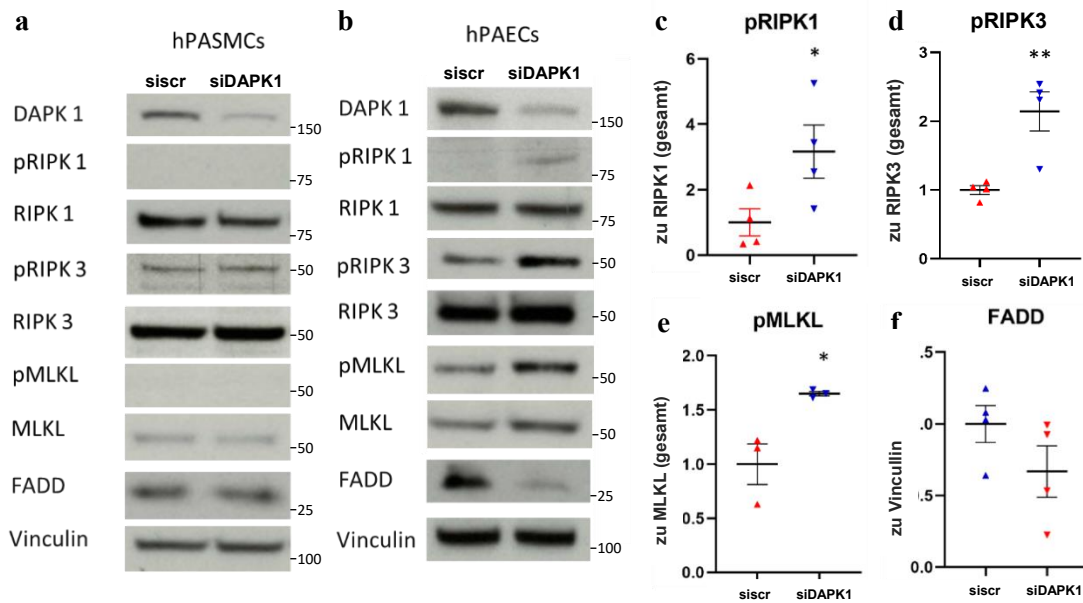


Abbildung 6: Expression von FADD auf Proteinebene und Phosphorylierung von RIPK1, RIPK2 und MLKL in hPASCs und hPAECs nach Knockdown von DAPK1

a. repräsentative Westernblots für die Expression von FADD auf Proteinebene und Phosphorylierung von RIPK1, RIPK2 und MLKL in hPASCs nach Knockdown von DAPK1 (n=2)

b. repräsentative Westernblots für die Expression von FADD auf Proteinebene und Phosphorylierung von RIPK1, RIPK2 und MLKL in hPAECs nach Knockdown von DAPK1 (n=3-4)

c. relative Phosphorylierung von RIPK1 in hPAECs in Relation zur si scr nach Knockdown von DAPK (n=4)

d. relative Phosphorylierung von RIPK3 in Relation zu si scr in hPAECs nach Knockdown von DAPK (n=4)

e. relative Phosphorylierung von MLKL in Relation zu si scr in hPAECs nach Knockdown von DAPK (n=3)

f. relative Expression von FADD in Relation zu si scr in hPAECs nach Knockdown von DAPK (n=4)

Signifikante Unterschiede wurden im Vergleich zur siScr-Kondition wurden je nach Signifikanzniveau wie folgt gekennzeichnet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$

3.3. Einfluss des Knockdowns von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf Zellzyklus, Apoptose und Zellviabilität

Um zu untersuchen, inwieweit die Abwesenheit von RIPK1, RIPK3 und MLKL die Zellviabilität und den Zellzyklus von hPAECs beeinflusst und die Apoptosebereitschaft der Zelle verändert, wurde in Zellkulturexperimente die Expression von RIPK1, RIPK3 oder MLKL via siRNA-Transfektion inhibiert und die Ergebnisse mittels Westernblot und dem Cellviability Assay CellTiter Glo analysiert.

3.3.1. Einfluss auf die Expression von DAPK1 und weiterer ausgewählter Proteine der Apoptose und des Zellzyklus

In diesem Teil der Versuchsreihe wurden hPAECs mit siRNAs behandelt, um einen Knockdown von RIPK1, RIPK3 bzw. MLKL zu initiieren. Anschließend wurde das aus diesen Zellkulturen isolierte Protein mittels Westernblots analysiert. Als Ladekontrolle wurde Vinculin verwendet. Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, bewirkte die verminderte Expression von RIPK1, RIPK3 und MLKL eine Akkumulation der proapoptotischen Proteine DAPK1 und p53 innerhalb der Zellen. Am deutlichsten ist dieser Effekt in beiden Fällen nach Knockdown von RIPK1 zu beobachten. Aufgrund erheblicher Unterschiede zwischen den Einzelwerten innerhalb der betrachteten Gruppen sind diese Ergebnisse für p53 allerdings nicht als signifikant, sondern eher als eine Tendenz zu werten. Für DAPK1 ergaben sich signifikante Unterschiede zur si scr-Kondition. Die Signifikanzniveaus sind Abbildung 7 zu entnehmen.

Während durch den Knockdown der oben genannten Nekroptosemarker die Konzentration von p53 und DAPK1 eher steigt, ist bei Zyklin D1 tendentiell eine Verminderung der Konzentration zu beobachten. Besonders deutlich ist diese Verminderung bei Knockdown von RIPK3 zu erkennen und dort auch signifikant mit $p \leq 0,05$.

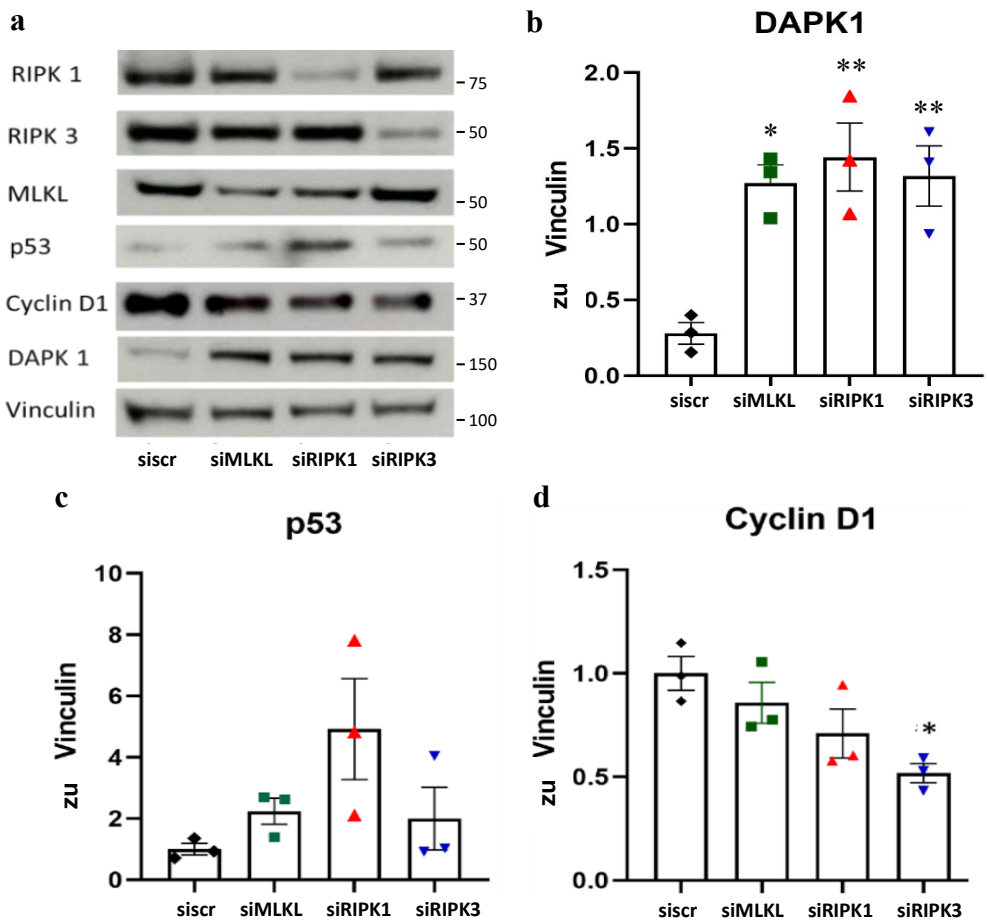


Abbildung 7: Einfluss des Knockdowns von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf die Expression von DAPK1, p53 und Cyclin D1

a. repräsentative Westernblots für die Expression von DAPK1, p53 und Cyclin D1 auf Proteinebene, jeweils nach Knockdown von RIPK1, RIPK3 oder MLKL (n = 3)

b. Expression von DAPK auf Proteinebene nach Knockdown des jeweiligen Nekroptosemarkers in Relation zu Vinculin (n = 3)

c. relative Expression von p53 nach Knockdown des jeweiligen Nekroptosemarkers im Vergleich zu si scr und in Relation zu Vinculin (n = 3)

d. relative Expression von Cyclin D1 nach Knockdown des jeweiligen Nekroptosemarkers im Vergleich zu si scr und in Relation zu Vinculin (n = 3)

Signifikante Unterschiede wurden im Vergleich zur siscr-Kondition wurden je nach Signifikanzniveau wie folgt gekennzeichnet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$

3.3.2. Einfluss des Knockdown von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf die Zellviabilität

Die Zellviabilität der hPAECs wurde nach Transfektion der jeweiligen siRNA mithilfe des CellViability Assay CellTiter gemessen. Wie anhand von Abbildung 8 erkennbar ist, war kein signifikanter Effekt des Knockdown von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf die Viabilität der hPAECs nachweisbar.

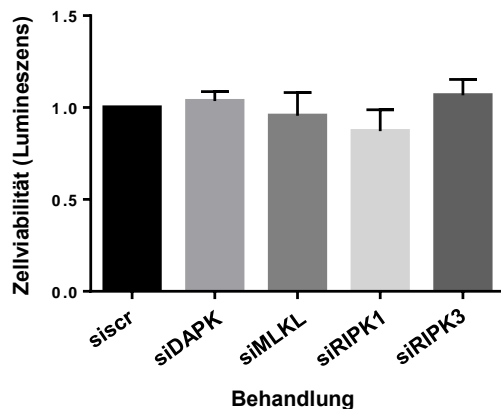


Abbildung 8: Einfluss des Knockdown von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf die Zellviabilität in Relation zu siScr ($n = 3$)

3.4. Medikamentöse Induktion der Nekroptose in hPAECs mithilfe von Kombinationen der Wirkstoffe ZVAD, BV-6 und TNF- α

Zur Entwicklung einer experimentellen Methode zur medikamentösen Induktion der Nekroptose in hPAECs, wurde in Zellkulturen mittels des Pan-Caspase-Inhibitors ZVAD-FMK zuerst die Caspasen-Kaskade inklusive Caspase 8 und infolgedessen die Apoptose gehemmt. Mit der Hemmung von Caspase 8 wird hierbei eine bedeutsame Voraussetzung für den Ablauf der Nekroptose erfüllt. Im Anschluss wurde der Zelltod jeweils entweder mittels TNF- α oder mithilfe des cIAP1/2(Cellular Inhibitor of Apoptosis 1/2)-Inhibitors BV-6 in den zuvor mit ZVAD behandelten Zellkulturen induziert. Somit sollte unter Inhibierung des Apoptosesignalweges und gleichzeitiger Induktion des Zelltodes durch Signale, die typischerweise die Apoptose der Zelle auslösen würden, die Nekroptose als alternativer regulierter Zelltod initiiert werden. Im Rahmen dieser Experimente wurde auch die isolierte Wirkung von ZVAD und BV-6 verschiedener Konzentration auf die hPAECs untersucht. Dies diente vor allem der Eruiierung geeigneter Konzentrationen für die Kombination beider Medikamente in späteren Experimenten

3.4.1. Die isolierte Wirkung von Z-VAD-FMK und von BV-6 in verschiedenen Konzentrationen auf hPAECs

In Zellkulturexperimenten wurden hPAECs mit jeweils 0,5 μM , 1 μM , 5 μM oder 10 μM Z-VAD-FMK behandelt. Für die Behandlung der Zellkulturen mit BV-6 wurden die Konzentrationen 0,5 μM , 1 μM und 2 μM verwendet. Da sowohl Z-VAD-FMK als auch BV-6 in DMSO gelöst ist, wurde zusätzlich zur Negativkontrolle mit reinem Basalmedium noch eine Negativkontrolle mit DMSO hinzugefügt, um die Ergebnisse dazu in Relation zu setzen. Die Eruiierung der Zellviabilität erfolgte im Anschluss mithilfe des CellViability Assay CellTiter Glo. Der genaue Ablauf dieser Experimente wurde bereits im Kapitel 2.2.1.5. erläutert.

Nach der Behandlung der Zellkulturen mit 0,5 μM und 1 μM Z-VAD-FMK war jeweils ein leichter Anstieg der Zellviabilität zu beobachten. Interessanterweise führte die Behandlung der hPAECs mit Z-VAD-FMK in den Konzentrationen 5 μM und 10 μM entgegen unserer anfänglichen Erwartungen zu einer deutlichen Abnahme der Zellviabilität, welche bei 5 μM eine Signifikanz zeigte. Diese Viabilitätsminderung war nach Behandlung mit 10 μM Z-VAD-FMK tendenziell noch stärker als bei 5 μM , was einen dosisabhängigen toxischen Effekt von Z-VAD-FMK auf die hPAECs vermuten lässt. Unter dem Einfluss von BV-6 war eine Abnahme der Zellviabilität zu beobachten, welche für die Konzentration von 2 μM signifikant war.

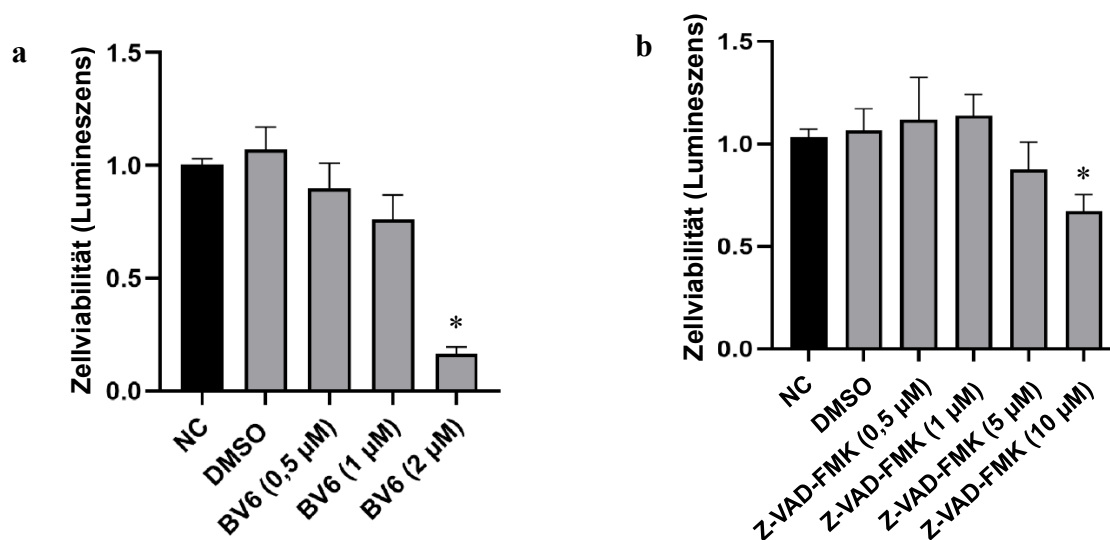


Abbildung 9: Wirkung von Z-VAD-FMK bzw. von BV-6 in verschiedenen Konzentrationen auf hPAECs

a. Zellviabilität von hPAECs nach Behandlung mit Z-VAD-FMK in den Konzentrationen 0,5 μM , 1 μM , 5 μM bzw. 10 μM in Relation zur Zellviabilität der hPAECs unter Einfluss von DMSO ($n = 4$)

b. Zellviabilität von hPAECs nach Behandlung mit BV-6 in den Konzentrationen 0,5 μM , 1 μM bzw. 2 μM in Relation zur Zellviabilität der hPAECs unter Einfluss von DMSO ($n = 4$)

Signifikante Unterschiede im Vergleich zur DMSO-Kondition wurden mit * für $p \leq 0,05$ gekennzeichnet

3.4.2. Induktion von Nekroptose durch die kombinierte Behandlung mit Z-VAD-FMK und BV-6 beziehungsweise TNF- α

Die Konzentrationen der für dieses Experiment eingesetzten Wirkstoffe wurden anhand der unter 3.4.1. beschriebenen Ergebnisse festgelegt. Nach Behandlung der Zellen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK zur Inhibierung der Apoptose wäre eine Steigerung der Zellviabilität zu erwarten gewesen. Da bei höheren Konzentrationen des Z-VAD-FMK ein toxischer Effekt zu beobachten war, wurden für die Induktion der Nekroptose niedrigere Konzentrationen von 0,5 und 1 μM gewählt. Für BV-6 sollte eine Konzentration ausgewählt werden, bei der die Apoptose in den hPAECs induziert wird aber gleichzeitig noch eine Steigerung der Zellmortalität durch die Induktion der Nekroptose bei Kombination mit Z-VAD-FMK möglich wäre. Zwar war die Abnahme der Zellviabilität bei einer Konzentration von 2 μM BV-6 am deutlichsten, allerdings fiel diese auf so niedrige Werte, dass eine weitere Abnahme kaum noch messbar gewesen wäre. Darum wurde stattdessen die Konzentration von 1 μM für dieses Experiment gewählt.

Um die Nekroptose zu induzieren, wurden die Zellen, wie in 2.2.1.5. beschrieben, zuerst mit Z-VAD-FMK behandelt, um die Apoptose zu inhibieren. Nach einer Inkubationszeit von 45 min wurde dann BV-6 bzw. TNF- α hinzugefügt, um den Zelltod einzuleiten. In beiden Fällen war eine signifikante Verminderung der Zellviabilität der hPAECs bei Kombination beider im Vergleich zum alleinigen Einfluss der einzelnen Wirkstoffe feststellbar.

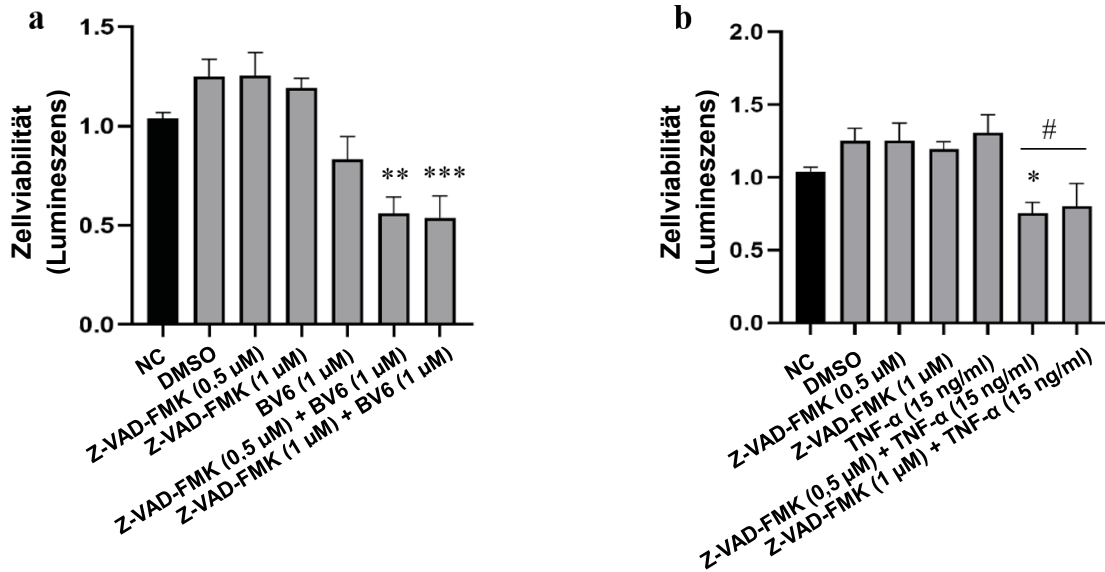


Abbildung 10: Wirkung von Z-VAD-FMK in Kombination mit TNF- α bzw. BV-6 in verschiedenen Konzentrationen auf hPAECs

a. Zellviabilität von hPAECs nach Behandlung mit ZVAD-FMK und BV-6 in Relation zur Zellviabilität der hPAECs nach Behandlung mit DMSO (n = 4)

b. Zellviabilität von hPAECs nach Behandlung mit Z-VAD-FMK und TNF- α in Relation zur Zellviabilität der hPAECs nach Behandlung mit DMSO (n = 7)

Signifikante Unterschiede wurden im Vergleich zur DMSO-Kondition wurden je nach Signifikanzniveau wie folgt gekennzeichnet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$

Signifikante Unterschiede mit $p \leq 0,05$ im Vergleich zur TNF- α -Kondition wurden mit # gekennzeichnet

3.5. Die Wirkung von GSK-872 auf die Zellviabilität von hPAECs

Wie im Kapitel „Zielsetzung der Arbeit“ bereits erwähnt, wurde in Zellkulturexperimenten bereits eine dosisabhängige Zytotoxizität von GSK-872 auf verschiedene Zellarten festgestellt. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch an hPAECs zu beobachten ist, wurden hPAECs mit GSK-872 in verschiedenen Konzentrationen von 50 nM bis 10 µM behandelt (siehe Abbildung 11) und nach 24h Inkubationszeit die Zellviabilität mittels CellTiter Glo gemessen. Nährstoffbedingt war bei alleiniger Zugabe von FCS wie erwartet eine signifikante Steigerung der Zellviabilität im Vergleich zur DMSO-Kondition messbar. Nach Behandlung dieser Zellen mit GSK-872 in verschiedenen Konzentrationen kam es zu keinerlei weiteren signifikanten Veränderungen im Vergleich zur FCS-Kondition. So konnte keine signifikante dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität der hPAECs durch Behandlung von hPAECs mit GSK-872 beobachtet werden.

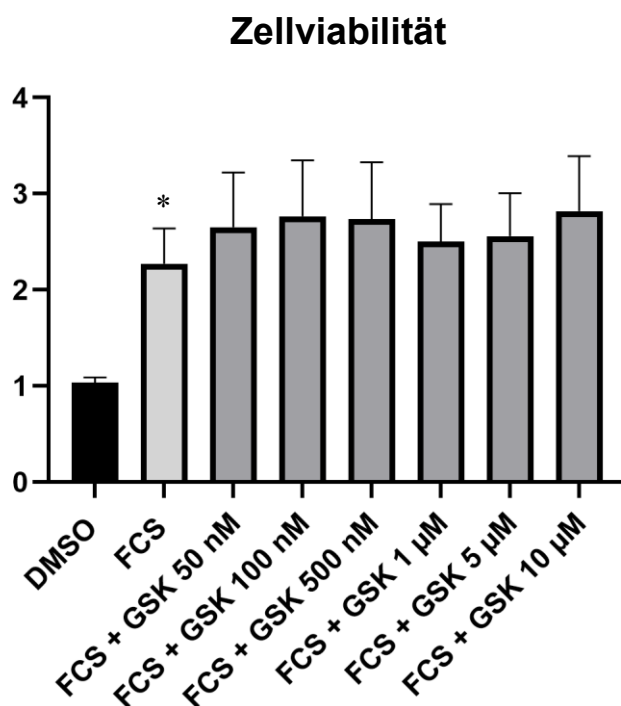


Abbildung 11: Wirkung von GSK-872 in verschiedenen Konzentrationen auf die Zellviabilität von hPAECs im Verhältnis zu FCS (n = 3)

Signifikante Unterschiede im Vergleich zur DMSO-Kondition wurden mit * für $p \leq 0,05$ gekennzeichnet

3. Diskussion

Die PAH ist eine lebensbedrohliche chronische Erkrankung, die mit einer Prävalenz von 25 Erkrankten pro 1 Millionen Einwohnern weltweit fast 200 Millionen Menschen betrifft und bis jetzt eine sehr schlechte Prognose mit einer mittleren Überlebenszeit von 2,8 Jahren und eine 3-Jahres-Überlebensrate von ca. 48 % bei fehlender PAH-spezifischer Behandlung aufweist. [64, 43, 12]. Mithilfe aktueller gezielter Behandlungsmethoden, wie z. B. hoch dosierter Kalziumantagonisten, Prostazykline oder Prostazyklin-Derivate, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, Phosphodiesterase-Inhibitoren, Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase und gegebenenfalls Lungentransplantationen, konnte für die Patienten die 3-Jahres-Überlebensrate derzeit auf bis zu 69 % erhöht werden, eine kurative Therapie steht aber, abgesehen von der Lungentransplantation als Ultima ratio, noch nicht zur Verfügung [21, 64, 40, 81].

Die Entdeckung und Erforschung der Nekroptose als pathophysiologischer Mechanismus in der Entstehung zahlreicher chronisch-inflammatorischer Erkrankungen könnte neue Therapiemöglichkeiten aufzeigen. Nachdem nun auch erste Hinweise auf die Beteiligung der Nekroptose an der Entstehung der PAH gefunden wurden, eröffnen sich neue Wege, um möglicherweise lebensverlängernde, vielleicht sogar kurative Behandlungsansätze für die PAH zu finden [57, 73, 82, 109, 48].

4.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Erforschung der Rolle der Nekroptose bei der Entstehung und Progression der PAH. Aus vorangegangenen Experimenten war bereits bekannt, dass das proapoptotische DAPK1 in hPAECs und hPASCs von an PAH-erkrankten Tieren und Menschen reduziert ist, was auf eine Apoptoseresistenz dieser Zellen schließen ließ [92]. Dieser pathophysiologische Aspekt sollte mithilfe der siRNA-Transfektion zum Knockdown von DAPK1 in hPAEC- und hPASC-Zellkulturen imitiert werden. Da bereits in einer Studie von Wu et al. die Nekroptosebereitschaft durch den Knockout von DAPK1 signifikant gesteigert werden konnte [109], lässt sich hier ein möglicher Zusammenhang zwischen DAPK1 und Nekroptose vermuten, welcher im Rahmen dieser Dissertation auch für hPAECs und hPASCs sowie Lungenhomogenate von SuHx-Ratten eruiert werden soll. Zur Untersuchung der Nekroptoseaktivität bei PAH auf mRNA-Ebene wurden die Lungenhomogenate außerdem mittels PCR analysiert. Sowohl in den Zellkultur- als auch in den Tierexperimenten konnte eine erhöhte Expression und Aktivität von Proteinen der Nekroptosesignalkette beschrieben werden.

In den Zellkulturexperimenten bestätigten sich diese Beobachtungen allerdings ausschließlich für die hPAECs, nicht aber für die hPASCs.

Nachdem die Nekroptose als Pathomechanismus der PAH identifiziert war, galt das Interesse der Auswirkung einer Hemmung der Nekroptose in hPAECs auf deren Zellzyklus und Apoptosebereitschaft. Durch den Knockdown der Nekroptosemarker RIPK1, RIPK3 und MLKL wurde eine Steigerung der Konzentration des proapoptotischen DAPK1 beobachtet, ohne dass die Zellviabilität dabei wesentlich beeinflusst wurde. Auch p53 war durch diesen Knockdown tendenziell erhöht, auch wenn noch keine Signifikanz erkennbar war. Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass auch die Inhibierung der Nekroptose die hPAECs gegenüber der Apoptose sensibilisiert, sodass sich eine antagonistische Wechselbeziehung zwischen den beiden Signalwegen vermuten lässt. Allerdings war in unseren Experimenten die Inhibierung der Nekroptose nicht ausreichend, um einen nekroptotischen Zelltod auszulösen, da die Zellviabilität durch den Knockdown der Nekrosomproteine unbeeinflusst blieb.

Ein weiteres Ziel der Studie war die Entwicklung eines Zellkulturmodells zur experimentellen, medikamentösen Induktion von Nekroptose in hPAECs. Durch die Blockierung der Apoptose mittels Z-VAD-FMK und anschließende Behandlung mit BV-6 oder TNF- α sank die Zellviabilität, was auf eine erfolgreiche Nekroptoseaktivierung hindeuten könnte.

Zur weiteren Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten der PAH, basierend auf der Hemmung der Nekroptose zur Resensibilisierung der hPAECs gegenüber der Apoptose wurde der selektive RIPK3-Inhibitor GSK-872 untersucht. Es war vorbekannt, dass dieser Inhibitor auf andere Zellen bereits neben der Hemmung der Nekroptose einen zytotoxischen Effekt gezeigt hatte. Da eine solche Zytotoxizität für die Therapie der PAH kontraproduktiv wäre, wurde untersucht, ob diese auch bei hPAECs zu beobachten ist. Es wurde jedoch keine signifikante Veränderung der Zellviabilität nach Behandlung mit GSK-872 festgestellt.

4.2. Methodendiskussion

4.2.1 Die Wahl des Tiermodells

Unser Ziel war zunächst die Expression der Nekrosomproteine RIPK1, RIPK2 und MLKL in Lungengewebeproben von Ratten zu untersuchen, die gemäß eines etablierten Tiermodells zur Simulation einer PAH behandelt wurden.

Tiermodelle sind ein essenzieller Bestandteil in der Erforschung von Krankheiten und der Suche nach deren Pathomechanismen und möglichen Therapien. Für die PH gibt es mehrere solcher Tiermodelle, allerdings existiert bisher kein Modell, das die PAH, wie sie beim Menschen vorkommt, in ihrer vollen Komplexität perfekt imitieren kann. Die meistgenutzten Tiermodelle für die PH allgemein, welche bei Ratten Anwendung finden, sind das chronische Hypoxie-Modell und das Monocrotalin-Modell [97].

Bei dem Modell der Hypoxie-induzierten PAH, welches überwiegend an Mäusen angewandt wird, werden durch normo- oder hypobare chronische Hypoxie strukturelle Umbauprozessen in den Lungengefäßen der Versuchstiere induziert. So kommt es z. B. zur Wandverdickung und Muskularisierung von pulmonalen Arterien, Arteriolen und Kapillaren in Verbindung mit Hypoxie-induzierten Inflammationsprozessen, was nach ca. zwei Wochen zu einer Verdopplung des mPAP und einer erhöhten Rechtsherzbelastung führt. Die Schwere des induzierten Krankheitsbildes ist allerdings nur leicht bis moderat und die strukturellen Veränderungen reversibel, weshalb die Vergleichbarkeit zum Krankheitsbild der PAH beim Menschen nur limitiert gegeben ist. [97]

Das Monocrotalin-Modell (MCT-Modell) ist ein vorwiegend an Ratten etabliertes Modell für schwere und letale PH. Monocrotalin ist das Gift der Pflanze *Crotalaria spectabilis* und gehört zur chemischen Gruppe der Retronektine. Interessanterweise entwickeln Ratten nach wiederholter subkutaner Gabe dieses Wirkstoffs eine PAH, es wird vermutet, dass es hierbei durch wiederholte Schädigung der pulmonalen Gefäßwände zu vaskulärem Remodelling im pulmonalarteriellen und -venösem System und folglich zu einer in diesem Fall stärkeren Erhöhung des mPAP und der rechtsventrikulären Belastung bis zur Insuffizienz kommt [97, 49, 107]. Allerdings schädigt Monocrotalin auch direkt andere Organe, z.B. Leber und Niere und verursacht am Herzen Myokarditiden, was für die Beurteilung der kardialen Auswirkungen der PAH wiederum hinderlich ist [97, 87, 72]. Auch konnten die Symptome und strukturellen Veränderungen der Versuchstiere in diesem Modell bisher sehr leicht therapiert werden, sogar durch Substanzen, die nachweislich an der Entstehung der PAH beteiligt sind, wie Dexfenfluramine und Elastase, sodass dieses Modell für die Suche möglicher Therapien eher weniger gut geeignet scheint [97, 53, 71].

Das Sugen 5416/Hypoxie-Modell (SuHx-Modell) wurde 2007 von Taraseviciene-Stewart et al. entwickelt und wird genutzt, um bei Ratten eine schwere PAH zu induzieren. Durch dieses Modell sind entscheidende pathophysiologische Eigenschaften erfolgreich imitierbar, z. B. die Steigerung des mPAP und der rechtsventrikulären Belastung, die Wandverdickung und Okklusion pulmonaler Gefäße. Auch essenzielle irreversible strukturelle Veränderungen der PAH, wie plexiforme Läsionen, Endothelzellproliferation und -hypertrophie und inflammatorische Immunzellinfiltration der pulmonalen Gefäßwände konnten bisher mithilfe des SuHx-Modells erfolgreich reproduziert werden [3, 97, 99]. Da im Rahmen dieser Arbeit besonders die mit Inflammation assoziierten strukturellen und intrazellulären Veränderungen der hPAECs untersucht werden sollen, scheint hierbei dieses Modell im Vergleich zum Hypoxie- oder MCT-Modell deutlich adäquater zur Simulierung der PAH. Das SuHx-Modell basiert auf der Inhibierung von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) in pulmonalen Gefäßen, einem wichtigen Wachstumsfaktor, der für die Differenzierung und die Homöostase der vaskulären Endothelzellen essenziell ist, durch Sugen 5416 in Kombination mit chronischer Hypoxie. Neben den Remodelingprozessen der Endothelzellen wurde durch die Hemmung von VEGF auch eine Hyperproliferation von vaskulären glatten Muskelzellen verursacht. Weitere Vorteile dieses Modells sind die Irreversibilität und die Progressivität der Veränderungen, sowie die selektive Wirkung von Sugen 5416 auf die Lungengefäße, ohne Auswirkungen auf die Gefäße anderer Organe, außerdem eignet sich dieses Modell besser zur Entwicklung möglicher Therapien, da im Gegensatz zum Monocrotalin-Modell die SuHx-induzierte PAH weniger einfach therapierbar ist [3, 97, 99]. Mithilfe von wöchentlichen subkutanen Injektionen von 20 mg/kg Sugen 5416 und chronischer Hypoxie (10 % O₂) für drei Wochen und anschließender Normoxie (21 % O₂) ohne Sugen-Injektionen für eine Woche, kann innerhalb eines Monats eine solche PAH bei Ratten induziert werden [3].

Aufgrund der beschriebenen Vorteile wurden für diese Arbeit Lungenhomogenate von SuHx-Ratten gewählt. Auch Zemskova et al. beschrieb 2020 bereits eine Beteiligung der Nekroptose an der SuHx-induzierten PAH bei Ratten [115], auch dadurch scheint dieses Tiermodell für unsere Fragestellung von Interesse zu sein.

4.2.2. Das Zellkulturmodell

Während Tiermodelle besonders gut zur Erforschung der Pathogenese von Krankheiten unter Betrachtung des gesamten Organismus geeignet sind, ermöglichen Experimente an Zellkulturen die genauere Beobachtung und Manipulation der pathogenetisch bedeutsamen intrazellulären Vorgänge innerhalb einzelner krankheitsrelevanter Gewebe- und Zellarten. Ein großer Vorteil der Zellkulturexperimente ist ihre Einfachheit. Im Vergleich zu den in-vivo-Experimenten, bei denen ein komplexer Organismus und die Veränderungen an Organen betrachtet werden, die aus unterschiedlichen Gewebe- und Zelltypen bestehen, kann bei den in-vitro-Experimenten eine einzelne Zellart unter präzise kontrollierbaren Bedingungen, wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidgehalt, pH-Wert, Osmolarität und Einfluss von Wachstumsfaktoren und Hormonen oder exogenen Wirkstoffen getrennt betrachtet werden.

Zu den Einschränkungen der Zellkulturexperimente zählt sowohl die begrenzte Vermehrungsfähigkeit der Zellen, als auch die durch wiederholtes Splitten bedingte Veränderung der Morphologie und der Zellfunktion. Um eine ausreichende Zahl an Zellen und eine zeitliche Flexibilität bei der Durchführung der einzelnen Experimente zu gewährleisten, ist neben dem Splitten auch das Einfrieren und Auftauen der Zellen notwendig. Durch diese Prozesse kann es auch zur Veränderung der Morphologie und Funktion bis hin zum Zelltod kommen. Um diese Probleme so weit wie möglich vorzubeugen, ist eine genaue Einhaltung standardisierter Protokolle für diese Arbeitsschritte notwendig. Um optimale Konditionen für das Zellwachstum zu schaffen, werden die Zellkulturen mit Growth Medium versorgt und im Zellinkubator kultiviert. Das nährstoffreiche Growth Medium und die Wärme und Luftfeuchtigkeit innerhalb des Zellinkubators bietet aber auch für die meisten Mikroorganismen optimale Wachstumsbedingungen, die Vermeidung einer Kontamination der Zellkulturen ist daher eine weitere große Herausforderung der Arbeit an Zellkulturen. Um das Risiko einer Kontamination zu minimieren ist das strenge Einhalten steriler Bedingungen bei der Arbeit mit den Zellkulturen notwendig, außerdem kann hierzu der Einsatz von Antibiotika nötig sein, da diese aber wiederum negative Auswirkungen auf das Zellwachstum haben können, sollte deren Einsatz sorgfältig abgewogen werden.

Kennzeichnend für die PAH ist das vaskuläre Remodeling der kleinen pulmonalen Gefäße, welches maßgeblich durch veränderte Proliferation und Differenzierung der Endothelzellen und die Hyperproliferation und Dysfunktion der glatten Muskelzellen bedingt wird. Diese Vorgänge führen auch zur Entstehung der für die PAH typischen plexiformen Läsionen. [75, 42, 30, 10] Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit besonders auf in-vitro-Experimente an hPAECs und hPASCs durchgeführt.

4.3. Ergebnisdiskussion

4.3.1. mRNA- und Proteinexpression von nekroptoseassoziierten Proteinen in SuHx-Rattenlungen

Im SuHx-Rattenmodell, welches hier genutzt wurde, um die Pathomechanismen der PAH nachzuempfinden, konnte durch die generelle Erhöhung der pronekroptotischen Proteine RIPK1, RIPK3 und MLKL und die Verminderung der proapoptotischen aktivierten Form der Caspase 8 gezeigt werden, dass in PAH-Lungen im Vergleich zu gesunden Lungen vermehrt Nekroptose und tendenziell vermindert Apoptose stattfindet.

Bereits auf mRNA-Ebene lässt sich via PCR eine signifikante Erhöhung der Transkription für die Gene von MLKL und RIPK1 beobachten (siehe Abbildung 3). Auch im Western Blot ist eine tendenziell gesteigerte Konzentration von MLKL im Lungengewebe erkennbar (siehe Abbildung 5b), RIPK1 konnte leider trotz wiederholter Versuche und der Verwendung verschiedener Antikörper nicht detektiert werden. Auch im HCT-Modell wurde zuvor schon eine Erhöhung der Konzentrationen von MLKL auf mRNA- und Proteinlevel beschrieben [110, 48]. Xiao et al. beschreibt allerdings auch eine Reduktion von RIPK1-mRNA im MCT-Modell [110]. In unseren Experimenten scheint die phosphorylierte und damit aktive Form von MLKL in der SuHx-Kondition im Verhältnis zum unphosphorylierten MLKL kaum verändert zu sein, sodass in diesem Fall eher von einer Regulierung auf Translationsebene auszugehen ist. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Steigerung von MLKL nur als Tendenz zu erkennen war, allerdings keine Signifikanz aufwies. Um eine klare Aussage treffen zu können, wären also weitere Untersuchungen erforderlich.

RIPK3 stellte sich im PCR noch nicht als signifikant verändert dar (siehe Abbildung 3c), obwohl später im Western Blot eine signifikante Erhöhung der Konzentration von RIPK3 in den SuHx-Lungen deutlich zu erkennen ist (siehe Abbildung 4).

Durch Xiao et al. wurde schon im Vorfeld in MCT-Rattenlungen eine Erhöhung der Konzentration von RIPK3-mRNA beschrieben und durch Jarabicova et al. wurde diese Erhöhung der RIPK3 Konzentration in MCT-Rattenlungen auch auf Proteinebene bestätigt, ebenso wie die vermehrte Phosphorylierung von RIPK3, welche ebenso in unseren Experimenten zu beobachten waren [48, 110]. Die verminderte Konzentration der RIPK3-mRNA, welche im Rahmen dieser Arbeit in SuHx-Rattenlungen ersichtlich wurde, stellt einen Widerspruch zu den Ergebnissen der eben genannten Studien dar. Die Wahl des Tiermodells könnte hier beispielsweise eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Die Erhöhung der RIPK3-Konzentration auf Proteinebene ohne Steigerung der Konzentration der für RIPK3 codierenden mRNA könnte darauf hinweisen, dass die Menge von RIPK3 in SuHx-Lungen weniger über die Transkription, sondern stattdessen über die Translation reguliert wird. Eine solche Regulierung der Translation eines Genes ermöglicht eine flexible und schnellere zelluläre Reaktion auf äußere Faktoren als die transkriptionale Regulation und wurde unter anderen auch für die Regulation der Globin-Synthese in Erythrozyten in Abhängigkeit der Häm-Konzentration mittels Veränderung der Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF-2 beschrieben [6, 95].

Ein weiterer bekannter translationaler Regulationsmechanismus ist die Aktivierung bzw. Inhibierung des Initiationsfaktors eIF-4, welcher für den Cap-Erkennungsprozess zuständig ist, z. B. durch die Phosphorylierung von eIF-4-bindenden Proteinen durch mTOR als Reaktion auf ein vermindertes Nährstoffangebot [95]. Da RIPK3 als wohl bedeutendster Schlüsselmediator der Nekroptose bekannt ist [89, 50, 100, 103], wäre eine solche schnelle und flexible Regulierungsmöglichkeit für die Expression eben dieses Proteines durchaus sehr sinnvoll. Ob die RIPK3-Expression nun tatsächlich fast ausschließlich über die Translation reguliert wird und über welchen Signalweg dies vorstättengeht, bleibt bisher ungeklärt und bedarf weiterer Nachforschungen.

Im Western Blot war die Konzentration von Caspase 8 in der SuHx-Kondition im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert, es konnte aber eine signifikante Verminderung der aktiven gespaltenen Caspase 8 nach Induktion der PAH beobachtet werden. Die Aktivierung von Caspase 8 durch Spaltung ist ein entscheidender Schritt in der Caspasenkaskade der Apoptose. Die verminderte Konzentration der aktivierten Caspase 8 lässt also eine geringere Apoptoseaktivität vermuten. Zudem ist die gespaltene Caspase 8 auch ein negativer Marker für die Nekroptoseaktivität, da sie in dieser aktiven Form den Nekroptose-Signalweg inhibiert, indem sie RIPK1 und RIPK3 spaltet [89, 104, 79, 27, 77, 98, 116, 5, 8, 35]. Jarabíková et al. beschrieb in seiner Studie an MCT-Ratten eine Erhöhung der aktiven Caspase 8 und wertet dies am ehesten als ein Indiz für eine Verminderung der Nekroptoseaktivität in PAH-Lungen [48]. Dieses von ihm beschriebene Ergebnis steht im Widerspruch zu unseren Beobachtungen, was als ein weiterer Hinweis gewertet werden könnte, dass die Verwendung unterschiedlicher Tiermodelle auch hier zu verschiedenen Ergebnissen geführt haben könnte.

4.3.2. Expression und Phosphorylierung der Nekroptosemarker nach Knockdown von DAPK in hPAECs und hPASCs

Die übermäßige Proliferation und die Apoptoseresistenz der hPAECs und der hPASCs stellt einen bedeutenden pathophysiologischen Mechanismus bei der Entstehung der PAH dar. Infolgedessen kommt es zum intraluminalen, mehrschichtigen Wachstum der Endothelzellen innerhalb der pulmonalen Gefäße und durch Proliferation der glatten Muskelzellen zur Zunahme der Wandstärke und somit auch des Blutdrucks im Lungenkreislauf [17, 85, 20, 63].

Durch frühere Experimente unserer Forschungsgruppe konnte gezeigt werden, dass sowohl in den SMCs, sowie generell in Lungenhomogenaten von MCT-Ratten, als auch von PAH-Patienten die Expression des proapoptotischen DAPK1 vermindert ist [93]. Diese Beobachtungen liefern eine mögliche Erklärung für die Apoptoseresistenz der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen bei PAH. Eine solche Apoptoseresistenz ist, wie bereits in der Einleitung erörtert wurde, ebenso ein wichtiges Ausgangskriterium für die Initiation des Nekroptosesignalweges innerhalb der Zelle [89]. In einer Studie von Wu et al. wurde der Zusammenhang von DAPK1 und der Nekroptoseaktivität in HT-29-Zellen untersucht, wobei festgestellt werden konnte, dass DAPK1 eine inhibierende Wirkung auf die Nekroptose aufweist [109]. Diese Erkenntnisse könnten als Hinweis dafür gelten, dass die mit PAH assoziierte verminderte DAPK1-Expression zur vermehrten Nekroptoseneigung in hPASCs und hPAECs führen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Zusammenhang erstmals genauer eruiert.

Zu diesem Zweck wurde in hPAECs und in hPASCs mittels siRNA ein Knockdown des DAPK1-Gens induziert und am Folgetag das Expressionsmuster und der Phosphorylierungsstatus der Nekroptoseakteure RIPK1, RIPK3, MLKL, sowie die Expression des proapoptotischen FADD mittels Westernblot untersucht. Durch unsere Experimente konnten wir in den betrachteten Endothelzellen eine Zunahme der Expression der drei oben genannten Nekroptosemarker und eine tendenzielle Abnahme der Konzentration von FADD auf Proteinebene im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Die Phosphorylierung von RIPK1, RIPK3 und MLKL war nach DAPK1-Knockdown signifikant erhöht. Diese Effekte ließen sich allerdings nur für die hPAECs, nicht aber bei den hPASCs beobachten. Dies deutet darauf hin, dass Nekroptose eine bei der Genese der bereits in der Einleitung beschriebenen Endothelzellschädigung und der darauf folgenden Ausbildung plexiformer Läsionen eine Rolle spielt, dies scheint hPASCs nicht im selben Maße zu betreffen. Möglicherweise sind hierbei andere Mechanismen involviert.

Eine weitere, durchaus plausible Erklärung für den geringen Effekt des Knockdowns von DAPK1 auf hPASCs ist die Robustität dieser Zellart im Vergleich zu den anfälligeren

hPAECs, welche sich auch für uns im Umgang mit beiden Zellarten bemerkbar machte. hPASCs wuchsen im Rahmen der Kultivierung bei weitem schneller, waren weniger anfällig für Kontamination und änderten in Folge von wiederholtem Splitting weniger schnell ihren Phänotyp. Im Vergleich dazu war die Arbeit mit den weniger robusten hPAECs deutlich anspruchsvoller.

Die Phosphorylierung des RIPK1 bzw. des RIPK3 ist zur Initiation des Nekroptosesignalweges essenziell, welcher schließlich in der Polymerisierung des phosphorylierten MLKL und der anschließenden Porenbildung in der Zellmembran durch diese Polymere endet [79, 89, 104, 27, 98, 77, 116, 35, 5, 8]. In Anbetracht dessen liefern unsere Ergebnisse einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Reduktion der DAPK1-Expression, die sich auch infolge einer PAH in den ECs und SMCs nachweisen lässt, zu einer höheren Nekroptosebereitschaft in hPAECs führt. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine Schlüsselrolle der Nekroptose in der Pathophysiologie des PAH-typischen Remodeling-Prozesses der pulmonalen Gefäße.

4.3.3. Einfluss des Knockdowns von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf Zellzyklus, Apoptose und Zellviabilität

Bisher ist bekannt, dass die Inhibierung wichtiger Akteure der Apoptose-Signalkette die Vulnerabilität der Zelle gegenüber der Nekroptose erhöht. Ebenso ist bekannt, dass proapoptotische Proteine, wie z. B. DAPK1, den Nekroptosesignalweg blockieren [109, 104, 89]. Der enge Zusammenhang zwischen Apoptose und Nekroptose lässt vermuten, dass durch die Inhibierung des Nekroptose-Signalweges wiederum die Apoptoseneigung der Zelle durch eine Art Rückkopplungsmechanismus gesteigert werden könnte. Diese Fragestellung ist besonders bedeutsam für neue Therapieansätze, die darauf ausgelegt sind, der erhöhten Apoptoseresistenz in hPAECs und hPASCs von PAH-Patienten entgegenzuwirken und somit diesen Pathomechanismus der PAH-Entstehung und -Progression gezielt auszuschalten.

Im Westernblot zeigte sich nach Knockdown von RIPK1, RIPK3 bzw. MLKL in hPAECs eine Erhöhung der Expression der proapoptotischen Proteine DAPK1 und p53, welche nach Knockdown von RIPK1 am deutlichsten zu erkennen waren. Des Weiteren führte der Knockdown dieser drei Nekroptosemarker, besonders aber der Knockdown von RIPK3 zu einer verminderten Konzentration von Cyclin D1, einem Protein, welches zur Progression des Zellzyklus und zum Eintritt der Zelle in die S-Phase beiträgt, indem es mit CDK4 und CDK6 einen Komplex bildet. Wird Cyclin D1 vermehrt degradiert oder weniger exprimiert, so kann es zum Stillstand des Zellzyklus und zur Initiation der

Apoptose kommen. Diese Reduzierung der Cyclin D-Konzentration war nach Knockdown von RIPK3 bei $p < 0,05$ signifikant.

Durch unsere Experimente konnten erstmals Hinweise darauf geliefert werden, dass die Inhibierung der Nekroptose via Knockdown von RIPK1, RIPK3 und MLKL möglicherweise zu einer vermehrter Apoptoseneigung der Zelle durch Verminderung von p53 führt und außerdem potenziell zum Stillstand des Zellzyklus via Verminderung von Cyclin D1 beitragen könnte. Da mit Ausnahme der Reduktion von Cyclin D1 nach RIPK3-Knockdown die Ergebnisse nicht als signifikant zu bewerten waren und damit nur eine allgemeine Tendenz zu erkennen ist, wäre für ein sicheres Verständnis dieses Sachverhaltes noch weitere Forschung vonnöten.

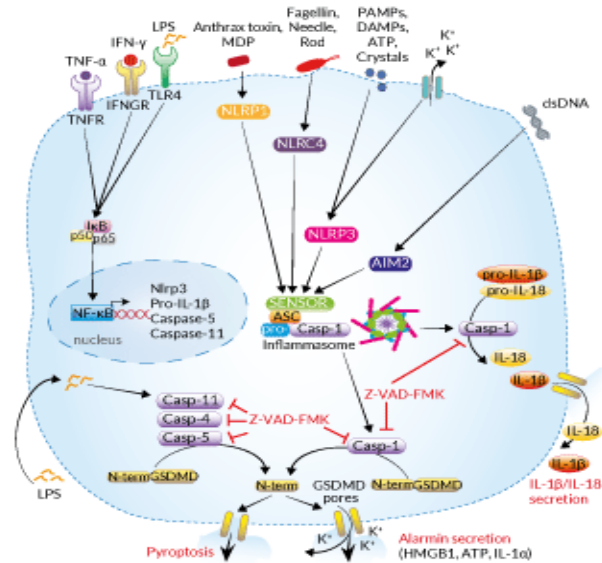
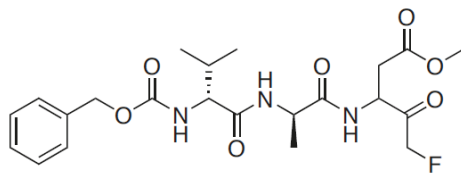
Mithilfe von Messung der Zellviabilität der hPAECs mittels CellTiter Glo Assay nach Knockdown von RIPK1, RIPK3 bzw. MLKL konnte weiterhin beobachtet werden, dass trotz der zuvor beobachteten erhöhten Apoptosebereitschaft die Zellviabilität nicht signifikant eingeschränkt oder anderweitig verändert war. Dies weist darauf hin, dass die für die PAH typische Apoptoseresistenz durch Inhibierung der Nekroptoseproteine aufgehoben werden könnte, ohne dass die Blockierung dieser Nekroptoseproteine zu einer Störung der Zellviabilität führt. Dies macht die Inhibierung der Nekroptose zu einem möglicherweise vielversprechenden neuen Ansatz für die zukünftige Entwicklung neuer Therapien der PAH.

4.3.4. Medikamentöse Induktion der Nekroptose in hPAECs mithilfe von Kombinationen der Wirkstoffe ZVAD, BV-6 und TNF- α

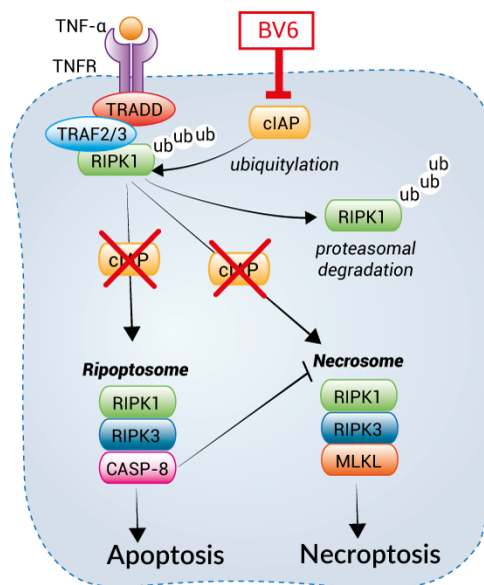
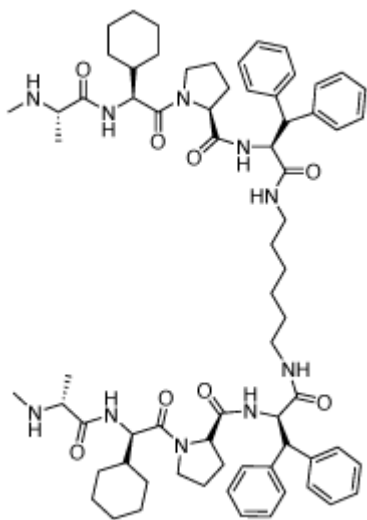
Im Rahmen dieser Arbeit wurden anhand der oben beschriebenen Experimente bereits Hinweise auf die mögliche Beteiligung der Nekroptose an den PAH-typischen Remodellingprozessen der Lunge gefunden. Diese Hinweise ergaben sich vor allem für die hPAECs. Um solche Zusammenhänge genauer zu untersuchen, könnte ein Zellkulturmodell zur Induktion der Nekroptose an hPAECs allgemein von Nutzen sein. Einen der Wege, um in hPAECs Necroptose zu induzieren, stellt der oben beschriebene Knockdown von DAPK1 dar, welcher aber auf der bereits zuvor bekannten Beobachtungen der PAH-bedingten Verminderung von DAPK1 in den Lungengefäßen beruht. Im Rahmen dieser Dissertation wurde mithilfe des Pan-Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK, des proinflammatorischen und proapoptotischen Zytokins TNF- α und des proapoptotischen cIAP/xIAP-Inhibitors BV-6 an der Entwicklung eines weiteren Zellkulturmodells gearbeitet. Nähere Details zu Z-VAD-FMK und BV-6 wurden bereits im Methodenteil unter 2.2.1.5. beschrieben. TNF- α ist ein natürlich im Körper

vorkommendes Zytokin, welches durch die Aktivierung des TNF- α -Rezeptors die Apoptose oder im Falle der Inhibierung der Apoptose die Nekroptose auslösen kann [89, 15, 109, 115]. Die Initiation der Nekroptose via TNF- α wurde ebenso bereits in der Einleitung genauer betrachtet. Die Strukturformel und Wirkungsweise von BV-6 und Z-VAD-FMK sind in Abbildung 12 schematisch dargestellt.

Abbildung 12: Struktur und Wirkungsweise von Z-VAD-FMK und BV-6. Neben der chemischen Struktur des jeweiligen Wirkstoffs ist dessen Wirkungsweise auf die intrazellulären Signalkaskaden schematisch dargestellt.



a. Struktur und Funktionsweise von Z-VAD-FMK [46]



b. Struktur und Funktionsweise von BV-6 [45]

Zur Entwicklung des hier beschriebenen Zellmodells zur Induktion der Nekroptose in hPAECs wurden die Ergebnisse einer Studie von Wu et al. herangezogen, in der Nekroptose mithilfe von Kombinationen der Wirkstoffe Z-VAD-FMK, BV-6, TNF- α und AT-406 in BMDMs induziert werden konnte [109].

Da die dosisabhängige Wirkung der einzelnen Substanzen je nach Zelltyp variieren kann, wurde zunächst die Wirkung von Z-VAD-FMK in verschiedenen Konzentrationen auf die Zellviabilität der hPAECs untersucht. Neben der antiapoptotischen Wirkung des Pan-Caspase-Inhibitors sind schon seit einigen Jahren auch dosisabhängige zytotoxische Effekte auf bestimmte Zellreihen bekannt [66, 113, 65]. So beschrieb Martinet et al. 2006 die Induktion eines nicht-apoptotischen Zelltodes durch Z-VAD-FMK in den murinen Makrophagen-Zellreihen J774A.1 und RAW264.7 sowie in primären murinen Peritonealmakrophagen infolge der Aktivierung von RIPK1. Mithilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte in den behandelten Makrophagen die Degeneration langlebiger Proteine in Autophagosomen beobachtet werden. Dieser Effekt ließ sich durch Behandlung der Zellen mit dem Autophagieinhibitor 3-Methyladenine verhindern, des Weiteren wurden auch nekrotische Zellen nach Behandlung mit Z-VAD-FMK beobachtet werden. Murine SMCs zeigten sich gegenüber dieses zytotoxischen Effekts im Gegensatz zu den Makrophagen immun [66]. Yu et al. beschrieb ebenso Hinweise des Zelltodes durch Autophagie in murinen L929-Fibroblasten, RAW264.7-Makrophagen und Peritonealmakrophagen, sowie in humanen monozytoiden U937-Zellen nach Behandlung mit Z-VAD-FMK [113].

Auch für in-vivo-Experimente kam Z-VAD-FMK bereits zur Anwendung. So wurde Z-VAD-FMK von Zemskova et al. verwendet, um Apoptose in männlichen Ratten zu inhibieren, die zuvor gemäß des SuHx-Modells behandelt worden waren [115].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Steigerung der Zellviabilität bei hPAECs nach Behandlung mit Z-VAD-FMK der Konzentrationen 0,5 μ M und 1 μ M beobachtet werden. In höheren Konzentrationen von 5 μ M und 10 μ M kam es durch diesen Wirkstoff wiederum zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität. Dies könnte Hinweis auf eine dosisabhängige zytotoxische Wirkung von Z-VAD-FMK auf hPAECs sein. BV-6 bewirkte erwartungsgemäß eine dosisabhängige Verminderung der Zellviabilität. Für die darauf folgenden Experimente wurden gezielt Konzentrationen des Z-VAD-FMK gewählt, bei denen kein zytotoxischer Effekt zu beobachten war, da nur die Blockade der Caspasenkaskade, nicht aber die Induktion eines nicht-apoptotischen Zelltodes zur Initiation der Nekroptose gewünscht war und dieser zusätzliche Effekt ansonsten zur

Verfälschung der Ergebnisse geführt hätte. Die Konzentration von BV-6 wurde so gewählt, dass eine proapoptotische Wirkung zu erwarten war, allerdings in einem Maße, dass ggf. bei erfolgreicher Nekroptoseinduktion durch die Kombination beider Wirkstoffe noch eine deutlichere Verminderung der Zellviabilität der hPAECs zu erkennen wäre.

Somit wurden im nächsten Abschnitt dieser Experimentenreihe 0,5 μM bzw. 1 μM Z-VAD-FMK mit jeweils 1 μM BV-6 oder 15 ng/ml TNF- α kombiniert und die Wirkung dieser Kombinationen mit den Einzelwirkungen der Substanzen auf die Zellviabilität der hPAECs verglichen. Die Behandlung der Zellen mit 1 μM des proapoptotischen BV-6 führte zu einer signifikant geringeren Abnahme der Zellviabilität als die kombinierte Behandlung mit 1 μM BV-6 und 0,5 bzw. 1 μM des antiapoptotischen Z-VAD-FMK. Ebenso führte die Kombinationsbehandlung der hPAECs mit Z-VAD-FMK und TNF- α zu einer stärkeren Abnahme der Zellviabilität als die alleinige Behandlung mit TNF- α . Wie oben beschrieben, findet die Nekroptose besonders dann bevorzugt statt, wenn Caspase-8 und IAPs in der Zelle inhibiert oder abwesend sind, sodass die Apoptose nicht stattfinden kann und der Zelltod zeitgleich durch endogene oder exogene Auslöser, wie z.B. Aktivierung des TNF- α -Rezeptors, induziert wird [89]. Aus diesen Ergebnissen lässt sich also schlussfolgern, dass die Senkung der Zellviabilität in den hPAECs, welche mit den oben beschriebenen Wirkstoffkombinationen behandelt wurden, auf die Nekroptose zurückzuführen ist. Dass in diesen Zellen tatsächlich Nekroptose stattfindet, lässt sich mithilfe des hier angewendeten experimentellen Designs nicht eindeutig beweisen. Hierzu sind noch weitere Nachforschungen notwendig, beispielsweise mit Nachweis von DAMPs als zusätzliches Zeichen des nekroptotischen Zelltodes.

4.3.5. Die Wirkung von GSK-872 auf die Zellviabilität von hPAECs

GSK-872 ist ein selektiver RIPK3-Inhibitor und wurde schon in vivo eingesetzt, um die Nekroptose in Rattengehirnen nach einer experimentell induzierten Subarachnoidalblutung zu inhibieren, wodurch der neuronale Schaden vermindert werden konnte [7]. Die oben diskutierten Daten deuten darauf hin, dass die Nekroptose in den hPAECs ebenso wie die Apoptoseresistenz an den PAH-typischen Remodelingprozessen der Lungengefäße beteiligt ist und dass eine Inhibierung der Nekroptose die Apoptoseneigung der jeweiligen Zellen steigert. Daher stellt sich die Frage, ob GSK-872 das Potenzial für einen neuartigen Therapieansatz bei PAH aufweist, da es eine Möglichkeit eröffnen könnte, die Nekroptose in den hPAECs zu inhibieren und gleichzeitig die Sensibilität der Zellen gegenüber der Apoptose wiederherzustellen. Allerdings wurde bei der Behandlung von SVEC, L929, 3T3SA und MEF neben der

antinekroptotischen Wirkung auch eine dosisabhängige zytotoxische Wirkung festgestellt, welche durch Induktion der Apoptose in diesen Zellen bedingt ist. Dies könnte aufgrund der Gefahr schwerer Gefäßschäden für eine Therapie von Nachteil sein, falls der beschriebene Effekt auch bei Zellen der pulmonalen Gefäße zu beobachten wäre [62].

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden hPAEC-Zellkulturen mit GSK-872 behandelt und nach 24h Inkubationszeit die Zellviabilität mittels CellTiter Glo Assay gemessen. Dabei konnte keine signifikante Veränderung der Zellviabilität beobachtet werden, was darauf hinweist, dass die Inhibierung der Nekroptose mithilfe des selektiven RIPK3-Inhibitors GSK-872 zwar die Zellen gegenüber der Apoptose sensibilisiert, was durch die bereits oben diskutierten Ergebnissen gezeigt werden konnte, allerdings ohne den apoptotischen Zelltod direkt auszulösen oder die Zellviabilität zu stören. Es besteht also kein Anhalt für eine maßgebliche zytotoxische Wirkung auf hPAECs durch die verwendeten Konzentrationen von GSK-872. Dieser RIPK3-Inhibitor bleibt also weiterhin interessant für einen zukünftigen klinischen Therapieansatz zur Behandlung der PAH. Aufgrund bisher bisher noch unzureichender Studienlage zur systemischen Wirkung von GSK-872 im menschlichen Organismus, ist hierzu noch weitere Forschung vonnöten.

4.4. Fazit

Obwohl es schon erste Hinweise auf die Beteiligung der Nekroptose an der Entstehung der PAH gibt, ist nur wenig über den genauen Mechanismus bekannt. In den beiden Studien von Xiao et al. und Jarabíková et al. wurden bisher in Ratten mithilfe des MCT-Modells PAH induziert und anschließend Proben aus deren Lungen bzw. aus dem rechten Ventrikel analysiert [45, 109]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals neben der Analyse von Lungengewebe des SuHx-Rattenmodells auch ausgewählte humane Zellarten auf ihr Nekroptose- und Apoptose-Verhalten untersucht, die eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie der PAH innehaben.

Aufgrund vorangegangener Experimente unserer Forschungsgruppe ist bereits bekannt, dass in hPASCs von an PAH erkrankten Patienten und Tieren der PAH-Tiermodelle die Expression von DAPK1 erniedrigt ist [92]. Diese entscheidende PAH-typische Bedingung wurde nun durch den Knockdown von DAPK1 in hPASCs und in hPAECs mithilfe von siRNA-Transfektion simuliert. Sowohl im SuHx-Modell als auch im Zellkulturmodell mit an hPAECs unter DAPK1-Knockdown konnte durch die allgemeine Erhöhung der Nekroptosemarker eine gesteigerte Nekroptose-Aktivität, sowie durch

Verminderung der aktivierten Form von Caspase 8 und des proapoptotischen FADD eine verminderte Apoptoseaktivität mittels Western Blots bestätigt werden, diese Veränderungen waren bei den hPASCs allerdings nicht zu beobachten.

Des Weiteren konnte durch den Knockdown der Nekroptosemarker RIPK1, RIPK3 und MLKL eine zumindest tendenzielle Steigerung der Konzentration proapoptotischer Proteine, wie DAPK1 und p53, sowie eine signifikante Verminderung von Cyclin D1 beobachtet werden. Die Zellviabilität blieb durch den Knockdown dieser drei Proteine allerdings unbeeinflusst. Dies ist als ein mögliches Indiz für eine antagonistische Wechselwirkung zwischen Apoptose und Nekroptose zu werten. Bis dato war vor allem bekannt, dass eine Blockierung der Apoptose zur Aktivierung des Nekroptose-Signalweges beitragen kann. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente liefern nun auch Hinweise darauf, dass die Blockierung des Nekroptose-Signalweges die Sensibilität der hPAECs gegenüber der Apoptose steigert, ohne dabei den unmittelbaren Zelltod auszulösen. Dies ist auch ein vielversprechender Hinweis bei der Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten der PAH, welche auf die Wiederherstellung der Sensibilität betroffener hPAECs gegenüber des apoptotischen Zelltodes abzielen könnten.

Im Zuge dieser Arbeit konnte außerdem ein vielversprechender neuer Ansatz für zukünftige Forschung bezüglich der Nekroptose in hPAECs beschrieben werden. Die Behandlung von hPAECs mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK in Kombination mit BV-6 oder dem Zytokin TNF- α hatten eine signifikante Senkung der Zellviabilität zur Folge. In Anbetracht der bekannten Mechanismen, welche zur Initiierung und den intrazellulären Ablauf der Nekroptose verantwortlich sind, ergibt sich hieraus ein vielversprechendes Zellkulturmodell für die medikamentöse Induktion der Nekroptose in hPAECs. Ob die Reduktion der Zellviabilität tatsächlich auf die Nekroptose oder doch auf einen anderen nicht-apoptotischen Zelltod zurückzuführen ist, müsste durch weitere Forschung noch endgültig geklärt werden.

Um einer neuen Therapiemöglichkeit für die PAH, basierend auf der Erkenntnis der Beteiligung der Nekroptose an der Krankheitsentstehung näherzukommen, wurde GSK-872, ein selektiver RIPK3-Inhibitor näher betrachtet. Laut mehrerer Studien an SVEC, L929, 3T3SA und MEF zeigte GSK-872 abgesehen von der Inhibition der Nekroptose auch eine zytotoxische Wirkung via Aktivierung der Apoptose. Nach Behandlung von hPAECs mit GSK-872 konnte nun allerdings keine signifikante Veränderung der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden, sodass dieser Nekroptoseinhibitor weiterhin für mögliche neue Therapieansätze interessant bleibt.

4.5. Ausblick

Die hier beschriebenen Experimente liefern einen ersten Einblick in den treibenden Einfluss der Nekroptose auf die Genese einer PAH und deren Wechselwirkung auf Apoptose und Zellzyklus. Da die Zellkulturexperimente im Rahmen dieser Arbeit allerdings fast ausschließlich an einer etablierten Zellreihe von hPAECs durchgeführt wurde, bleibt weiterhin die Frage offen, inwieweit dieser alternative Zelltod in anderen Zellarten der Pulmonalgefäße oder der Herzen betroffener Patienten eine Rolle spielt. Ebenso ist zu bedenken, dass die Experimente zur Untersuchung der Nekroptose ausschließlich anhand experimenteller Modelle der PAH durchgeführt wurden. Zum besseren Verständnis der hier untersuchten Zusammenhänge und für eine bessere Vergleichbarkeit mit der PAH beim Menschen, wären Experimente mit aus Patientenlungen und -herzen isolierten hPAECs, hPASCs, pulmonalarteriellen Fibroblasten, und Kardiomyozyten von großer Interesse.

Die Rolle der Nekroptose bei der Entstehung der PAH und der hemmende Einfluss von DAPK1 auf die beteiligten Prozesse macht sowohl die Nekroptose als auch DAPK1 zu vielversprechenden Ansatzpunkten neuer Therapiemöglichkeiten für diese Erkrankung. Besonders die Ergebnisse zu GSK-872 könnten sich hierbei als wegweisend erweisen. Bisher wurde die Hemmung der Nekroptose durch Inhibition von RIPK3 mittels GSK-872 an zahlreichen Zellarten in vitro beobachtet aber auch hier wurden bisher noch nicht mit Zellen aus Patientenlungen gearbeitet. Des Weiteren wurde das Fehlen einer zytotoxischen Wirkung dieses Inhibitors im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit nur an hPAECs getestet. Für zukünftige Experimente wäre es also besonders lohnenswert, die Wirkung von GSK-872 auf hPAECs, hPASCs, pulmonalarteriellen Fibroblasten, und Kardiomyozyten zu eruieren, welche von Patienten mit PAH in verschiedenen Krankheitsstadien isoliert wurden, auch um zu ermitteln, in welchem Stadium mit diesem Wirkstoff am ehesten ein therapeutischer Effekt erzielt werden könnte. In fernerer Zukunft wären auch in vivo-Experimente mit GSK-872 von Interesse, um die systemische Wirkung des Inhibitors zu untersuchen. Auch sollte der Frage eines möglicherweise therapeutischen Nutzens der Expressionssteigerung von DAPK1 zur Normalisierung des Nekroptose- und Apoptoseverhaltens der hPAECs und hPASCs weiter nachgegangen werden.

Um zukünftige Experimente zu erleichtern, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Zellkulturmodell zur medikamentösen Induktion der Nekroptose an hPAECs entwickelt. Die Ergebnisse hierbei weisen auf eine erfolgreiche Initiierung der Nekroptose mithilfe der Wirkstoffe Z-VAD-FMK, BV-6 und TNF- α hin, allerdings konnte

dies aufgrund des experimentellen Designs noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Dies, sowie auch die Übertragbarkeit dieses Modells auf andere Zellarten, ist ein weiterer möglicher Ansatzpunkt zukünftiger Experimente.

Zusammenfassung

Die Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH) ist eine schwerwiegende chronisch-inflammatorische Lungenerkrankung mit sehr schlechter Prognose und bisher nur limitierten Therapiemöglichkeiten, deren Entstehung durch verschiedene Risikofaktoren, wie z. B. genetische Prädisposition oder verschiedene Noxen bedingt sein kann. Im Zuge inflammatorische Prozesse kommt es zu Thrombosen, Vasokonstriktion und vaskulärem Remodeling, was zur Widerstandserhöhung im Lungenkreislauf und infolgedessen im Verlauf zur Rechtsherzbelastung mit Entwicklung eines Cor Pulmonale und schließlich dem Tod durch Rechtsherzversagen führt. Das erwähnte vaskuläre Remodeling ist u. a. gekennzeichnet durch eine gesteigerte Proliferation und Apoptoseresistenz pulmonalarteriellen Zellen und wird durch Gefäßschäden und Inflammation initiiert. Bisher wurden bereits einige Hinweise darauf gefunden, dass die Nekroptose als alternativer programmierter Zelltod, welcher zur Inflammation führt, eine entscheidende Bedeutung bei der Initiierung des vaskulären Remodelings innehaben könnte. Ziel dieser Arbeit ist die Eruiierung dieses Zusammenhangs und der potentiellen Auswirkung der Nekrosom-Formierung auf die PAH.

Zu diesem Zweck wurden zunächst mittels des SuHx-Rattenmodells und Zellkulturexperimenten an hPAECs und hPASMCs Expressionsmuster und Phosphorylierungsstatus der nekroptotischen Proteine RIPK1, RIPK3 und MLKL und der pro-apoptotischen Proteine FADD und Caspase 8 analysiert. Hierfür kamen PCR- und Western Blot-Analysen zum Einsatz, welche eine Erhöhung der Nekroptose- bei erniedrigter Apoptoseanfälligkeit der untersuchten Zellen und Gewebe ergaben. Nach siRNA-Knockdown von RIPK1, RIPK3 und MLKL konnte außerdem eine Steigerung der Expression der pro-apoptotischen Proteine DAPK1 und p53, allerdings ohne Einfluss auf die Zellviabilität beobachtet werden. Dies legt nahe, dass die Hemmung der Necroptose die Sensibilität der Zellen gegenüber Apoptose erhöht, ohne direkt zum Zelltod zu führen. Des Weiteren konnte ein Zellkulturmodell für die Induktion von Nekroptose in hPAECs durch Kombination der Pan-Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK mit BV-6 bzw. TNF- α entwickelt werden. Um neuen Therapiemöglichkeiten näherzukommen, wurden schließlich hPAECs mit dem RIPK3-Inhibitor GSK-872 behandelt, dabei konnte keine Veränderung der Zellviabilität festgestellt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass GSK-872 keine zytotoxische Wirkung auf hPAECs aufweist.

Zusammenfassend konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass die Nekroptose maßgeblich zur Pathogenese und Progression der PAH beiträgt und damit ein attraktives Ziel für die Entwicklung neuer Therapieansätze darstellt, u. a. auch durch Einsatz Nekroptoseinhibitoren, wie dem RIPK3-Inhibitor GSK-872.

Summary

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a severe chronic inflammatory lung disease with poor prognosis and limited treatment options so far, which can be caused by various risk factors such as genetic predisposition or exposure to different toxins. Inflammatory processes leading to thrombosis, vasoconstriction, and vascular remodeling, result in increased resistance in the pulmonary circulation and subsequent right heart strain, development of cor pulmonale, and ultimately death due to right heart failure. The mentioned vascular remodeling is characterized, among other things, by increased proliferation and resistance of apoptosis of pulmonary vascular cells, initiated by vascular damage and inflammation. Some evidence has already been found suggesting that necroptosis, an alternative programmed cell death leading to inflammation, could have a crucial role in initiating vascular remodeling. The aim of this study is to elucidate this connection and to investigate the potential impact of necrosome formation to the PAH.

To this end, expression profiles and phosphorylation status of necroptotic proteins RIPK1, RIPK3, and MLKL, as well as pro-apoptotic proteins FADD and Caspase 8, were initially analyzed using the SuHx rat model of PAH and cell culture experiments involving hPAECs and hPASMCs. PCR and Western blot analyses were employed, revealing an increase in necroptosis and reduced apoptosis susceptibility of the examined cells and tissues. Furthermore, siRNA knockdown of RIPK1, RIPK3, and MLKL resulted in increased expression of pro-apoptotic proteins DAPK1 and p53, without affecting cell viability. This suggests that inhibition of necroptosis increases the sensitivity of cells towards apoptosis without directly leading to cell death. A cell culture model for inducing necroptosis in hPAECs was developed by combining the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK with BV-6 or TNF- α . Finally, to explore new therapeutic possibilities, hPAECs were treated with the RIPK3 inhibitor GSK-872, and no change in cell viability was observed. Thus, it was demonstrated that GSK-872 does not have a cytotoxic effect on hPAECs.

In summary, this thesis has shown that necroptosis significantly contributes to the pathogenesis and progression of PAH, making it an attractive target for the development of new therapeutic approaches, including the use of necroptosis inhibitors such as the RIPK3 inhibitor GSK-872.

Abkürzungsverzeichnis

+	Plus
-	Minus
<	kleiner
>	größer
≤	kleiner oder gleich
≥	größer oder gleich
%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
BM2	Basalmedium 2 (engl. basal medium 2)
BMDM	engl. bone marrow-derived macrophages
BML	Bleomycin
BMPR2	engl. bone morphogenetic rotein receptor type 2
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cAIP1	engl. cellular inhibitor of apoptosis protein 1
ca.	zirka
cAIP2	engl. cellular inhibitor of apoptosis protein 2
CD4	engl. cluster of differentiation 4
cDNA	Komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus (engl. cytomegalovirus)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (engl: chronic obstructive pulmonary disease)
DAI	engl. DNA-dependent factor of interferon
DAMPs	engl. damage-associated molecular patterns
DAPK1	engl. death-associated protein kinase 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)

DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (engl. Dulbeccos phosphate buffered saline)
ECs	Endothelzellen (engl. endothelial cells)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF-2	eukaryotischer Initiationsfaktor 2
eIF-4	eukaryotischer Initiationsfaktor 4
EKG	Elektrokardiogramm
EC GM2	engl. endothelial cell growth medium 2
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERS	Europäische Gesellschaft für Atemwegserkrankungen (engl. European Respiratory Society)
ESC	Europäische Gesellschaft der Kardiologie (engl. European Society of Cardiology)
FADD	engl. fas-associated protein with death domain
FCS	Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FLIP	engl. FLICE-like inhibitory protein
FPAH	Familiäre Pulmonalarterielle Hypertonie
GA-1000	Gentamycin/Amphotericin B
ggf.	gegebenenfalls
GM	Wachstumsmedium (engl. growth medium)
AK	Antikörper
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HIV	engl. human immunodeficiency virus
HMGB1	engl. high-mobility group protein B1
hPAECs	humane pulmonalarterielle Endothelzellen (engl. human pulmonary artery endothelial cells)
hPASMCs	humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (engl. human pulmonary artery smooth muscle cells)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IAP	engl. inhibitors of apoptosis protein
IFN- γ	Interferon γ
IGF- β	engl. Insulin-like growth factor β
IPAH	Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
IPF	idiopathischen Lungenfibrose (engl. idiopathic pulmonary fibrosis)
IL1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6

IL-8	Interleukin 8
IL-12	Interleukin 12
IL-18	Interleukin 18
kDa	Kilodalton
l	Liter
MAPK	engl. mitogen-activated protein kinase
MCT	Monocrotalin
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
ml	Milliliter
MLKL	engl. mixed lineage kinase domain like pseudokinase
mTOR	engl. mammalian target of Rapamycin
mPAP	mittlerer pulmonal arterieller Drucks (engl. mean pulmonary arterial pressure)
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NLR	engl. Nod-like receptor
Nox	Normoxie
NSA	Necrosulfamide
NFκB	nukleärer Faktor κB
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
Opti-MEM	engl. optimized minimal essential medium
p53	Protein 53 kDa
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PASMC	pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (engl. pulmonary artery smooth muscle cells)
PAWP	pulmonal-kapillärer Verschlussdruck (engl. pulmonary arterial wedge pressure)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline)
pH	Potential des Wasserstoffs (lat. potentia hydrogenii)
pMLKL	phosphoriliertes MLKL
pRIPK1	phosphoriliertes RIPK1

pRIPK3	phosphoriliertes RIPK3
PCH	pulmonale kapilläre Hämangiomatose (engl. pulmonary capillary hemangiomatosis)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PH	Pulmonale Hypertonie
PPHN	persistente PH des Neugeborenen
PVOD	pulmonale veno-okklusive Erkrankung (engl. pulmonary veno-occlusive disease)
PVR	pulmonal vaskulären Widerstand (engl. pulmonary vascular resistance)
RHD	engl. receptor homology domain
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay
RIPK1	engl. receptor interacting protein kinase 1
RIPK3	engl. receptor interacting protein kinase 3
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
rpm	Umdrehung pro Minute (engl. rounds per minute)
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	engl. small interfering RNA
SMC	glatte Muskelzellen (engl. smooth muscle cells)
Sm GM2	engl. smooth muscle cell growth medium 2
SuHx	Sugen-Hypoxie
TBS	engl. TRIS buffered saline
TBST	engl. TRIS buffered saline in TWEEN 20
TGF- β	engl. transforming growth factor β
TNF- α	Tumornekrose-Faktor α
TNFR1	TNF-Rezeptor 1
TLR	engl. Toll-like receptor
TRADD	engl. tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain protein
TRAF2	engl. TNF receptor associated factor 2
TRAF5	engl. TNF receptor associated factor 5
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
USP22	Ubiquitin-spezifische Peptidase 22 (engl. ubiquitin specific peptidase 22)

V	Volt
VEGF	Gefäßendothelialer Wachstumsfaktor (engl. vascular endothelial growth factor)
WB	Western Blot
WSPH	Welt-Symposium für Pulmonale Hypertonie
WU	Wood-Einheiten (engl. wood unit)
xIAP	engl. x-linked Inhibitor of Apoptosis
z.B.	Zum Beispiel
ZIPK	ZIP-Kinase (engl. zipper interacting protein kinase)
Z-VAD-FMK	engl. carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-(O-methyl)- fluoromethylketone

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung der TNF- α -abhängige Nekroptose	S. 8
Abbildung 2	Anordnung der Proben für die PCR	S. 28
Abbildung 3	Expression von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf RNA-Ebene im SuHx-Rattenmodell	S. 43
Abbildung 4	Expression auf Proteinebene und Phosphorylierung von RIPK3 im SuHx-Rattenmodell	S. 44
Abbildung 5	Expression auf Proteinebene und Phosphorylierung bzw. Spaltung von MLKL und Caspase 8 im SuHx-Rattenmodell	S. 45
Abbildung 6	Expression von FADD auf Proteinebene und Phosphorylierung von RIPK1, RIPK2 und MLKL in hPASCs und hPAECs nach Knockdown von DAPK1	S. 47
Abbildung 7	Einfluss des Knockdowns von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf die Expression von DAPK1, p53 und Cyclin D1	S. 49
Abbildung 8	Einfluss des Knockdowns von RIPK1, RIPK3 und MLKL auf die Zellviabilität in Relation zu siscr	S. 50
Abbildung 9	Wirkung von Z-VAD-FMK bzw. von BV-6 in verschiedenen Konzentrationen auf hPAECs	S. 51
Abbildung 10	Wirkung von Z-VAD-FMK bzw. von BV-6 in verschiedenen Konzentrationen auf hPAECs	S. 53
Abbildung 11	Wirkung von GSK'872 in verschiedenen Konzentrationen auf die Zellviabilität von hPAECs im Verhältnis zu FCS	S. 54
Abbildung 12	Struktur und Wirkungsweise von Z-VAD-FMK und BV-6	S. 65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	klinische Klassifikation der PH	S. 2
Tabelle 2	Risikofaktoren für die Entstehung einer medikamenten-induzierten PAH	S. 4
Tabelle 3	Labortechnische Apparaturen und Instrumente	S. 15-16
Tabelle 4	Verbrauchsmaterialien	S. 17-18
Tabelle 5	Reagenzien, Chemikalien und Lösungen	S. 18-20
Tabelle 6	Zellen, Zellkulturmedien und weitere Substanzen	S. 20
Tabelle 7	Antikörper und siRNAs	S. 21-22
Tabelle 8	Primer	S. 22
Tabelle 9	Kits	S. 23
Tabelle 10	Mastermix 1	S. 26
Tabelle 11	Mastermix 2	S. 26
Tabelle 12	PCR-Mix	S. 27
Tabelle 13	Ablauf der PCR	S. 29
Tabelle 14	Zusammensetzung der Standards für die Proteinquantifizierung	S. 39

Literaturverzeichnis

1. Bauer EM., Shapiro R, Zheng H, Ahmad F, Ishizawar D, Comhair SA., *et al.*: High mobility group box 1 contributes to the pathogenesis of experimental pulmonary hypertension via activation of Toll-like receptor 4. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 2013, Band 18: 1509–1518.
2. Boutet K, Frachon I, Jobic Y, Gut-Gobert C, Leroyer C, Carlhant-Kowalski D, *et al.*: Fenfluramine-like cardiovascular side-effects of benfluorex. *The European respiratory journal* 2009, Band 33: 684–688.
3. Bueno-Beti C, Hadri L, Hajjar RJ., Sassi Y: The Sugden 5416/Hypoxia Mouse Model of Pulmonary Arterial Hypertension. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2018, Band 1816: 243–252.
4. Caccamo A, Branca C, Piras IS., Ferreira E, Huentelman MJ., Liang WS., *et al.*: Necroptosis activation in Alzheimer's disease. *Nature neuroscience* 2017, Band 20: 1236–1246.
5. Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang H-C, Choksi S, Liu J, *et al.*: Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nature cell biology* 2014, Band 16: 55–65.
6. Chen J-J: Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias. *Blood* 2007, Band 109: 2693–2699.
7. Chen T, Pan H, Li J, Xu H, Jin H, Qian C, *et al.*: Inhibiting of RIPK3 attenuates early brain injury following subarachnoid hemorrhage: Possibly through alleviating necroptosis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2018, Band 107: 563–570.
8. Cho YSik, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TDutta, Guildford M, Chan FKa-Ming: Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 2009, Band 137: 1112–1123.
9. Chuang Y-T, Fang L-W, Lin-Feng M-H, Chen R-H, Lai M-Z: The tumor suppressor death-associated protein kinase targets to TCR-stimulated NF-kappa B activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2008, Band 180: 3238–3249.
10. Cool CD., Stewart JScott, Werahera P, Miller GJ., Williams RL., Voelkel NF., Tuder RM.: Three-Dimensional Reconstruction of Pulmonary Arteries in Plexiform Pulmonary Hypertension Using Cell-Specific Markers. *The American Journal of Pathology* 1999, Band 155: 411–419.
11. Dai W, Cheng J, Leng X, Hu X, Ao Y: The potential role of necroptosis in clinical diseases (Review). *International journal of molecular medicine* 2021, Band 47
12. D'Alonzo GE., Barst RJ., Ayres SM., Bergofsky EH., Brundage BH., Detre KM., *et al.*: Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Annals of internal medicine* 1991, Band 115: 343–349.
13. Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL., Korkina O, Teng X, *et al.*: Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature chemical biology* 2008, Band 4: 313–321.
14. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, *et al.*: Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology* 2005, Band 1: 112–119.
15. Degterev A, Zhou W, Maki JL., Yuan J: Assays for necroptosis and activity of RIP kinases. *Methods in enzymology* 2014, Band 545: 1–33.
16. Deiss LP., Feinstein E, Berissi H, Cohen O, Kimchi A: Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes & development* 1995, Band 9: 15–30.
17. Delom F: Pulmonary Arterial Hypertension and Cancer: An Update on Their Similarities. *ARRB* 2014, Band 4: 20–37.

18. Dhuriya YK., Sharma D: Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of neuroinflammation* 2018, Band 15: 199.
19. Dobbelstein M, Shenk T: Protection against apoptosis by the vaccinia virus SPI-2 (B13R) gene product. *Journal of virology* 1996, Band 70: 6479–6485.
20. Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, *et al.*: Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *The Journal of clinical investigation* 2001, Band 108: 1141–1150.
21. Farber HW., Miller DP., Poms AD., Badesch DB., Frost AE., Muros-Le Rouzic E, *et al.*: Five-Year outcomes of patients enrolled in the REVEAL Registry. *Chest* 2015, Band 148: 1043–1054.
22. Fishman AP.: Aminorex to fen/phen: an epidemic foretold. *Circulation* 1999, Band 99: 156–161.
23. Frazier AAnn, Franks TJ., Mohammed T-LH., Ozbudak IH., Galvin JR.: From the Archives of the AFIP: pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomatosis. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 2007, Band 27: 867–882.
24. Gade P, Manjegowda SB., Nallar SC., Maachani UB., Cross AS., Kalvakolanu DV.: Regulation of the death-associated protein kinase 1 expression and autophagy via ATF6 requires apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and cellular biology* 2014, Band 34: 4033–4048.
25. Galiè N, McLaughlin VV., Rubin LJ., Simonneau G: An overview of the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension. *The European respiratory journal* 2019, Band 53
26. Gleason CA., Juul SE.: *Avery's Diseases of the newborn*. Elsevier, Philadelphia, PA 2018
27. Gong Y, Fan Z, Luo G, Yang C, Huang Q, Fan K, *et al.*: The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular cancer* 2019, Band 18: 100.
28. Gozuacik D, Bialik S, Raveh T, Mitou G, Shohat G, Sabanay H, *et al.*: DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell death and differentiation* 2008, Band 15: 1875–1886.
29. Gozuacik D, Kimchi A: DAPk protein family and cancer. *Autophagy* 2006, Band 2: 74–79.
30. Guignabert C, Dorfmüller P: Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *Seminars in respiratory and critical care medicine* 2013, Band 34: 551–559.
31. Günther S, Behr J, Knoop H: Medikamenten-induzierte pulmonale Hypertonie - eine aktuelle Übersicht. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 2016, Band 70: 320–327.
32. Gurtner HP.: Aminorex and pulmonary hypertension. A review. *Cor et vasa* 1985, Band 27: 160–171.
33. Han J, Zhong C-Q, Zhang D-W: Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nature immunology* 2011, Band 12: 1143–1149.
34. Harris PA., Berger SB., Jeong JU., Nagilla R, Bandyopadhyay D, Campobasso N, *et al.*: Discovery of a First-in-Class Receptor Interacting Protein 1 (RIP1) Kinase Specific Clinical Candidate (GSK2982772) for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Journal of medicinal chemistry* 2017, Band 60: 1247–1261.
35. He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X: Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell* 2009, Band 137: 1100–1111.
36. Heinkelein M, Pilz S, Jassoy C: Inhibition of CD95 (Fas/Apo1)-mediated apoptosis by vaccinia virus WR. *Clinical and experimental immunology* 1996, Band 103: 8–14.

37. Henshall DC., Araki T, Schindler CK., Shinoda S, Lan J-Q, Simon RP.: Expression of death-associated protein kinase and recruitment to the tumor necrosis factor signaling pathway following brief seizures. *Journal of neurochemistry* 2003, Band 86: 1260–1270.
38. Hoeper MM., Bogaard HJan, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, *et al.*: Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013, Band 62: D42-50.
39. Hoeper MM., Ghofrani H-A, Grünig E, Klose H, Olschewski H, Rosenkranz S: Pulmonary Hypertension. *Deutsches Aerzteblatt Online* 2017
40. Hoeper MM., Ghofrani HA., Gorenflo M, Grünig E, Rosenkranz S, Schranz D: Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie. *Kardiologe* 2010, Band 4: 189–207.
41. Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM., Badagliacca R, Berger RM. F., Brida M, *et al.*: 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European heart journal* 2022, Band 43: 3618–3731.
42. Humbert M, Morrell NW., Archer SL., Stenmark KR., MacLean MR., Lang IM., *et al.*: Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2004, Band 43: 13S-24S.
43. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, *et al.*: Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation* 2010, Band 122: 156–163.
44. Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, Kopolovic J, Vadai E, Eisenbach L, Kimchi A: DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 1997, Band 390: 180–184.
45. InvivoGen: IAP inhibitor - BV6. <https://www.invivogen.com/bv6>. [Stand: 21.01.2024].
46. InvivoGen: Pan-Caspase inhibitor - Z-VAD-FMK. <https://www.invivogen.com/z-vad-fmk>. [Stand: 21.01.2024].
47. Jang C-W, Chen C-H, Chen C-C, Chen J, Su Y-H, Chen R-H: TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nature cell biology* 2002, Band 4: 51–58.
48. Jarabicová I, Horváth C, Velasová E, Bies Piváčková L, Vetešková J, Klimas J, *et al.*: Analysis of necroptosis and its association with pyroptosis in organ damage in experimental pulmonary arterial hypertension. *Journal of cellular and molecular medicine* 2022, Band 26: 2633–2645.
49. Jasmin JF., Lucas M, Cernacek P, Dupuis J: Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2001, Band 103: 314–318.
50. Kaiser WJ., Sridharan H, Huang C, Mandal P, Upton JW., Gough PJ., *et al.*: Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *The Journal of biological chemistry* 2013, Band 288: 31268–31279.
51. Kaiser WJ., Upton JW., Mocarski ES.: Viral modulation of programmed necrosis. *Current opinion in virology* 2013, Band 3: 296–306.
52. Karunakaran D, Geoffrion M, Wei L, Gan W, Richards L, Shangari P, *et al.*: Targeting macrophage necroptosis for therapeutic and diagnostic interventions in atherosclerosis. *Science advances* 2016, Band 2: e1600224.
53. Kato T, Kitamura H, Kanisawa M: Comparative effects of isosorbide dinitrate, prednisolone, indomethacin, and elastase on the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Experimental and Molecular Pathology* 1989, Band 50: 303–315.
54. Kettle S, Alcamí A, Khanna A, Ehret R, Jassoy C, Smith GL.: Vaccinia virus serpin B13R (SPI-2) inhibits interleukin-1beta-converting enzyme and protects virus-

- infected cells from TNF- and Fas-mediated apoptosis, but does not prevent IL-1beta-induced fever. *The Journal of general virology* 1997, 78 (Pt 3): 677–685.
55. Khoury MK., Gupta K, Franco SR., Liu B: Necroptosis in the Pathophysiology of Disease. *The American Journal of Pathology* 2020, Band 190: 272–285.
 56. Lau EM. T., Tamura Y, McGoon MD., Sitbon O: The 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: a practical chronicle of progress. *The European respiratory journal* 2015, Band 46: 879–882.
 57. Lee J-M, Yoshida M, Kim M-S, Lee J-H, Baek A-R, Jang ASoo, *et al.*: Involvement of Alveolar Epithelial Cell Necroptosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2018, Band 59: 215–224.
 58. Li J-X, Feng J-M, Wang Y, Li X-H, Chen X-X, Su Y, *et al.*: The B-Raf(V600E) inhibitor dabrafenib selectively inhibits RIP3 and alleviates acetaminophen-induced liver injury. *Cell death & disease* 2014, Band 5: e1278.
 59. Li S, Ning L-G, Lou X-H, Xu G-Q: Necroptosis in inflammatory bowel disease and other intestinal diseases. *World journal of clinical cases* 2018, Band 6: 745–752.
 60. Louhimo J, Steer ML., Perides G: Necroptosis Is an Important Severity Determinant and Potential Therapeutic Target in Experimental Severe Pancreatitis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 2016, Band 2: 519–535.
 61. Machado RD., Aldred MA., James V, Harrison RE., Patel B, Schwalbe EC., *et al.*: Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Human mutation* 2006, Band 27: 121–132.
 62. Mandal P, Berger SB., Pillay S, Moriwaki K, Huang C, Guo H, *et al.*: RIP3 induces apoptosis independent of pronecrotic kinase activity. *Molecular cell* 2014, Band 56: 481–495.
 63. Marcos E, Fadel E, Sanchez O, Humbert M, Dartevielle P, Simonneau G, *et al.*: Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circulation research* 2004, Band 94: 1263–1270.
 64. Maron BA., Galiè N: Diagnosis, Treatment, and Clinical Management of Pulmonary Arterial Hypertension in the Contemporary Era: A Review. *JAMA cardiology* 2016, Band 1: 1056–1065.
 65. Martinet W, Meyer GR. Y. de, Timmermans J-P, Herman AG., Kockx MM.: Macrophages but not smooth muscle cells undergo benzyloxycarbonyl-Val-Ala-DL-Asp(O-Methyl)-fluoromethylketone-induced nonapoptotic cell death depending on receptor-interacting protein 1 expression: implications for the stabilization of macrophage-rich atherosclerotic plaques. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2006, Band 317: 1356–1364.
 66. Martinet W, Schrijvers DM., Herman AG., Meyer GR. Y. de: z-VAD-fmk-induced non-apoptotic cell death of macrophages: possibilities and limitations for atherosclerotic plaque stabilization. *Autophagy* 2006, Band 2: 312–314.
 67. McLaughlin VV., Archer SL., Badesch DB., Barst RJ., Farber HW., Lindner JR., *et al.*: ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association: developed in collaboration with the American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, Inc., and the Pulmonary Hypertension Association. *Circulation* 2009, Band 119: 2250–2294.
 68. Micheau O, Tschopp J: Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell* 2003, Band 114: 181–190.
 69. Michie AM., McCaig AM., Nakagawa R, Vukovic M: Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: regulation in cancer. *The FEBS journal* 2010, Band 277: 74–80.

70. Minagawa S, Yoshida M, Araya J, Hara H, Imai H, Kuwano K: Regulated Necrosis in Pulmonary Disease. A Focus on Necroptosis and Ferroptosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2020, Band 62: 554–562.
71. Mitani Y, Mutlu A, Russell JC., Brindley DN., DeAlmeida J, Rabinovitch M: Dexfenfluramine protects against pulmonary hypertension in rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 2002, Band 93: 1770–1778.
72. Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, *et al.*: Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation research* 1993, Band 73: 887–897.
73. Mizumura K, Cloonan SM., Nakahira K, Bhashyam AR., Cervo M, Kitada T, *et al.*: Mitophagy-dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD. *The Journal of clinical investigation* 2014, Band 124: 3987–4003.
74. Mocarski ES., Upton JW., Kaiser WJ.: Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nature reviews. Immunology* 2011, Band 12: 79–88.
75. Montani D, Günther S, Dorfmüller P, Perros F, Girerd B, Garcia G, *et al.*: Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet journal of rare diseases* 2013, Band 8: 97.
76. Montani D, Seferian A, Savale L, Simonneau G, Humbert M: Drug-induced pulmonary arterial hypertension: a recent outbreak. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 2013, Band 22: 244–250.
77. Murphy JM., Czabotar PE., Hildebrand JM., Lucet IS., Zhang J-G, Alvarez-Diaz S, *et al.*: The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity* 2013, Band 39: 443–453.
78. Newton K, Dugger DL., Wickliffe KE., Kapoor N, Almagro MCristina de, Vucic D, *et al.*: Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* 2014, Band 343: 1357–1360.
79. Oberst A, Dillon CP., Weinlich R, McCormick LL., Fitzgerald P, Pop C, *et al.*: Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* 2011, Band 471: 363–367.
80. Oerlemans MI. F. J., Liu J, Arslan F, Ouden K den, van Middelaar BJ., Doevendans PA., Sluijter JP. G.: Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo. *Basic research in cardiology* 2012, Band 107: 270.
81. Olschewski H, Hoepfer MM., Borst MM., Ewert R, Grünig E, Kleber F-X, *et al.*: Diagnostik und Therapie der chronischen pulmonalen Hypertonie. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 2006, Band 60: 749–771.
82. Pouwels SD., Hesse L, Faiz A, Lubbers J, Bodha PK., Hacken NH. T. ten, *et al.*: Susceptibility for cigarette smoke-induced DAMP release and DAMP-induced inflammation in COPD. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2016, Band 311: L881-L892.
83. Pouwels SD., Zijlstra GJan, van der Toorn M, Hesse L, Gras R, Hacken NH. T. ten, *et al.*: Cigarette smoke-induced necroptosis and DAMP release trigger neutrophilic airway inflammation in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2016, Band 310: L377-86.
84. Rabe KF., Watz H: Chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* 2017, Band 389: 1931–1940.
85. Rai PR., Cool CD., King JA. C., Stevens T, Burns N, Winn RA., *et al.*: The cancer paradigm of severe pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2008, Band 178: 558–564.
86. Raveh T, Droguett G, Horwitz MS., DePinho RA., Kimchi A: DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nature cell biology* 2001, Band 3: 1–7.

87. Roth RA., Dotzlafl LA., Baranyi B, Kuo C-H, Hook JB.: Effect of monocrotaline ingestion on liver, kidney, and lung of rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1981, Band 60: 193–203.
88. Sahay S: Evaluation and classification of pulmonary arterial hypertension. *Journal of thoracic disease* 2019, Band 11: S1789-S1799.
89. Sauler M, Bazan IS., Lee PJ.: Cell Death in the Lung: The Apoptosis-Necroptosis Axis. *Annual review of physiology* 2019, Band 81: 375–402.
90. Selman M, King TE., Pardo A: Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Annals of internal medicine* 2001, Band 134: 136–151.
91. Selman M, Pardo A: Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2006, Band 3: 364–372.
92. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS., Denton CP., Gatzoulis MA., Krowka M, *et al.*: Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 2019, Band 53
93. Smith CAnne: Die Rolle der Serin/Threonin-Proteinkinase DAPK1 in der pulmonalen Hypertonie
94. Smith CC. T., Davidson SM., Lim SY., Simpkin JC., Hothersall JS., Yellon DM.: Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent? *Cardiovascular drugs and therapy* 2007, Band 21: 227–233.
95. Sonenberg N, Hinnebusch AG.: Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 2009, Band 136: 731–745.
96. Stacher E, Graham BB., Hunt JM., Gandjeva A, Groshong SD., McLaughlin VV., *et al.*: Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2012, Band 186: 261–272.
97. Stenmark KR., Meyrick B, Galie N, Mooi WJ., McMurtry IF.: Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2009, Band 297: L1013-32.
98. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, *et al.*: Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* 2012, Band 148: 213–227.
99. Taraseviciene-Stewart L, Nicolls MR., Kraskauskas D, Scerbavicius R, Burns N, Cool C, *et al.*: Absence of T cells confers increased pulmonary arterial hypertension and vascular remodeling. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2007, Band 175: 1280–1289.
100. Thapa RJ., Nogusa S, Chen P, Maki JL., Lerro A, Andrade M, *et al.*: Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, Band 110: E3109-18.
101. Thomson JR., Machado RD., Pauciulo MW., Morgan NV., Humbert M, Elliott GC., *et al.*: Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *Journal of medical genetics* 2000, Band 37: 741–745.
102. Upton JW., Kaiser WJ., Mocarski ES.: Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell host & microbe* 2010, Band 7: 302–313.
103. Upton JW., Kaiser WJ., Mocarski ES.: DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell host & microbe* 2012, Band 11: 290–297.
104. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P: Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2014, Band 15: 135–147.

105. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G: Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2010, Band 11: 700–714.
106. Wang W-J, Kuo J-C, Yao C-C, Chen R-H: DAP-kinase induces apoptosis by suppressing integrin activity and disrupting matrix survival signals. *The Journal of cell biology* 2002, Band 159: 169–179.
107. Wilson DW., Segall HJ., Pan LC.W., Dunston SK.: Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvascular Research* 1989, Band 38: 57–80.
108. Wu J, Huang Z, Ren J, Zhang Z, He P, Li Y, *et al.*: Mkl1 knockout mice demonstrate the indispensable role of Mkl1 in necroptosis. *Cell research* 2013, Band 23: 994–1006.
109. Wu Y-H, Chou T-F, Young L, Hsieh F-Y, Pan H-Y, Mo S-T, *et al.*: Tumor suppressor death-associated protein kinase 1 inhibits necroptosis by p38 MAPK activation. *Cell death & disease* 2020, Band 11: 305.
110. Xiao G, Zhuang W, Wang T, Lian G, Luo L, Ye C, *et al.*: Transcriptomic analysis identifies Toll-like and Nod-like pathways and necroptosis in pulmonary arterial hypertension. *Journal of cellular and molecular medicine* 2020, Band 24: 11409–11421.
111. Yang S-H, Lee DKenneth, Shin J, Lee S, Baek S, Kim J, *et al.*: Nec-1 alleviates cognitive impairment with reduction of A β and tau abnormalities in APP/PS1 mice. *EMBO molecular medicine* 2017, Band 9: 61–77.
112. Yenari MA., Kauppinen TM., Swanson RA.: Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2010, Band 7: 378–391.
113. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, *et al.*: Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science (New York, N.Y.)* 2004, Band 304: 1500–1502.
114. Yuan J, Amin P, Ofengeim D: Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases. *Nature reviews. Neuroscience* 2019, Band 20: 19–33.
115. Zemsanova M, McClain N, Niihori M, Varghese MV., James J, Rafikov R, Rafikova O: Necrosis-Released HMGB1 (High Mobility Group Box 1) in the Progressive Pulmonary Arterial Hypertension Associated With Male Sex. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 2020, Band 76: 1787–1799.
116. Zhang D-W, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu B-J, Lin S-C, *et al.*: RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science (New York, N.Y.)* 2009, Band 325: 332–336.
117. Zhou T, Wang Q, Phan N, Ren J, Yang H, Feldman CC., *et al.*: Identification of a novel class of RIP1/RIP3 dual inhibitors that impede cell death and inflammation in mouse abdominal aortic aneurysm models. *Cell death & disease* 2019, Band 10: 226.

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Lucka, 17.07.2025

Laura Schellbach

Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralph Schermuly für die Möglichkeit der Mitwirkung an einem wissenschaftlichen Forschungsprojekt und die Hilfe bei der Organisation und Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Ein besonders großer Dank gilt meiner Betreuerin und Projektleiterin Dr. Tanya Novoyatleva für die gemeinsame Planung der Experimente und ihre Bereitschaft zur ständigen Hilfestellung bei Fragen und Unklarheiten zu den Experimenten und dem Schreiben dieser Dissertation.

Des Weiteren möchte ich mich bei Carina Lepper, Dr. Swathi Veeroju und insbesondere Dr. Nabham Rai für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft, Motivation und für die Schaffung einer Arbeitsatmosphäre danken, in der man sich wohl fühlen kann.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die in allen Lebenslagen an meiner Seite standen und ohne deren Unterstützung die Arbeit an dieser Dissertation niemals möglich gewesen wäre.