

Aus dem Herzzentrum der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. St. Baldus

Die Bedeutung MLKL- und RIPK1 vermittelter nekroptotischer Prozesse in der
Pathophysiologie der abdominalen Aortenaneurysmen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Gülşah Fülgen Schwab
aus Bonn

promoviert am 02. September 2022

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Privatdozent Dr. med. M. Adam
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. H. Walczak

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Dr. rer. nat. Martin Mollenhauer
Privatdozent Dr. med. Matti Adam

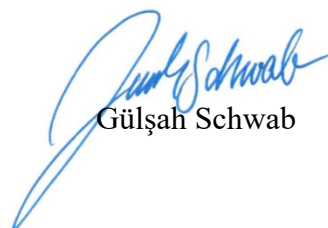
Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/ eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten der Universität zu Köln gelesen und sie bei der Durchführung der Dissertation beachtet habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, 23.09.2021


Gülşah Schwab

Die Elastase-Operationen an den Versuchstieren wurden vom Biologisch-Technischen-Assistenten Herrn Simon Grimm übernommen.

Die Pumpenimplantationen an den Versuchstieren wurden von mir selbst, nach Einweisung durch Herrn Dr. Dennis Mehrkens, in den Laborräumen der Arbeitsgruppe aus der Klinik für Kardiologie in der Universitätsklinik Köln, durchgeführt.

Die Organentnahmen wurden nach Einweisung von Herrn Dr. Senai Bokredenghel vollständig von mir übernommen.

Die echokardiographischen Untersuchungen der Versuchstiere in Narkose erfolgte mit Unterstützung von Herrn Dr. Dennis Mehrkens und Herrn Dr. Senai Bokredenghel. Die Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Senai Bokredenghel.

Die Anfertigung der histologischen Schnitte und die anschließenden Färbungen wurden vollständig von mir übernommen. Bei der α -SMA immunhistochemischen Färbung erhielt ich bei der Vorbereitung und Anfertigung Unterstützung von der Biologielaborantin Frau Nadja Kulesza.

Unterstützung in den Zellkulturversuchen erhielt ich von Herrn Dr. Senai Bokredenghel. Die Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Martin Mollenhauer.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. med. Matti Adam für die Überlassung des Themas sowie die erfahrene Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern Herrn Dr. rer. nat. Martin Mollenhauer und Frau Dr. rer. nat. Anna Klinke, die mir jederzeit bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit außerordentlich wertvolle Unterstützung zukommen ließen.

Danken möchte ich Herrn Simon Grimm und Frau Nadja Kulesza für die technische Unterstützung dieser Arbeit.

Dem gesamten Team der Arbeitsgruppe möchte ich für die familiäre Atmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung und Anleitung über die gesamte Zeit meiner Arbeit danken.

Der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Manolis Pasparakis danke ich für die Bereitstellung der Versuchstiere.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Gülgün und Hayrettin Duman, ohne deren Unterstützung mein Studium nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Schwiegereltern Claudia und Werner Schwab danke ich für die vielen lieben Worte während des Studiums und der Erarbeitung meiner Doktorarbeit.

Meinem Mann Sebastian Schwab möchte ich sehr für seine Geduld und seine emotionale Unterstützung danken. Durch deine Ermutigungen und deine Zusprüche hast du einen großen Beitrag bei der Fertigstellung meiner Dissertation geleistet. Du bist immer bereit das Beste für mich zu tun und dafür danke ich dir sehr.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung

A.
Aa., Ae.
AA
AAA
Abb.
A. dest
AS
Ang II, AT II
BL
B-Mode
DAMPs
DAPI
EC, ECs
ECM
FB, FBs
foi
forward primer
GAGs
HE
HAOSMCs
IL
IL-6
IL-1 β , IL-1B
IVC
KG
KO
Ktr
LAX

Wortlaut

Arterie
Arterien
Aortenaneurysma
abdominelles Aortenaneurysma
Abbildung
lat. Aqua destillata (=destilliertes Wasser)
Aminosäure
Angiotensin II
Baseline
Brightness-Modulation
engl. damage-associated molecular patterns
(=schadenassoziierte molekulare Muster)
4',6-Diamidin-2-phenylindol
(=Fluoreszenzfarbstoff)
engl. endothelial cells (=Endothelzellen)
engl. extracellular matrix (extrazelluläre
Matrix)
engl. fibroblasts (=Fibroblasten)
gemeint ist hier: field of interest
engl., Vorwärtsprimer
Glykosaminoglykane
Hämatoxylin-Eosin
humane aortale SMCs
Interleukin
Interleukin 6
Interleukin 1 β , Interleukin 1B
Individuell ventilierte Käfige
Körpergewicht
Knock-out
Kontrolle
lange Achse an der Aorta abdominalis

LV	linker Ventrikel im Herzen
MLKL	engl. Mixed lineage Kinase Like (=gemischte Abstammung Kinase-ähnliche Domäne Kinase)
Mkl ^{-/-}	MLKL Knock-out Maus
M-Mode	Motion-Mode
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MOVAS	engl. Primary vascular aortic smooth muscle cells (=primäre glatte Muskelzellen der Mausgefäßaorta)
mRNA	engl. messenger RNA (=Boten-RNA)
MPT	mitochondriale Membranpermeabilitätsübergang
n	Anzahl
Nec-1	Necrostatin-1 (=selektiver Inhibitor der Nekroptose)
Nec-1s	Necrostatin-1s
NET	engl. neutrophil extracellular traps (=Neutrophile extrazelluläre Fallen)
ns	nicht signifikant
p	p-Wert, statistische Signifikanz
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin (Antibiotikum)
PG, PGs	Proteoglykane
PMNs	polymorphkernige Leukozyten
PPE	engl. pancreas porcine elastase (=Schweine-Elastase der Bauchspeicheldrüse)
reverse Primer	engl. Rückwärtsprimer
RHIM	RIP-Interaktionsmotiv
RIP	engl. Receptor-interacting protein (=Rezeptor-interagierendes Protein)
RIPK1, RIP1	engl. Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1, Receptor-interacting protein 1 (=Rezeptor-interagierende Serin/Threonin-Kinase 1)
Ripk1 ^{KD}	andere Bezeichnung für Ripk1 ^{D138N/D138N} Maus, Ripk1 ^{KD} =RIPK1 Kinase inaktive, defiziente Maus

RIPK3	Rezeptor-interagierende Serin/Threonin-Kinase 3
ROS	engl. Reactive oxygen species (=reaktive Sauerstoffspezies)
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
SAX	kurze Achse an der Aorta abdominalis
s.c.	subkutan
SMC, plural: SMCs	engl. smooth muscle cells (= glatte Muskelzellen)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNF/TNFR-Superfamilie	Tumornekrosefaktor/Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
V.	Vene
WT	Wildtypmaus
zVADfmk, zVAD	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (=irreversibler Pan-Caspase-Inhibitor)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: A) Skizze der Aorta. 1 - Truncus brachiocephalicus, 2 - A. carotis communis, 3 - A. subclavia sinistra, 4 - Aa. renales, 5 - Aa. iliacae communes.

B) Ausschnitt aus der Aorta abdominalis einer WT Baseline Maus. 1 - Tunica intima, 2 - Tunica media, 3 - Tunica adventitia, L - Lumen. HE-Färbung. Maßstab: 50 µm. 20x Vergrößerung. **S. 16**

Abb. 2: Skizze. Die Apoptose der SMCs in der Tunica media ist ein zentrales Ereignis bei der Entwicklung vom AAA. Apoptose-assoziierte Freisetzung von DAMP ist ein schwacher Induktor der Inflammation. DAMP: damage-associated molecular patterns. **S. 21**

Abb. 3: Übersichtsskizze der Apoptose und der Nekroptose. Die Skizze zeigt die Rolle einzelner Proteine in der Ausbildung der Apoptose und der Nekroptose.

FADD: Fas-Associating Death Domain-Containing Protein (=Fas-assoziiertes Todesdomänen haltiges Protein), TNF R1: Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1, TRADD: TNFR1-associated death domain protein (=TNFR1-assoziiertes Todesdomänenprotein), CYLD: Cylindromatosis tumor suppressor gene (=Tumorsuppressorgen für Zylindromatose), cIAP1: Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 (=zellulärer Inhibitor des Apoptoseproteins 1), Traf2: TNF receptor-associated factor 2 (=TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 2), Casp8: Caspase 8. **S. 23**

Abb. 4: Skizze. Die Nekroptose der SMCs in der Tunica media ist ein zentrales Ereignis bei der Entwicklung vom AAA. Die Aktivierung der Nekroptose über RIPK1, RIPK3 und MLKL bewirkt eine erhöhte Freisetzung von DAMPs, die im Vergleich mit der DAMP-Freisetzung bei der Apoptose als starker Induktor der Inflammation gilt. **S. 24**

Abb. 5: Skizze über murine AAA Mausmodelle Ang II und PPE. Angaben zum zeitlichen Verlauf der echokardiographischen Untersuchungen der drei Monate alten männlichen Mäuse. **S. 39**

Abb. 6: Skizze. Auswirkung von TNF- α , zVADfmk und Necrostatin-1 auf glatte Muskelzellen (SMCs). **S. 45**

Abb. 7: mRNA Expression von MLKL-, IL-6-, TNF- α - und IL-1 β - in humanen SMCs in Relation zur Kontrollgruppe in % nach 8 Stunden. **A)** MLKL Expression, **B)** IL-6 Expression, **C)** IL-1 β Expression. (A) Kontrolle n=8, TNF- α n=7, TNF- α + zVAD n=7, TNF- α + zVAD + Nec-1 n=8; B) Kontrolle n=8, TNF- α n=8, TNF- α + zVAD n=8, TNF- α + zVAD + Nec-1 n=8; C) Kontrolle n=8, TNF- α n=8, TNF- α + zVAD n=8, TNF- α + zVAD + Nec-1 n=8); (* = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001). **S. 54**

Abb. 8: mRNA Expression von IL-6 nach TNF- α Behandlung in murinen SMCs. mRNA Expression in Relation zur WT Kontrolle (%) nach 8 Stunden. (WT Kontrolle n=13, WT + TNF- α n=17, Ripk1^{KD} Kontrolle n=14, Ripk1^{KD} + TNF- α n=18, Mlkl^{-/-} Kontrolle n=13, Mlkl^{-/-} + TNF- α n=18); (ns = p>0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001). **S. 56**

Abb. 9: relative mRNA Expression von MLKL in murinen WT- und Ripk1^{KD} SMCs. Relative Expression in % nach 8 Stunden Inkubation. (WT Kontrolle n=17, Ripk1^{KD} Kontrolle n=17, WT + TNF- α n=18, Ripk1^{KD} + TNF- α n=18, WT TNF- α + zVAD n=18, Ripk1^{KD} TNF- α + zVAD n=18, WT TNF- α + zVAD + Nec-1 n=17, Ripk1^{KD} TNF- α + zVAD + Nec-1 n=18); (* = p<0.05; *** = p<0.001). **S. 57**

Abb. 10: Repräsentative Ultraschalluntersuchungen an Tag 28 (LAX) nach PPE-Behandlung zeigen, dass Mlkl^{-/-} und Ripk1^{KD} vor abdominalen Aneurysmen geschützt sind. Die gelben Pfeile stellen den operierten Abschnitt dar. **S. 58**

Abb. 11: Angiotensin II Modell. Echokardiographische Untersuchungen der prozentualen Aortendiameter in LAX bei WT-, Ripk1^{KD} und Mlkl^{-/-} Tieren an Tag 0, 7 und 14. Die Hemmung der Nekroptose schützt die Aorta vor einer Aortendilatation. (WT Tag 0, 7, 14 n=7; Ripk1^{KD} Tag 0, 7 n=6, Ripk1^{KD} Tag 14 n=5; Mlkl^{-/-} Tag 0, 7, 14 n=5); (* = p<0.05; ** = p<0.01). **S. 60**

Abb. 12: PPE Modell. Echokardiographische Untersuchungen der prozentualen Aortendiameter in LAX bei WT-, Ripk1^{KD} und Mlkl^{-/-} Tieren an Tag 0, 7, 14, 21 und 28. Die Hemmung der Nekroptose schützt die Aorta vor Aortendilatation. (WT Tag 0 n=17, WT Tag 3 n=10, WT Tag 7 n=10, WT Tag 14 n=10, WT Tag 21 n=7, WT Tag 28 n=7; Ripk1^{KD} Tag 0 n=13, Ripk1^{KD} Tag 3 n=9, Ripk1^{KD} Tag 7 n=9, Ripk1^{KD} Tag 14 n=10, Ripk1^{KD} Tag 21 n=10, Ripk1^{KD} Tag 28 n=9; Mlkl^{-/-} Tag 0 n=15, Mlkl^{-/-} Tag 3 n=9, Mlkl^{-/-} Tag 7 n=9, Mlkl^{-/-} Tag 14 n=9, Mlkl^{-/-} Tag 21 n=8; Mlkl^{-/-} Tag 28 n=9); (* = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001). **S. 61**

Abb. 13: Histologischer Ausschnitt aus der Aorta abdominalis einer WT behandelten Ang II Maus. 1 - Tunica intima, 2 - Tunica media, 3 - Tunica adventitia, L - Lumen. HE-Färbung. In der HE-Färbung werden die Kerne blau und das Zytoplasma sowie die Muskulatur orange-rot gefärbt. Maßstab: 25 μ m. 40x Vergrößerung. **S. 62**

Abb. 14: A-F) Repräsentative HE-Färbung von unbehandelten und behandelten WT- und Mlkl^{-/-} Mäuseaorten im Querschnitt. Die HE-Färbung zeigt bei unbehandelten Baseline Mlkl^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Baseline Wildtyp-Tieren eine erhöhte Dicke der Tunica media (μ m). Die gelben Pfeile stellen dar, wie die Messung der Dicke der Tunica media durchgeführt wurde. Maßstab: 100 μ m. 10x Vergrößerung. In der HE-Färbung werden die Kerne blau und das Zytoplasma sowie die Muskulatur orange-rot gefärbt. **G)** Stärke der Tunica media in μ m. Vergleich von WT- und Mlkl^{-/-} Mäusen. (WT BL n=9, Mlkl^{-/-} BL n=7, WT PPE n=8, Mlkl^{-/-} PPE n=10, WT AngII n=7, Mlkl^{-/-} AngII n=7); (***) = p<0.001). **S. 63**

Abb. 15: A-F) Repräsentative Picro-Sirius-Rotfärbung von unbehandelten und behandelten WT- und Mlkl^{-/-} abdominalen Aorten im Querschnitt-Modell. Maßstab: 100 μ m. 10x Vergrößerung. Bei dieser Färbung erscheinen die Kollagenfasern rot, Muskulatur und Zytoplasma gelb und die Zellkerne blau. **G)** Picrosirius-Rot-Färbung von Aorten aus WT- und von Mlkl^{-/-} Mäusen nach 14 Tagen Ang II- und 28 Tagen PPE-Behandlung. foi=field of interest - entspricht der Fläche der Tunica media (n = >5: WT BL n=9, Mlkl^{-/-} BL n=7, WT PPE n=11, Mlkl^{-/-} PPE n=9, WT AngII n=9, Mlkl^{-/-} AngII n=5; (***) = p<0.001; ** = p<0.01). **S. 66**

Abb. 16: Repräsentative Masson-Trichrom-Färbung aus abdominalen Aortenschnitten im Querschnitt. Maßstab: 25 μ m. 40x Vergrößerung. Die elastischen Fasern werden violett schwarz, das Bindegewebe grün und das Zytoplasma/die Muskulatur rot angefärbt. **S. 67**

Abb. 17: **A)** Elastinbrüche/100 μm und **B)** relative Elastinmenge in % innerhalb der Aortenwand in unbehandelten und behandelten WT- und $\text{Mlkl}^{-/-}$ Mäusen. (A) WT BL n=9, $\text{Mlkl}^{-/-}$ BL n=7, WT PPE n=10, $\text{Mlkl}^{-/-}$ PPE n=9, WT AngII n=6, $\text{Mlkl}^{-/-}$ AngII n=5; B) WT BL n=9, $\text{Mlkl}^{-/-}$ BL n=7, WT PPE n=8, $\text{Mlkl}^{-/-}$ PPE n=8, WT AngII n=6, $\text{Mlkl}^{-/-}$ AngII n=5); (* = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$). **S. 69**

Abb. 18: **A)** Repräsentative α -SMA und DAPI Färbung der abdominalen Aorten im Querschnitt. Maßstab: 100 μm . 20x Vergrößerung. α -SMA fluoresziert in der immunhistochemischen Färbung grün. Die Zellkerne fluoreszieren nach der DAPI Färbung blau. **B-C)** Vergleich der α -SMA Expression in % of foi = field of interest (B) und α -SMA positive Kerne/Gesamtkerne in der Tunica media in % (C). $\text{Mlkl}^{-/-}$ Aorten zeigen eine erhöhte α -SMA Expression. (A) WT BL n=5, $\text{Mlkl}^{-/-}$ BL n=6, WT PPE n=6, $\text{Mlkl}^{-/-}$ PPE n=5, WT AngII n=6, $\text{Mlkl}^{-/-}$ AngII n=4; B) WT BL n=5, $\text{Mlkl}^{-/-}$ BL n=6, WT PPE n=4, $\text{Mlkl}^{-/-}$ PPE n=4, WT AngII n=6, $\text{Mlkl}^{-/-}$ AngII n=4); (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$). **S.71**

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	5
2. Abbildungsverzeichnis	8
3. Einleitung	14-25
3.1. Das abdominelle Aortenaneurysma	14
3.2. Makroskopische und Mikroskopische Anatomie der Aorta	15
3.3. Anatomie der infrarenalen Bauchaorta	16
3.4. Zelluläre Komposition der Aorta und ihr Einfluss auf die Entstehung abdomineller Aortenaneurysmen	17-19
• Die Bedeutung der Tunica media im AAA	17
• Der Einfluss von Elastin und Kollagen auf das AAA	18
• Die Funktion der SMCs im AAA	19
3.5. Die Bedeutung inflammatorischer Prozesse bei der Entstehung von abdominellen Aortenaneurysmen	19
3.6. Apoptose	20
3.7. Nekrose	21
3.8. Nekroptose	22
3.9. Arbeitshypothese	24
3.10. Zusammenfassende Fragestellung dieser Arbeit	25
4. Material und Methoden	26-52
<u>4.1. Material</u>	
• Geräte	26
• Materialien	27
• Medikamente	30
• Chemikalien	31
• Hergestellte Lösungen	33
• Antikörper	34
• Reverse und forward Mausprimer (RT-PCR)	34
• SMC Zellen für die Zellkultur	34
• Software	34
• Versuchstiere	35
<u>4.2. Methoden</u>	
• Tiermodelle	36

- Implantation der Minipumpen zur ATII-Applikation mit Salzdät (AT II Modell)	36
- Modell der Pankreas-Elastase-Infusion (PPE-Modell)	37
• Entnahme von Organen	39
• Echokardiographie	40
• Histologische Untersuchungen	41
• Färbemethoden	41
- Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gefrierschnitten	41
- Pikro-Siriusrot Kollagenfärbung	42
- Trichrom-Masson-Färbung (TM) mit Resorcin-Fuchsin (Elastika-Färbung)	42
- Immunhistochemische Färbung: α -SMA, Alexa Fluor 488	43
• Zellkultur	44
- SMC-Isolation	45
• Real-Time PCR	48
• Verwendete Programme zur Analyse der echokardiographischen Aufnahmen und der histologischen Schnitte	49
• Auswertung der histologischen Aortenschnitte	49
• Statistik	52
5. Ergebnisse	53-73
5.1. Zellkulturexperimente an humanen SMCs	53
• MLKL abhängige Expression proinflammatorischer Zytokine in humanen SMCs	
5.2. Zellkulturexperimente an murinen SMCs	55
• Ripk1 ^{KD} SMCs zeigen eine reduzierte MLKL-Expression nach Stimulation mit TNF- α	
5.3. Echokardiographische Untersuchungen an Angiotensin II- und PPE Mausmodellen	58
• Angiotensin II und seine Auswirkung auf das AAA	59
• PPE und seine Auswirkung auf das AAA	60
5.4. Histologische Ergebnisse	62
• Beurteilung der Dicke der Tunica media innerhalb der Aorta abdominalis	63
• Untersuchung der kollagenen Struktur innerhalb der Tunica media	65

der Aorta abdominalis	
• Elastinbrüche innerhalb der Tunica media der Aorta abdominalis	67
• Relative prozentuale Elastinmenge innerhalb der Tunica media der Aorta abdominalis	68
• α -SMA Expression in der Tunica media der Aorta abdominalis	69
• α -SMA positive Kerne/ Gesamtanzahl der Kerne in der Tunica media	70
6. Diskussion	73-82
7.1. Nekroptose im abdominellen Aortenaneurysma	73
7.2. Die Rolle von Nekroptose in der Inflammation	75
7.3. Pathophysiologische Umbauprozesse in der Tunica media im abdominellen Aortenaneurysma	76
7.4. Gegenüberstellung der aneurysmatischen Modelle: Ang II und PPE	77
7.5. Pharmakologische Inhibition der Nekroptose - ein Ausblick	80
8. Zusammenfassung	83-84
9. Literaturverzeichnis	85-90
10. Vorabveröffentlichungen	91
11. Lebenslauf	92-94
Anhang: Kurzfassung der Dissertationsschrift	95

3. Einleitung

3.1. Das abdominelle Aortenaneurysma

Aortenaneurysmen (AA) stellen eine häufige und potenziell lebensbedrohliche Erkrankung dar. Sie sind definiert als eine permanente Gefäßausweitung mit einer Erweiterung des Durchmessers von mehr als 50 % im Vergleich zum normwertigen Durchmesser der betreffenden Arterie [1].

Die durchschnittliche Inzidenz von abdominellen Aortenaneurysmen (AAA) in westlichen Populationen beträgt 0,4 - 0,67 % [2], wobei besonders Patienten höheren Alters betroffen sind. Dies lässt gerade vor dem Hintergrund der demographischen Entwicklung einer steigenden Lebenserwartung in den industrialisierten Gesellschaften auch steigende Inzidenzen abdomineller Aortenaneurysmen erwarten.

Die Liste an weiteren Risikofaktoren ist lang und unspezifisch. Zu diesen Risikofaktoren zählen eine positive Familienanamnese, männliches Geschlecht, Ethnizität, arterielle Hypertension, chronisch obstruktive Lungenerkrankung, maligne Grunderkrankungen, Pluripara, Nikotin- und Drogenabusus, Adipositas, Dysfunktionen des Immunsystems sowie alkoholische Pankreatitiden [1, 3-5]. Neben dem männlichen Geschlecht wird der Nikotinabusus als der dominierende Risikofaktor mit einem 10-fach höheren Risiko für AA angesehen [6, 7]. Anhand dieser Aufzählung der Risikofaktoren wird klar, dass es eine relevant große Risikogruppe für die Entwicklung und Progredienz abdomineller Aortenaneurysmen gibt. Weiterhin ergeben sich häufig nicht nur additive, sondern auch exponentielle Steigerungseffekte durch das Vorhandensein mehrerer Risikofaktoren.

Aortenaneurysmen sind oft über einen längeren Zeitraum asymptomatisch, sodass die Diagnose nicht selten ein Zufallsbefund ist. Dies ist besonders erwähnenswert, da die Mortalität bei Ruptur eines unbehandelten AA bis zu 80 Prozent beträgt. Hierbei sind selbst die Patienten eingeschlossen, die noch einer operativen Therapie zugeführt werden können [8]. Aus diesem Grund gelten Ultraschalluntersuchungen als primäre Screening- und Follow-up Untersuchung, deren Bedeutung aufgrund der hohen Mortalität nicht hoch genug eingeschätzt werden kann.

Den multiplen Risikofaktoren, der relativ hohen Inzidenz und der hohen Mortalität stehen nur wenige Therapieoptionen gegenüber.

Konservative Maßnahmen wie eine sehr strenge Blutdruckeinstellung <120/80 mmHg und eine Nikotinabstinenz können die kardiovaskulären Risikofaktoren minimieren und wirken ebenso protektiv auf die Progredienz bestehender Aortenaneurysmen. Doch selbst bei nahezu

optimaler medikamentöser Therapie und Reduktion der Risikofaktoren, wodurch eine Progredienz des Aneurysmas und eine Reduktion der Mortalität erreicht werden kann, stehen lediglich offene Operationen oder endovaskuläre Eingriffe an der Aorta als kurative Behandlungsoptionen zur Verfügung [8, 9].

Trotz der Entwicklung neuer Medikamente und effektiverer Screening-Methoden zur Früherkennung der Erkrankung ist diese weiterhin mit einer großen Morbidität und Mortalität verbunden [10, 11].

Es besteht daher ein hoher Bedarf an neuen therapeutischen Ansätzen, für die ein besseres Verständnis der Pathogenese unabdingbar ist.

3.2. Makroskopische und Mikroskopische Anatomie der Aorta

Die Aorta ist die größte Arterie im menschlichen Körper und trägt sauerstoffhaltiges Blut vom Herzen durch den Brustkorb und die Bauchhöhle des Körpers. Sie hat ihren Ursprung im linken Ventrikel und wird in vier Abschnitte unterteilt [3]. Die Aorta geht vom linken Ventrikel aus und verläuft gerade nach kranial (Aorta ascendens). Den zweiten Anteil bildet der gebogene Anteil (Arcus aortae) von dem der Truncus brachiocephalicus, die A. carotis communis und die A. subclavia sinistra abgehen. Der dritte und vierte Anteil verläuft nach kaudal und ist der absteigende Teil (Aorta descendens), welches mit der Gabelung der Aorta in die paarige A. iliaca communis endet. Die Aorta descendens kann weiter in die Aorta thoracica (Teil vom Arcus aortae bis zum Hiatus aorticus des Diaphragmas) und die Aorta abdominalis (Teil nachdem Hiatus-Durchtritt bis zu den Ae. iliacae communes) aufgeteilt werden.

Die Aorta abdominalis wird anhand der A. renalis schließlich noch in die darüber- und darunterliegende Aorta abdominalis suprarenalis bzw. infrarenalis untergliedert.

Die Aortenwand ist in drei Schichten unterteilt (von außen nach innen): Tunica externa (oder Tunica adventitia), Tunica media und Tunica intima (siehe Abb. 1) [3]. Basierend auf dieser histologischen Einteilung wird zwischen dem „Aneurysma verum“ (echtes Aneurysma), „Aneurysma spurium“ und „Aneurysma dissecans“ unterschieden. Beim Aneurysma verum sind alle Wandschichten (Tunicae intima, media, adventitia) ausgeweitet. Beim Aneurysma spurium ist keine der Wandschichten von der Ausweitung betroffen. Hierbei kommt es lediglich zu einem Einriss der Gefäßwand und anschließender Tamponierung durch ein Hämatom, die zu einer Ausbildung einer Bindegewebskapsel beiträgt. Beim Aneurysma dissecans (dissezierendes Aneurysma) sind nur Teile der Wand von der Ausweitung

betroffen. Nach dem Riss der Intima kommt es zur Einblutung zwischen den Gefäßwandschichten mit oder ohne Wiederanschluss an das Gefäßlumen.

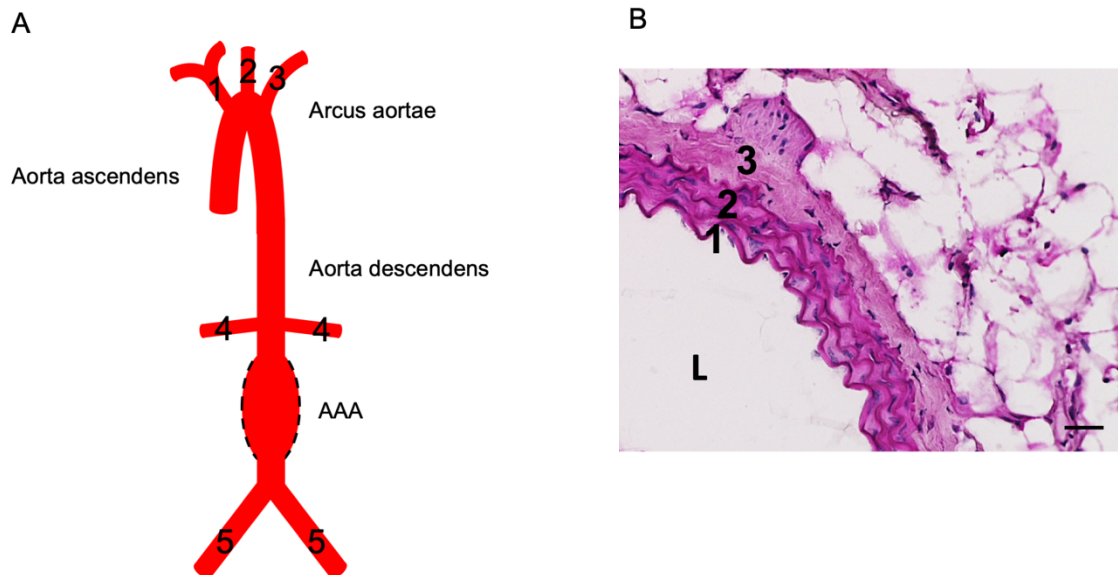


Abb. 1: **A)** Skizze der Aorta. 1 - Truncus brachiocephalicus, 2 - A. carotis communis, 3 - A. subclavia sinistra, 4 - Aa. renales, 5 - Aa. iliacae communes.
B) Ausschnitt aus der Aorta abdominalis einer WT Baseline Maus. 1 - Tunica intima, 2 - Tunica media, 3 - Tunica adventitia, L - Lumen. HE-Färbung. Maßstab: 50 µm. 20x Vergrößerung.

3.3. Anatomie der infrarenalen Bauchaorta

Der Durchmesser der infrarenalen Bauchaorta beträgt im Mittel bei gesunden Männern 1.41 - 2.05 cm und bei gesunden Frauen 1.66 - 2.16 cm, wobei die gemessenen Durchmesser der Aorta von der Messmethode, dem Alter, dem Geschlecht, dem Blutdruck sowie von anderen Faktoren abhängig sind [1].

Die infrarenale Bauchaorta ist besonders anfällig für die Ausbildung eines Aneurysmas [12, 13] und daher mit ca. 80 % die häufigste Lokalisation. Ab einem Durchmesser größer als 3 cm wird diese als aneurysmatisch angesehen [3, 12]. Die infrarenale Aorta weist mehrere einzigartige anatomische Merkmale auf, die sie anfällig für strukturelle Veränderungen machen. So unterscheidet sie sich besonders im Hinblick auf Elastizität, Kollagengehalt und in ihrer hämodynamischen Kraft von den anderen Abschnitten [13, 14]. Zudem zeigt die infrarenale Aorta im Vergleich zum Rest einen Mangel an Vasa vasorum [13, 15]. Die Vasa vasorum sind kleine Arterien und Venen, welche die Wand der Aorta versorgen, während die

innere Schicht (Intima) direkt durch das Blut aus dem Lumen versorgt wird. Diese anatomische Besonderheit kann Störungen der Mikrozirkulation und daher auch der Versorgung der Tunica media verursachen, die eine Rolle bei der Aneurysmabildung spielt. Außerdem nimmt die Dicke der Tunica media sowie der Elastin- und Kollagengehalt in der infrarenalen Aorta verglichen mit den übrigen aortalen Abschnitten ab [13].

Die erwähnten strukturellen Veränderungen in der infrarenalen Aorta sind entwicklungsbiologisch begründet. Bereits der aufsteigende und der absteigende Anteil der Aorta zeigen embryologisch unterschiedliche Charakteristika [16]. Die glatten Muskelzellen (smooth muscle cells, SMCs) der aufsteigenden Aorta stammen embryologisch aus dem Neuralrohr und dem paraxialen Mesoderm ab [17, 18]. Das Mesoderm ist eines der drei Keimblätter (Ento-, Meso- und Ektoderm), aus denen sich alle Strukturen des menschlichen Körpers entwickeln. Die gesamte absteigende Aorta enthält SMCs, die aus dem Mesoderm stammen. Die unterschiedliche Abstammung beeinflusst die verschiedenen vaskulären und pathologischen Eigenschaften wie Kalzifizierung und Arteriosklerose und strukturelle Defekte innerhalb der Aorta wie oben beschrieben [16].

3.4. Zelluläre Komposition der Aorta und ihr Einfluss auf die Entstehung abdomineller Aortenaneurysmen

Eine weitere wichtige Funktion der Aorta ist die Reduktion der Arbeitslast des Herzens, damit das Herz nicht gegen zu hohe (oder auch zu niedrige) Widerstände arbeiten muss, wenn das Blut während der Systole aus dem Herzen ausgestoßen wird [13].

Um diese Funktion sicherzustellen, besteht die Aortenwand in ihren drei Schichten aus einem komplexen zellulären Aufbau, welcher maßgeblich aus Endothelzellen (ECs), SMCs, Fibroblasten (FBs) und extrazellulären Matrix-Proteinen (ECM-Proteinen) besteht [19].

Die Bedeutung der Tunica media im AAA

Eine besondere Bedeutung in der Entstehung infrarenaler Aortenaneurysmen fällt der Tunica media zu. Die Tunica media besteht vor allem aus SMCs, welche konzentrisch von Lamellen aus Elastin und Kollagen umgeben sind [20]. Das Elastin und Kollagen innerhalb der Media wird hauptsächlich von medialen SMCs und Fibroblasten aus der Adventitia synthetisiert [13]. Elastin und fibrilläre Kollagene sind dabei die ECM-Bestandteile, welche für die Dehnungs- und Zugeigenschaften der Aorta verantwortlich sind und so die Aufrechterhaltung des Körperkreislaufs unterstützen [3, 21].

Der Einfluss von Elastin und Kollagen auf das AAA

Kollagenfasern stellen mit einem Anteil von circa 20 % den größten Teil der Strukturproteine in der Aorta [13].

Im Rahmen der Systole oder bei systolischen Blutdruckspitzen werden die elastischen Lamellen und Kollagenfasern in der Media gedehnt. Kommt es zu einer unphysiologischen Dehnung, zum Beispiel bei einer systolischen Blutdruckspitze oder bei Schädigung des Gefäßes, werden auch die Kollagenfasern des weniger straffen Kollagennetzwerks der Adventitia gedehnt.

Der Großteil der physiologischen Druckbelastung der Aorta wird hauptsächlich von den elastischen Fasern und weniger vom Kollagen getragen. Dies liegt an der unterschiedlichen Konstruktion, da Kollagene sich vorwiegend in eng gewickelten helikalen Ketten formieren, die untereinander stark vernetzt und somit in ihrer Dehnbarkeit eingeschränkt sind [21]. Im Gegensatz bestehen die Elastinfasern aus amorphem Elastin und elastischen Mikrofibrillen [13]. Prozentual können Kollagenfasern bis zu 2-4 % gedehnt werden, wohingegen elastische Fasern eine Dehnung von bis zu 50-70 % aufweisen [21]. Da es im Vergleich zur thorakalen Aorta mehr Kollagen als Elastin in der abdominellen Aorta gibt [20], entstehen Aortenaneurysmen häufiger in der abdominellen Aorta. Dieses Phänomen eines höheren Kollagen- zu Elastin-Verhältnis, welches oft vereinfacht als „Gefäßsteifigkeit“ ausgedrückt wird, erklärt auch das Risikoprofil hypertensiver und älterer Patienten häufiger abdominelle Aortenaneurysmen auszubilden [21].

Weiterhin besteht bei hypertensiven Patienten neben der Degeneration elastischer und kollagener Fasern der Tunica media [22] auch eine Störung des Verhältnisses zwischen Kollagenabbau und Kollagensynthese.

Neben Kollagen- und Elastinfasern weist die Tunica media zudem einen besonders hohen Anteil an Makromolekülen wie Proteoglykane (PGs), Glykoproteine, Glykosaminoglykane (GAGs) auf [19]. Die Gesamtheit dieser unterschiedlichen Bestandteile bezeichnet man als extrazelluläre Matrix (ECM), die hauptsächlich von den SMCs gebildet wird. Die ECM stellt die nichtzelluläre Komponente der Aortenwand, die der strukturellen Unterstützung dient, die Bioverfügbarkeit zahlreicher Wachstumsfaktoren und Zytokinen reguliert und somit Zellfunktionen und Zellverhalten beeinflusst. Eine Veränderung der ECM bestimmt maßgeblich den physiologischen und den pathologischen Umbau der Aortenwand [19].

Die Funktion der SMCs im AAA

Die SMC ist einer der modellierfähigsten Zellen im menschlichen Körper [23]. In der Tunica media der Aorta kommt es neben dem Abbau der extrazellulären Matrix wie oben geschildert auch zu einem Verlust glatter Gefäßmuskelzellen, welche die Entwicklung und das Fortschreiten des AAA ebenfalls beeinflussen [8, 24].

Zu diesem Verlust an SMCs trägt neben dem Zelltod, der für den wesentlichen Teil des SMC-Verlustes verantwortlich ist [25, 26], auch die Seneszenz - also eine Einschränkung der Replikation - der SMCs bei. Weiterhin kann das Umschalten von SMCs in einen makrophagenähnlicheren Phänotyp auftreten [23]. Ein Verlust von SMCs beschleunigt das Fortschreiten von Gefäßerkrankungen. Dies trifft insbesondere auf Aneurysma-Erkrankungen zu, fördert aber auch die Entstehung von Atherosklerose. Diese Pathologien fördern in einer Art "Teufelskreis" wiederum die weitere Degeneration der Tunica media [27], welches zu den oben genannten Konsequenzen führt.

3.5. Die Bedeutung inflammatorischer Prozesse bei der Entstehung von abdominalen Aortenaneurysmen

Zusätzlich zu den oben aufgeführten wichtigen histologischen und zellulären Veränderungen wird die Entstehung eines AAA oft von einer chronischen Infiltration von inflammatorischen Zellen in die Tunica adventitia und in die Tunica media begleitet [28].

Als Inflammation wird allgemein eine Reaktion des Immunsystems bezeichnet, die als Folge einer Infektion oder einer Gewebeerletzung ausgelöst wird. Unkontrollierte, übermäßige oder anhaltende Entzündungsreaktionen, verursachen dabei Gewebeschäden und tragen zur Pathogenese von akuten und chronisch entzündlichen Erkrankungen bei, wie es auch beim AA der Fall ist [29].

In der frühen Phase der Aneurysmaentwicklung kommt es, ausgelöst beispielsweise durch eine Läsion der Tunica intima, zu lokalen Entzündungsreaktionen mit anschließender Infiltration von Monozyten, Makrophagen und polymorphkerniger Leukozyten (PMNs) [30], welche wiederum durch die Produktion verschiedener Zytokine wie TNF- α -, IL-6- und IL-1 β und lokalen Mediatoren wie Leukotrienen die Entzündungsreaktion aufrechterhalten und steigern [31-33]. Zytokin-mediert kommt es zu einer Hochregulation von lokalen adhäsionsfähigen Molekülen auf Endothelzellen, an die weitere Immunzellen binden, zu einer medialen Neovaskularisation, einer Abnahme von SMCs und den Abbau der zellulären Matrix [31-33] und damit zu einem Progress der Aneurysmen-Entstehung führen.

Dem klassischen Makrophagen-Zytokin TNF- α kommt dabei eine besondere Rolle zu. Es ist ein Mitglied der TNF/TNFR-Superfamilie und an vielen Prozessen, vor allem aber an lokalen und systemischen Entzündungen, beteiligt [34]. Es induziert außerdem die Expression vieler proinflammatorischer Gene und ist gleichzeitig ein starker Induktor des Zelltodes [35], wobei die beiden Hauptformen des Zelltodes die Apoptose und die Nekrose sind [36].

3.6. Apoptose

Die Apoptose ist eine Form des regulierten Zelltodes und die am besten bekannte und untersuchte Form des Zelltodes. Der regulierte Zelltod ist für viele physiologische Prozesse wie die epitheliale Zellerneuerung und Selektion von Zellen von wesentlicher Bedeutung [29]. Die Apoptose wird durch eine Familie von Cysteinproteasen, die als Caspasen bekannt sind, koordiniert und aktiviert [37]. In Bezug auf die Entstehung abdomineller Aortenaneurysmen ist die Rolle der Caspase-vermittelten Apoptose für den apoptotischen Verlust von SMCs in der Tunica media der Aorta bereits recht gut untersucht [11]. Zellen, die Apoptose erleiden, aktivieren zahlreiche Proteine in einer zeitlich sowie räumlich eng geregelten Abfolge [38]. Die Initiierung der Apoptose erfolgt durch eine Stimulierung von Rezeptoren der Familie von Tumornekrosefaktoren oder eine Schädigung der DNA-Integrität durch verschiedene Stressfaktoren [38]. Bei der Übertragung dieser Signale ist die Wechselwirkung von Proteinen mit Todeseffektordomänen ein wichtiger Mechanismus bei der Apoptose [39]. Proteine mit Todeseffektordomänen, haben in der Zelle unter anderem die Funktion membrangebundene Rezeptoren mit cytosolischen Effektor-Caspasen zu binden. Die Aktivierung dieser Caspasekaskaden ist ein zentraler Schritt in Induktion der Apoptose. Die Caspasen -8 und -9 können apoptotische Signale initiieren und mit Caspase-3, -6 und -7 die eigentliche Apoptose ausführen [38]. Caspase-8 besitzt hierbei eine zentrale Rolle [40-42]. Apoptotischer Zelltod tritt im normalem sowie in pathologisch verändertem Gewebe auf. Im Gegensatz zu anderen Formen von Zelltod ist der Zellabbau bei der Apoptose sehr geordnet und in hohem Maße reguliert. Dies ist ein wichtiger Unterschied zu anderen Formen von lytischem Zelltod, bei denen es zur Freisetzung von inflammatorischen Triggerfaktoren kommen kann [43]. Ein Beispiel für einen solchen Triggerfaktor ist die Freisetzung von "damage-associated molecular patterns" (DAMPs) [40]. DAMPs sind Strukturen, die unter physiologischen Bedingungen nicht entzündliche Funktionen erfüllen, während sie bei zellulärem Stress oder einem lokalen Gewebeschaden auf der Zelloberfläche freigesetzt werden können, woraufhin sie zur Entzündungsreaktion - im konkreten Fall der Ausbildung eines AAA - beitragen (siehe Abb. 2) [40].

Apoptose

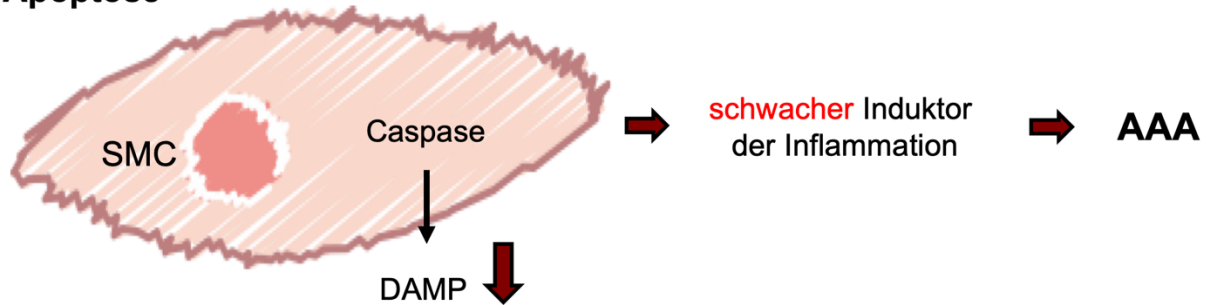


Abb. 2: Skizze. Die Apoptose der SMCs in der Tunica media ist ein zentrales Ereignis bei der Entwicklung vom AAA. Apoptose-assoziierte Freisetzung von DAMP ist ein schwacher Induktor der Inflammation. DAMP: damage-associated molecular patterns.

3.7. Nekrose

Die Nekrose wird im Gegensatz zur Apoptose oftmals als passive Form des Zelltods ohne die für die Apoptose charakteristischen Regulationsmechanismen definiert [38]. Die Nekrose kennzeichnet eine Schwellung der Zelle und ihrer Organellen, gefolgt von einem Verlust der Zellmembranintegrität und der Freisetzung von Zellinhalten in den extrazellulären Raum [38]. Abhängig von der Morphologie und der Beteiligung von Lysosomen werden zwei verschiedene Arten des nekrotischen Zelltods unterschieden: autophagische und nicht lysosomale Zellzertrümmerung [44]. Der autophagische Zelltod ist durch zahlreiche Vakuolen im Zytoplasma gekennzeichnet, die mit zellulären Überresten gefüllt sind. Der nichtlysosomale Zelltod zeigt eine ausgeprägte Dilatation von Organellen und die Ausbildung von leeren Räumen innerhalb der Zelle ohne einer nachweisbaren Beteiligung von Lysosomen [38, 39]. Nekrose werden durch verschiedene Signalwege gesteuert und teilen aber dennoch gemeinsam geschaltete Mediatoren wie die Produktion von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oder den ATP-Abbau [35, 45] und konvergieren schließlich in einer ähnlichen zellulären Zellphase einschließlich osmotischer Schwellung (Onkose), lysosomaler und eventuell Plasmamembranpermeabilisation [46].

Galt die Nekrose bislang als unreguliertes Geschehen, zeigen Studien jedoch zunehmend, dass auch die Nekrose ein reguliertes Ereignis darstellt [37, 47]. In den letzten Jahren und Jahrzehnten wurden diverse Zelltodmodalitäten beschrieben, die weder die Kriterien der Apoptose noch der Nekrose erfüllen, sodass diese in verschiedene Zelltodmodalitäten unterteilt wurden wie Nekroptose, Parthanatos, Ferroptose oder Oxytose, mitochondriale

Membranpermeabilitätsübergang (MPT)-abhängige Nekrose, Pyroptose, Pyronekrose und NETose [29].

3.8. Nekroptose

Nekroptose ist eine hochgradig regulierte und kontrollierte Form des Zelltodes. Sie hat einen bedeutenden Einfluss auf Proliferation- und Entzündungsvorgänge innerhalb der Aorta. Darüber hinaus wurde für die Nekroptose bereits eine Bedeutung beim Myokardinfarkt, Apoplex [48, 49], Atherosklerose [50], Ischämie-Reperfusionverletzung [51, 52], Pankreatitis [53-55] und in entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen [37, 56, 57]. Für die Nekroptose konnten bereits mehrere bedeutende Mediatoren identifiziert werden. Hier sind insbesondere die Enzymkinasen Rezeptor-interagierende Serin/Threonin-Proteinkinase 3 (RIPK3), Rezeptor-interagierende-Proteinkinase 1 (RIPK1) sowie Mixed-Lineage-Kinase-Like (MLKL) zu nennen.

Die Initiierung der Nekroptose erfolgt durch Aktivierung von Fas-Rezeptoren - den sogenannten „Todes-Rezeptoren“ - durch Fas-Liganden. Diese werden insbesondere auf SMCs exprimiert. Die Aktivierung der Fas-Rezeptoren leitet zum einen die Apoptose der entsprechenden Zelle ein, kann andererseits aber auch für die Induktion der Nekroptose verantwortlich sein. RIPK1 hat dabei eine duale Funktion, die kinaseabhängig und -unabhängig die Nekroptose und Apoptose hemmen oder auslösen kann [29]. Ob eine Zelle nach Fas-Rezeptor Aktivierung die Apoptose oder Nekroptose einleitet, ist ein regulierter Prozess, der maßgeblich von der Aktivität der Caspase-8 abhängt. Ist die Aktivität der Caspase-8 gehemmt, kommt es zu einer Bindung von RIP1 und RIP3 über das sogenannte RIP-Interaktionsmotiv (RHIM) auf RIPK3 und RIPK1 und konsekutiv zur Bildung eines RIP1/RIP3-Komplexes [58]. Hierdurch wird die Nekroptose induziert. Ein weiteres wichtiges Effektorprotein dieser Kaskade ist MLKL, welches ein Substrat von RIP3 darstellt und an der Ausführung der Nekroptose beteiligt ist [59, 60]. Die Phosphorylierung von MLKL ist der letzte Schritt in der Ausführung der Nekroptose und gilt als der wichtigste pathophysiologische Schritt der Nekroptose *in vivo* [61].

Die gemeinsame Aktivierung von RIP1, RIP3 und MLKL wird in der Gesamtheit als Nekrosom bezeichnet [62]. Dieser Multiproteinkomplex führt dazu, dass die Nekroptose induziert wird (siehe Abb. 3) [63]. Durch inaktive RIPK1 bleibt dementsprechend die Phosphorylierung von RIPK3 aus, welches zu einer Inhibition der nekroptotischen Antwort führt.

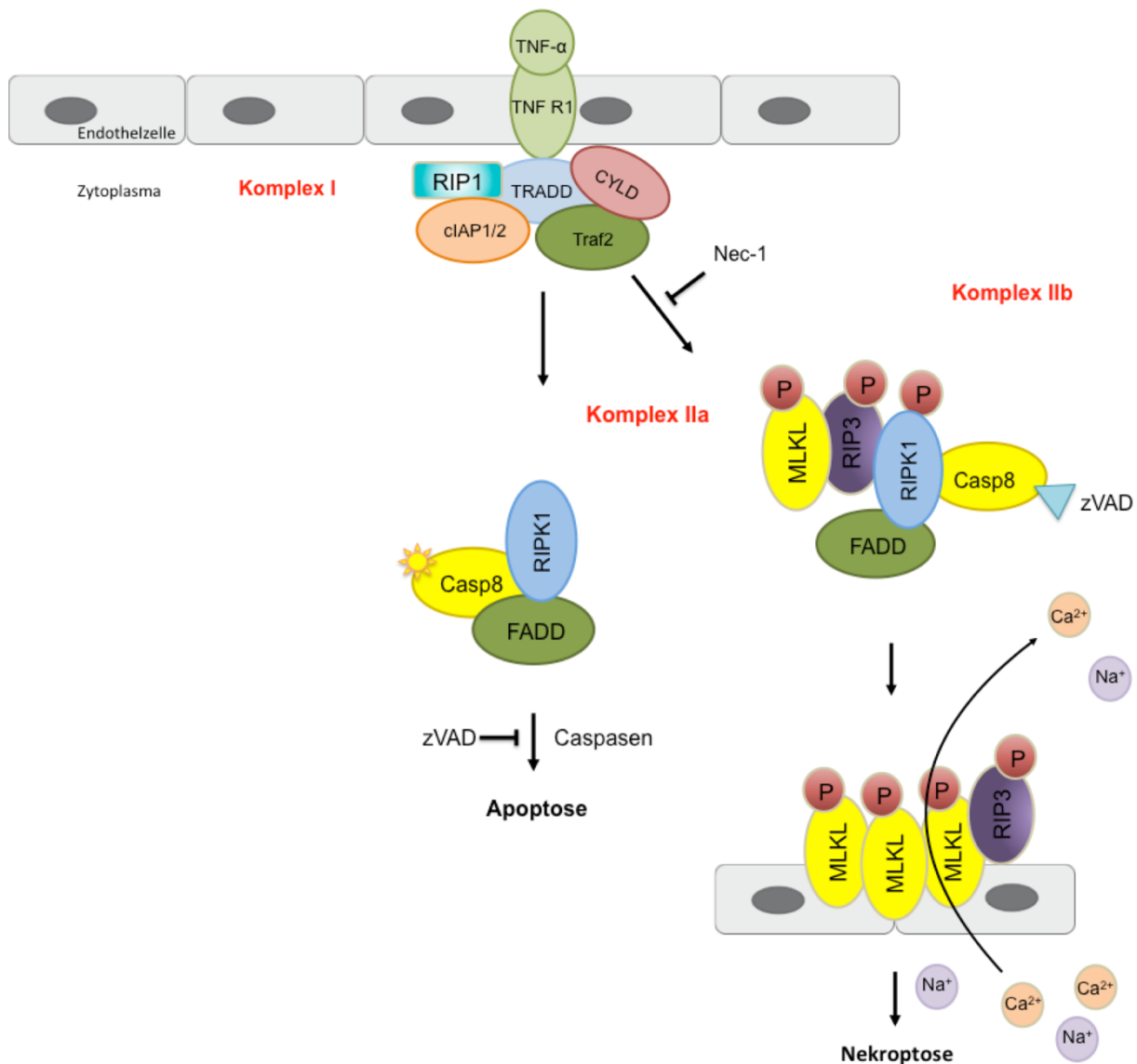


Abb. 3: Übersichtsskizze der Apoptose und der Nekroptose. Die Skizze zeigt die Rolle einzelner Proteine in der Ausbildung der Apoptose und der Nekroptose.

FADD: Fas-Associating Death Domain-Containing Protein (=Fas-assoziiertes Todesdomänen haltiges Protein), TNF R1: Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1, TRADD: TNFR1-associated death domain protein (=TNFR1-assoziiertes Todesdomänenprotein), CYLD: Cylindromatosis tumor suppressor gene (=Tumorsuppressorgen für Zylindromatose), cIAP1: Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 (=zellulärer Inhibitor des Apoptoseproteins 1), Traf2: TNF receptor-associated factor 2 (=TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 2), Casp8: Caspase 8.

Pathophysiologisch kommt es durch die Phosphorylierung von MLKL zu einem Integritätsverlust der Zellmembran, sowie konsekutiv zu einer Zellschwellung gefolgt vom Aufbruch der Plasmamembran, die zum Zelltod führt [64].

Zusammenfassend sind daher die Phosphorylierung der Kinasen RIP1 und RIP3, die Rekrutierung und Aktivierung von MLKL durch RIP3 und die erwähnte Ruptur der Plasmamembran als bedeutende pathophysiologische Mechanismen der Nekroptose zu nennen. Über die Nekroptose-induzierte Freisetzung von DAMPs wird wiederum eine Kaskade weiterer Mechanismen wie eine Leukozytenaktivierung und Ausschüttung von Chemokinen induziert, die zu einer Aggravierung der Inflammation führt (siehe Abb. 4) [48].

Nekroptose

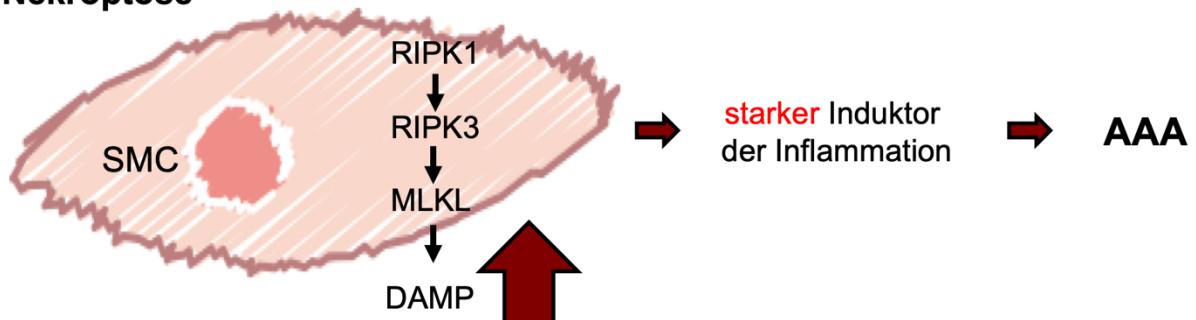


Abb. 4: Skizze. Die Nekroptose der SMCs in der Tunica media ist ein zentrales Ereignis bei der Entwicklung des AAA. Die Aktivierung der Nekroptose über RIPK1, RIPK3 und MLKL bewirkt eine erhöhte Freisetzung von DAMPs, die im Vergleich mit der DAMP-Freisetzung bei der Apoptose als starker Induktor der Inflammation gilt.

3.9. Arbeitshypothese

Nekroptotische Prozesse wurden mit der Pathogenese der AAA assoziiert [11]. Die Inhibition der Nekroptose auf die Entwicklung von AA ist jedoch noch nicht ausreichend untersucht.

Die diesem Projekt zu Grunde liegende Hypothese ist, dass die Mediatoren RIPK1 und MLKL durch die Initiierung der Nekroptose und konsekutiver Inflammation eine Schlüsselrolle in der Entstehung und Progression abdomineller Aortenaneurysmen besitzen.

Es wurden daher in diesem Projekt jene Signalkaskaden untersucht, die eine durch RIPK1 und MLKL vermittelte inflammatorische Reaktion bei Aortenaneurysmen induzieren.

3.10. Zusammenfassende Fragestellung dieser Arbeit

Folgende Fragen sollen in dieser Arbeit beantwortet werden:

- 1.) Unterliegen aortale glatte Muskelzellen *in vivo* und *in vitro* einer Form von RIPK1- und MLKL- abhängigem Zelltod? Hat dies einen Einfluss auf die Entstehung eines abdominellen Aortenaneurysmas?
- 2.) Stellt eine therapeutische Inhibierung von RIPK1 und MLKL einen protektiven Effekt für eine Ausbildung eines abdominellen Aortenaneurysmas dar?
- 3.) Welche Auswirkungen haben nekroptotische Prozesse aortaler Gefäßmuskelzellen auf das strukturelle Remodeling der Aorta während der AAA Entstehung?

4. Material und Methoden

4.1. Material

Geräte

Auflichtmikroskop Zellkultur Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Beatmungsgerät MiniVent	Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus, March, Deutschland
BioRad Zell-Zählmaschine	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Biorevo BZ-9000 Mikroskop	Keyence Inc., Osaka, Japan
Digitalwaage EMB 1000-2	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Eppendorf Comfort Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feinwaage	VWR International, Pennsylvania, USA
Heraeus HERAcell® CO ₂ -Inkubator (37°C, 5% CO ₂) (Zellkultur)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Isofluran-Anlage	Penlon Sigma, Abingdon, USA
Kaltlichtquelle KL 1500 electronic	Schott AG, Mainz, Deutschland
Kryostat CM3050 S	Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Deutschland
Laminar Flow Werkbank SterilGARD Class II Type A/B3	The Baker Company, Sanford, USA
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Breisgau, Deutschland
Mikroskop Olympus CK 2	Olympus, Shinjuku, Japan
MiniSpin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
MX550D Schallkopf	Fujifilm VisualSonics Inc., Toronto, Kanada
Operationsmikroskop Leica MZ6 + Leica M50 mit Stativ	Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Deutschland
Perfect spin 24Plus Zentrifuge	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Präzisionswaage	A&D Instruments Ltd., Abingdon, England

Real-Time PCR Thermocycler System 7300	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
Stickstofftank (CRYO-Behälter)	Linde (The Linde Group), Dublin, Irland
TKM-Temperature-Control-Module	FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland
Vevo Compact Dual Anesthesia System	Fujifilm VisualSonics Inc., Toronto, Kanada
Vevo Mouse Handling Table Funktionstisch mit Wärmeplatte	Fujifilm VisualSonics Inc., Toronto, Kanada
Vevo 3100 Ultraschallgerät (Micro-Ultrasound Imaging System)	Fujifilm VisualSonics Inc., Toronto, Kanada
Vortex Schüttler VF2 Janke & Kunkel	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Breisgau, Deutschland
Wasserbad 37°C SUB Aqua 26 Plus (Zellkultur)	Grant Instruments, Cambridge, England
Zentrifuge Eppendorf 5420 (Zellkultur, RNA-Isolation)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR Plate Spinner (Mikrotiterplatten- Zentrifuge)	VWR International, Pennsylvania, USA
Zentrifuge Mega Star 1.6 R (Zellkultur)	VWR International, Pennsylvania, USA

Materialien

Accu-jet® pro Pipettierhelfer	Brand GmbH & Co KG Wertheim, Deutschland
Alzet osmotische Minipumpe (Modell 2004, 200 µl Volumen)	DURECT Corporation, Kalifornien, USA
Baktolin® Hautdesinfektionsmittel	Hartmann, Heidenheim an der Brenz, Deutschland
BD Eclipse™ Sicherheitsinjektionskanüle 21Gx1 ½“	BD Becton Dickinson, New Jersey, USA
BD Plastikpak 1 ml	BD Becton Dickinson, New Jersey, USA
BD Plastikpak 2 ml	BD Becton Dickinson, New Jersey, USA
Cutasept®, Desinfiziens	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
CV-Sonic Ultraschallgel	C+V Pharma Depot GmbH, Versmold, Deutschland

Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent Technologies Inc. Santa Clara, USA
Deckgläser 24x60 mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Lohmar, Deutschland
Dewargefäß	KGW-Isotherm Karlsruher Glastechnisches Werk Schieder GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dunkle Färbekammer	Simport Scientific, Kanada
Eppendorf Safe-Lock Tubes (Reaktionsgefäße) 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ES Kompressen (Tupfer)	Hartmann, Heidenheim an der Brenz, Deutschland
Färbekasten	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Filterpapier	Whatman, Maidstone, England
Glaspipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Infusionsbesteck Intrafix® Air P - B.Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Introcan Safety® 22Gx1“	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Kosmetiktücher Tapira plus	GVS-Grossverbraucherspezialisten eG, Friedewald, Deutschland
Klebeband 3 M Micropore Tape Kleber-Vliespflaster (1,25cm x 5m)	3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland
Kunststoffküvetten	Medite, Burgdorf, Deutschland
Liquid Blocker Super Pap Pen	Daido Sangyo Co. Ltd., Tokyo, Japan
MaiMed® - Tip Classic Eco	MaiMed GmbH, Neuenkirchen, Deutschland
Manuelle Färbekammer	Medite, Burgdorf, Deutschland
MiniCollect® Complete 0,8 ml LH Lithium Heparin Separator	Greiner Bio-one, Solingen, Deutschland

Nahtmaterial PROLENE® (Polyglykolid 6/0, Polypropylen 8/0 - 6/0, Nylon 10/0) mit gebogener Nadel	Ethicon Inc., New Jersey, USA
Nunc® CryoTubes® Kryoröhrchen 1,8 ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Omnifix® Solo - B.Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Operationsbesteck	FST fine science tools by DUMONT Medical biology, Schweiz
PCR Platten Hard-Shell® 96-well	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
PeqPETTE in diversen Größen	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Petrischalen steril, Cellstar® Cell culture dishes 100x20 mm	Greiner Bio-one, Solingen, Deutschland
Petrischalen steril, Tissue culture dish 60x15 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Polyethylenschlauch (PE-10) (intrathekaler Mauskatheter) 2,5 cm 32 G, Länge 6 cm	BioMedical Instruments, Zöllnitz, Deutschland
Promega GoTaq® qPCR Master Mix Kit	Promega, Madison, USA
Research® Plus Pipetten (Einkanalpipetten)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reverse Transcription Kit QuantiTect®	Qiagen, Hilden, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen, diverse Größen (1, 5, 10 ml)	BD Becton Dickinson, New Jersey, USA
Sterican® Standardkanülen (diverse Größen)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
sterile Schraubröhren (Falcons), diverse Größen (15, 20 und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Superfrost™ Plus Adhäsionsobjektträger	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
TC-Flaschen T75, steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Flaschen T25, steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Platten 6- und 12-Well, steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Tip-System Stack Pack diverse Größen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Tissue-Tek® Cyromold® Kryoeinbettformen (15mm x 15 mm x 15 mm)	Sakura Finetek, Torrance, USA
Tissue Tek®, Einbettmedium	Sakura Finetek, Torrance, USA
Veet Enthaarungscreme	Reckitt Benckiser GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber/-Heber 25 cm, steril	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Lohmar, Deutschland

Medikamente

Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen, Deutschland
0,25% Bupivacaine HCl Injektion USP 2,5 mg/ml	Hospira, Inc., Lake Forest, USA
Buprenorphin (Temgesic®); Analgetikum 0,1 mg/Kg KG	Indivior Eu Ltd., Berkshire, England
Heparin-Natrium 25.000 I.E./ml Injektions- /Infusionslösung, 5.000 I.E./ml i.v. und s.c.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Isofluran (Attane™); Hypnotikum/Analgetikum Dosierung nach gewünschter Narkosetiefe	Piramal, Indien, Mumbai

Chemikalien

Agarose (Pulver)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Albumin (Pulver, $\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ampuwa® Spüllösung 1000 ml Plastipur (destilliertes Wasser)	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Aceton	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Angiotensin II human (Zellkultur) A9525	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ATCC® Vascular Cell Basal Medium (VSMC) PCS-100-030™	LGC Standards, Wesel, Deutschland
ATCC® VSMC Complete Growth Kit (ohne FBS Zusatz)	LGC Standards, Wesel, Deutschland
Bovine serum albumin solution (FBS) 35%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bovines Serumalbumin (BSA) $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dimethyl sulfoxide (DMSO) $\geq 99.7\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Elastase (190 u/ml) E1250-25MG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eosin-G-Lösung 0,5 % wässrig	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut (99,9%)	Chemsolute Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Ethanol 70%	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Ethanol ROTIPURAN® $\geq 99,8\%$, p.a., vergällt	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
EUKITT®	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
FCS (fetales Kälberserum)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Lohmar, Deutschland
Flüssigstickstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Goldner Lösung I	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Goldner Lösung II	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

Goldner Lösung III	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun nach Mayer	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
HBSS (mit Calcium und Magnesium)	Gibco Life Technologies Limited, England
HBSS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Zusatz)	Gibco Life Technologies Limited, England
Invitrogen™ RT-PCR-Wasser	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Isopropylalkohol (2-Propanol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
isotonische Kochsalzlösung 0,9%	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Liberase™	Roche, Basel. Schweiz
Millex® Spritzenfilter (Zellkultur)	Merck Millipore, Massachusetts, USA
Nagellack	Cosnova GmbH, Sulzbach, Deutschland
Necrostatin-1 (Methylthiohydantion-DL-tryptophan) BML-AP309	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
PBS Phosphate-Buffered Saline (Zellkultur)	Gibco Life Technologies Limited, England
PBS Phosphate-Buffered Saline (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Zusatz) (Zellkultur)	Gibco Life Technologies Limited, England
PBS Tabletten	Gibco Life Technologies Limited, England
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PFA, Paraformaldehyde (Pulver)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Resorcine-Fuchsine Weigert 2E-030	Waldeck GmbH & Co KG, Münster, Deutschland
Roti®-Histol (Xylolersatz)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
TNF-α (Zellkultur) Luminex® Performance Assay Mouse TNF-alpha Kit	R&D systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA 0,25% (gebrauchsfertig)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tryptan blue Dye 0.40 % 1,5 ml	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Tween20	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Weigerts-Eisenhämatoxylin-Färbekit Lösung A+B (A: SAP 716694, B: SAP 716696)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
zVADfmk	InvivoGen, San Diego, Kalifornien, USA

Hergestellte Lösungen

Agarose 1,5%	Agarose der Firma Sigma-Aldrich verdünnt mit destilliertem Wasser
Blockierlösung IHC α -SMA	1 % PBS + 10 % FCS und 1% BSA
Citratpuffer	selbst hergestellt: 630 ml Millipore H ₂ O + 12,6 ml Lösung A (21,01 g Citric Acid in 1 Liter A.dest) + 57,4 ml Lösung B (29,41 g Natrium Citrat in 1 Liter A. dest) + 350 μ l Tween20
Einfriermedium	90% Medium (ATCC ohne Wachstumszusätze), 5% FBS und 5% DMSO
Essigsäure 1%	100 % reinste Essigsäure der Firma Carl Roth verdünnt mit destilliertem Wasser
Ethanol 96%	Ethanol absolut (99,9%) verdünnt mit destilliertem Wasser
DMSO 5%	DMSO \geq 99.7% der Firma Sigma-Aldrich verdünnt mit destilliertem Wasser
HCl 1 %	32% reinst HCl (Salzsäure) der Firma Carl Roth verdünnt mit destilliertem Wasser
1% HCl-Alkohol	32% reinst HCl (Salzsäure) der Firma Carl Roth mit absolutem Ethanol (99,9%) der Firma Chemsolute Th. Geyer GmbH & Co. KG verdünnt
Liberase-Elastase-Lösung	Liberase-Lösung mit 6,3 μ l Elastase (190 u/ml)
Liberase-Lösung	0,1 mg/ml Liberase der Firma Roche in HBSS der Firma Gibco™ ThermoFisher Scientific (5 mg in 50 ml HBSS)
1x PBS	(2 Tabletten PBS in 500 ml destilliertes Wasser aufgelöst)
Pikro-Sirius-Rot-Lösung	Mischung von gesättigter Pikrinsäure (AppliChem ITW Reagents 251049.160) und Sirius red F3B (C.I. 35782; auch Direct Red)

4 % PFA	Paraformaldehyde (Pulver) der Firma Sigma-Aldrich 4 g abgewogen und in destilliertes Wasser (1 Liter) verdünnt
---------	--

Antikörper

Anti-alpha smooth muscle Actin antibody (α -SMA) Rabbit polyclonal IgG 0,2 mg/ml, ab5694	Abcam plc., Cambridge, England
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) ab150113	Abcam plc., Cambridge, England

Reverse und forward Mausprimer (Real-Time PCR)

β -Actin	Eurofins Genomics, Luxemburg
GAPDH	Eurofins Genomics, Luxemburg
IL-1 β	Eurofins Genomics, Luxemburg
IL-6	Eurofins Genomics, Luxemburg
MLKL	Eurofins Genomics, Luxemburg
Ripk1	Eurofins Genomics, Luxemburg
TNF- α	Eurofins Genomics, Luxemburg

SMC Zellen für die Zellkultur

Human Aortic Smooth Muscle Cells (HOASMC), adult, humane Aorta (normal, Tunica intima, Tunica media, plaquefreies Gewebe)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
---	-------------------------------

Software

BZ-II-Analyzer, Version 1.42	Keyence Inc., Osaka, Japan
BZ-II-Viewer, Version 1.4.1.2	Keyence Inc., Osaka, Japan
Office 365 Pro Plus, Version 16.0.10325.20008	Microsoft Inc., Redmond, USA
Prism 6, Version 6.01	Graphpad Software Inc., La Jolla, USA

Vevo LAB, Version 2.1.0	Fujifilm, VisualSonics Inc. Toronto, Kanada
-------------------------	---

Versuchstiere

WT Mäuse (C57 black6J Stammhintergrund), Männlich, Alter: 9 - 10 Wochen	CECAD in Köln (in vivo Research Facility Research Center) aus der Arbeitsgruppe von Herr Professor Dr. Manolis Pasparakis
Ripk1^{KD} Mäuse (Ripk1 ^{D138N/D138N} C57 black6J Stammhintergrund) Männlich, Alter: 9 - 10 Wochen	CECAD in Köln (in vivo Research Facility Research Center) aus der Arbeitsgruppe von Herr Professor Dr. Manolis Pasparakis
Mkl^{-/-} Mäuse (C57 black6J Stammhintergrund) Männlich, Alter: 9 - 10 Wochen	CECAD in Köln (in vivo Research Facility Research Center) aus der Arbeitsgruppe von Herr Professor Dr. Manolis Pasparakis

Wildtyp Mäuse (C57 black6J Stammhintergrund)

C57Bl6J (WT) wurden als gesunde Kontrolltiere verwendet. Diese wurden als Inzuchtstämme gezüchtet, um ein hohes Maß an Gleichmäßigkeit in ihren vererbten Eigenschaften, Phänotypen, Verhalten und Ansprechen auf experimentelle Behandlungen sicherzustellen.

Ripk1^{D138N/D138N} Mäuse vereinfacht Ripk1^{KD} Mäuse (C57 black6J Stammhintergrund)

Bei Ripk1^{D138N/D138N} Mäusen handelt es sich um eine Knock-In-Maus, die endogen eine katalytisch inaktive RIPK1 exprimieren [65, 66].

Ripk1^{D138N/D138N} Mäuse haben eine Mutation, bei dem es zu einem Ersatz der Aminosäure (AS) Aspartat (D) bei Position 138 zur AS Asparagin (D138N) kommt [65]. In dieser Arbeit wird übersichtshalber die Bezeichnung Ripk1^{KD} Maus verwendet. Ripk1^{-/-} Tiere sind nicht lebensfähig [65, 67] und waren aus diesem Grund nicht Gegenstand dieser Arbeit.

RIP1 (Rezeptor-interagierende Serin/Threonin Kinase 1) ist ein zytoplasmatischer Bestandteil der RIP (Rezeptor-interagierenden Protein) -Familie der Serin/Threonin Kinasen und stellt ein Trigger für den proinflammatorisch apoptotischen und nekroptotischen Zelltod dar. Es ist bekannt, dass RIPK1 D138N exprimierende Zellen *in vitro* vor einer TNF Induktion resistent sind. *In vivo* sind Ripk1^{KD} Mäuse von einem TNF induzierten Schock geschützt [65].

Mkl^{-/-} Mäuse (C57 black6J Stammhintergrund)

Mkl^{-/-} Mäusen bzw. Mkl^{del31/del31} fehlt das MLKL (Mixed Lineage Kinase Like) -Gen. Die Phosphorylierung von MLKL ist für die RIP1-abhängige Induktion der Nekroptose essentiell.

Die Defizienz hemmt die Nekroptose, während es keine Auswirkungen auf die Apoptose hat [55].

In der vorliegenden Arbeit wurden 9-12 Wochen alte, männliche (Gewicht ca. 25-30 g) Wildtyp Mäuse (C57 black6J Stammhintergrund), Ripk1^{KD} Mäuse (C57 black6J Stammhintergrund) und Mkl^{-/-} Mäuse (C57 black6J Stammhintergrund) verwendet (siehe Abb. 5). Diese stammen aus dem CECAD in Köln (in vivo Research Facility Research Center) aus der Arbeitsgruppe von Herr Professor Dr. Manolis Pasparakis.

Die Versuchstiere wurden in klimatisierten Räumen im Institut für experimentelle Medizin in Köln gehalten. Die Mäuse wurden in IVC-Haltungssystemen gehalten und mit gamma-bestrahltem Haltungsfutter (ssniff®, V1534-703) und angesäuertem Wasser ad libitum versorgt. Das Lichtregime wurde konstant mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12-12 Stunden eingehalten.

Alle Tierversuche, die dieser Arbeit zugrunde liegen wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen bewilligt und von Personen mit entsprechender fachlicher Eignung durchgeführt. Die zugehörige Tierversuchsnummer lautet AZ 81-02.04.2018.A030.

4.2. Methoden

Tiermodelle

Implantation der Minipumpen zur ATII-Applikation mit Salzdiät (AT-II Modell)

Medikation:

- 30 Minuten Prä- und Post-OP: Buprenorphin Temgesic® (Stock: 0,324 mg/ml: 0,1 mg/kg; 1:30 mit NaCl -100 µl/10g Maus) s.c.

Narkose:

- Isofluran (initial 5%, OP 1-2%)

Das Angiotensin-II Modell wird in vielen Studien als Modell zur AAA-Formation genutzt. In den Versuchsgruppen erfolgte die Applikation von Angiotensin II über eine Alzet-Minipumpe in Kombination mit einer Salzdiät (NaCl 1%) im Trinkwasser der Tiere. Den Mäusen werden

mit Angiotensin II befüllte osmotische Pumpen implantiert [11], die subkutan für 2 Wochen Angiotensin II mit einer Rate von 0,6 ng/g/min applizieren.

Zur Analgesie erhielten die Tiere 30 Minuten vor dem Eingriff der Implantation eine subkutane Injektion mit Buprenorphin. Die Mäuse werden durch Inhalation von Isofluran (3,5 - 5 % initial, 1-2% bedarfsgesteuert zur Erhaltung) anästhesiert. Zum Schutz vor Austrocknung erhalten die Mäuse eine Augensalbe. Damit die Tiere nicht Auskühlung werden sie auf einer Wärmeplatte in Bauchlage überführt und vor eine Nosecap gelegt und mit Klebeband auf der Platte fixiert. Sind keine Schmerzreize mehr wahrnehmbar (Zwischenzehenreflex erloschen), wird der OP-Bereich großflächig mit Enthaarungscreme enthaart und mit Hautdesinfektionsmittel desinfiziert. Es erfolgt ein etwa 10 mm großer Hautschnitt rechtslateral im Bereich des Nackens, woraufhin mit einem Nadelhalter vorsichtig eine subkutane Tasche gebildet und die Pumpe subkutan mit Öffnung zur Schwanzspitze eingeführt wird. Die Wunde wird anschließend mit zwei bis drei Klammern verschlossen. Die Mäuse werden aus der Narkose geholt und bis zum Aufwachen per Infrarotlampe in ihrem Käfig gewärmt. Die Tiere erhalten für weitere 2 Tage postoperative Analgesie mit Buprenorphin 0,1 mg/ kg KG alle 6-8 Stunden.

Modell der Pankreas-Elastase-Infusion (PPE-Modell)

Medikation:

- 30 Minuten Prä- und Post-OP: Buprenorphin Temgesic® (Stock: 0,324 mg/ml: 0,1 mg/kg; 1:30 mit NaCl -100 µl/10g Maus) s.c.
- Porcine Pankreas Elastase (150 µl PPE (E1250-25MG von Sigma) + 615 µl NaCl 0,9%)

Narkose:

- Isofluran (initial 5%, OP 1-2%)

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob die RIP1/MLKL vermittelte Nekroptose eine Rolle in der Progression von Aneurysmen darstellt, haben wir in unserem Labor ein Modell etabliert, das die Induktion von AAA durch lokale Injektion von Pankreas-Elastase ermöglicht [11, 68]. Ripk1^{-/-}, Mlk1^{-/-} sowie Wildtyp-Mäusen wird durch einen operativen Eingriff porcine Pankreas-Elastase (PPE, Schweine-Pankreas-Elastase) injiziert, die die Ausbildung eines AA erzeugt. Durch die vorübergehende Infundierung der ligierten infrarenale Aorta mit Schweine-Pankreas-Elastase wird insbesondere die Elastase-vermittelte Inflamationsreaktion der Aneurysmaentstehung nachgebildet [8]. Einen Tag vor AAA-

Induktion sowie an Tag 3, 7, 14, 21 und 28 erfolgt eine basale echokardiographische Untersuchung.

An Tag 28 erfolgt die Euthanasie der Tiere und die Organentnahme sowie Organprozessierung.

Die Mäuse erhalten zunächst 30 Minuten vor OP eine Analgesie durch subkutane Injektion von Buprenorphin. Anschließend wird durch Inhalation mit 3,5 - 5% Isofluran die Narkose eingeleitet und anschließend kontinuierlich mit 1 - 2% bedarfsgerecht aufrechterhalten. Der Eingriff wird unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Das Abdomen wird enthaart und mit Alkohol desinfiziert. Die Tiere erhalten zum Schutz vor Austrocknung Augensalbe. Die narkotisierten Mäuse werden einer medianen Laparotomie unterzogen und die Bauchorta wird in Höhe der Bifurkation und der linken Nierenvene isoliert. Vor der Perfusion wird der aortale Diameter (AD) mit einem optischen Gitter der Auflösung 0,01 mm bestimmt. Alle aortalen Äste innerhalb von 1,0 cm nahe der Bifurkation werden ligiert. Es werden anschließend temporäre Ligaturen um den proximalen und distalen Abschnitt der Aorta gelegt. Anschließend erfolgt eine Punktion der Aorta im Bereich der Bifurkation mit einer 30G Nadel. Es wird ein mit Hitze behandelter Polyethylenschlauch (PE-10) über die Aorta eingeführt und durch einen Faden fixiert. Durch die Verwendung einer Spritzenpumpe bis 100 mmHg wird in die Aorta 0,05 ml Kochsalzlösung mit 0,0414 U /ml Typ I Schweine-Pankreas-Elastase injiziert. Während der typischerweise 5-minütigen Behandlung wird die Aorta circa 50 - 70% dilatiert. Der Perfusionskatheter wird anschließend entfernt und die Punktionswunde mit einer 10-0 Naht verschlossen. Wichtig ist, dass man beim Verschließen keine Verengung der Aorta erzeugt. Die Wunde wird zweilagig mit Nylon/Polypropylenfäden verschlossen und 1-3 Tropfen 0,25% Bupivacain (ca. 1 Tropfen pro Zentimeter Hautschnitt) lokal appliziert. Danach werden die Mäuse wieder in ihren Käfigen platziert und erhalten hier freie Nahrung und Wasser. Herzfrequenz, Atemfrequenz und Gewebedurchblutung werden während des gesamten Verfahrens überwacht.

Die operierten Mäuse erhalten für 3 Tage eine postoperative Analgesie mit Buprenorphin s.c. alle 6-8 Stunden sowie über Nacht im Trinkwasser (5 ml Temgesic® (0,3mg/ml Buprenorphin in 160ml Trinkwasser)).

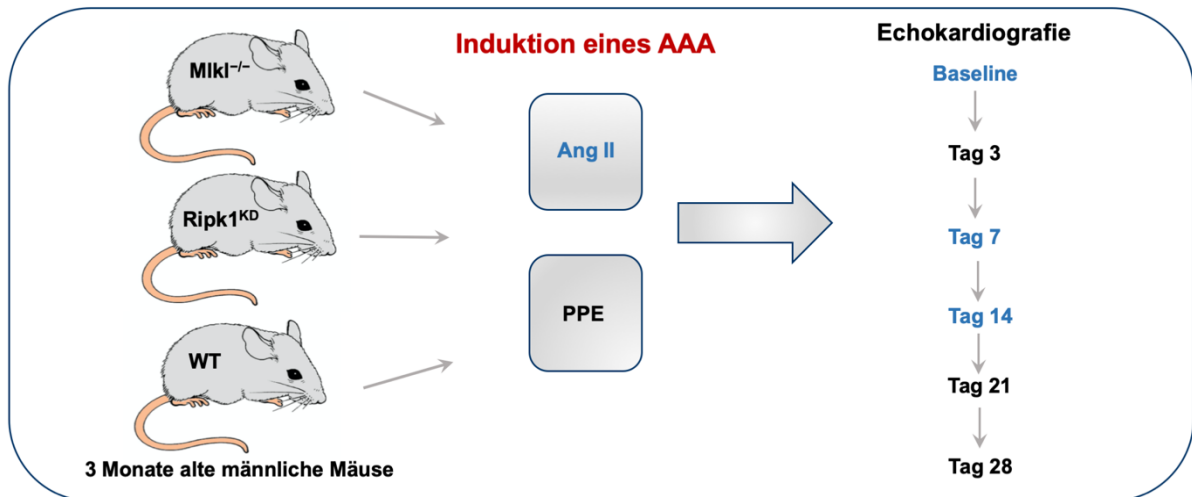


Abb. 5: Skizze über murine AAA Mausmodelle Ang II und PPE. Angaben zum zeitlichen Verlauf der echokardiografischen Untersuchungen der drei Monate alten männlichen Mäuse.

Entnahme von Organen

Medikation:

- 30 Minuten Prä- und Post-OP: Buprenorphin Temgesic® (Stock: 0,324 mg/ml: 0,1 mg/kg; 1:30 mit NaCl -100 µl/10g Maus) s.c.

Narkose:

- Isofluran (initial 5%, OP 1-2%)

Für die Organentnahme wird die Maus zunächst mithilfe von Isofluran und einer Narkosekammer narkotisiert (Einleitung: 3,5%) und anschließend für die Inhalationsnarkose auf einer Wärmeplatte fixiert und durch eine Narkosemaske in Narkose gehalten (bedarfsgesteuert 1-2% Isofluran).

Bereits 30 Minuten vor dem Eingriff erhalten die Tiere eine subkutane Injektion mit Buprenorphin zur Analgesie. Wenn kein Schmerzreiz mehr erkennbar ist (Zwischenzehen-Reflex) wird das Abdomen der Maus desinfiziert und geöffnet. Hierfür wird vorerst mit einer spitzen, gebogenen Pinzette das Xiphoid fixiert und leicht angehoben. Unterhalb des Rippenbogens wird mit einer Knochenschere eingeschnitten und entlang des Rippenbogens wird der Schnitt erweitert. Ein Nadelhalter wird am Xiphoid befestigt, damit sich das Zwerchfell aufspannt. Anschließend wird das Zwerchfell vorsichtig durchtrennt.

Die Blutabnahme erfolgt mit einer 1 ml Spritze mit 30 G Kanüle + 10 µL Heparin (rein) aus dem linken Ventrikel des Herzens. 100 - 200 µL Blut werden aufgezogen und anschließend in einem 1,5 ml Eppi mit Heparin Kügelchen (MiniCollect®) aufgenommen. Das Blut wird zehn Minuten bei 4.400 g zentrifugiert und das Plasma (Überstand) bei -80°C eingefroren und gelagert. Währenddessen wird mit einer 0,9 % NaCl-Lösung die Organe perfundiert, um Blutreste aus der Peripherie zu spülen. Der NaCl-Infusionsbeutel wird auf eine geeignete Höhe angebracht und an ein Butterfly angeschlossen. Um die Aorta zu spülen, wird der Butterfly in den linken Ventrikel (LV) eingestochen und das rechte Atrium angeschnitten, damit das Blut herauslaufen kann. Die 0,9% NaCl-Lösung wird für eine Minute im LV injiziert bis die Leber sich optisch abgeblasst hat. Im Anschluss wird das Herz mit Agarose perfundiert, um das Lumen der Aorta zu füllen. 1,5% Agarose (in A. dest angesetzt) werden auf einem Heizrührer auf 100 °C aufbereitet, bis eine klare Lösung entsteht. Die Agaroselösung wird dann auf 60°C runtergekühlt. Mit einer 1 ml Spritze wird die warme Agaroselösung aufgezogen und durch eine 20 G Kanüle in den linken Ventrikel injiziert. Die Kanüle sollte noch kurz im LV verbleiben damit die Agarose aushärten kann und nicht direkt herausläuft.

Im Anschluss werden die Herzen und Aorten entnommen und mit Tissue Tek® Einbettmedium in Kryoeinbettformen in einem Dewargefäß eingefroren. Nach der letzten Entnahme werden die Herzen und Aorten in den Kryoeinbettformen bei -80°C eingefroren. Aufgrund der schnell einsetzenden Gerinnung ist eine Blutabnahme am lebenden Tier notwendig. Die Tiere werden nach dem Eingriff mittels zervikaler Dislokation getötet.

Echokardiographie

Die Elastase-operierten Mäuse wurden an Tag 0, 3, 7, 14, 21 und Tag 28 einer Echokardiographie unterzogen. Die Angiotensin II-Modell Mäuse wurden nach Tag 0, 7 und 14 untersucht.

Hierfür steht das Kleintierultraschallgerät Vevo 3100, Visual Sonics mit diversen Stativen und Wärmeplatte inkl. EKG zur Verfügung. Die Maus wird zunächst in einer Narkosekammer mit Isofluran narkotisiert (3,5%) und anschließend für die Inhalationsnarkose auf einer Wärmeplatte in Rückenhaltung fixiert und mit Isofluran (bedarfgesteuert 1-2%) unter Narkose gehalten. Die Untersuchung wird unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Vor der Ultraschalluntersuchung werden die Tiere am Abdomen großflächig mit Enthaarungscreme enthaart und mit Hautdesinfektionsmittel desinfiziert. Die Tiere erhalten

zum Schutz vor Austrocknung Augensalbe. Für die Echokardiographie wird ein kleiner Gefäßschallkopf verwendet. Auf eine s.c. Analgesie wurde verzichtet, weil es sich hierbei nicht um einen invasiven Eingriff handelt. Die Untersuchungsdauer liegt bei ca. 30 Minuten pro Tier.

Histologische Untersuchungen

Es wurden 4 µm dicke Schnitte kryokonservierter Aorten unterhalb der Abgänge der Aa. renales und kurz vor den Abgängen der Aa. iliacae communes am Kryostaten (CM3050 S Kryostat, Leica Microsystems) angefertigt. Die angefertigten Schnitte wurden auf Objektträger bei -80°C gelagert. Die Objektträger wurden in verschiedenen Abschnitten nach den unten aufgeführten Färbemethoden gefärbt.

Färbemethoden

Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gefrierschnitten:

In der HE-Färbung werden die Kerne blau und das Zytoplasma sowie die Muskulatur orange-rot gefärbt.

Als Lösungen werden Hämalaun nach Mayer und Eosin als gebrauchsfertige Lösungen verwendet. Zu Beginn werden die Lösungen in Kunststoffküvetten gefüllt und manuell an einer Färbebank unter dem Abzug gefärbt.

Die Schnitte werden für zehn Minuten in Aceton fixiert und im Anschluss für wenige Minuten luftgetrocknet. Anschließend werden die Schnitte für 90 Sekunden in Hämalaun gefärbt. Nach dieser ersten Färbelösung werden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült und zehn Minuten in einer Glasküvette unter kaltem, fließendem Leitungswasser gebläut. Dieser Schritt bewirkt, dass die Zellkerne und alle anderen basophilen Strukturen sich blau anfärben.

Die Schnitte werden dann für eine Minute in Eosin gefärbt. Zur Entwässerung werden die Schnitte zweimal kurz in 96% Ethanol gespült und für eine Minute in Roti®-Histol (Xylolersatz) geklärt. Die Objektträger werden mit Eukitt® als Eindeckmittel und einem Deckglas eingedeckt. Nach der Trocknung der Schnitte erfolgte die Aufnahme an dem Biorevo BZ-9000 Mikroskop.

Pikro-Siriusrot Kollagenfärbung:

Die Pikro-Siriusrot Färbung ist eine Färbung zur Darstellung von Kollagen. Die Zellkerne imponieren grau-braun, das Kollagen rot und übriges Gewebe gelb.

Zu Beginn werden die Kryoschnitte für zehn Minuten in -20°C kalten Aceton fixiert, getrocknet und in destillierten Wasser gespült.

Die Färbung beginnt mit einer absteigenden Alkoholreihe aus je eine Minute in Isopropanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol und destilliertes Wasser. Die absteigende Alkoholreihe dient dazu das Gewebe in ein wässriges Milieu zu überführen, um es schließlich in den Färbelösungen zu färben. Zur Herstellung der Färbelösung Weigerts-Eisenhämatoxylin wird Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1 vermischt. Die Aortenschnitte werden für fünf Minuten in der Weigerts-Eisenhämatoxylinlösung gefärbt. Im Anschluss werden die Schnitte wiederholt mit warmen Leitungswasser gespült. Nach einer kurzen Differenzierung in einprozentigem HCl-Alkohol-Differenzierungslösung werden die Schnitte erneut in warmen Leitungswasser gespült. Die einprozentige HCl-Alkohol-Lösung wird verwendet, um überschüssigen Farbstoff aus dem Gewebe zu entfernen. Durch die Differenzierung - selektive Entfärbung - wird das Zytoplasma wieder entfärbt. Das Zytoplasma hält den Farbstoff besser zurück als andere Strukturen innerhalb der Aorta.

Anschließend kommen die Schnitte für 30 Minuten in eine Pikro-Sirius-Red-Lösung. Diese entsteht durch Mischung von gesättigter Pikrinsäure und Sirius red F3B und wird vor der ersten Benutzung filtriert.

Die Schnitte werden nach der Färbung zweimal in 0,5% Essigsäurewasser abgespült. Hiernach werden die Objektträger unter dem Mikroskop kontrolliert um sicherzustellen, dass die Kollagenfasern ausreichend gefärbt wurden sind. Diese Kontrolle ist essentiell, um eine Überfärbung zu vermeiden. Nach der Färbung werden die Schnitte dreimal für jeweils eine Minute in Isopropanol dehydriert. Zum Schluss werden die Objektträger zweimal für je eine Minute in Roti®-Histol fixiert und mit Eukitt® und Eindeckgläser eingedeckt.

Trichrom-Masson-Färbung (TM) mit Resorcin-Fuchsin (Elastika-Färbung):

Die Masson-Trichrom-Färbung ist eine Übersichtsfärbung, bei der die Kerne braun-schwarz, das Zytoplasma/die Muskulatur rot, die Erythrozyten orange und das Bindegewebe grün gefärbt werden. Die elastischen Fasern werden durch den Farbstoff Resorcin-Fuchsin violett-schwarz gefärbt. Grundsätzlich dient diese Färbung zur Auszählung der Strangbrüche im Bindegewebe in der Tunica media der Aorta.

Zu Beginn werden die Schnitte für zehn Minuten in Aceton fixiert und anschließend luftgetrocknet. Um die elastischen Fasern darzustellen, werden die Schnitte für 15 Minuten in Resorcin-Fuchsin gefärbt. Nach einem kurzen Spülvorgang in destilliertem Wasser werden die Schnitte für fünf Minuten in Eisenhämatoxylin gefärbt und wieder kurz gespült.

Zur Entfärbung werden die Schnitte für eine Minute in einprozentiger HCl-Lösung gestellt und nochmals in destilliertem Wasser gespült. Anschließend werden die Objektträger für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und wieder kurz in destilliertem Wasser gespült. Nun folgt jeweils die Färbung in den gebrauchsfertigen Goldner I, II und III Lösungen. In der Goldner I Lösung verbleiben die Schnitte für eine Minute. Anschließend werden die Objektträger in der Reihenfolge destilliertes Wasser, einprozentige Essigsäure und destilliertes Wasser kurz gespült. In der Goldner II Lösung verbleiben die Schnitte für fünf Minuten. Auch hiernach erfolgt die kurze Spülung in destilliertem Wasser, einprozentige Essigsäure und destilliertes Wasser. Für vier Minuten werden die Objektträger in der Goldner III Lösung gefärbt und im Anschluss in derselben Reihenfolge wie zu den Schritten Goldner I und II in destilliertes Wasser, einprozentige Essigsäure und destilliertes Wasser gespült. Zum Schluss der Färbereihe werden die Objektträger zweimal kurz in 96% Ethanol entwässert und für zehn Minuten in Roti®-Histol fixiert. Die Objektträger werden mit Eukitt® und Eindeckgläser eingedeckt.

Immunhistochemische Färbung: α -SMA, Alexa Fluor 488:

Die α -SMA Färbung dient dazu die Kerne der glatten Muskelzellen in der Aorta abdominalis darzustellen. Der sekundäre Antikörper ist ein konjugierter Antikörper Alexa Fluor 488 (goat anti-mouse), der die Kerne der glatten Muskelzellen immunhistochemisch grün darstellt.

Die Kryoschnitte werden zuerst einmal für zehn Minuten in 4 % PFA fixiert. Anschließend werden die Schnitte für fünf Minuten in PBS gewaschen. Die Objektträger werden dann in einem selbst hergestellten Citratpuffer für 20 Minuten in einem Glasbehälter auf einer 100°C Heizplatte permeabilisiert. Die Lösung mit den Objektträgern wird für 30 Minuten auf Raumtemperatur runtergekühlt und im Anschluss werden die Schnitte für fünf Minuten in PBS gewaschen. Die Objektträger werden an den Rändern mit einem saugfähigen Kosmetiktuch abgetupft und die Aorten einzeln mit einem PapPen umrandet und wieder in eine frische Küvette mit PBS eingefügt. Die PBS-Flüssigkeit wird nach dem Waschschrift vorsichtig von den Schnitten abgeklopft und überschüssige Flüssigkeit am Rand des Gewebes mit einem Kosmetiktuch abgesaugt. Die Schnitte werden dann mit einer Lösung aus PBS + 10% FCS + 1% BSA geblockt. Über Nacht wird der Primärantikörper α -SMA in der

Verdünnung 1:200 auf die Objektträger pipettiert und in einer feuchten Kammer belassen. Am nächsten Tag werden die Schnitte dreimal mit PBS gespült und anschließend trocken getupft. Nun wird der konjugierte Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 (Verdünnung 1:100 in 1x PBS) für 60 Minuten bei Raumtemperatur appliziert. Nach der Inkubation werden die Schnitte für fünf Minuten in PBS gewaschen. Die Kerne werden mit DAPI (Verdünnung 1:1000 in 1x PBS) für fünf Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Zum Schluss werden die Schnitte dreimal in 1x PBS gewaschen und wieder vorsichtig trocken getupft. Die Objektträger werden nach der Färbung mit Dako Fluorescence Mounting Medium und einem Deckglas eingedeckt. Damit die Schnitte nicht austrocknen, werden die Objektträger mit Nagellack umrandet und bei Raumtemperatur getrocknet.

Zellkultur

Die Zellkulturexperimente wurden mit kommerziell erworbenen humanen aortalen SMCs (HAOSMCs) und primär isolierten murinen SMCs aus WT-, *Mlkl^{-/-}* und *Ripk1^{KD}* Mäusen durchgeführt. Die murinen SMCs wurden jeweils aus der thorakalen und dem abdominalen Bereich der Aorta isoliert (siehe SMC-Isolation). Die humanen und murinen SMCs wurden mit TNF- α , zVADfmk, Necrostatin-1 und Albumin als Kontrolle ko-kultiviert (siehe Abb. 6).

Die Zellen wurden bis Passage 4 in Zellkulturflaschen (TC-Flaschen T25 und T75) hochgezüchtet und anschließend für qPCR (Real-time PCR) Experimente aufgearbeitet. Die Zellen wurden mit dem Medium ATCC Vascular Cell Basal Medium 1x Pen/Strep und 20% FCS gefüttert.

Für die RNA-Isolierung wurden Versuche in 6-Well-Platten durchgeführt. Pro Well wurden 100.000 (1×10^5) Zellen in 1000 μ l Medium (ATCC Vascular Cell Basal Medium mit 1x Pen/Strep und 20% FCS) ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht im Inkubator bei 37°C bei 5% CO₂ belassen.

Alle Versuche wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Inkubation mit den Substanzen TNF- α , zVADfmk, Necrostatin-1 und Albumin erfolgte für 8 und 24 Stunden. Über die qPCR wurde die mRNA Expression der Nekroptosemarker MLKL und Ripk1 und die der Entzündungsmediatoren TNF- α , IL-6 und IL-1 β analysiert.

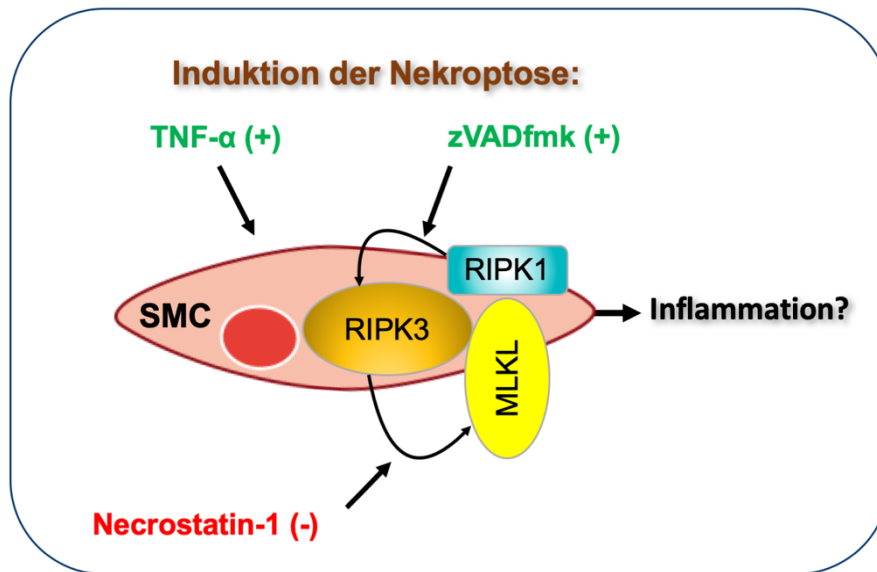


Abb. 6: Skizze. Auswirkung von TNF- α , zVADfmk und Necrostatin-1 auf glatte Muskelzellen (SMCs).

SMC-Isolation

Konzentration für die *in vitro*-Experimente mit murinen SMCs:

AT II	(für 24 Stunden)	100 nM (0,1 μ M= 0,1 μ mol/l)
TNF- α	(für 12 Stunden)	50 ng/ml
Albumin	(für 24 Stunden)	50 ng/ml

Operative Prozedur zur Isolation muriner SMCs:

Der Thorax der Mäuse wird unter sterilen Bedingungen geöffnet und der linke Ventrikel im Herzen mit 10 ml steril filtriertem PBS für wenige Minuten gespült. Anschließend wird die aufsteigende Aorta bis zu den renalen Gefäßen abgetrennt (Aorta thoracalis). Die Aorta abdominalis (infrarenal bis zu den Abgängen der Beckenarterien) wird ebenfalls seziiert.

Die Aorten werden bis zum Versuchsende getrennt untersucht und die Zellen isoliert kultiviert und für weitere Versuchszwecke in Stickstoff eingefroren.

Die Aorten werden jeweils in einem 1,5 ml Eppi mit ATCC Medium ohne FBS-Zusatz (Hungermedium) mit Hilfe einer Pinzette eingefügt. Anschließend wird die etwa 3 cm lange Aorta in einem 1,5 ml Eppi mit 1 ml Liberase-Lösung (0,1 mg/ml Liberase in HBSS) für zehn Minuten bei 37°C eingetaucht. Im nächsten Schritt wird die Aorta auf ein steriles Plastikschälchen mit Liberase-Lösung platziert. Hierbei wird die Tunica adventitia der Aorta

mit einer chirurgischen Pinzette vorsichtig und ohne das Gefäß zu zerreißen in der Liberase-Lösung unter einem Auflichtmikroskop entfernt. Nun wird die Aorta vorsichtig in Längsrichtung aufgeschnitten und in ATCC Medium mit 20% FBS in 12 Well-Platten bei 37°C über Nacht inkubiert. Sobald die Gefäßstücke sich in den 12-Well-Platten befinden, wird unter sterilen Arbeitsbedingungen gearbeitet.

Am nächsten Tag werden die Aorten einzeln in 3 ml Liberase-Elastase-Lösung in 12-Well-Platten gelegt und mit einer sterilen Schere in kleine Stücke geschnitten. Anschließend werden die 12-Well-Platten bei 37°C für 85 Minuten in den Inkubator gestellt. Nach der Inkubation werden die Aortenzellen in den Platten homogenisiert. Die Homogenisierung erfolgt mit einer 100-1000µl Einkanalpipette mit blauen sterilen Spitzen (1. Homogenisierung) und anschließend mit einer 10-100µl Einkanalpipette mit gelben sterilen Spitzen (2. Homogenisierung), indem man die Flüssigkeit in die Pipette auf- und abzieht. Nach der Homogenisierung werden die Zellen bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Die Liberase-Lösung wird gestoppt, indem man pro Well 2 ml Medium (+20 % FBS) hinzufügt. Anschließend wird die Lösung mit Hilfe einer Pipette in zweier Schritten in 15 ml Falcons (sterile Schraubröhren) überführt. Im ersten Schritt wird in jedes Well 3 ml Medium (+ 20% FBS) pipettiert und das Volumen jeweils in ein Falcon überführt. Im zweiten Schritt werden 2 ml Medium (+ 20% FBS) in jedes Well pipettiert und zur restlichen Flüssigkeit im Falcon überführt. Im Anschluss werden die Falcons für fünf Minuten bei 180g (ohne Bremse) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgesaugt und jeweils 2 ml Medium (+ 20% FBS) zum Pellet gegeben. Falls der Überstand trüb sein sollte, wird der Zentrifugationsschritt wiederholt.

Die Zellsuspension wird in 12 Well-Platten überführt und jedes Falcon mit 1 ml Medium (+ 20% FBS) gewaschen und zu der Zellsuspension im Well hinzugegeben. Die 12-Well-Platten werden dann bei 37°C (5% CO₂) im Inkubator kultiviert. Wenn die Zellen konfluent sind (ab etwa 80%), werden die Zellen in T25 TC-Flaschen überführt.

Subkultivierung:

Das Medium aus der Flasche (T25 oder T75) wird abgesaugt und zweimal mit einer vorgewärmten PBS-Lösung gewaschen. Anschließend fügt man 1-2 ml Trypsin/EDTA 0,25 % in T75 Flaschen hinzu und inkubiert die Zellen für zwei bis drei Minuten bei 37°C. Die Reaktion wird durch Zugabe von vorgewärmten Medium abgestoppt. Anschließend wird die Zelllösung in ein 15 ml Falcon überführt und bei 150g für fünf Minuten zentrifugiert (ohne

Bremse). Der Überstand wird mit einer Pipette abgesaugt und das Pellet mit frischem, vorgewärmten Medium resuspendiert.

Es ist unumgänglich, dass Fibroblasten mit in den Zellkulturflaschen wachsen. Um Fibroblasten von den glatten Gefäßmuskelzellen zu isolieren, sollten für mindestens 3 Passagen wie nachfolgend beschrieben vorgegangen werden:

Die Zellsuspension wird in sterile Petrischalen überführt und für 20 Minuten bei 37°C in den Inkubator gestellt. Anschließend wird die Suspension von der Petrischale unter sterilen Arbeitsbedingungen abgesaugt und in eine T25 bzw. T75 Flasche überführt. Vor dem Hintergrund, dass Fibroblasten schneller am Flaschenuntergrund haften, wird dieser Schritt zur Erhaltung einer Monokultur aus glatten Muskelzellen durchgeführt. Diese Ausplattierung wird bei der Subkultivierung dreimal wiederholt bis man davon ausgehen kann, dass keine Fibroblastenzellen mehr in der Kultur vorhanden sind.

Einfrieren:

Die Zellen werden unter einem Auflichtmikroskop betrachtet, um den Grad der Zelldichte zu bestimmen und Bakterien- und Pilzkontaminationen auszuschließen. Die über 80% konfluenten T75 Flaschen werden vorsichtig zweimal mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺ Zusatz) gewaschen, um das restliche Medium zu entfernen. Die anhaftenden und halb anhaftenden Zellen werden mit 0,25% Trypsin/EDTA in HBSS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺ Zusatz) für drei bis vier Minuten bei 37°C im Inkubator trypsinisiert. Durch vorsichtiges Anstoßen der Flasche werden die Zellen von der Flasche gelöst. Die Trypsinisierung wird mit Medium (ohne Wachstumszusätze) gestoppt und die Zellsuspension wird für fünf Minuten bei 180g zentrifugiert. Anschließend wird die Suspension abgesaugt und zu dem Pellet 1,5 ml kaltes Einfriermedium gegeben und in Kryoröhrchen überführt. 14 µl Zellsuspension werden mit 14 µl Trypanblau gemischt und mit der BioRad Zell-Zählmaschine gezählt. Die Kryoröhrchen werden für eine Stunde bei -20°C und dann über Nacht bei -80°C in einem Gefrierbehälter, die mit Isopropylalkohol gefüllt ist, eingefroren und am nächsten Tag in den Stickstofftank überführt.

Real-Time PCR

Die Proben für die Real-Time PCR stammen aus Zellkulturexperimenten. Die murinen SMCs stammen aus der Aorta abdominalis (siehe SMC-Isolation). Die humanen glatten Gefäßmuskelzellen aus der Aorta wurden kommerziell von der Firma Sigma Aldrich erworben.

Aus den isolierten Zellkulturproben der humanen und murinen Aorten werden jeweils die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben.

Die humanen und murinen SMCs werden mit TNF- α , zVADfmk, Nec-1 und zur Kontrolle mit Albumin behandelt. Alle Proben wurden als Dreifachbestimmung analysiert.

Das Real-Time Kit stammt von der Firma Promega (GoTaq[®] qPCR Master Mix Kit). Als RT-PCR-Thermozykler wurde das Applied Biosystems 7300 verwendet.

Vor der RT-PCR wird die RNA mit dem Reverse Transcription Kit QuantiTect[®] der Firma Qiagen isoliert. Für die RT-PCR benötigt man forward und reverse Primer, die von der Firma Eurofins Genomics kommerziell erworben wurden (siehe Tabelle Material und Methoden).

Als Housekeeping Gene wurden GAPDH und β -Actin verwendet. Zudem benötigt man eine Taq-Polymerase (GoTaq[®] Hot Start Polymerase), Reference Dye (Farbstoff BRYT[®] Green Dye), RNase freies Wasser (RT-PCR-Wasser), cDNA von den Proben gewünschter Konzentration (Bsp. 1 ng/ μ l), qPCR-Platten und Folien.

Mit Hilfe der Reverse Transkription wird die cDNA amplifiziert, die für die qPCR Durchführung benötigt wird.

Pipettierung der Platte:

Die qPCR-Platte wird auf Eis gestellt während in der Zwischenzeit die Kitsubstanzen (GoTaq[®] Hot Start Polymerase, Puffer und der Farbstoff BRYT[®] Green Dye) des GoTaq[®] qPCR Master Mix Kit, cDNA und Primer aufgetaut werden. Der Mastermix mit GoTaq[®] Hot Start Polymerase, Puffer, RT-PCR-Wasser und Farbstoff wird erstellt und der entsprechende Primer (forward und reverse) hinzugefügt. Der Mastermix wird für jeden Primer erstellt und durchmischt.

Die cDNA wird durchmischt und auf die kalten qPCR-Platten pipettiert. Im Anschluss wird der Mastermix mit Primer auf die qPCR-Platte pipettiert. Die Platte wird mit einer Folie beklebt und für 20 Sekunden im PCR Plate Spinner zentrifugiert. Im Anschluss wird die

Platte in den Real-Time PCR Thermozykler gestellt und die Vorlage mit dem Amplifikationsprotokoll im Zyklus geladen.

Verwendete Programme zur Analyse der echokardiographischen Aufnahmen und der histologischen Schnitte

Die Auswertung der echokardiographischen Bilder von den Elastase- und Angiotensin II-Modell Mäusen erfolgte mit dem Programm VevoLAB 2.2.0 - Vevo Vasc (Vascular package: Abdominal Aorta - AA Diameter). Hierbei wurden Bilder im M-Mode und B-Mode in der Längs- (LAX) und der Kurzachse (SAX), EKV Bilder in LAX und SAX (Atmung rausgerechnete Wandbewegungsaufnahmen), Bilder mit Color Mode + PW-Doppler Gate und Color + PW-Doppler Einstellung von der abdominalen Aorta kurz vor dem Abgang der Aa. iliaca communes in der Längs- und Kurzachse aufgenommen. Für die Auswertung wurde jeweils die Wandbewegung der Aorta in Millimetern (mm) im M-Mode an drei verschiedenen Stellen in der Diastole und der Systole von der Außen- zur Innenkante ausgemessen und der Mittelwert (Avg) hieraus gebildet. Die Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism® 6 zusammengefasst und daraus Graphen generiert.

Die immunhistochemischen und histologischen Färbungen wurden mit dem Mikroskop (Biorevo BZ-9000 Mikroskop, Keyence Inc., Osaka, Japan) aufgenommen und mit dem Programm (BZ-II-Analyzer, Version 1.42, Keyence Inc., Osaka, Japan) ausgewertet. Die Aufnahmen erfolgten in 10x, 20x und 40x Vergrößerung.

Auswertung der histologischen Aortenschnitte

Analyse des Durchmessers der Tunica media:

Die Dicke der Tunica media wurde an histologischen Schnitten in etwa derselben Schnitthöhe in 10x Vergrößerung mit dem Mikroskop (Biorevo BZ-9000 Mikroskop, Keyence Inc., Osaka, Japan) aufgenommen und dem Programm BZ-II-Analyzer (Version 1.42, Keyence Inc., Osaka, Japan) ausgemessen.

Hierbei wurde für jede Maus die Dicke der Tunica media im Querschnitt an 14 Messpunkten von peripher nach luminal der Aorta bestimmt, indem auf den zu bestimmenden Gefäßabschnitt ein Lot gefällt wurde. Aus diesen 14 Messungen wurde für jede Maus ein Mittelwert gebildet.

Analyse der Kollagen-Staining Bilder (Pikro-Siriusrot):

Die Kollagen-Färbungen wurden pro Maus in 10x Vergrößerung mit dem Mikroskop Biorevo BZ-9000 Keyence aufgenommen und mit dem Programm BZ-II-Analyzer ausgewertet.

Hierbei wurde mit dem BZ-Analyzer Programm die Querschnittsfläche der Tunica media für jede Maus ausgewählt und somit die Zielfläche in μm^2 (Area (Target area) in μm^2) berechnet.

Dabei ist es wichtig, dass die Querschnittsflächen der Medien zwischen den Tieren einen etwa gleich großen Schwellenwert (Treshold) besitzen.

Im nächsten Schritt wählt man manuell mit dem Mauszeiger die zu bestimmende Kollagenfläche aus. Die Auswahl erfolgt nach der Farbe der Kollagenfasern (hier: orange-rot).

Das Programm BZ-II-Analyzer berechnet aus der ausgewählten Kollagenfläche die Gesamtfläche des Integrationsbereiches in μm^2 (Area (1st) Integration total area μm^2) und das Flächenverhältnis in % (Area ratio (1st) %) in der gesamten Tunica media aus.

Analyse der Elastinbrüche und der Elastinfläche innerhalb der Tunica media (Trichrom-Masson-Staining):

Die Elastinschnitte wurden in der 40x Vergrößerung mit dem Mikroskop Biorevo BZ-9000 Keyence aufgenommen und mit dem Programm BZ-II-Analyzer ausgewertet.

Für die Analyse der Elastinbrüche wurde im BZ-Analyzer eine Linie (freehand line (L)) in Mikrometer (μm) gezogen und die Anzahl der Brüche (breaks) (n) in einem Elastinstrang im Querschnitt bestimmt. Um Fehler zu vermeiden und die Ergebnisse einheitlich zu vergleichen, wurde bei jeder Maus die medialste Elastinfaser in der Tunica media ausgewählt. Anschließend wurde für jedes Tier die Brüche (n) durch die Länge der Elastinfaser in μm (L) geteilt und die Prozentzahl gebildet ($n/L*100$).

Für die Analyse der Elastinfläche wurde zunächst mit dem BZ-Analyzer Programm die Querschnittsfläche der Tunica media für jede Maus ausgewählt, um die Zielfläche in μm^2 (Area (Target area) in μm^2) zu berechnen. Dabei ist es wichtig, dass die Querschnittsflächen der Medien zwischen den Tieren einen etwa gleich großen Schwellenwert (Treshold) besitzen.

Im nächsten Schritt wählt man manuell mit dem Mauszeiger die zu bestimmende Elastinfläche aus, um die Gesamtfläche des Integrationsbereiches in μm^2 (Area (1st) Integration total area μm^2) kenntlich zu machen. Für die Gesamtfläche des Integrationsbereiches in μm^2 wurde manuell die Elastinfärbung (Farbe: violett) ausgewählt.

Um die Ergebnisse nicht zu fälschen ist es wichtig, dass man für jede Maus die gleiche Farbintensität auswählt. Die Auswertung sollte dementsprechend in einem kurzen Zeitintervall stattfinden.

Das Programm BZ-II-Analyzer berechnet aus der ausgewählten Elastinfläche die Gesamtfläche des Integrationsbereiches in μm^2 (Area (1st) Integration total area μm^2) und das Flächenverhältnis in % (Area ratio (1st) %) in der gesamten Tunica media aus.

α -SMA(Immunfluoreszenzanalyse) innerhalb der Tunica media:

Die α -SMA immunhistochemischen Objektträger wurden in der 20x Vergrößerung mit dem Mikroskop Biorevo BZ-9000 Keyence aufgenommen und mit dem Programm BZ-II-Analyzer ausgewertet.

Hierbei wurde zunächst mit dem BZ-Analyzer Programm die Querschnittsfläche der Tunica media für jede Maus ausgewählt, um die die Zielfläche in μm^2 (Area (Target area) in μm^2) zu berechnen.

Dabei ist es wichtig, dass die Querschnittsflächen der Medien zwischen den Tieren einen etwa gleich großen Schwellenwert (Treshold) besitzen.

Um die α -SMA Gesamtfläche des Integrationsbereiches in μm^2 (Area (1st) Integreation total area μm^2) innerhalb der Tunica media zu bestimmen, wählt man manuell mit dem Mauszeiger die α -SMA Fläche aus. α -SMA hat in der Färbung die Fluoreszenzfarbe grün.

Das Programm BZ-II-Analyzer berechnet aus der ausgewählten α -SMA Fläche die α -SMA Gesamtfläche des Integrationsbereiches in μm^2 (Area (1st) Integreation total area μm^2) und das Flächenverhältnis in % (Area ratio (1st) %) in der gesamten Tunica media aus.

α -SMA positive Kerne/ Gesamtkerne in der Tunica media (Immunfluoreszenzanalyse):

Für die Auswertung wurden die immunhistochemischen Bilder in der 20x Vergrößerung von der Auswertung α -SMA (Immunfluoreszenzanalyse) innerhalb der Tunica media übernommen.

Im ersten Schritt wurden mit dem Programm BZ-II-Analyzer alle Kerne - DAPI: Fluoreszenzfarbe blau - manuell mit dem Mauszeiger innerhalb der Tunica media ausgezählt.

Im nächsten Schritt wurden die positiven Kerne - α -SMA grün + Kern (Fluoreszenzfarbe blau) - manuell gezählt, indem jeder positive Kern mit dem Mauszeiger angewählt wurde.

Das Programm berechnet am Ende die Gesamtanzahl der Kerne und die Gesamtanzahl der positiven Kerne innerhalb der Tunica media.

Abschließend wurde ein Quotient aus der Anzahl α -SMA positiver Kerne und der Gesamtanzahl der Kerne gebildet.

Statistik

Die Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism® 6 (LaJolla, USA). Als Normalitätstest wurde der D'Agostino-Pearson-Test - in Prism® als omnibus K2 Test bezeichnet - durchgeführt, um die Normalverteilung der einzelnen Werte in der Gaußsche Verteilungskurve zu beurteilen.

Zur Bestimmung der Signifikanz wurden einfaktorielle Varianzanalysen (One-way ANOVA) mit anschließendem Fisher's LSD (Fisher's Least Significant Difference) Test mit einzeln gepoolten Varianzen verwendet. Der Fisher-LSD-Test besteht aus einer Reihe einzelner t-Tests, die den Mittelwert einer Gruppe mit dem Mittelwert einer anderen Gruppe vergleicht und eine gepoolte signifikante Differenz (SD) aus allen Gruppen berechnet. Bei quantitativen Vergleichen von zwei Gruppen dient der zweiseitige t-Test zur Ermittlung der statistischen Signifikanz.

Das Signifikanzniveau (p) wurde in den Abbildungen folgendermaßen dargestellt:

$p > 0,05$ ns, $p < 0,05 > 0,01$ *, $p < 0,01 > 0,001$ **, $p < 0,001$ ***. Bei p Werten $> 0,05$ wurde die nicht angenommene Signifikanz der Ergebnisse mit der Abkürzung ns markiert.

Alle graphischen Darstellungen wurden als einzelne Werte in Gruppen zusammengefasst. Die Anzahl der Mäuse innerhalb der Gruppen war mindestens 5.

5. Ergebnisse

5.1. Zellkulturexperimente an humanen SMCs

MLKL abhängige Expression proinflammatorischer Zytokine in humanen SMCs

Der Zelluntergang aortaler SMCs ist ein bekannter Faktor in der Progression von Aortenaneurysmen. Ob die Induktion der Nekroptose durch aktivierte Leukozyten und deren Produkte wie das proinflammatorische Zytokin TNF- α erfolgt und ob die durch Nekroptose vermittelten Mechanismen der Leukozytenaktivierung und Inflammation auch in humanen SMCs stattfindet, sollte in einem ersten Schritt durch *in vitro* Analysen an humanen SMCs untersucht werden.

Die Nekroptose stellt hierbei eine Variante des programmierten Zelltods dar, welche MLKL-spezifisch reguliert wird und als Induktor einer Entzündungsreaktion wirken kann. In einem ersten Schritt wurden daher humane SMCs mit 50 ng/ml TNF- α ko-kultiviert. Nach 8 Stunden Kultivierung mit TNF- α zeigte sich eine erhöhte Expression von MLKL auf mRNA-Ebene. Diese gesteigerte mRNA Expression von MLKL fehlte in Kontrollzellen, die mit Albumin behandelt wurden.

Im nächsten Schritt haben wir untersucht, ob die TNF- α -vermittelte MLKL-Expression eine proinflammatorische Zytokinexpression auslöst. Wir haben dazu in humanen glatten Muskelzellen die mRNA Expression von MLKL, IL-6 und IL-1 β nach 8 Stunden Inkubation mit 50 ng/ml TNF- α bestimmt (siehe Abb. 7).

Es wurde eine Ko-Kultur aus humanen SMCs zusammen mit TNF- α alleine, TNF- α und zVADfmk sowie TNF- α , zVADfmk und Necrostatin-1 durchgeführt. Das synthetische Molekül zVADfmk (Carbobenzoxyvalylalanylasparyl- [O-methyl] fluormethylketon) ist ein nichtphysiologischer Pan-Caspase-Inhibitor, welches den apoptotischen Weg des Zelltodes hemmt und in Richtung des Nekroptose-assoziierten Zelltodes wirkt [69].

Necrostatin-1 (Nec-1) hingegen hemmt die Wechselwirkung von RIP1-RIP3 und die nachfolgenden nachgeschalteten Effektoren der Nekroptose [37, 61]. Es ist daher ein starker Nekroptosehemmer.

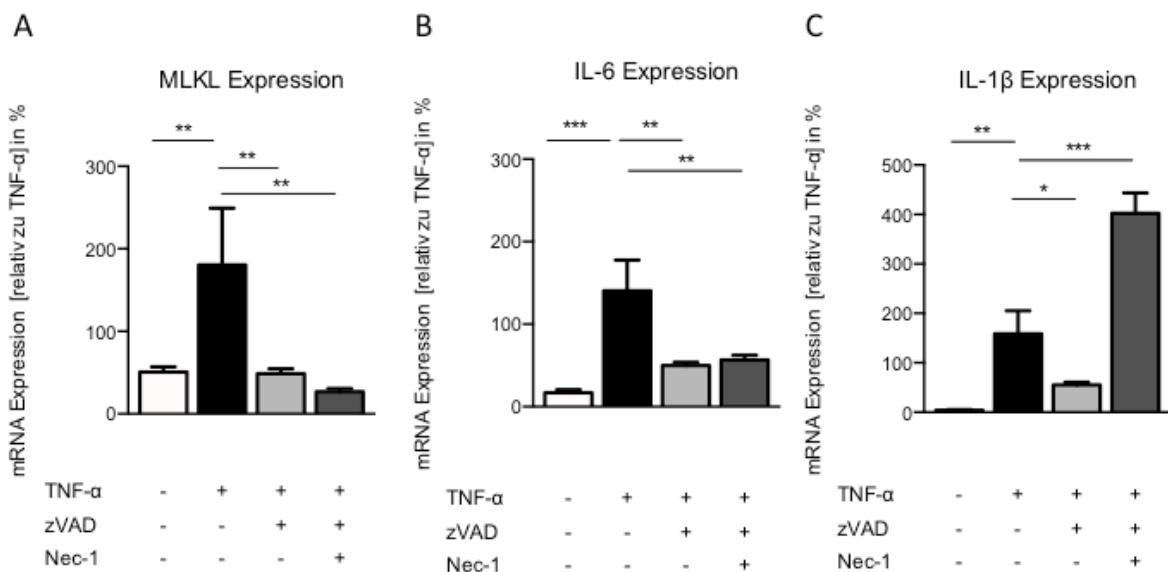


Abb. 7: mRNA Expression von MLKL-, IL-6-, TNF- α - und IL-1 β - in humanen SMCs in Relation zur Kontrollgruppe in % nach 8 Stunden. **A)** MLKL Expression, **B)** IL-6 Expression, **C)** IL-1 β Expression. (A) Kontrolle n=8, TNF- α n=7, TNF- α + zVAD n=7, TNF- α + zVAD + Nec-1 n=8; B) Kontrolle n=8, TNF- α n=8, TNF- α + zVAD n=8, TNF- α + zVAD + Nec-1 n=8; C) Kontrolle n=8, TNF- α n=8, TNF- α + zVAD n=8, TNF- α + zVAD + Nec-1 n=8); (* = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001).

Die mRNA Expression wurde jeweils vergleichend zur Kontrollgruppe, welche wiederum mit Albumin behandelt wurde, dargestellt.

Aus Abb. 7 wird deutlich, dass die MLKL-, IL-6- und IL-1 β Expression in SMC nach der Behandlung mit TNF- α signifikant ansteigt. Hieraus lässt sich schließen, dass humane SMCs durch TNF- α Behandlung proinflammatorische Zytokine produzieren können.

In Bezug auf die MLKL-Expression glatter Muskelzellen hat sich gezeigt, dass der synthetische Nekroptose-Induktor zVADfmk zusammen mit TNF- α eine MLKL-Expression induzieren kann, welches die vorbeschriebene Bedeutung von TNF- α nochmals hervorhebt. Es kommt bei Ko-Kultivierung mit Nec-1 mit humanen SMCs zu keiner relevanten MLKL-Induktion. Selbst dann nicht, wenn gleichzeitig TNF- α vorhanden ist.

Diese Ergebnisse legen eine bedeutende Rolle von TNF- α in der Induktion der Nekroptose nahe.

Die Ergebnisse in Bezug auf die IL-6 und IL-1 β Expression sind nicht eindeutig mit der alleinigen Induktion der Nekroptose zu erklären. Die IL-6 Expression ist ausschließlich bei

der alleinigen Kultivierung der humanen SMCs mit TNF- α angestiegen, nicht hingegen bei Kultivierung mit zVADfmk und Necrostatin. Die IL-1 β Expression steigt bei der Ko-Kultur mit TNF- α alleine sowie bei der Ko-Kultur bestehend aus TNF- α , zVADfmk und Nec-1 signifikant an.

Hieraus lässt sich schließen, dass die Expression der untersuchten proinflammatorischen Zytokine nicht ausschließlich auf die Nekroptose zurückzuführen ist.

Zusammenfassend konnten wir feststellen, dass TNF- α in humanen SMCs die MLKL-Expression auf mRNA Ebene induziert. Zudem scheint TNF- α eine MLKL-vermittelte proinflammatorische Wirkung aufzuweisen, indem es die IL-6- und IL-1 β Expression auf mRNA Ebene erheblich steigert. Bei der Zugabe von zVAD sinkt die MLKL- und die IL-6- und IL-1 β Expression, welches ein Effekt der Nekroptose ist. Durch die nachfolgende Zugabe von Nec-1 wird die MLKL-Expression ebenfalls stark blockiert.

Nach diesen Ergebnissen aus humanen SMCs haben wir als Vorbereitung für *in vivo* Studien im Mausmodell auch *in vitro* Untersuchungen an murinen SMCs durchgeführt. Nach der Erkenntnis, dass die Behandlung von humanen SMCs mit TNF- α , zVADfmk und Nec-1 die MLKL-Expression eine Inflammation moduliert, wurde nun mehr deren Einfluss an murinen SMCs untersucht.

5.2. Zellkulturexperimente an murinen SMCs

Ripk1^{KD} SMCs zeigen eine reduzierte MLKL-Expression nach Stimulation mit TNF- α

In den *in vitro* Studien an humanen SMCs konnten wir zeigen, dass die Stimulation mit TNF- α die MLKL-Expression induziert und dass die Induktion eine proinflammatorische Reaktion auslöst. Um den Einfluss der Nekroptose auf die Inflammation genauer zu zeigen, isolierten wir SMCs aus *Mkl1*^{-/-} Tieren, da hier eine komplette Inhibition der Nekroptose gegeben ist. Zusätzlich haben wir SMCs auch aus Ripk1^{KD} und WT Mäusen isoliert, um einen potenziellen Einfluss der Apoptose zu überprüfen. Hierfür haben wir murine SMCs benutzt und diese wiederum für 8 Stunden mit TNF- α inkubiert (siehe Abb. 8).

Es wurde die mRNA Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6, welches ein starker Induktor für die Leukozytenaktivierung ist und bei der Entwicklung des AAA eine wichtige Rolle spielt, in primären isolierten murinen SMCs aus Ripk1^{KD} und MLKL-defizienten Mäusen bestimmt.

Die IL-6 Expression ist in murinen SMCs nach Kultivierung mit TNF- α signifikant angestiegen. Interessanterweise war in Apoptose- und Nekroptose reduzierten Ripk1^{KD}

SMCs die IL-6 Expression signifikant reduziert, während eine noch deutlichere Reduktion sich in den SMCs der vollständig Nekroptose defizienten *Mlkl*^{-/-} Tiere zeigte. Zusammengefasst scheint die Expression von IL-6 in primären SMCs, zumindest teilweise, Nekroptose-abhängig zu sein.

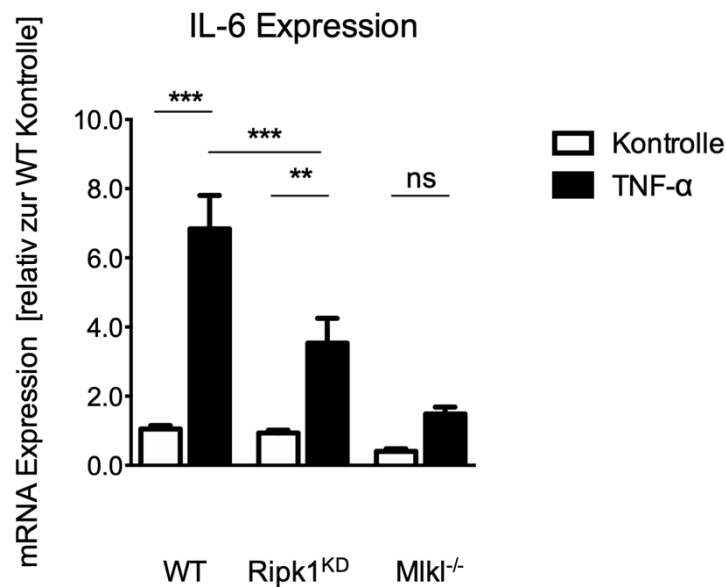


Abb. 8: mRNA Expression von IL-6 nach TNF- α Behandlung in murinen SMCs. mRNA Expression in Relation zur WT Kontrolle (%) nach 8 Stunden. (WT Kontrolle n=13, WT + TNF- α n=17, Ripk1^{KD} Kontrolle n=14, Ripk1^{KD} + TNF- α n=18, *Mlkl*^{-/-} Kontrolle n=13, *Mlkl*^{-/-} + TNF- α n=18); (ns = p>0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001).

Im nächsten Experiment haben wir untersucht, welchen Einfluss TNF- α , zVAD und Nec-1 auf die Expression von MLKL in murinen SMCs ausüben. Hierfür haben wir die mRNA Expression von MLKL in murinen WT- und Ripk1^{KD} SMCs nach 8 Stunden Kultur untersucht (siehe Abb. 9). Hierbei wurde eine Ko-Kultur aus murinen SMCs mit TNF- α alleine, TNF- α und zVADfmk sowie TNF- α , zVAD und Necrostatin-1 durchgeführt. Die mRNA Expression wurde jeweils vergleichend zur mit Albumin behandelten Kontrollgruppe dargestellt. Bei den WT- und Ripk1^{KD} SMCs konnten wir nach Kultivierung mit TNF- α feststellen, dass die MLKL Expression in WT Zellen signifikant stärker ansteigt als in den Ripk1^{KD} SMCs. Die gesteigerte *in vitro* Expression von MLKL in murinen WT SMCs durch TNF- α ist ein Hinweis auf die funktionelle Abhängigkeit der Nekroptose von RIPK1.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass die *in vitro* Expression von MLKL in murinen WT SMCs durch die Inkubation mit TNF- α und zVADfmk keine signifikanten Unterschiede

aufweist. Nach Ko-Kultivierung von TNF- α , zVADfmk und Necrostatin-1 zeigt sich eine signifikant niedrigere Expression von MLKL in murinen Ripk1^{KD} SMCs verglichen mit alleiniger TNF- α Stimulation. Dies bedeutet, dass nicht nur RIPK1 in der Induktion von MLKL beteiligt ist. Kein Unterschied ergibt sich im Vergleich von WT- und Ripk1^{KD} SMCs nach Nekroptose-Inhibition durch Necrostatin, welches die Rolle von RIPK1 in der Nekroptose-Induktion unterstreicht.

Zusammengenommen scheint auch TNF- α einen wesentlichen Effekt auf die MLKL Expression in WT- nicht aber in der Kinase-inaktive Mutante Ripk1^{KD} SMCs auszuüben. Ripk1 Kinase-inaktive SMCs sind gegen eine TNF-induzierte Nekroptose resistent [65]. Zudem ist RIPK1 von zentraler Bedeutung in der Nekroptose-Einleitung in SMCs, jedoch nicht der einzige Induktor der MLKL-Expression.

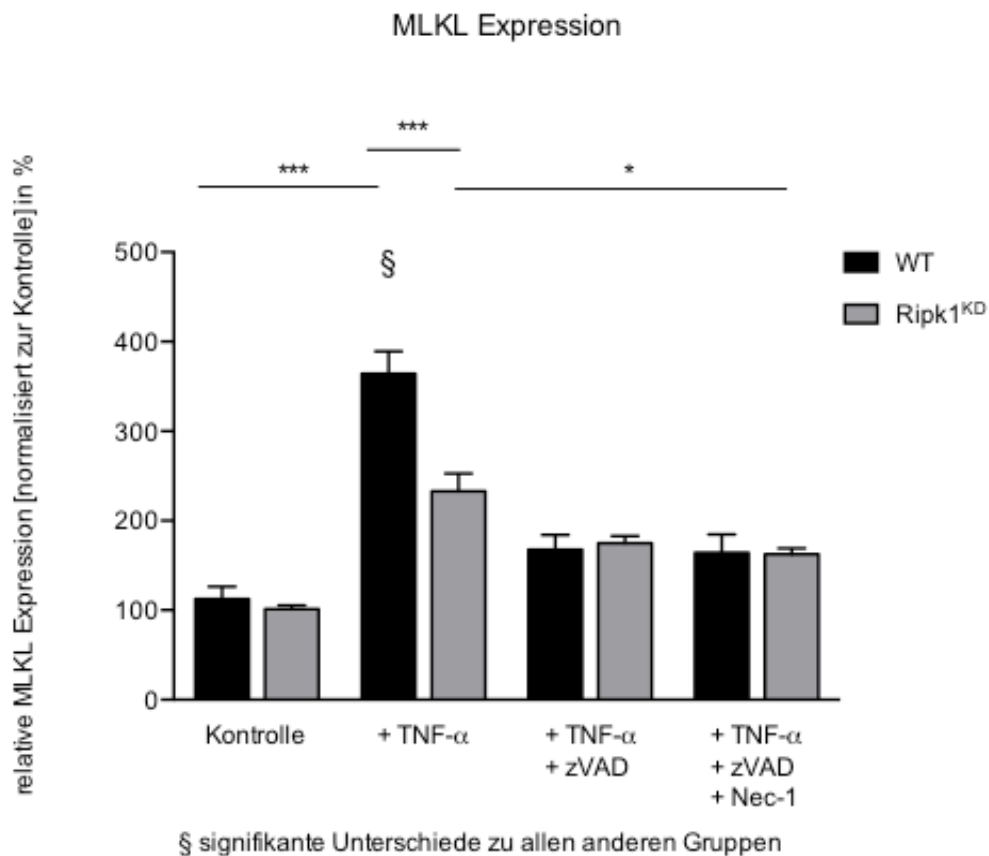


Abb. 9: relative mRNA Expression von MLKL in murinen WT- und Ripk1^{KD} SMCs. Relative Expression in % nach 8 Stunden Inkubation. (WT Kontrolle n=17, Ripk1^{KD} Kontrolle n=17, WT + TNF- α n=18, Ripk1^{KD} + TNF- α n=18, WT TNF- α + zVAD n=18, Ripk1^{KD} TNF- α + zVAD n=18, WT TNF- α + zVAD + Nec-1 n=17, Ripk1^{KD} TNF- α + zVAD + Nec-1 n=18); (* = p<0.05; *** = p<0.001).

Nachdem wir *in vitro* erste Hinweise auf die Relevanz von MLKL-abhängigem Zelltod in SMCs gefunden hatten, war das Ziel, dies *in vivo* nachzuweisen.

Hierbei haben wir *in vivo* Studien in Mäusen durchgeführt. Dabei haben wir WT-, Ripk1^{KD}- und Mkl1^{-/-} Mäuse in den zwei AAA Modellen - Angiotensin II und PPE - untersucht. Als Kontrollgruppe wurde eine große Gruppe an präoperativen WT Tieren verwendet.

5.3. Echokardiographische Untersuchungen an Angiotensin II- und PPE-Mausmodellen

Hierbei haben wir die Aorta abdominalis im Längsschnitt (LAX) sonographisch geschallt.

In Abb. 10 können wir an repräsentativen Ultraschallmessungen am OP-Bereich von PPE Tieren an Tag 28 im Längsschnitt erkennen, dass die WT-Aorten ein größeres Aneurysma ausbilden als die Ripk1^{KD}- und MLKL-defizienten Aorten. Die Aorta erscheint durchgehend steifer und nimmt eine sackartige Struktur an (siehe gelbe Pfeile).

Die Ripk1^{KD} und MLKL-defizienten Tiere weisen kleinere Aortenaneurysmen auf. Wir können somit festhalten, dass die Nekroptose mit ihren Schlüsselenzymen RIPK1 und MLKL von großer Bedeutung in der Entstehung und dem Progress abdomineller Aortenaneurysmen spielt.

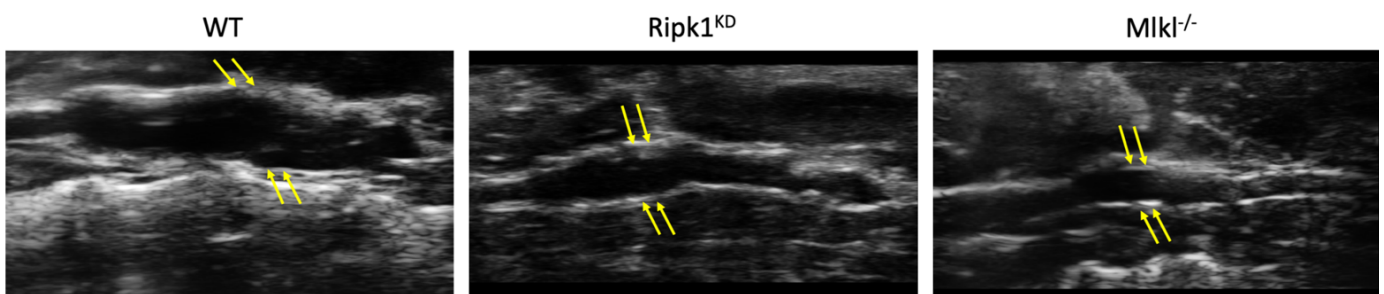


Abb. 10: Repräsentative Ultraschalluntersuchungen an Tag 28 (LAX) nach PPE-Behandlung zeigen, dass Mkl1^{-/-} und Ripk1^{KD} vor abdominellen Aneurysmen geschützt sind. Die gelben Pfeile stellen den operierten Abschnitt dar.

Angiotensin II und seine Auswirkung auf das AAA

Zur experimentellen Induktion abdomineller Aortenaneurysmen wurde in unserem ersten Modell WT-, Ripk1^{KD}-, Mlkl^{-/-} Mäuse Angiotensin II über osmotische Pumpen für insgesamt 14 Tage appliziert und eine Salzdiät (NaCl 1%) verabreicht (siehe Abb. 11). Abbildung 11 zeigt die prozentuale Zunahme des Aortendurchmessers an Tag 0, 7 und 14 in WT-, Ripk1^{KD}- und Mlkl^{-/-} Mäusen. Schon ab Tag 7 konnten wir einen signifikanten Unterschied zwischen den WT-, Ripk1^{KD}- und Mlkl^{-/-} Gruppen erkennen.

An Tag 7 haben die WT Mäuse eine große Diameterweite von im Mittel $47,50 \pm 29,56$ % über den Baselinewerten entwickelt. Der Aortendurchmesser von Ripk1^{KD} Mäusen steigt hingegen an Tag 7 nur um $24,58 \pm 11,63$ % an. Am geringsten ist der prozentuale Durchmesserzuwachs bei den MLKL-defizienten Mäusen. An Tag 7 beträgt deren prozentualer Zuwachs im Mittel $8,12 \pm 3,14$ % und steigt an Tag 14 um $23,16 \pm 14,57$ % an. In Baseline, also vor Induktion eines AAA, besteht kein Unterschied im aortalen Zuwachs des Durchmessers der untersuchten Tiere.

An Tag 14 liegt die Aortenweite bei den WT Mäusen schon bei $61,38 \pm 25,95$ % über dem Normwert an Tag 0. Der Diameterzuwachs bei den Ripk1^{KD} Tieren steigt auf $28,03 \pm 13,27$ % über dem Normwert an Tag 0. Die Mlkl^{-/-} Tiere haben an Tag 14 einen Diameterzuwachs von $23,16 \pm 14,57$ % über dem Normwert an Tag 0 entwickelt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass das Angiotensin II Modell ein AAA zuverlässig induzieren kann. Weiterhin scheinen die Aorten der Ripk1^{KD}- und MLKL-defizienten Mäuse vor einer aneurysmatischen Dilatation geschützt zu sein.

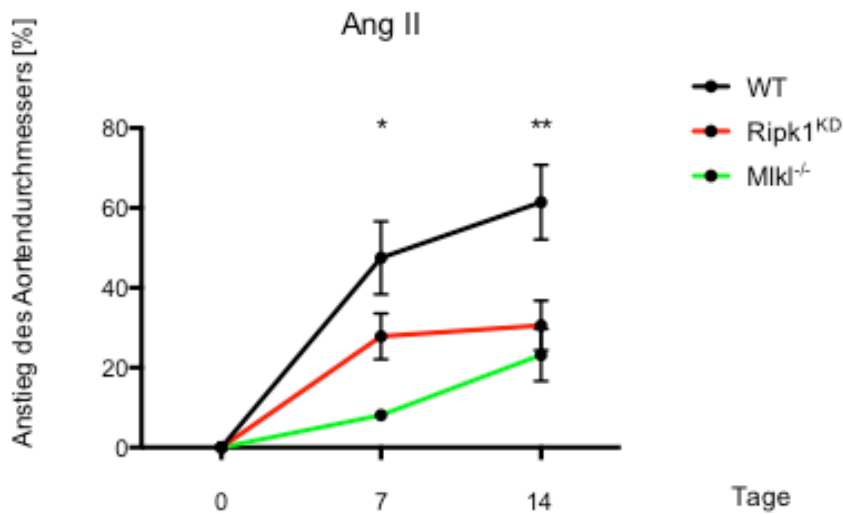


Abb. 11: Angiotensin II Modell. Echokardiographische Untersuchungen der prozentualen Aortendiameter in LAX bei WT-, Ripk1^{KD} und Mlkl^{-/-} Tieren an Tag 0, 7 und 14. Die Hemmung der Nekroptose schützt die Aorta vor einer Aortendilatation. (WT Tag 0, 7, 14 n=7; Ripk1^{KD} Tag 0, 7 n=6, Ripk1^{KD} Tag 14 n=5; Mlkl^{-/-} Tag 0, 7,14 n=5); (* = p<0.05; ** = p<0.01).

PPE und seine Auswirkung auf das AAA

Auch nach Induktion des AAA durch das PPE-Modell haben wir die prozentuale Zunahme des Aortendurchmessers an Tag 0, 3, 7, 14, 21 und 28 in WT-, Ripk1^{KD}-, Mlkl^{-/-}- Mäusen echokardiographisch bestimmt (Abb. 12).

An Tag 7 haben die WT Mäuse eine prozentuale Zunahme der Diameterweite um 82,37 ± 46,51%. Die Mlkl^{-/-} Tiere haben eine Zunahme der Aortenweite um 44,26 ± 30,03% und die Ripk1^{KD} Tiere einen prozentualen Zuwachs des Aortendurchmessers von 42,13 ± 29,04%. An Tag 28 beträgt die prozentuale Zunahme des Aortendurchmessers bei den WT Mäusen 144,2 ± 70,80%.

Ab Tag 14 ist zu erkennen, dass der Diameter der Ripk1^{KD} Tiere weniger ansteigt als bei den Mlkl^{-/-} Tieren [Tag 14: Ripk1^{KD} Mäuse vs. Mlkl^{-/-} Mäuse 45,66 ± 24,22 vs. 64,74 ± 34,72 (Aortendilatation in %); * = p<0.05]. An Tag 21 liegt der Aortendurchmesser bei den Ripk1^{KD} Mäusen bei 49,78 ± 27,42% und bei den Mlkl^{-/-} Tieren steigt der Durchmesser auf

82,89 ± 28,83%. An Tag 28 sind die Aorten der MLKL-defizienten Mäuse auf 95,44 ± 53,46% signifikant erweitert (**= p<0.01). Die Ripk1^{KD} Aorten haben an Tag 28 einen Durchmesser von 58,88 ± 24,19% (**= p<0.01). Den größten Durchmesser haben die WT Tiere an Tag 28 mit 144,2 ± 70,80%.

Die Dilatation der Aorten scheint in dem PPE Modell im Vergleich zu dem Angiotensin II-Modell stärker ausgeprägt zu sein.

Auch im PPE Modell stellt sich heraus, dass die Ripk1^{KD}- und MLKL-defizienten Mäuse von einem aneurysmatischen Umbau geschützt sind.

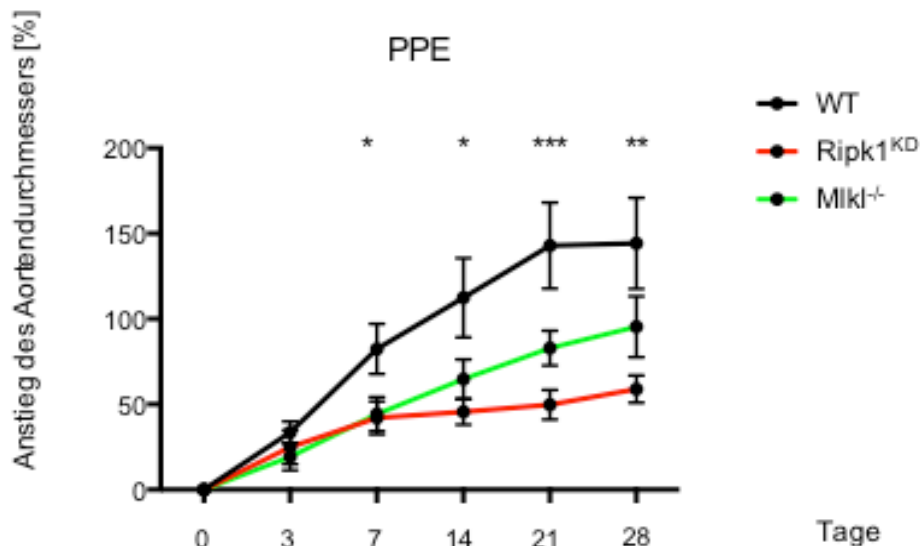


Abb. 12: PPE Modell. Echokardiographische Untersuchungen der prozentualen Aortendiameter in LAX bei WT-, Ripk1^{KD} und Mlkl^{-/-} Tieren an Tag 0, 7, 14, 21 und 28. Die Hemmung der Nekroptose schützt die Aorta vor Aortendilatation. (WT Tag 0 n=17, WT Tag 3 n=10, WT Tag 7 n=10, WT Tag 14 n=10, WT Tag 21 n=7, WT Tag 28 n=7; Ripk1^{KD} Tag 0 n=13, Ripk1^{KD} Tag 3 n=9, Ripk1^{KD} Tag 7 n=9, Ripk1^{KD} Tag 14 n=10, Ripk1^{KD} Tag 21 n=10, Ripk1^{KD} Tag 28 n=9; Mlkl^{-/-} Tag 0 n=15, Mlkl^{-/-} Tag 3 n=9, Mlkl^{-/-} Tag 7 n=9, Mlkl^{-/-} Tag 14 n=9, Mlkl^{-/-} Tag 21 n=8; Mlkl^{-/-} Tag 28 n=9); (* = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001).

In den beiden Mausmodellen zeigte sich, dass die MLKL-defizienten Tiere über den gesamten Zeitverlauf vor einer Erweiterung der Aorta geschützt waren (siehe grüne Kurve).

Dies war weiterhin der Fall, wenn wir diese Experimente mit Ripk1^{KD} Tieren durchführten (siehe rote Kurve). Die echokardiographischen Ergebnisse geben die ersten wichtigen Hinweise, dass MLKL und RIPK1 einen essentiellen Beitrag zur Formation eines Aneurysmas beitragen und eine Defizienz von MLKL und RIPK1 einen protektiven Effekt in der AAA-Progression darstellt.

5.4. Histologische Ergebnisse

Nachdem wir in den echokardiographischen Untersuchungen einen signifikanten makroskopischen Unterschied innerhalb der operierten Gruppen festgestellt haben, haben wir uns im nächsten Schritt die Aorten mikroskopisch angesehen, um die Effekte in der abdominalen Aorta von behandelten/ unbehandelten WT-, Ripk1^{KD}- Mkl^{-/-} Mäusen zu untersuchen. Hierzu legten wir den Fokus auf die Untersuchung von Umbauprozessen der elastischen und kollagenen Fasern, sowie die SMCs innerhalb der Aortenwand (siehe Abb. 13).

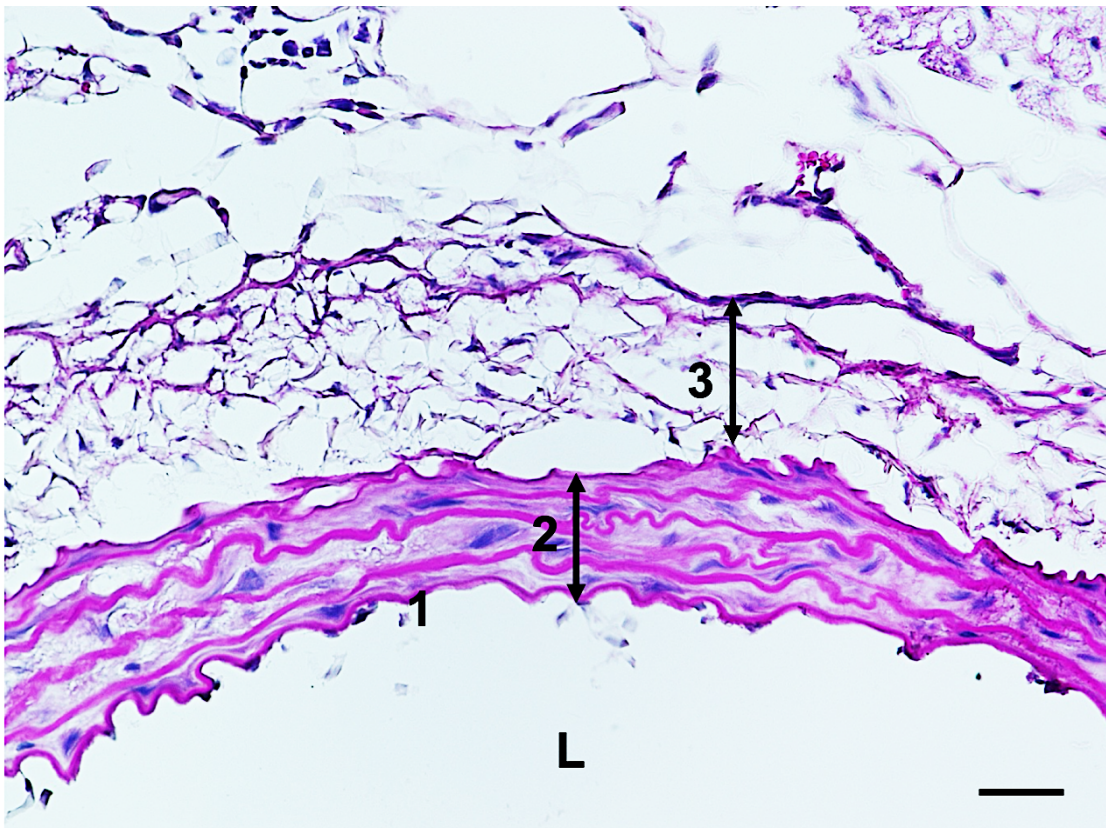


Abb. 13: Histologischer Ausschnitt aus der Aorta abdominalis einer WT behandelten Ang II Maus. 1 - Tunica intima, 2 - Tunica media, 3 - Tunica adventitia, L - Lumen. HE-Färbung. In der HE-Färbung werden die Kerne blau und das Zytoplasma sowie die Muskulatur orange-rot gefärbt. Maßstab: 25 µm. 40x Vergrößerung.

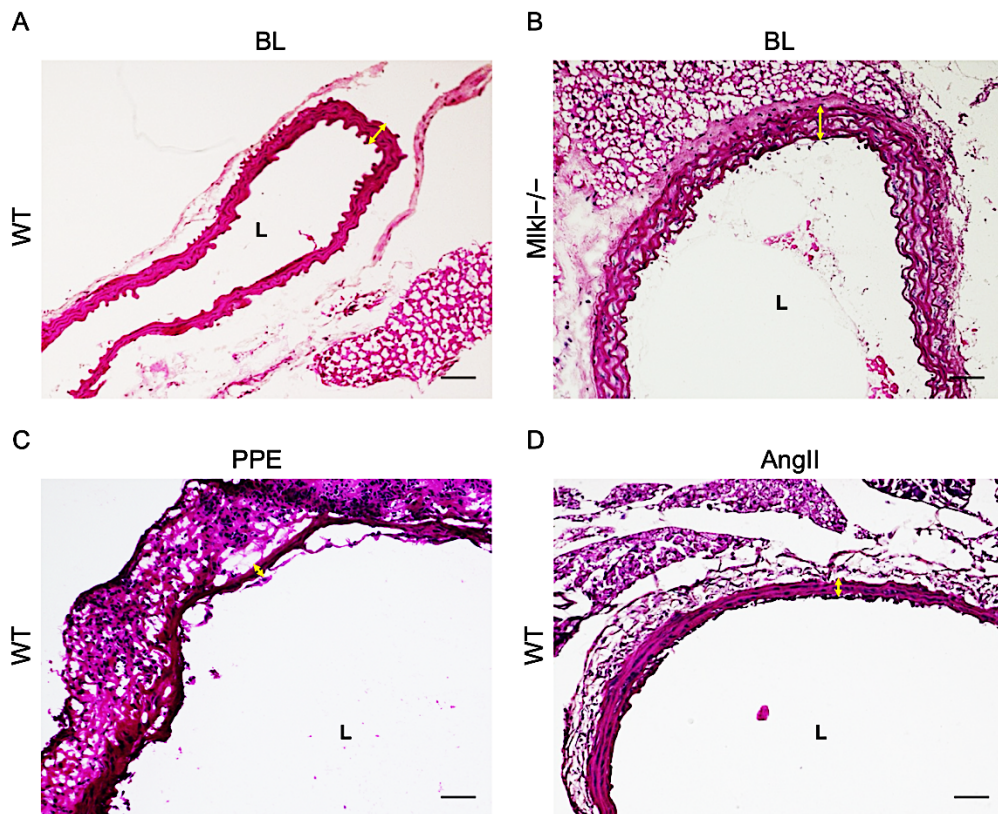
Beurteilung der Dicke der Tunica media innerhalb der Aorta abdominalis

Repräsentative Bilder der HE-Färbungen, die in Abbildung 14 zu sehen sind, lassen erkennen, dass die Tunica media der unbehandelten Aorta aus $Mkl1^{-/-}$ Mäusen dicker ist als die Aorta der WT-Tiere (siehe Abb. 14 A-B). Abbildung 14 C-F zeigt repräsentative histologische Bilder von behandelten WT- und $Mkl1^{-/-}$ Mäusen.

Die Dicke der Tunica media betrug in den unbehandelten MLKL-defizienten Tieren im Mittel $42,83 \mu\text{m} (\pm 4,54)$ und war damit deutlich dicker als bei den unbehandelten Wildtypmäusen. Die Dicke der Aorta von WT-Mäusen lag bei den unbehandelten Tieren bei $27,37 \mu\text{m} (\pm 8,48)$.

Ein ähnliches Bild ergab sich nach Aneurysmainduktion durch das PPE-Modell. Hier war die Dicke der Aorta in den $Mkl1^{-/-}$ Tieren signifikant dicker als bei der WT-Gruppe ($Mkl1^{-/-}$ $39,96 \pm 8,76 \mu\text{m}$ versus WT $28,17 \pm 2,85 \mu\text{m}$).

Im Angiotensin II Modell konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen. Hier lag die Dicke der Tunica media bei den WT Ang II Tieren bei $27,72 \mu\text{m} (\pm 6,59 \mu\text{m})$ und bei den $Mkl1^{-/-}$ Ang II Tieren bei $28,59 \mu\text{m} (\pm 5,08)$.



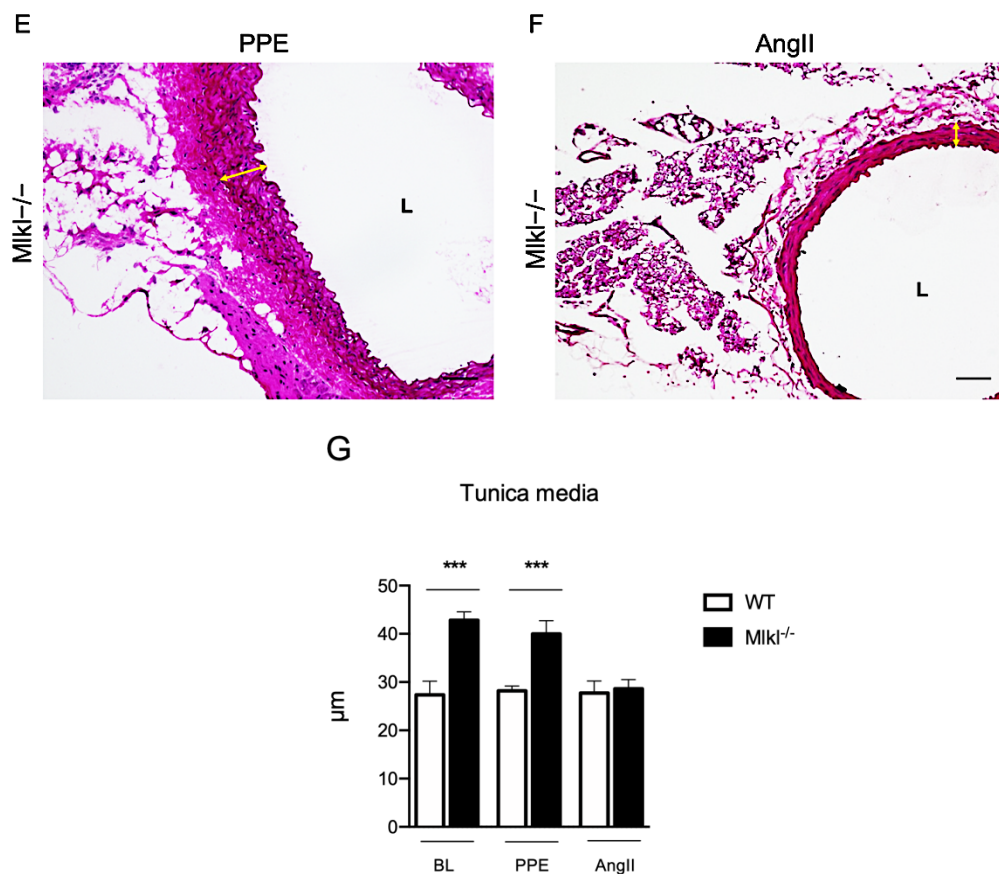


Abb. 14: A-F) Repräsentative HE-Färbung von unbehandelten und behandelten WT- und Mkl1^{-/-} Mäuseaorten im Querschnitt. Die HE-Färbung zeigt bei unbehandelten Baseline Mkl1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Baseline Wildtyp-Tieren eine erhöhte Dicke der Tunica media (µm). Die gelben Pfeile stellen dar, wie die Messung der Dicke der Tunica media durchgeführt wurde. Maßstab: 100 µm. 10x Vergrößerung. In der HE-Färbung werden die Kerne blau und das Zytoplasma sowie die Muskulatur orange-rot gefärbt. G) Stärke der Tunica media in µm. Vergleich von WT- und Mkl1^{-/-} Mäusen. (WT BL n=9, Mkl1^{-/-} BL n=7, WT PPE n=8, Mkl1^{-/-} PPE n=10, WT AngII n=7, Mkl1^{-/-} AngII n=7); (***) = p<0.001).

Hieraus lässt sich ableiten, dass die Mkl1^{-/-} Mäuse im Angiotensin II Modell einem stärkeren strukturellen Umbau in der Tunica media ausgesetzt sind. Die PPE Mkl1^{-/-} Aorten sind vergleichend weniger von einem strukturbehafteten Umbau betroffen.

Wir schließen daraus, dass die Nekroptose das Remodeling der Tunica media 28 Tage nach Induktion beeinflusst.

Untersuchung der kollagenen Struktur innerhalb der Tunica media der Aorta abdominalis

Kollagen ist als Strukturprotein für die Gefäßstabilität entscheidend. Aufgrund der großen Bedeutung des kollagenen Umbaus der Aortenwand in der Entstehung abdomineller Aortenaneurysmen haben wir eine Piko-Siriusrot-Färbung der Aorta behandelter und unbehandelter WT- und Mkl^{-/-} Mäusen durchgeführt, um kollagene Strukturen zu analysieren. In Abbildung 15 A-B zeigte sich in repräsentativen Piko-Siriusrot-Färbungen, dass in unbehandelten WT- und Mkl^{-/-} Aorten der Kollagenanteil in etwa gleich stark ist. Nach Induktion der Aortenaneurysmen kann man histologisch eine veränderte Kollagen-Ratio in der Tunica media erkennen. Der Kollagengehalt ist in den WT behandelten Tieren nach Aneurysma-Induktion signifikant gesunken. Es lässt sich daraus schließen, dass die Aorta aufgrund des niedrigeren Kollagengehaltes instabiler geworden ist (siehe Abb. 15 C-F).

Abbildung 15 G zeigt den prozentualen Anteil von Kollagen in der Tunica media unbehandelter WT- und Mkl^{-/-} Mäusen sowie in WT- und Mkl^{-/-} Mäusen, in denen ein AA mithilfe des PPE- und Angiotensin II-Modells induziert wurde.

Es lässt sich feststellen, dass die unbehandelten WT- und Mkl^{-/-} Tiere einen vergleichbaren prozentualen Kollagenanteil in der Tunica media aufweisen (WT 17,91 ± 4,043% versus Mkl^{-/-} 15,06 ± 2,902%).

Nach Induktion eines AA kommt es in WT- und Mkl^{-/-} Mäusen zu strukturellen Veränderung in Bezug auf den Kollagengehalt der Tunica media.

In den Mkl^{-/-} Tieren kommt es nach experimenteller Induktion eines AA zu keinem Kollagenverlust. Nach Induktion eines AA im PPE-Modell lag hier der prozentuale Anteil an Kollagen bei 22,63 ± 6,394 % (WT 11,51 ± 4,119%). Ähnliche Ergebnisse wurden auch im Angiotensin II Modell erhalten. Hier verbleibt der prozentuale Kollagenanteil in Mkl^{-/-} Mäusen bei 21,57 ± 7,656 % (WT 12,14 ± 5,986%).

Zusammenfassend kommt es nach der Behandlung in WT Tieren zu einem Abbau kollagener Strukturen innerhalb der Tunica media. Die Mkl^{-/-} Tiere weisen im Vergleich einen geringeren kollagenen Abbau auf. Es lässt sich daraus folgern, dass die Nekroptose eine Bedeutung bezüglich des Verlustes kollagener Fasern in der Tunica media bei der Entstehung abdomineller Aortenaneurysmen besitzt.

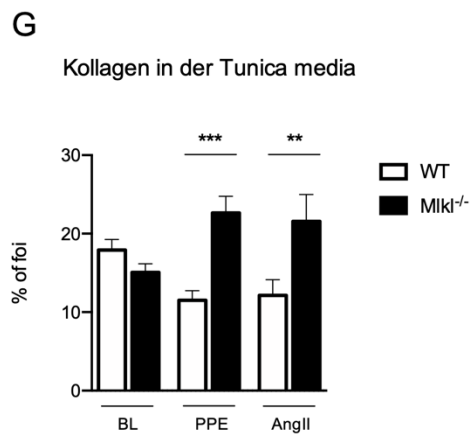
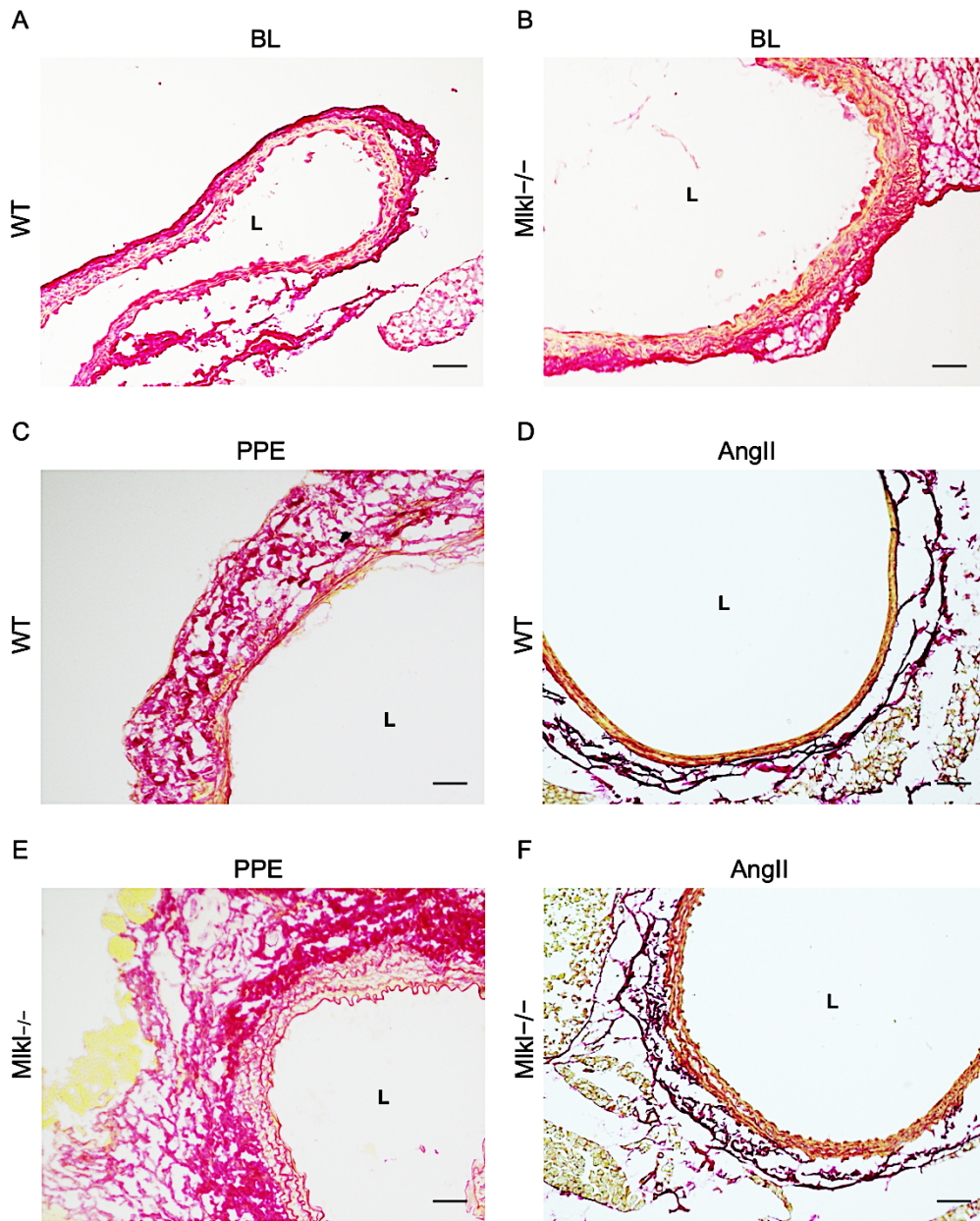


Abb. 15: A-F) Repräsentative Picro-Sirius-Rotfärbung von unbehandelten und behandelten WT- und Mkl1^{-/-} abdominellen Aorten im Querschnitt-Modell. Maßstab: 100

µm. 10x Vergrößerung. Bei dieser Färbung erscheinen die Kollagenfasern rot, Muskulatur und Zytoplasma gelb und die Zellkerne blau. **G)** Picosirius-Rot-Färbung von Aorten aus WT- und von *Mkl1*^{-/-} Mäusen nach 14 Tagen Ang II- und 28 Tagen PPE-Behandlung. foi=field of interest - entspricht der Fläche der Tunica media (n = >5: WT BL n=9, *Mkl1*^{-/-} BL n=7, WT PPE n=11, *Mkl1*^{-/-} PPE n=9, WT AngII n=9, *Mkl1*^{-/-} AngII n=5; (***) = p<0.001; ** =p<0.01).

Elastinbrüche innerhalb der Tunica media der Aorta abdominalis

Zur Beurteilung des Elastins der Tunica media wurde die Aorta behandelter und unbehalteter WT- und *Mkl1*^{-/-} Mäusen mit einer kombinierten Masson-Trichrom-Resorcin-Färbung gefärbt. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf Elastinbrüche und den relativen Elastingehalt innerhalb der Aortenwand gelegt.

In der repräsentativen Masson-Trichrom-Resorcin-Färbung in Abbildung 16 lässt sich erkennen, dass die Baseline WT und *MLKL*-defizienten Tiere eine geordnete Aortenwandstruktur besitzen (siehe Abb. 16, Panel 1). Die elastischen Fasern haben eine einheitliche Struktur und keine Brüche.

Im PPE- und Ang II Modell ist mikroskopisch ersichtlich, dass die elastischen Fasern verändert sind. Die elastischen Fasern in den Wildtyp-Tieren des PPE- respektive AngII-Modells sind aufgelockerter und enthalten ausgeprägte Brüche (siehe schwarze Pfeile), welche in den *Mkl1*^{-/-} Tieren fehlen (siehe Abb. 16, untere Bildreihe).

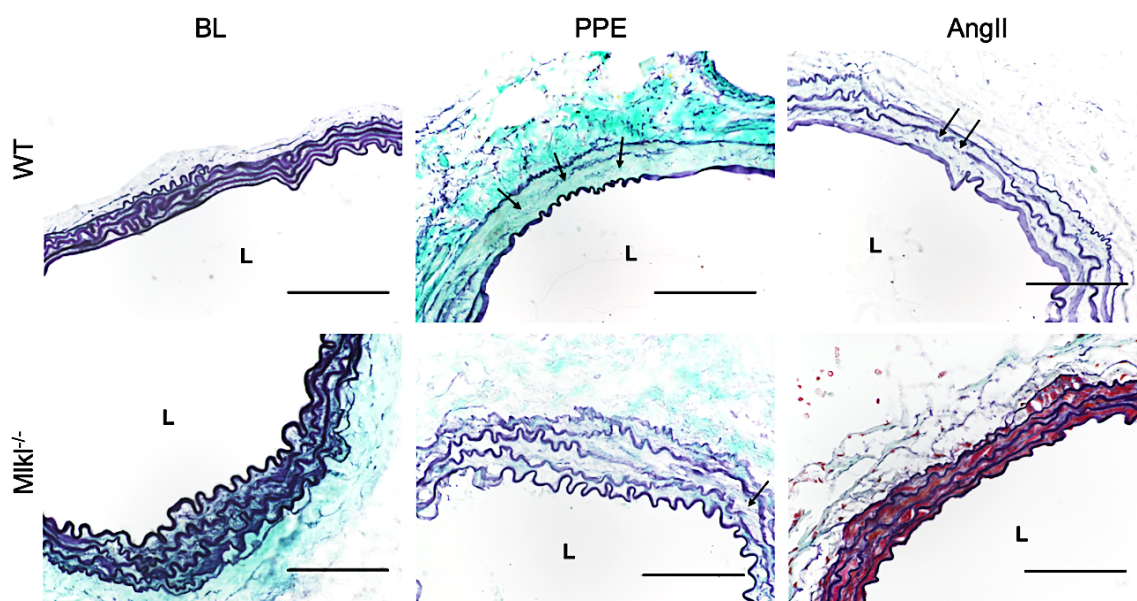


Abb. 16: Repräsentative Masson-Trichrom-Färbung aus abdominellen Aortenschnitten im Querschnitt. Maßstab: 25 μm . 40x Vergrößerung. Die elastischen Fasern werden violett schwarz, das Bindegewebe grün und das Zytoplasma/die Muskulatur rot angefärbt.

Ausgehend von der Masson-Trichrom-Färbung wurden die elastischen Brüche je 100 μm Tunica media von unbehandelten WT- und $\text{Mkl}^{-/-}$ Mäusen sowie mit PPE und Ang II behandelten WT- und $\text{Mkl}^{-/-}$ Mäusen quantifiziert (Abbildung 17 A). Die Strangbrüche der elastischen Fasern haben wir als einen Indikator für eine strukturelle Degradierung von Matrixproteinen im AAA verwendet.

Die unbehandelten Aorten der WT Tiere haben 0,17 (\pm 0,22) Elastinbrüche pro 100 μm . In den Baseline $\text{Mkl}^{-/-}$ Mäusen konnten wir keine Brüche feststellen.

Die PPE-behandelten WT Mäuse haben im Mittel 0,61 (\pm 0,35) Elastinbrüche pro 100 μm Tunica media. Die behandelten $\text{Mkl}^{-/-}$ Mäuse bilden signifikant weniger Elastinbrüche pro 100 μm . aus. In $\text{Mkl}^{-/-}$ Mäusen, in denen ein AA mithilfe des PPE Modells induziert wurde, beträgt die Strangbruchrate im Mittel $0,15 \pm 0,15$ pro 100 μm .

Wiederum ähnliche Ergebnisse konnten wir auch im Ang II Modell erhalten. Hier liegen in den WT-Tieren mit 0,32 (\pm 0,13) Elastinbrüche pro 100 μm mehr Elastinbrüche als in den $\text{Mkl}^{-/-}$ Mäusen vor ($0,04 \pm 0,01$ pro 100 μm).

Relative prozentuale Elastinmenge innerhalb der Tunica media der Aorta abdominalis

In Abbildung 17 B haben wir die relative prozentuale Elastinmenge der Tunica media in unbehandelten WT- und $\text{Mkl}^{-/-}$ Mäusen sowie in den Mäusen, bei denen ein AA mithilfe der PPE- und Ang II Modelle induziert wurden, zusammengefasst.

In der Baseline weisen die WT Tiere mit 37,72% (\pm 7,60) keine signifikanten Unterschiede der relativen Elastinmenge verglichen mit $\text{Mkl}^{-/-}$ Mäuse auf ($42,62\% \pm 14,75$). Nach der Behandlung kommt es in beiden Gruppen zu signifikanten Veränderung der prozentualen Elastin-Zusammensetzung innerhalb der Tunica media.

Im PPE Modell sinkt der Elastingehalt der WT-Mäuse auf 16,09% (\pm 3,98), wohingegen die $\text{Mkl}^{-/-}$ Mäuse mit 25,46 % (\pm 5,21) einen signifikant niedrigeren Elastinabbau aufweisen.

Ähnliche Ergebnisse konnten wir im AngII Modell zeigen (WT $27,26 \pm 1,89$ % versus $\text{Mkl}^{-/-}$ $36,20 \pm 3,43$ %).

Wir können festhalten, dass die beiden AAA Modelle einen erheblichen Effekt auf die elastischen Strukturen innerhalb der Tunica media der Aorta ausüben (siehe Abb. 16). Dieser Effekt scheint wiederum maßgeblich auf die Nekroptose rückführbar. Aneurysmen führen zu einem Verlust des Strukturproteins Elastin, dessen Abbau in den MLKL-defizienten Tieren reduziert war. Eine Hemmung der Nekroptose kann daher den Umbau der Aorta verhindern.

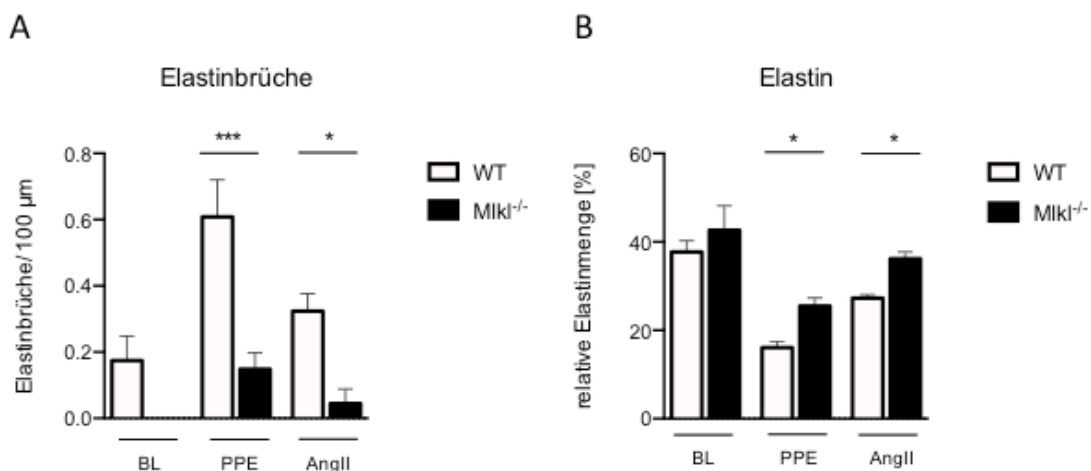


Abb. 17: **A)** Elastinbrüche/100 µm und **B)** relative Elastinmenge in % innerhalb der Aortenwand in unbehandelten und behandelten WT- und Mkl1^{-/-} Mäusen. (A) WT BL n=9, Mkl1^{-/-} BL n=7, WT PPE n=10, Mkl1^{-/-} PPE n=9, WT AngII n=6, Mkl1^{-/-} AngII n=5; B) WT BL n=9, Mkl1^{-/-} BL n=7, WT PPE n=8, Mkl1^{-/-} PPE n=8, WT AngII n=6, Mkl1^{-/-} AngII n=5); (* = p<0.05; *** = p<0.001).

α-SMA Expression in der Tunica media der Aorta abdominalis

In einer immunhistochemischen Färbung von α-SMA, einem SMC-Marker, wurde die glatte Muskulatur innerhalb der Tunica media vergleichend zwischen den Ang II und PPE Modellen untersucht.

In den dargestellten repräsentativen immunhistochemischen Bildern (Abb. 18) können wir festhalten, dass es im AAA zu einem Um- und Abbau von glatten Muskelzellen innerhalb der Tunica media kommt. Die Mkl1^{-/-} Tiere scheinen hierbei von diesem Abbau geschützt zu sein (siehe Abb. 18 A, untere Bildreihe).

Ferner haben wir die relative α -SMA Expression in der Tunica media quantifiziert (siehe Abb. 18 B) sowie den Anteil α -SMA positiver Kerne an der Gesamtanzahl der Kerne in der Tunica media dargestellt (siehe Abb. 18 C). In den unbehandelten WT Mäusen liegt die α -SMA Expression bei 13,60 % ($\pm 3,84$) (Mkl^{-/-} 8,5% $\pm 5,54$). Nach der Induktion eines AA sinkt die α -SMA Expression in den Wildtypmäusen, während sie in den Mkl^{-/-} Mäusen weitestgehend konstant bleibt.

In den PPE WT Tieren beträgt die α -SMA Expression 3,40% ($\pm 2,35$). In den Mkl^{-/-} Tieren verbleibt die α -SMA Expression der Tunica media auf dem Niveau der Baseline-Tiere 10,89% ($\pm 3,04$). Im Ang II Modell sinkt die α -SMA Expression der WT Tiere auf 4,16% ($\pm 2,27$). Auch hier verbleibt die α -SMA Expression in der Aorta von Mkl^{-/-} Tieren konstant (5,67% $\pm 7,67$).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Konzentration von α -SMA nach Aneurysmainduktion abgenommen hat, nicht jedoch in den Mkl^{-/-} Tieren. Dies war auch nach Normalisierung auf Zellkernanzahl der Fall. Dies wiederum ergibt Hinweise nicht nur auf eine fehlende Dedifferenzierung der SMCs unter Nekroptosedefizienz, sondern auch auf eine vermehrte SMC-Zell-Anzahl mit erhaltener Mediadicke.

Die Inhibition der Nekroptose verringert somit den Untergang von glatten Muskelzellen in der Tunica media der Aortenwand.

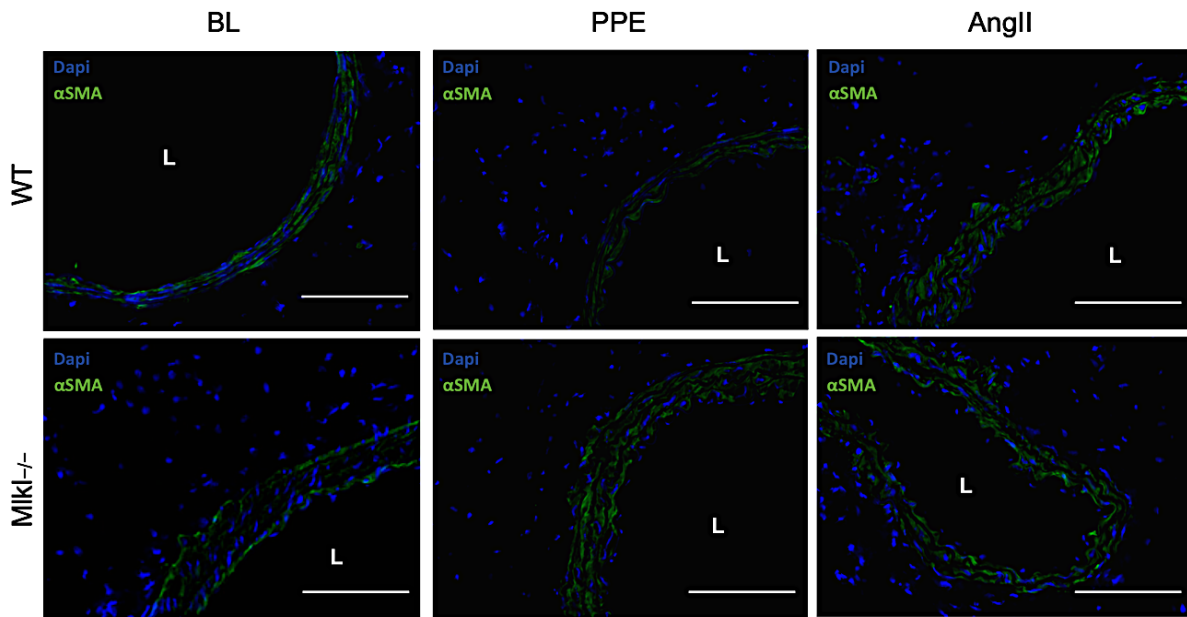
α -SMA positive Kerne/ Gesamtanzahl der Kerne in der Tunica media

In Abbildung 18 C haben wir die Anzahl α -SMA positiver Zellen in Relation zu der Gesamtanzahl der Kerne in der Tunica media gesetzt, um einen Hinweis auf einzelne Muskelzellen zu erhalten. Passend zu den Ergebnissen der α -SMA-Expression besteht kein relevanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mkl^{-/-} Mäusen in der Baseline.

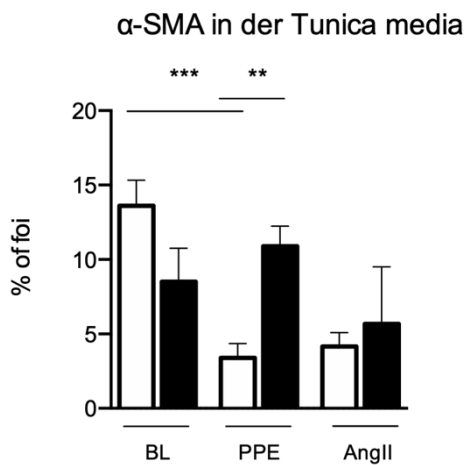
Kommt es aber zur Ausbildung eines AA nach PPE-Infusion ist die Ratio an α -SMA positiven Zellen zu Gesamtzellkernen in den Mkl^{-/-} Tieren signifikant erhöht (0,71 % $\pm 0,16$). In dem Ang II Modell bestätigt sich diese Tendenz, jedoch zeigt sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen WT und Mkl^{-/-} Tieren (WT 0,28 % $\pm 0,10$ versus Mkl^{-/-} 0,40 % $\pm 0,35$).

Zusammengefasst führt die Nekroptose zu einem Verlust von α -SMA der SMCs in der Tunica media der Aorta. Mkl^{-/-} Tiere sind durch die fehlende Nekroptose von diesem Phänomen geschützt, auch wenn dies im Ang II nur mit einem statistischen Trend bestätigt werden konnte.

A



B



C

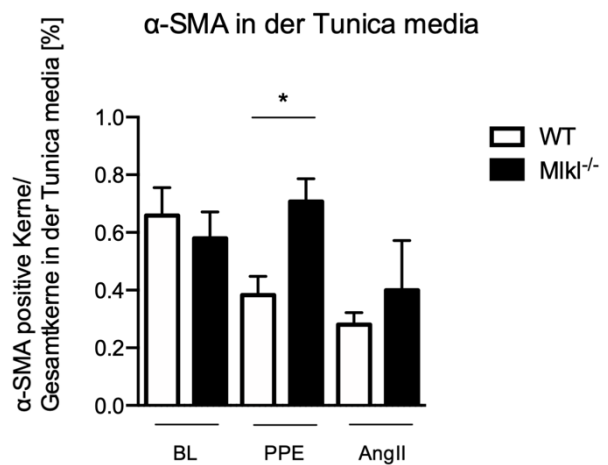


Abb. 18: A) Repräsentative α -SMA und DAPI Färbung der abdominalen Aorten im Querschnitt. Maßstab: 100 μ m. 20x Vergrößerung. α -SMA fluoresziert in der immunhistochemischen Färbung grün. Die Zellkerne fluoreszieren nach der DAPI Färbung blau. B-C) Vergleich der α -SMA Expression in % of foi = field of interest (B) und α -SMA positive Kerne/Gesamtkerne in der Tunica media in % (C). Mlkl^{-/-} Aorten zeigen eine erhöhte α -SMA Expression. (A) WT BL n=5, Mlkl^{-/-} BL n=6, WT PPE n=6, Mlkl^{-/-} PPE n=5, WT AngII n=6, Mlkl^{-/-} AngII n=4; B) WT BL n=5, Mlkl^{-/-} BL n=6, WT PPE n=4,

Mlkl^{-/-} PPE n=4, WT AngII n=6, Mlkl^{-/-} AngII n=4); (* = p<0.05 ; ** = p<0.01; *** = p<0.001).

7. Diskussion

7.1. Nekroptose im abdominalen Aortenaneurysma

In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die Nekroptose-assoziierten Enzymkinasen RIPK1 und MLKL in der Pathogenese des AAA besitzen. Nekroptose ist eine Art des regulierten Zelltodes, bei der es durch Freisetzung von DAMPs zu einer nachfolgenden pro-inflammatorischen Reaktion kommt [40, 70]. Es ist bekannt, dass die RIPK3- und RIPK1-Spiegel bei einem AA und bei Atherosklerose erhöht sind [43, 69]. Passend hierzu wurde ebenfalls beschrieben, dass eine Defizienz von RIPK1 und RIPK3 die Entstehung eines AAA abschwächen kann. Die Bedeutung von RIPK3 in der Nekroptose wurde bereits untersucht [66]. Da der für die Nekroptose entscheidende Prozess jedoch die Bildung eines Nekrosom-Komplexes aus RIPK1 und RIPK3 und phosphorylierten MLKL ist [71], wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bedeutung der Enzymkinasen RIPK1 und MLKL in der Entstehung abdominaler Aortenaneurysmen im Mausmodell untersucht.

Es wurden daher RIPK1-inaktive Mäuse (*Ripk1^{KD}*) sowie *Mkl1^{-/-}* Mäuse verwendet, um die Frage zu beantworten wie sich eine Inaktivierung dieser Schlüsselenzyme der Nekroptose auf die Pathogenese abdominaler Aortenaneurysmen auswirken.

Wir konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmalig nachweisen, dass die Nekroptose die Ausbildung abdominaler Aortenaneurysmen entscheidend mitbedingt, da RIPK1-inaktive und MLKL-defiziente Mäuse vor einer Ausbildung eines AAA geschützt sind.

Pathophysiologisch konnten wir in dieser Arbeit diverse Nekroptose-assoziierte Mechanismen identifizieren, die in der Entstehung vom AAA eine Rolle spielen. Wir konnten *in vitro* zeigen, dass TNF- α als wichtiger Induktor von Zelltodmechanismen, unter anderem von Nekroptose, die MLKL Expression in humanen aortalen SMCs steigert (siehe Abb. 7). Diese gesteigerte MLKL-Expression führt zu einem gesteigerten proinflammatorischen Niveau, welches durch die Induktion IL-6 und IL-1 β demonstriert wurde.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Kinaseaktivität von RIPK1 nicht TNF- α abhängig ist [67]. Dennoch wurde sie als unverzichtbar für die TNF- α -induzierte Nekroptose beschrieben [65], was sich auch durch unsere Arbeiten bestätigen lässt.

Das in dieser Arbeit verwendete Molekül zVADfmk (zVAD, Carbobenzoxyvalylalanylasparyl-[O-methyl]fluormethylketon) ist ein nichtphysiologischer Pan-Caspase-Inhibitor, welches den apoptotischen Zelltod hemmt und ein wichtiger

Induktor der Nekroptose ist [69, 72]. zVAD bewirkt eine anhaltende Aktivierung des Nekrosoms und führt schließlich zu einer Nekroptose [29].

Necrostatin-1 (Nec-1; Methyl-Thiohydantoin-Tryptophan (MTH-TRP)) wurde 2005 entdeckt [61] und ist der erste nachgewiesene gezielt selektive RIP1-Inhibitor [48]. Das kleine Molekül Nec-1 hemmt die Wechselwirkung von RIP1-RIP3 und die nachfolgenden nachgeschalteten Effektoren der Nekroptose und wird daher als bevorzugter Inhibitor der Nekroptose eingesetzt.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass TNF- α die Induktion von MLKL sowie konsekutiv die Induktion von IL-6 und IL-1 β bewirkt. Der synthetische Nekroptose-Induktor zVAD erfüllt erst dann seine Wirkung, wenn gleichzeitig TNF- α vorliegt. Die Hemmung der Nekroptose mittels Necrostatin-1 verhindert erfolgreich die erhöhte Expression von MLKL als Hinweis auf Nekroptose-Induktion (siehe Abb. 7 und 9).

In dieser Arbeit haben wir das Molekül Nec-1 und nicht Nec-1s verwendet. Nec-1s oder auch 7-Cl-O-Nec-1 genannt, ist eine stabilere und chemisch veränderte Variante von Nec-1 und gilt als spezifischster RIPK1-Inhibitor. Zudem ist Nec-1s keine toxische Wirkung zugeschrieben [73]. Ein toxischer Effekt von Nec-1 auf unsere Ergebnisse lässt sich nicht ausschließen. Somit sind zukünftige Experimente mit dem Einsatz von Nec-1s geplant, um unsere Ergebnisse mit Nec-1 zu überprüfen und gegebenenfalls eine noch spezifischere Inhibition von Nekroptose zu erreichen.

In den *in vivo* Ergebnissen haben wir zeigen können, dass die beiden Modelle Angiotensin II und PPE ein AAA induzieren. Hierbei konnten wir feststellen, dass Ripk1-inaktive und MLKL-defiziente Mäuse weitestgehend von einem aneurysmatischen Umbau abgeschirmt sind. Nekroptose beeinflusst das Remodeling innerhalb der Tunica media, wovon MLKL-defiziente Mäuse schon in Baseline geschützt sind (Abb. 14 A-B und 14 G).

In der Ausbildung des AAA kommt es zu einem Abbau kollagener Strukturen und zu einem Verlust von kollagenen Fasern innerhalb der Tunica media von dem MLKL-defiziente Tiere gesichert sind (Abb. 15 C-F und 15 G). Auch konnten wir eine Bedeutung der Nekroptose in Bezug auf den Verlust elastischer Fasern der abdominalen Aorta nachweisen, da es nach AAA-Induktion zu einem erheblichen Verlust von α -SMA innerhalb der Tunica media der Aorta abdominalis gekommen ist. *Mkl1*^{-/-} Tiere sind durch die fehlende Nekroptose von diesem Phänomen geschützt (Abb. 16 - 18).

Eine eindeutige Zuordnung des α -SMA-Verlustes zu SMC-Zellen ist mit den durchgeführten immunhistochemischen Färbungen nicht möglich. Der α -SMA Antikörper kann sowohl Fibroblasten als auch glatte Muskelzellen anfärben. Diese könnte man durch eine Ko-Färbung mit dem Fibroblastenmarker DDR2 unterscheiden. DDR2 (Discoidin-Domänenrezeptor 2) ist eine Rezeptortyrosinkinase, die kollagene Strukturen als ihre Liganden erkennt [74]. Diese Ko-Färbung wurde in dieser Arbeit noch nicht durchgeführt.

7.2. Die Rolle von Nekroptose in der Inflammation

Wie aus der Literatur bekannt konnten wir in unserer Versuchsreihe *in vitro* und *in vivo* feststellen, dass in der AAA-Bildung der Ab- und Umbau extrazellulärer Matrix, der Verlust von SMCs und entzündliche Prozesse in der Aorta eine große Rolle spielen [8, 24].

Man geht davon aus, dass sich programmierte Formen des Zelltodes wie die Apoptose und Nekroptose als Gegengewicht in der ersten Verteidigungslinie gegen exogene oder selbstabgeleitete Entzündungsreize entwickelt haben [69].

Diese werden durch verschiedene Signalwege gesteuert und teilen aber dennoch gemeinsam geschaltete Mediatoren wie die Produktion von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oder den ATP-Abbau [35, 45]. ROS sind reaktive Sauerstoffmoleküle, die durch verschiedene zelluläre Vorgänge entstehen können und werden häufig beim Zelltod von zugrunde gehender Zellen - beispielsweise Mitochondrien [75] - ausgeschüttet.

Ein Schlüsselfaktor, welcher bestimmt, ob Apoptose oder Nekroptose in einer Zelle ablaufen soll, ist RIPK3. Bei katalytischer Aktivität/Inaktivität kann RIPK3 den nekroptotischen oder apoptotischen Weg bestimmen.

Es wird angenommen, dass Nekroptose einen stärkeren proinflammatorischen Reiz als die Apoptose darstellt. Dies wurde bislang jedoch nicht in relevanten experimentellen Modellen *in vivo* getestet [29].

Nekroptose wird durch eine Vielzahl von Signalen einschließlich Todesrezeptorliganden induziert und wird vom Nekrosomenkomplex RIPK1, RIPK3 und MLKL reguliert [76].

Wir haben hier nun erstmals auch eine bedeutende Rolle für RIPK1 und MLKL im abdominalen Aortenaneurysma-Modell beschrieben. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass nicht nur das Vorliegen und die Funktion von RIPK3 entscheidend für die Nekroptose im AAA ist, sondern auch die Enzymkinasen RIPK1 und MLKL unabdingbar sind.

Bei der Entstehung und dem Progress von AAA wird bislang vor allem der Apoptose eine wichtige Rolle zugesprochen. Diese Arbeit zeigt nun eine zusätzliche Bedeutung der

Nekroptose nahe. Bedenkt man das in dieser Arbeit nur Mäuse verwendet wurden, bei denen nur einer dieser Enzyme dysfunktional war, so erscheint es möglich, dass die Rolle der Nekroptose gegebenenfalls sogar noch unterschätzt wird und eine Inhibition auf mehreren Ebenen der Nekroptosekaskade eine noch effektivere Protektion vor AAA ermöglichen würde.

Zu beachten ist, dass einige RIPK1-abhängige Effekte auch mit der Aktivierung von Inflammasomen zusammenhängen können [77, 78]. Inflammasomen sind zytosolische Multiproteinkomplexe des angeborenen Immunsystems, die Entzündungsreaktionen steuern können [79].

Um die absolute Bedeutung von RIPK1 in der Nekroptose noch spezifischer zu untersuchen, wären $Ripk1^{-/-}$ Tiere sehr gut geeignet. $Ripk1^{-/-}$ Tiere (C57BL/6 Stammhintergrund) sterben allerdings schon kurz nach der Geburt aufgrund einer systemischen Inflammation und einem darauffolgendem Multiorganversagen [65]. In unserer Arbeit haben wir daher $Ripk1^{D138N/D138N}$ ($Ripk1^{KD}$) Mäuse verwendet, die laut Literatur eine funktionsunfähige RIP1 Kinase besitzen [66, 67].

7.3. Pathophysiologische Umbauprozesse in der Tunica media im abdominellen Aortenaneurysma

In unseren histologischen Ergebnissen konnten wir darstellen, dass die spezifische Inhibition der Nekroptose via $Mlkl^{-/-}$ und $Ripk1$ strukturelle Veränderungen der Aorta nach Induktion abdomineller Aortenaneurysmen verhindert (Abb. 14 - 18).

In der Masson-Trichrom-Färbung konnten wir erkennen, dass die $Mlkl^{-/-}$ Mäuse vor Elastinbrüchen schon vor der Aneurysmainduktion geschützt sind. Nach der Aneurysmainduktion haben die $Mlkl^{-/-}$ Tiere nachweislich weniger Elastinbrüche ausgebildet (Abb. 16 und 17 A).

Weiterhin kamen wir zu der Erkenntnis, dass $Mlkl^{-/-}$ Aorten innerhalb der Media bezüglich eines Unterganges von glatten Muskelzellen geschützt sind.

Hier konnte eine Reduktion von SMCs Zelluntergang an Aortenaneurysmen gezeigt und im Mausmodell reproduziert werden. Aufgrund des Fehlens spezifischer Antikörper für MLKL, beispielsweise zwecks Anwenden von spezifischen Färbungen auf Nekroptose, kann jedoch zunächst nicht abschließend geklärt werden, ob nicht auch andere Zelltodmechanismen beeinträchtigt sind. Um das generelle Ausmaß von SMC-Zelltod zu visualisieren, wäre eine TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) Färbung sinnvoll, da diese untergehenden Zellen – konkret die SMCs – anfärbt [56].

Durch den Einsatz von extrem spezifischen Knockout-Modellen (Ripk1^{KD} sowie Mkl1^{-/-}) ist jedoch von einer sehr exakten Inhibition der Nekroptose auszugehen, daher weisen unsere Ergebnisse generell auf eine Nekroptose-assoziierte Schädigung der Tunica media im AAA hin. Setzt man die hier vorgelegten histologischen Ergebnisse in Relation zu den Ergebnissen der echokardiographisch ermittelten aortalen Durchmesser so wird klar, dass die histologischen Umbauprozesse mit der AAA Progression *in vivo* korrelieren.

Es lässt sich spekulieren, ob nach erstmaliger Entzündungsreaktion in der Aorta nicht eine sich selbst unterhaltende Wirkung entsteht. Durch die Infiltration der Leukozyten wandern diverse potenzielle TNF-Produzenten in das aortale Gewebe ein, welches wiederum den Prozess der Nekroptose aufrechterhält. Natürlich können in diesem Zusammenhang auch inflammatorische Zellen selbst nekroptotisch sein.

Inwieweit es einen spezifischen endogenen Inhibitor der Nekroptose gibt, ist nicht bekannt. Umso wichtiger erscheint der Versuch, durch Einsatz exogener Inhibitoren Nekroptose zu unterbinden, da sich hieraus Verbesserungen in medikamentösen Therapiestrategien ergeben können mit denen sich das Auftreten eines AAA speziell durch Beeinflussung von RIPK1 und MLKL beeinflussen ließe.

Die eindeutigen Vorteile einer Reduktion von RIPK1 und MLKL rechtfertigen weitere pharmakologische Studien an aneurysmatischen Modellen.

7.4. Gegenüberstellung der aneurysmatischen Modelle: Ang II und PPE

Um zu erklären, welche pathophysiologischen Vorgänge hinter der AAA-Bildung stattfinden, wurden schon früh AAA Tiermodelle an Mäusen erstellt [8].

Für das AAA gibt es mehrere Mausmodelle, die jeweils Vor- und Nachteile haben [80].

Das Elastase-induzierte Mausmodell ist ein weit verbreitetes Modell, das die wichtigsten pathologischen Merkmale von menschlichen AAA einschließt und SMC-Abbau, Inflammation und Elastinabbau zusammenfasst [80, 81]. Die ersten Elastase-Modelle fanden an der Ratte statt, indem Elastase in das infrarenale Segment der Rattenaorta injiziert wurde [82]. Die Begründung für die Entwicklung des PPE Modells beruht auf der durch Elastin hervorgerufene strukturellen Veränderungen innerhalb des AAA [80]. Das Modell der Ratte wurde modifiziert, um AAA in der infrarenalen Region von Mäusen zu fördern [68].

Das PPE Modell ist mit mehreren Einschränkungen verbunden. Die Ruptur ist eine Hauptkomplikation bei menschlichem AAA [2], das in diesem Modell selten passiert [43]. Mechanische Effekte der Elastaseperfusion auf die Aorta und die Variabilität von

verschiedenen kommerziellen Elastasepräparaten wurden ebenso in dem PPE Modell festgestellt [80].

Man fand heraus, dass im PPE Modell ein RIPK3 Mangel die Aneurysmabildung reduzieren kann. Auf Zellkulturebene fand man heraus, dass eine RIPK3-Defizienz eine TNF-vermittelte Reaktion in kultivierten glatten Muskelzellen inhibieren kann [43].

In unseren Ergebnissen beim PPE Modell kam es zu einem verzögerten Einsetzen der Aortendilatation (Abb. 12), welches bereits in der Literatur vorbeschrieben ist [8, 81].

Auf Zellebene konnte man in bisherigen Konzepten feststellen, dass es im PPE Modell zu einer räumlich und zeitlich verbundenen transmuralen Aortenwandinfiltration durch mononukleäre Phagozyten und zu einer ausgeprägten Zerstörung der medialen elastischen Lamellen kommt [81]. Weiterhin konnte man im Elastase-induzierten Modell eine Erhöhung der SMC Nekrose im AAA beobachten [43].

Daher eignet sich das Elastase-induzierte Modell sehr gut, um die Rolle chronischer Entzündungen bei der Aortendegeneration zu untersuchen und so die Auswirkungen verschiedener pharmakologischer Wirkstoffe oder genetischer Veränderungen auf die Aneurysmabildung zu testen [81].

Im Angiotensin II Modell ist die AAA Bildung in männlichen Mäusen, wie auch beim Menschen, erhöht und weist eine doppelt so hohe Inzidenz wie bei weiblichen Mäusen auf [83]. Nach der Angiotensin II Behandlung konnte man ein charakteristisches infrarenales Aortensegment feststellen [84].

Das auslösende Ereignis, das innerhalb von Tagen nach der Angiotensin II Infusion auftritt, scheint ebenfalls eine mediale Makrophagenakkumulation in der Region zu sein, die zur AAA-Bildung neigt und mit einem Elastinabbau verbunden ist. Es ist nicht klar, ob die Makrophagenakkumulation als Stimulus für den Elastinabbau oder umgekehrt ist [80].

In unseren Aorten konnten wir keine Infiltration von Entzündungszellen feststellen. Dies ist wahrscheinlich auf den späten Zeitpunkt zurückzuführen, an dem die Tiere euthanasiert wurden.

Wir haben die WT-, Ripk1^{KD}- und Mkl1^{-/-} Mäuse im AAA Modell Angiotensin II für 14 Tage und im PPE Modell für 28 Tage behandelt. In der medialen Schicht konnten wir nur wenige apoptotische Zellen nachweisen, was wahrscheinlich dem späten Zeitpunkt zurückzuführen ist zu dem das Gewebe histologisch untersucht wurde [66]. Die Apoptose-Aktivität erreicht kurz nach Induktion des Aneurysmas ihren Höhepunkt [85].

Während das Angiotensin II Modell im Vergleich einfacher durchzuführen ist, sind Fragen aufgekommen, ob das Modell mit dem humanen AA vergleichbar ist. Das Angiotensin II Modell unterstreicht die Wichtigkeit des Renin-Angiotensin-Systems (RAAS) für die Entwicklung von AAA in der Maus während der subkutanen Infusion von Angiotensin II über zwei Wochen. Im AT II Modell kommt es früh zur Infiltration von Makrophagen in die mediale Schicht der Aorta gefolgt von einer medialen Ruptur und einer schnellen Expansion des Aneurysmas innerhalb der ersten Wochen.

Später treten intraluminale Thromben und die Bildung von Neovaskularisationen auf [8].

Im Angiotensin II Modell sind die Ripk1^{KD} und MLKL-defizienten Mäuse von einem AA weitestgehend geschützt (Abb. 11 und 12).

Im PPE und Angiotensin II Modell kommt es nach einer anfänglichen moderaten Dilatation des aortalen Durchmessers, insbesondere nach Tag 7, zu einer deutlichen Zunahme. Das Wachstum wird dann von entscheidenden Schritten der AAA-Entwicklung begleitet: einer Entzündungsreaktion mit Rekrutierung von Leukozyten und Mastzellen und einem umfangreichen Abbau von medialen elastischen Fasern und einer Hochregulation von extrazellulären MMP [68].

Vergleichend können wir festhalten, dass das PPE Modell dem Angiotensin II Modell zu bevorzugen ist, da die *in vivo* Untersuchungen aussagekräftiger sind. Bei der Kollagenbestimmung innerhalb der Tunica media fanden wir heraus, dass die PPE *Mlkl*^{-/-} Tiere weitestgehend von einem Kollagenabbau geschützt waren (Abb. 15 G). Ebenso sinkt der Elastingehalt in der Media der Aorten stärker bei den WT PPE Tieren als bei den Angiotensin II WT Tieren (Abb. 17 B). Die PPE WT Mäuse bilden mehr Elastinbrüche aus als die Angiotensin II WT Mäuse (Abb. 17 A). Das lässt sich eventuell erklären, dass im PPE Modell es durch den operativen Eingriff zu einem direkten Effekt auf aortale Strukturen kommt.

Ein anderes murines AAA ist das durch Calciumphosphat induzierte AAA-Modell (CaPO₄-Maus-AAA-Modell) [66, 86], das sich vom herkömmlichen CaCl₂-Modell ableitet [87].

Hierbei wird die infrarenale Region der Bauchorta von 3 Monate alten Mäusen einer perivaskulären Calciumphosphatbehandlung ausgesetzt. Im Vergleich zum CaCl₂-Modell beschleunigt das CaPO₄-Maus-AAA-Modell signifikant die Aneurysmabildung, indem es eine robustere Dilatation ausbildet [86]. Negative Anmerkungen zum CaPO₄-Maus-AAA-

Modell sind, dass hierbei eine erhöhte SMC-Apoptose, ein zunehmender Abbau der Matrix, eine signifikante Reaktion des Immunsystems, Aortenverkalkung, oxidativer Stress und Neovaskularisation auftreten [8]. Das Modell ist deshalb für unsere Versuche untauglich.

Zusammenfassend kann keines der aktuellen Tiermodelle alle Aspekte des menschlichen AAAs reproduzieren. Da im Rahmen der Arbeit nur die Bedeutung singulärer Enzymkinasen analysiert werden konnte, ist wahrscheinlich, dass ein möglicher Phänotyp abdomineller Aortenaneurysmen bei Inhibition der Nekroptose noch deutlich stärker ausgeprägt sein könnte.

7.5. Pharmakologische Inhibition der Nekroptose - ein Ausblick

Das AAA ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, für die es keine kausale pharmakologische Therapie gibt.

Diese degenerative Gefäßerkrankung ist gekennzeichnet durch einen Verlust von SMCs, Inflammation, Umbau der ECM und einer fortschreitenden Erweiterung der abdominalen Aorta. Eine pharmakologische Inhibition erscheint unter anderem aufgrund der hier vorgelegten Ergebnisse vielversprechend.

Eine neue Klasse von Nekroptosehemmern stellt das Substrat GSK2593074A (GSK'074) dar, das RIPK1 und RIPK3 dual inhibiert. GSK'074 unterbindet die Nekroptose und blockiert die Zytokinproduktion von humanen und murinen SMCs.

In experimentellen Versuchen fand man heraus, dass eine intraperitoneale Injektion von GSK'074 im Angiotensin II Modell die Induktion eines AA in männlichen und weiblichen Mäusen signifikant abschwächt.

Immunhistochemisch konnte man zeigen, dass GSK'074 die Aneurysmainduktion insbesondere innerhalb der Tunica media reduziert. Eine Behandlung mit GSK'074 verringert zudem histologisch den Zelltod und die Infiltration von Makrophagen im AAA. In vorangegangenen Zellkulturexperimenten an glatten Muskelzellen der Mauseorta (MOVAS) entdeckte man, dass nach einer längeren Kultivierungszeit von 24 Stunden GSK'074 ebenso MLKL blockiert. Dies hebt die herausragende Stellung der Nekroptose beim AAA heraus und unterstützt die hier vorgelegten Ergebnisse.

GSK'074 hat eine hohe Wirksamkeit und eine minimale Zytotoxizität und wäre ein wünschenswertes Medikament zur Abschwächung der AAA-Progression und anderer mit Nekroptose in Zusammenhang stehender Erkrankungen [66]. Ein weiterer pharmakologischer Kandidat ist Cpd27. Dies ist ebenfalls ein kommerziell erwerbliches

Molekül, das eine starke Anti-RIPK1-Kinase-Aktivität hat und wie Nec-1s und PN10 (Inhibitor von RIPK1) TNF- α inhibiert [77].

Die für die Leukämiebehandlung verwendeten BCR-ABL-Inhibitoren Ponatinib und Pazopanib wurden kürzlich als Inhibitoren von RIPK1 und RIPK3 identifiziert [88, 89]. Ponatinib und Pazopanib inhibieren den RIPK1- und RIPK3 abhängigen Zelltod und die Transkription von TNF- α . Man fand zudem heraus, dass eine Fusion von Ponatinib und Nec-1 das Hybridmolekül PN10 bildet, welches besonders hochwirksam und selektiv die nekroptotische Signalübertragung von RIPK1 inhibiert [77].

Die erste Verbindung, die die Kinase MLKL hemmt war (E)-N-(4-(N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)sulfamoyl)phenyl)-3-(5-nitrothiophen-2-yl)acrylamid auch bekannt unter dem Namen Necrosulfonamid (NSA).

NSA wurde als Sonde genutzt, um MLKL als nachgeschaltetes Ziel von RIPK3 zu identifizieren. Man fand aber früh heraus, dass NSA die RIPK3-abhängige Phosphorylierung von MLKL nicht beeinflusst. NSA ist in der Lage menschliche Zellen vor nekrotischen Stimuli zu schützen, jedoch nicht Mauszellen, was seine Verwendung in präklinischen Mausmodellen ausschließt.

Daher wurde allzu bald eine neue Klasse von MLKL-Inhibitor auch bekannt als Verbindung 1 (Compound 1) (GW806742X oder SYN-1215) beschrieben, das die Pseudokinasedomäne von MLKL bindet, blockiert und somit eine Rolle in der Nekroptose einnimmt.

Neuere Experimente zeigten jedoch, dass SYN-1215 ebenso an RIPK1 bindet und dessen Kinaseaktivität hemmt. Ein Teil der Aktivitätshemmung kann somit auch auf die Hemmung von RIPK1 zurückzuführen sein.

Die Spezifität der MLKL-Inhibitoren ist jedoch nicht auf die Hemmung von MLKL beschränkt und ihre Wirksamkeit ist wahrscheinlich auch auf die Auswirkungen auf andere Schritte im Nekroptoseweg zurückzuführen [77]. Deswegen scheint NSA und SYN-1215 für unsere Experimente unbrauchbar zu sein.

Der pleiotrope Effekt von RIP-Kinasen sollte bei der Bewertung der therapeutischen Aktivität von Arzneimitteln in experimentellen Krankheitsmodellen berücksichtigt werden. Das bedeutet, dass eine eindeutige Zuordnung des Zelltods zu einer bestimmten Form des Todeswegs - wie beispielsweise Apoptose oder Nekroptose - nicht nur auf

pharmakologischen Beweisen beruhen, sondern exakt dargestellt werden sollten. Dies könnte durch die Verwendung von Einzel- oder sogar Kombinations-Knockout Tieren und Zellen mit dem Ziel besserer Behandlungsstrategien definiert werden [77].

Die gezielte Behandlung des Nekroptosewegs kann eine therapeutische Chance bei verschiedenen Krankheiten darstellen. Die Literaturen zeigen, dass schon mehrere Inhibitoren entwickelt wurden, die experimentell Verwendung fanden [76].

Unsere Arbeit unterstreicht die Bedeutung der Enzymkinasen RIPK1 und MLKL sowie die Bedeutung der Nekroptose in der Entstehung und Pathogenese abdomineller Aortenaneurysmen.

Die pharmakologische Intervention an diesem Punkt der Pathogenese kann einen Beitrag leisten, die Größenprogredienz der Aneurysmen einzudämmen. Dies würde einem großen Patientenkollektiv zugutekommen, da einerseits die Mortalität und Morbidität reduziert werden könnte und andererseits auch eine erste nicht-operative kausale Therapie zur Verfügung stünde.

8. Zusammenfassung

In Bezug auf Diagnostik und Therapie abdomineller Aortenaneurysmen stehen Patienten und ihre behandelnden Ärzte vor einem Dilemma. Aortenaneurysmen sind oftmals Zufallsbefunde, die nicht selten erst nach einer Ruptur diagnostiziert werden. Selbst im für den Patienten günstigsten Falle einer frühen Diagnostik sind die therapeutischen Ansatzpunkte auf große operative oder endovaskuläre Operationen limitiert.

Die Progression abdomineller Aortenaneurysmen ist neben vielen Umbauprozessen der extrazellulären Matrix, einem veränderten Kollagen- und Elastingehalt der Aorta vor allem auch mit dem Verlust glatter Muskelzellen assoziiert.

Es konnte in Vorarbeiten bereits nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von RIPK3 eine programmierte Form der Nekrose, der sogenannten Nekroptose in glatten Muskelzellen bewirkt. Die Nekroptose wird maßgeblich durch das Signaling des Zytokins TNF- α induziert. Da auch die Pathogenese des abdominellen Aortenaneurysmas (AAA) durch inflammatorische Vorgänge mitbedingt wird, wurde mit diesem Projekt der Frage nachgegangen, welche Rolle die Nekroptose in Bezug auf die Entstehung abdomineller Aortenaneurysmen spielt.

Neben RIPK3 werden auch den Enzymkinasen RIPK1 und MLKL in Zusammenhang mit nekroptotischen Vorgängen eine zentrale Bedeutung zugeschrieben.

In dieser Arbeit haben wir daher die Bedeutung von RIPK1 und MLKL *in vitro* sowie in zwei murinen Modellen des AAA untersucht.

Wir konnten zeigen, dass die TNF- α induzierte Expression von MLKL in einer gesteigerten Expression von proinflammatorischen Zytokinen resultiert, die Nekroptose also einen Beitrag zum proinflammatorischen Milieu im AAA leistet.

Wir haben ferner gezeigt, dass eine MLKL-Defizienz im Mausmodell des AAA protektiv auf die Ausbildung eines AAA wirkt. Histologisch repräsentiert sich dies mit einer Reduktion des Kollagen- und Elastinverlustes der Tunica media, einer erhaltenen Zellproliferation von glatten Muskelzellen der Aorta sowie eines reduzierten inflammatorischen Niveaus. Ähnliche Ergebnisse konnten wir für RIPK1^{KD} Mäuse erhalten, in den RIPK1 nicht dem TNF-Signaling folgt. In diesen Mäusen kann eine Nekroptose-Induktion aufgrund der fehlenden Funktionalität von RIPK1 nicht erfolgen. Dies bedeutet, dass sowohl MLKL als auch RIPK1 essentielle Bestandteile der Nekroptose sind und beide Enzymkinasen sich funktionell wechselseitig bedingen und eine Defizienz einer Kinase nicht kompensiert werden kann.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass eine pharmakologische Inhibition der Nekroptose ein Progress abdomineller Aortenaneurysmen verlangsamen kann. Dies mag in Zukunft über spezifische MLKL- oder RIPK1-Inhibition einen direkten therapeutischen Ansatz bilden. Eine therapeutische Inhibition des Nekroptoseweges könnte somit Mortalität und Morbidität reduzieren und das konservative Therapiespektrum um eine erste kausale und nicht präventive Therapieoption erweitern.

9. Literaturverzeichnis

1. Johnston KW, Rutherford RB, Tilson, Shah DM, Hollier L, Stanley JC, *Suggested standards for reporting on arterial aneurysms*. J Vasc Surg, 1991(13 (3)): p. 452-8.
2. Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM Thompson MM, *Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms*. Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(2): p. 92-102.
3. Legg JS, Legg LM, *Abdominal Aortic Aneurysms*. Radiol Technol., 2016(88 (2)): p. 145-163.
4. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Littooy FN, Bandyk D, Krupski WC, Barone GW, Acher CW, Ballard DJ, *Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group*. Ann Intern Med, 1997. **126**: p. 441-449.
5. Blanchard JF, Armenian HK, Friesen PP, *Risk factors for abdominal aortic aneurysm: results of a case-control study*. Am J Epidemiol., 2000(151): p. 575-583.
6. Wong DR, Willett WC, Rimm EB, *Smoking, hypertension, alcohol consumption, and risk of abdominal aortic aneurysm in men*. Am J Epidemiol, 2007. **165**(7): p. 838-45.
7. MacSweeney STR, Ellis M, Worrell PC, Greenhalgh RM, Powell JT, *Smoking and growth rate of small abdominal aortic aneurysms*. Lancet, 1994. **344**: p. 651-2.
8. Adam M, Raaz U, Spin JM, Tsao PS, *MicroRNAs in Abdominal Aortic Aneurysm*. Current Vascular Pharmacology, 2015(13): p. 280-290.
9. Liaw JVP, Clark M, Gibbs R, Jenkins M, Cheshire N, Hamady M, *Update: Complications and management of infrarenal EVAR*. Eur J Radiol, 2009. **71**(3): p. 541-51.
10. Maegdefessel L, Spin JM, Raaz U, Eken SM, Toh R, Azuma J, Adam M, Nagakami F, Heymann HM, Chernugobova E, Jin H, Roy J, Hultgren R, Caidahl K, Schrepfer S, Hamsten A, Eriksson P, McConnell MV, Dalman RL, Tsao PS, *miR-24 limits aortic vascular inflammation and murine abdominal aneurysm development*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5214.
11. Wang Q, Zhou T, Liu Z, Ren J, Phan N, Gupta K, Stewart DM, Morgan S, Assa C, Kent KC & Liu B, *Inhibition of Receptor-Interacting Protein Kinase 1 with Necrostatin-1s ameliorates disease progression in elastase-induced mouse abdominal aortic aneurysm model*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 42159.
12. Prisant LM, Mondy JS, *Abdominal Aortic Aneurysm*. J Clin Hypertens, 2004(6 (2)): p. 85-9.
13. Ghorpade A, Baxter BT, *Biochemistry and molecular regulation of matrix macromolecules in abdominal aortic aneurysms*. Ann NY Acad Sci, 1996(800 (1)): p. 138-50.
14. McDonald DA, *Regional pulse wave velocity in the arterial tree*. J Appl Physiol, 1968(24(1)): p. 73-8.
15. Ruddy JM, Jones JA, Spinale FG, Ikonomidis JS, *Regional heterogeneity within the aorta: relevance to aneurysm disease*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008. **136**(5): p. 1123-30.
16. Pfaltzgraff ER, Shelton EL, Galindo CL, Nelms BL, Hooper CW, Poole SD, Labosky PA, Bader BL, Reese J, *Embryonic domains of the aorta derived from diverse origins exhibit distinct properties that converge into a common phenotype in the adult*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2014. **69**: p. 88-96.
17. Wasteson P, Johansson BR, Jukkola T, Breuer S, Akyürek LM, Partanen J, Lindahl P, *Developmental origin of smooth muscle cells in the descending aorta in mice*. Development, 2008. **135**(10): p. 1823-1832.

18. Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM, *Fate of the mammalian cardiac neural crest*. Development, 2000(127): p. 1607-1616.
19. Jana S, Hu M, Shen M, Kassiri Z, *Extracellular matrix, regional heterogeneity of the aorta, and aortic aneurysm*. Exp Mol Med, 2019. **51**(12): p. 1-15.
20. Wolinsky H, Glacov S, *A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals*. Circ Res, 1967: p. 99-111.
21. Dobrin PB, *Mechanics of Normal and Diseased Blood Vessels*. Annals of Vascular Surgery, 1988. **2**(3): p. 283-294.
22. Espinola-Klein C, Neufang A, Duber C, *Infrarenal aortic aneurysm*. Internist (Berl), 2008. **49**(8): p. 955-64; quiz 965-6.
23. Leeper NJ and Maegdefessel L, *Non-coding RNAs: key regulators of smooth muscle cell fate in vascular disease*. Cardiovasc Res, 2018. **114**(4): p. 611-621.
24. Raaz U, Zöllner AM, Schellinger IN, Toh R, Nakagami F, Brandt M, Emrich FC, Kayama Y, Eken S, Adam M, Maegdefessel L, Hertel T, Deng A, Jagger A, Buerke M, Dalman RL, Spin JM, Kuhl E, Tsao PS, *Segmental aortic stiffening contributes to experimental abdominal aortic aneurysm development*. Circulation, 2015. **131**(20): p. 1783-95.
25. Kunieda T, Minamino T, Nishi J-i, Tateno K, Oyama T, Katsuno T, Miyauchi H, Orimo M, Okada S, Takamura M, Nagai T, Kaneko S, Komuro I, *Angiotensin II induces premature senescence of vascular smooth muscle cells and accelerates the development of atherosclerosis via a p21-dependent pathway*. Circulation, 2006. **114**(9): p. 953-60.
26. Ailawadi G, Moehle CW, Pei H, Walton SP, Yang Z, Kron IL, Lau CL, Owens GK, *Smooth muscle phenotypic modulation is an early event in aortic aneurysms*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **138**(6): p. 1392-9.
27. Clarke MCH, Littlewood TD, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Bennett MR, *Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration*. Circ Res, 2008. **102**(12): p. 1529-38.
28. Shimizu K, Mitchell RN and Libby P, *Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(5): p. 987-94.
29. Pasparakis M. and Vandenabeele P, *Necroptosis and its role in inflammation*. Nature, 2015. **517**(7534): p. 311-20.
30. Thomas M, Gavrila D, McCormick ML, Miller FJ, Daugherty A, Cassis LA, Dellsperger KC, Weintraub NL, *Deletion of p47phox attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2006. **114**(5): p. 404-413.
31. Sharma AK, Lu G, Jester A, Johnston WF, Zhao Y, Hajzus VA, Saadatzaheh R, Su G, Bhamidipati CM, Mehta GS, Kron IL, Laubach VE, Murphy MP, Ailawadi G, Upchurch GR, *Experimental abdominal aortic aneurysm formation is mediated by IL-17 and attenuated by mesenchymal stem cell treatment*. Circulation, 2012. **126**(11 Suppl 1): p. S38-45.
32. Harrison SC, Smith AJP, Jones GT, Swerdlow DI, Rampuri R, Bown MJ, Folkersen L, Baas AF, Jan de Borst G, Blankensteijn JD, Price JF, Van der Graaf Y, McLachlan S, Agu O, Hofman A, Uitterlinden AG, Franco-Cereceda A, Ruigrok YM, Van't Hof FN, Powell JT, Van Rij AM, Casas JP, Eriksson P, Holmes MV, Asselbergs FW, Hingorani AD, Humphries SE, *Interleukin-6 receptor pathways in abdominal aortic aneurysm*. Eur Heart J, 2013. **34**(48): p. 3707-16.
33. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Fujii K, Akiyama N, Furutani A, Hoshii Y, Tanaka N, Ricci R, Ishihara T, Esato K, Hamano K, Matsuzaki M, *Regression of abdominal*

- aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase*. Nat Med, 2005. **11**(12): p. 1330-8.
34. Balkwill F, *TNF-alpha in promotion and progression of cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 409-16.
 35. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G, *Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(10): p. 700-14.
 36. Jouan-Lanhouet S, Riquet F, Duprez L, Vanden Berghe T, Takahashi N, Vandenabeele P, *Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **35**: p. 2-13.
 37. Linkermann A and Green DR, *Necroptosis*. N Engl J Med, 2014. **370**(5): p. 455-65.
 38. Ziegler U and Groscurth P, *Morphological features of cell death*. News Physiol Sci, 2004. **19**: p. 124-8.
 39. Tibbetts MD, Zheng L and Lenardo MJ, *The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis*. Nature Immunology, 2003. **4**((5)): p. 404-9.
 40. Kaczmarek A, Vandenabeele P and Krysko DV, *Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance*. Immunity, 2013. **38**(2): p. 209-23.
 41. Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, Liu Z-g, *Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis*. Genes Dev. , 1999. **13**: p. 2514-2526.
 42. Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang LF, Wang FS, Wang X, *Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3*. Mol Cell, 2014. **54**(1): p. 133-146.
 43. Wang Q, Liu Z, Ren J, Morgan S, Assa C, Liu B, *Receptor-interacting protein kinase 3 contributes to abdominal aortic aneurysms via smooth muscle cell necrosis and inflammation*. Circ Res, 2015. **116**(4): p. 600-11.
 44. Clarke PGH, *Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms*. Anat Embryol, 1990(181): p. 195-213.
 45. Galluzzi L, Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Buettner S, Eisenberg T, Vandenabeele P, Madeo F and Kroemer G, *Programmed necrosis from molecules to health and disease*. Int Rev Cell Mol Biol, 2011. **289**: p. 1-35.
 46. Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Parthoens E, Deckers W, Devos M, Festjens N, Guerin CJ, Brunk UT, Declercq W and Vandenabeele P, *Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features*. Cell Death Differ, 2010. **17**(6): p. 922-30.
 47. Han J, Zhong CQ and Zhang DW, *Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system*. Nat Immunol, 2011. **12**(12): p. 1143-9.
 48. Degtarev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J, *Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins*. Nat Chem Biol, 2008. **4**(5): p. 313-21.
 49. Smith CCT, Davidson SM, Lim SY, Simpkin JC, Hothersall JS, Yellon DM, *Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent?* Cardiovasc Drugs Ther, 2007. **21**(4): p. 227-33.
 50. Lin J, Li H, Yang M, Ren J, Huang Z, Han F, Huang J, Ma J, Zhang D, Zhang Z, Wu J, Huang D, Qiao M, Jin G, Wu Q, Huang Y, Du J and Han J, *A role of RIP3-mediated macrophage necrosis in atherosclerosis development*. Cell Rep, 2013. **3**(1): p. 200-10.
 51. Linkermann A, Brasen JH, Himmerkus N, Liu S, Huber TB, Kunzendorf U, Krautwald S, *Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury*. Kidney Int, 2012. **81**(8): p. 751-61.

52. Oerlemans MIFJ, Liu J, Arslan F, Den Ouden K, Van Middelaar BJ, Doevendans PA, Sluijter JPG, *Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo*. Basic Res Cardiol, 2012. **107 (4)**: p. 270.
53. 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-alpha*. Cell, 2009. **137(6)**: p. 1100-11.
54. Zhang D-W, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu B-J, Lin S-C, Dong M-Q, Han J, *RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis*. Science, 2009. **325**: p. 332-336.
55. Wu J, Huang Z, Ren J, Zhang Z, He P, Li Y, Ma J, Chen W, Zhang Y, Zhou X, Yang Z, Wu S-Q, Chen L, Han J, *Mkl1 knockout mice demonstrate the indispensable role of Mkl1 in necroptosis*. Cell Res, 2013. **23(8)**: p. 994-1006.
56. Gunther C, Martini E, Wittkopf N, Amann K, Weigmann B, Neumann H, Waldner M, Hedrick SM, Tenzer S, Neurath MF and Becker C, *Caspase-8 regulates TNF-alpha-induced epithelial necroptosis and terminal ileitis*. Nature, 2011. **477(7364)**: p. 335-9.
57. Welz PS, Wullaert A, Vlantis K, Kondylis V, Fernández-Majada V, Ermolaeva M, Kirsch P, Sterner-Kock A, Van Loo G and Pasparakis M, *FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation*. Nature, 2011. **477(7364)**: p. 330-4.
58. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M and Chan FK, *Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation*. Cell, 2009. **137(6)**: p. 1112-23.
59. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, Wang L, Yan J, Liu W, Lei X, Wang X, *Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase*. Cell, 2012. **148(1-2)**: p. 213-27.
60. Zhao J, Jitkaew S, Cai Z, Choksi S, Li Q, Luo J and Liu ZG, *Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis*. Proc Natl Acad Sci, 2012. **109**: p. 5322-5327.
61. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA and Yuan J, *Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury*. Nat Chem Biol, 2005. **1(2)**: p. 112-9.
62. Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F, Vanden Berghe T, *The role of the kinases rip1 and rip3 in TNF-induced necrosis*. Sci Signal. , 2010. **3(115)**: p. 1-8.
63. Declercq W, Vanden Berghe T and Vandenabeele P, *RIP kinases at the crossroads of cell death and survival*. Cell, 2009. **138(2)**: p. 229-32.
64. Dhuriya YK and Sharma D, *Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death*. J Neuroinflammation, 2018. **15(1)**: p. 199.
65. Polykratis A, Hermance N, Zelic M, Roderick J, Kim C, Van T-M, Lee TH, Chan FKM, Pasparakis M and Kelliher MA, *Cutting edge: RIPK1 Kinase inactive mice are viable and protected from TNF-induced necroptosis in vivo*. J Immunol, 2014. **193(4)**: p. 1539-1543.
66. Zhou T, Wang Q, Phan N, Ren J, Yang H, Feldmann CC, Feltenberger JB, Ye Z, Wildman SA, Tang W, Liu B, *Identification of a novel class of RIP1/RIP3 dual inhibitors that impede cell death and inflammation in mouse abdominal aortic aneurysm models*. Cell Death Dis, 2019. **10(3)**: p. 226.
67. Rickard JA et al., *RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis*. Cell, 2014. **157(5)**: p. 1175-88.
68. Pyo R et al., *Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms*. J Clin Invest, 2000. **105(11)**: p. 1641-9.

69. Karunakaran D, Geoffrion M, Wei L, Gan W, Richards L, Shangari P, DeKemp EM, Beanlands RA, Perisic L, Maegdefessel L, Hedin U, Sad S, Guo L, Kolodgie FD, Virmani R, Ruddy T and Rayner KJ, *Targeting macrophage necroptosis for therapeutic and diagnostic interventions in atherosclerosis*. *Sci Adv*, 2016. **2** : e1600224.
70. Krakauer T, *Inflammasomes, Autophagy, and Cell Death: The Trinity of Innate Host Defense against Intracellular Bacteria*. *Mediators Inflamm*, 2019. **2019**: p. 2471215.
71. Wegner KW, Saleh D and Degterev A, D. Saleh, and A. Degterev, *Complex Pathologic Roles of RIPK1 and RIPK3: Moving Beyond Necroptosis*. *Trends Pharmacol Sci*, 2017. **38**(3): p. 202-225.
72. Yang Xiao-Sa et al., *Hypoxia-inducible factor-1 alpha is involved in RIP-induced necroptosis caused by in vitro and in vivo ischemic brain injury*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 5818.
73. Takahashi N et al., *Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models*. *Cell Death Dis*, 2012. **3**: p. e437.
74. Fu Hsueh-Liang et al., *Discoidin domain receptors: unique receptor tyrosine kinases in collagen-mediated signaling*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(11): p. 7430-7.
75. Wang X, Jiang W, Yan Y, Gong T, Han J, Tian Z and Zhou R, *RNA viruses promote activation of the NLRP3 inflammasome through a RIP1-RIP3-DRP1 signaling pathway*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(12): p. 1126-33.
76. Choi ME, Price DR, Ryter SW and Choi AMK, *Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease*. *JCI Insight*, 2019. **4**(15).
77. Conrad M et al., *Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities*. *Nat Rev Drug Discov*, 2016. **15**(5): p. 348-66.
78. Moriwaki K and Chan FK, *Necrosis-dependent and independent signaling of the RIP kinases in inflammation*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014. **25**(2): p. 167-74.
79. Broz P and Dixit VM, *Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2016. **16**(7): p. 407-20.
80. Daugherty A and Cassis LA, *Mouse models of abdominal aortic aneurysms*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(3): p. 429-34.
81. Thompson RW, et al., *Pathophysiology of abdominal aortic aneurysms: insights from the elastase-induced model in mice with different genetic backgrounds*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1085**: p. 59-73.
82. Anidjar S, Salzman JL, Gentric D, Lagneau P, Camilleri J-P and Michel JB, *Elastase induced experimental aneurysm in rats*. *Circulation*, 1990. **82**: p. 973-981.
83. Manning MW, Cassis LA, Huang J, Szilvassy SJ and Daugherty A, *Abdominal aortic aneurysms: fresh insights from a novel animal model of the disease*. *Vasc Med*, 2002. **7**: p. 45-54.
84. Saraff K et al., *Aortic dissection precedes formation of aneurysms and atherosclerosis in angiotensin II-infused, apolipoprotein E-deficient mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(9): p. 1621-6.
85. Yamanouchi D et al., *Effects of caspase inhibitor on angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein E-deficient mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(4): p. 702-7.
86. Yamanouchi D et al., *Accelerated aneurysmal dilation associated with apoptosis and inflammation in a newly developed calcium phosphate rodent abdominal aortic aneurysm model*. *J Vasc Surg*, 2012. **56**(2): p. 455-61.
87. Gertz SD, Kurgan A and Eisenberg D, *Aneurysm of the rabbit common carotid artery induced by periarterial application of calcium chloride in vivo*. *JCI*, 1988. **81**: p. 649-656.

88. Najjar M et al., *Structure guided design of potent and selective ponatinib-based hybrid inhibitors for RIPK1*. Cell Rep, 2015. **10**(11): p. 1850-60.
89. Fauster A et al., *A cellular screen identifies ponatinib and pazopanib as inhibitors of necroptosis*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1767.

10. Vorabveröffentlichungen

Kongressbeiträge

April 2019

Necroptosis promotes the formation of abdominal aortic aneurysm disease

G. Schwab, S. Bokredengel, M. Mollenhauer,

A. Klinke, S. Baldus, M. Pasparakis, M. Adam

Kongress der Deutschen Gesellschaft für

Kardiologie (DGK) in Mannheim

11. Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Gülşah Fülgen Schwab, geb. Duman
Geburtsdatum: 04. Januar 1990
Geburtsort: Bonn
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Bildungsweg

1996 - 2000 Grundschole Rochusschule, Bonn
2000 - 2006 Realschule Medinghoven, Bonn
2006 - 2009 Europaschule Bornheim
Schulabschluss: Abitur Juni 2009

Ausbildung

2009 - 2011 Lehrgang als BMA im RBZ Köln
2011 - 2012 MTA-L Ausbildung im RBZ Köln

Studium

April 2014 - August 2014 Medizin, Universität Göttingen
September 2014 - Dezember 2020 Medizin, Universität zu Köln
SS 2016 1. Staatsexamen (Physikum)
Oktober 2019 2. Staatsexamen
Dezember 2020 3. Staatsexamen, Approbation zur Ärztin

Fremdsprachen: fließend: Englisch, Türkisch
Grundkenntnisse: Französisch, Spanisch

Berufspraxis

Assistenzärztin

seit Februar 2021

Abteilung Innere Medizin
Marienhospital Euskirchen
Chefarzt: Dr. med. Michael Bothe
Gottfried-Disse-Str. 40
53789 Euskirchen

MTA-L

Februar 2013 - April 2014

Cluster vaskuläre Inflammation und Redox-Signaling, AG Baldus, Experimentelle Kardiologie der Uniklinik Köln

Studentische Hilfskraft

August 2015 - Dezember 2015

Cluster vaskuläre Inflammation und Redox-Signaling, AG Baldus, Experimentelle Kardiologie der Uniklinik Köln

April 2016 - Juni 2017

Leberfibrose und portale Hypertension, AG Trebicka, Medizinische Klinik I der Uniklinik Bonn

Juli 2017 - Januar 2020

Cluster vaskuläre Inflammation und Redox-Signaling, AG Baldus, Experimentelle Kardiologie der Uniklinik Köln

Wissenschaftlicher Werdegang

seit Mai 2017

Promotionsvorhaben:

Die Bedeutung MLKL- und RIPK1 vermittelter nekroptotischer Prozesse in der Pathophysiologie der abdominalen Aortenaneurysmen

Doktorvater: Privatdozent Dr. med. M. Adam,

Experimentelle Kardiologie der Uniklinik
Köln

Weiterbildung

18.09. - 22.09.2017

Tierversuchskurs - Felasa B (Köln)

Kongressbeiträge

April 2019

Necroptosis promotes the formation of
abdominal aortic aneurysm disease
G. Schwab, S. Bokredengel, M. Mollenhauer,
A. Klinke, S. Baldus, M. Pasparakis, M. Adam
Kongress der Deutschen Gesellschaft für
Kardiologie (DGK) in Mannheim

Stipendium

Kassenärztliche Vereinigung Nordrhein für das Wahlterial Allgemeinmedizin

Kurzfassung der Dissertationsschrift

Die Bedeutung MLKL- und RIPK1 vermittelter nekroptotischer Prozesse in der Pathophysiologie der abdominalen Aortenaneurysmen

von Gülşah Fülgen Schwab

Aus dem Herzzentrum der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. St. Baldus

Die Nekroptose ist eine Form des regulierten Zelltodes, der durch Rezeptor-interagierende Kinasen RIPK1 und RIPK3 induziert und im Gegensatz zur Apoptose durch das Substrat Mixed Lineage Kinase-Like (MLKL) ausgeführt wird. Die Entwicklung eines abdominalen Aortenaneurysmas (AAA) ist ein entzündlicher Prozess, der mit der Infiltration von Leukozyten in die Tunica media in Verbindung gebracht wird. Im Gegensatz zur Apoptose ist die Nekroptose mit einer vermehrten Entzündungsreaktion verbunden. Die Rolle der Nekroptose bei AAA ist bislang jedoch nur unzureichend untersucht. Ziel dieser Doktorarbeit war es die Rolle der Nekroptose in der Entstehung abdomineller Aortenaneurysmen zu untersuchen und damit auch einen potenziellen therapeutischen Ansatz zur Behandlung eines abdominalen Bauchaortenaneurysmas zu finden. Zur Beantwortung der Fragestellung führten wir *in vivo* Studien an zwei murinen AAA-Modellen durch. Es wurden Wildtyp- (WT C57BL/6 background), MLKL-defiziente- (Mkl^{-/-}) und RIPK1 inaktivierte (Ripk1^{D138N/D138N}) Mäusen einer speziellen Angiotensin II Behandlung (Ang II), die die Entwicklung eines AAA induziert, unterzogen. In einem operativen Modell erfolgte eine Perfusion der abdominalen Aorta mit Elastase (PPE). Um das Fortschreiten der Bildung von Aortenaneurysmen zu untersuchen, wurden echokardiographische Analysen an den Wildtyp-, MLKL-defizienten- und RIPK1-inaktivierten Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Diese ergaben, dass Mkl^{-/-} sowie Ripk1^{D138N/D138N} im Ang II-Modell an Tag 14 vor einer Gefäßerweiterung geschützt waren. Vergleichbare Ergebnisse erhielten wir 21 Tage nach PPE Behandlung. Histologisch repräsentiert sich dies mit einer Reduktion des Kollagen- und Elastinverlustes der Tunica media, einer erhaltenen Zellproliferation von glatten Muskelzellen der Aorta sowie eines reduzierten inflammatorischen Niveaus. Dieses Projekt identifizierte eine bedeutende Rolle der Nekroptose bei der Entwicklung eines AAA. Die Nekroptose und ihre Mediatoren MLKL und RIPK1 könnten als potenzielle pharmakologische Ziele für die Behandlung der AAA-Krankheit identifiziert werden.