

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A szabályozott nekrozis jelátvitelének tanulmányozása

Molnár Tamás

Témavezető: Dr. Koncz Gábor



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2021

A szabályozott nekrozis jelátvitelének tanulmányozása

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Molnár Tamás**
okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája keretében

Témavezető: **Dr. Koncz Gábor, PhD**

Az értekezés bírálói: Dr. Sebestyén Anna, PhD
Dr. Hegedűs Csaba, PhD

A bírálóbizottság elnöke: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

A bírálóbizottság tagjai: Dr. Sebestyén Anna, PhD
Dr. Hegedűs Csaba, PhD
Dr. Vámosi György, PhD
Dr. Barna Gábor, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, In Vitro Diagnosztikai Tömb nagyelőadó, 2022. január 17. 12:00.

1. Bevezetés

1.1. A sejthalálról szabadon

Régóta ismert, hogy a sejtproliferáció és a sejthalál szabályozása, egyensúlyban tartása minden soksejtű élőlény számára létfontosságú. A sejthalált közvetítő jelpályák a kezdeti iniciációs lépéseket követően irreverzibilis folyamatokat eredményeznek. Ez lehet egy erőteljes kaspáz aktiváció, a mitokondriális membránpotenciál összeomlása vagy pedig a mitokondrium külső membránjának teljes permeabilizációja. A Nomenclature Committee on Cell Death szerint azon sejtek tekinthetők halottnak, melyeknél az alábbi molekuláris vagy morfológiai kritériumok fennállnak: **1**, a sejt elvesztette citoplazmamembránjának integritását; **2**, a sejt, beleértve a sejtmagot is teljes fragmentáción esett át; **3**, a sejtet, beleértve annak fragmentumait is (például apoptotikus testeket) a szomszédos sejtek felvették.

A soksejtű organizmusok életében egy sejt halála gyakran nem tragikus esemény, sőt bizonyos életfolyamatokhoz gyakorta szükséges. Az apoptózis például állandóan zajló fiziológiás folyamat, melynek feladata, hogy eltávolítsa azokat a sejteket, melyek már betöltötték funkciójukat (szöveti turnover, embriogenezis), melyek funkcióképtelenek vagy veszélyt jelentenek a szervezet többi sejtjére (limfocitaérés, autoreaktív T-limfociták eliminálása). Az emberi szervezet közel $10^{13} - 10^{14}$ sejtjéből naponta körülbelül $10^{11} - 10^{12}$ hal el, illetve cserélődik újonnan keletkező sejtekre.

Azok a sejtek, melyeket extrém fizikai (nyomás, hőmérséklet vagy ozmotikus stressz), kémiai (extrém pH) vagy mechanikai hatások érnek, nem szabályozott módon pusztulnak el. Sejtszerkezetük menthetetlenül károsodik, emiatt maga a sejthalál nem elkerülhető, a sejt teljesen passzív elszenvetője a történéseknek. A legtöbb esetben azonban, maga a folyamat egy jól irányított, jelátviteli molekulák, valamint kontroll mechanizmusok által finomhangolt program szerint megy végbe, mely befolyásolható (gyorsítható vagy késleltethető) farmakológiai ágensek vagy genetikai beavatkozások által. Ilyen, úgynevezett szabályozott sejthalál kialakulhat teljesen függetlenül az intra- vagy extracelluláris környezeti faktoroktól, egy beépített és előre determinált program aktivációjával. Az ilyen programozott sejthalál folyamatok kiemelt fontosságúak az embrionális fejlődés és a normál szöveti turnover során. Másrésztől szabályozott sejthalál kialakulhat a belső vagy külső mikrokörnyezetből eredő stimulusok által is, melyek specifikus receptorok aktivációjával jelátviteli folyamatokat indítanak el.

Immunológiai kimenetelt tekintve a sejthalál lehet pro- vagy antiinflammatorikus, illetve tolerogén vagy immunogén. Az apoptózis dominanciája a nekroptózis felett fiziológiás körülmények között biztosítja a tolerogén kimenetelt, valamint, hogy ne alakulhasson ki

gyulladás. Amennyiben azonban ez a dominancia valami miatt nem jöhet létre, úgy a nekroptotikus sejtekből kiszabaduló veszély szignálok képesek aktiválni az adaptív immunrendszert és indukálhatják, segíthetik a dendritikus sejtek keresztprezentációját.

Az utóbbi 20 év sejthalálkutatásainak eredményeképpen számos apoptózistól független szabályozott sejthalálformát fedeztek fel és különítettek el morfológiai sajátásaik és molekuláris mintázatuk szerint.

1.2. Nekroptózis

A programozott nekrosis vagy nekroptózis egyike az utóbbi években felfedezett szabályozott sejthalálformáknak. Morfológiáját tekintve leginkább a nekrosisra hasonlít, hiszen sejtduzzadás, a sejtmembrán felszakadása, damage-associated molecular pattern (DAMP) kiszabadulás és gyulladás jellemzi. Mechanizmusában pedig klasszikus szabályozott folyamat, mivel receptor aktiváció indukálja, aminek következtében egy jelátviteli platform szerelődik össze, ami mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) oligomerek kialakulásához, membránokba történő épüléséhez és pórusok keletkezéséhez vezet. A jelenlegi szakirodalomban számos nekroptózist kiváltani képes tényező ismert. Ilyenek például a sejthalál receptorok ligandjai: Fas ligand (FasL), tumor necrosis factor (TNF), TNF-related apoptosis-inducing ligand (Trail), valamint TNF – related weak inducer of apoptosis (TWEAK), T-sejt receptor aktiváció, genotoxikus stressz, adhézións receptorok aktivációja, illetve sok tumor terápiában használt szer (például mitoxantrone, ciszplatin, dasatinib, shikonin, GX15-070). A kórokozókhoz asszociált molekuláris mintázatokról is ismert, hogy képesek nekroptózist indukálni bizonyos receptorokon keresztül: duplaszálú RNS-ek a Toll-like receptor 3 (TLR3), a lipopoliszacharid (LPS) a TLR4-en, patogén eredetű DNS a cyclic GMP-AMP Synthase-Stimulator of Interferon Genes (cGAS-STING) útvonalon, vagy a Z-DNA-binding protein 1 (ZBP1, más néven DAI) receptoron keresztül, illetve a retinoic-acid inducible gene I (RIG-1) receptorokról is ismert, hogy képesek bekapcsolni a nekroptotikus programot.

Munkánk során főképp a sejthalál receptorok ligandjai (FasL, TNF, Trail) által kiváltott nekroptózist vizsgáltuk. Ezen receptorok mind a tumor nekrosis szupercsaládba tartoznak, és a sejthalál kiváltásán kívül szerepük van a sejtproliferációban és a differenciációs folyamatokban. Szerkezetüket tekintve egy extracelluláris ligandkötő, egy transzmembrán és egy intracellulárisan elhelyezkedő haláldoménből (death domain, DD) állnak. A receptor aktivációját a specifikus ligand bekötődéseként létrejövő receptor oligomerizáció váltja ki, ami elindítja a jelátviteli kaskád. Ezt a TNF receptor példáján

szeretném részletesen is bemutatni, mert ez a legjobban ismert és bizonyított az irodalomban. A Fas és Trail receptorok szignalizációjának kezdeti partnerei némiképp különböznek a TNFR-tól, de a RIPK1-RIPK3 kapcsolódása, és az ezt követő downstream lépések már mindenhol megegyeznek.

1.3. A TNF receptor jelátvittele

1.3.1. Iniciációs lépések

Jelenlegi ismereteink szerint a TNF receptorárhoz való kötődése a jel függvényében, vagyis az intracelluláris jelátviteli partnerek aktivitásának és elérhetőségének állapotától négy jelátviteli kaszkád aktivációjához is vezethet. Ezek között ott találjuk a sejtaktivációért felelős NF- κ B útvonalat, a RIPK1 függő és független extrinsic apoptózist – mely antiinflammatorikus és tolerogén módon vezet a sejt eliminálásához – illetve a gyulladáskeltő és immunogén nekroptózist is.

A TNF bekötődése a receptor oligomerizációját, így aktivációját váltja ki, ami intracellulárisan egy többlépcsős folyamatban a RIPK1 kapcsolódásához és ubiquitinációjához vezet. A poliubiquitinálódott RIPK1 így már scaffoldként tud szolgálni a transforming growth factor- β (TGF- β)-activated kinase 1 (TAK1) kináznak és a vele komplexben lévő TAK1-binding protein (TAB) fehérjéknek, valamint az IKK komplexnek is, mely az alábbi tagokból áll: inhibitor of nuclear factor kappa-b kinase subunit alpha (IKK α), IKK β és az NF-kappa-B essential modulator (NEMO). Ezek a fehérjék foszforilációs és ubiquitinációs lépéseken keresztül aktiválják a mitogén-aktivált protein kinázokat (MAPK), vagyis a c-Jun N-terminal kinase (JNK), az extracellular signal-regulated kinase 1 és 2 (ERK1/2) és a p38 kinázokat, ami az activator protein 1 (AP-1) transzkripciós faktor aktivációjához vezet, de ezeken túl még az NF- κ B útvonalat is bekapcsolják (komplex I).

Az NF- κ B kaszkád aktivációját követően idővel a TNF receptorból érkező jel lecsendesedik, az intracelluláris jelátvivő komplex internalizálódik és komponensekre esik szét. Ez lehetőséget teremt egy más típusú komplex, a komplex IIa kialakulásának, ahol a TRADD a FAS-associated death domain proteinnel (FADD), a FLICE-like inhibitory protein hosszú izoformájával (FLIP_L) és a prokaspáz-8-cal képez egységet. Ez a komplex a prokaspáz-8 homodimerizációján, majd pedig hasításán és így aktiválódásán keresztül az apoptózis irányába tolja el a folyamatot, valamint a RIPK1 és a RIPK3 proteolitikus inaktivációján keresztül meggátolja nekroptózis elindulását. A komplex IIa mediálta apoptózist az esetek nagy részében az aktiválódott NF- κ B útvonal a FLIP_L expresszióján és a

RIPK1 K63-as ubiquitinációján keresztül gátolja. Ily módon a sejtek normál esetben védettek a TNF indukált apoptózissal szemben.

A RIPK1 deubiquitinációja megfigyelhető akkor is, mikor a mitokondriális second mitochondria derived activator of caspase (SMAC) összekapcsolódik a cIAP1 és cIAP2 fehérjékkel, ami az autoubiquitinációjukat és így proteolitikus degradációjukat idézi elő. Ez a hatás előidézhető IAP antagonisták (vagy SMAC mimetikumok) alkalmazásával is. Ekkor egy más összetételű alternatív komplex, a komplex IIb szerelődik össze, melyben a TRADD helyett a RIPK1 kapcsolja össze a FADD és prokaspáz-8 fehérjét, aminek eredményeként RIPK1 függő apoptózis jön létre. Az ekkor összeszerelődő komplex IIb-re gyakran ripoptoszómaként hivatkoznak.

Ezekén túlmenően nekroptózis is kialakulhat, de pillanatnyi tudásunk szerint csak abban az esetben, ha a RIPK1 deubiquitinálva, a kaspáz-8 pedig gátolva van. Ekkor jöhet csak létre a nekroptózis jelátvitelért felelős nekroszóma (komplex IIc).

1.3.2. Nekroszóma és a downstream lépések

A nekroptózisban kulcsszerepet játszó RIPK1 és RIPK3 kinázok közül mindkettő rendelkezik egy-egy C-terminálison elhelyezkedő 16 aminosavból álló RIP homotypic interaction motif (RHIM) doménnel. Nekroptotikus stimulusokat követően több RIPK1 és RIPK3 fehérje kapcsolódik össze oligomereket képezve ezen doménjükön keresztül és egy amyloid szerű mikrofibriláris komplexet hoznak létre, mely a nekroszóma strukturális gerincét alkotja. Ebben a komplexben mind a RIPK1, mind a RIPK3 foszforilálódni fog (humán fehérjékben a RIPK1 a 161-es, míg a RIPK3 a 277-es szerinen).

Az MLKL egy pszeudokináz, mely egy N terminálison elhelyezkedő oligomerizációban és plazmamembránokkal való asszociációban kulcsszerepet játszó four-helix bundle doménből (4HBD), egy C terminális pszeudokináz doménből, valamint a kettőt összekötő kapocsrégióból áll. A RIPK1 és RIPK3 fehérjékkel szemben, melyek kináz aktivitása esszenciális nekroptózis során, az MLKL pszeudokináz doménje interakciós doménként tölt be fontos szerepet, oly módon, hogy az MLKL-RIPK3 kapcsolat az MLKL pszeudokináz és a RIPK3 kináz doménjén keresztül valósul meg. Ezek mellett még fontos önszabályozási funkciót is betölt, ugyanis ez a domén tartja foszforiláció hiányában inaktívan a fehérjét, úgy, hogy a 4HBD-vel kapcsolódva, azt a fehérje belsejében tartja. Nyugalmi állapotban az MLKL monomerként helyezkedik el a citoplazmában, azonban a RIPK3 által végzett foszforilációt követően, mely humán sejtekben 357-es treoninon és a 358-as szerinen valósul meg, az MLKL aktív konformációba kerül. Ennek eredményeként a 4HBD kikerül a

molekula felszínére, ami így már képes a membránokban jelen lévő foszfatidilinozitol-foszfát csoportokhoz kötődni. Fontos lépés még a foszforilációt követően az MLKL-ek oligomerizációja, melynek során ezen fehérjék egér sejtekben jellemzően trimerekbe, míg humán sejtekben tetramerekbe állnak össze. Az ily módon már aktív MLKL oligomerek ezt követően leválnak a nekroszómáról és a membránokba ágyazódva pórusokat formálnak. Az így létrejövő víz és ion beáramlás hatására összeomlik a sejt ozmotikus homeosztázisa, ami a sejt duzzadásához és a nekrozisra jellemző morfológiai változásokhoz vezet.

1.4. A nekroptózis szerepe patológiás folyamatokban

A nekroptózis kutatások száma az utóbbi években exponenciálisan nőtt, hiszen egyre több betegségről derül ki, hogy kialakulásukban igen jelentős szerepet játszik a nekroptózis. Mind a jelátvitel túl- illetve alulműködése, valamint az apoptózis-nekroptózis átmenet szabályozásának zavarai szerepet kapnak olyan kórképek patomechanizmusában mint a neurodegeneratív megbetegedések, autoimmun folyamatok vagy gyulladásos kórképek, de bizonyítottan hozzájárulnak a különféle daganatok kialakulásához is.

A nekroptózis kutatások jelentős része foglalkozik a hipoxia következtében fellépő sejthalállal, hiszen napjaink vezető halálozási okaiként tartják számon az érelzáródással járó folyamatokat, mint a miokardiális infarktus, stroke, tüdőembólia. A műtéti beavatkozások során számos alkalommal egy-egy érszakasz időleges lezárásával, majd újranyitásával kell számolni (iszkémia/reperfúzió, IR). Ezekben az esetekben is kimutatták, hogy megemelkedik a sejtekben a pro-nekroptotikus fehérjék (RIPK1, RIPK3, MLKL) expressziója. Ismert továbbá, hogy a sejtek tartós éhezése során (glükóz és oxigén megvonás) lecsökken a nekroptózis negatív regulátorának, a kaspáz 8-nak a szintje.

Több neurodegeneratív megbetegedésben megfigyelték a sejthalál útvonalak abnormális túlműködését. A nekroptózis bizonyítottan hozzájárul olyan betegségek kialakulásához, mint az Alzheimer-kór, szklerózis multiplex (SM) vagy amiotrófiás laterálszklerózis (ALS). SM betegekben származó mintákban kimutatták a RIPK1, RIPK3 és az MLKL fehérjék abnormálisan magas aktivációját, valamint ezzel együtt a prokaspáz-8 aktivációjának defektusait. ALS-ben szenvedő páciensekben igazolták a nekroszóma fehérjék túlzott mértékű expresszióját, valamint ezek foszforilációját.

Az apoptózis dominanciája a nekroptózis felett biztosítja a sejthalál tolerogén és antiinflammatorikus kimenetét. Ha azonban ez valami miatt zavart szenved módosul a sejthalál immunológiai kimenete, ami krónikus gyulladáshoz vezethet, mely jellemzően az emésztőrendszert, veséket, bőrt és a légzőrendszert érinti. A gasztrointesztinális traktust

tekintve például emelkedett RIPK3 expressziót figyeltek meg alkoholos májbetegségben, míg a nem alkoholos zsírmáj esetén a RIPK3 mellett az MLKL expressziója is fokozott volt az egészséges mintákhoz képest. Szintén magas RIPK3 és/ vagy MLKL szint, valamint csökkent kaspáz-8 expresszió tapasztalható Crohn-betegek ileum végi szakaszán, gyulladásos bélbetegségben vagy allergiás colitisben szenvedő betegek mintáiban.

A tumorsejtekről ismert a sejthalál folyamatok elkerülése, hiszen kialakulásuk és későbbi túlélésük alapfeltétele, hogy az onkogenezis során ezen útvonalak gátlódjanak. Jelenlegi ismereteink szerint a nekroptózis szerepe a rákos megbetegedések kialakulásában és előrehaladásában meglehetősen ellentétes. Egyrészt nagyon sok féle daganatos mintában azt tapasztalták, hogy a RIPK3 és/ vagy az MLKL fehérjék szintje csökkent, vagy pedig funkcióképtelen változataik kerültek expresszióra. Ezekkel szemben több tanulmány számol be arról, hogy a nekroptózis által okozott gyulladás elősegíti a tumorok fejlődését és hozzájárul a tumor mikrokörnyezet kialakulásához. Arról is vannak adatok, hogy a tumorok képesek indukálni a közeli endotél sejtek nekroptózisát, mely hozzájárul a tumorok terjedéséhez, metasztázisok kialakulásához.

Bár jelenleg nincs elfogadott specifikus nekroptózist szabályozó terápiás szer, de több mint 20 olyan elfogadott és más betegségek kezelésében már használt szer ismert, melyek képesek befolyásolni (gátolni vagy indukálni) a nekroptózist. Érdemes lenne átgondolni és protokollokat kidolgozni, hogy hogyan lehetne ezeket a szereket használni más betegségek kezelésben is.

1.5. Az apoptózis aktivációjához vezető útvonalak

Már csaknem öt évtized telt el azóta, hogy John Foxton Ross Kerr és munkatársai bevezették az apoptózist, mint a szabályozott sejthalál fogalmát a tudományos életbe. Bár az eltelt évek során több szabályozott sejthalálformát is leírtak, az apoptózis azóta is referenciapontként szolgál más sejthalálútvonalak megértésében.

Apoptózis kialakulhat a külső és a belső mikrokörnyezetből érkező jelek hatására is. A külső jellel induló, extrinsic apoptózis kialakulásában az első lépés a sejt felszínén található sejthalálreceptorok (TNFR, TrailR, FasR) ligandkötése, majd azok ezt követő oligomerizációja, mely a death-inducing signaling complex (DISC) összeszerelődésével a prokaspáz-8 és 10 aktivációjához vezet. A jelátvitel sejtípustól függően ezt követően két módon mehet tovább: az I-es típusú sejtekben nagy mennyiségű aktív kaspáz-8 keletkezik, melyek ezt követően azonnal aktiválják az effektor kaspázokat (prokaspáz-3 és -7). A II-es típusú sejtekben azonban nem elég hatékony a DISC összeszerelődése, emiatt pedig

késleltetett vagy gyenge prokaspáz-8 aktiváció figyelhető meg, ahol a kevés aktív kaszpáz-8 a Bcl-2 családba tartozó BH3 interacting-domain death agonist (Bid) fehérje hasításával az apoptózis mitokondriális útvonalát tudja csak bekapcsolni (trunkált, proapoptotikus Bid a BAK oligomerizációján keresztül a mitokondrium permeabilizációját idézi elő).

Az apoptózis belső vagy más néven mitokondriális útvonalát nagyon sokféle intracelluláris stresszhatás indíthatja el, többek között (de nem kizárólag) növekedési faktorok hiánya, citoszkeleton sérülése, DNS károsodás, hipoxia, valamint hibás, sérült vagy rosszul feltekeredett fehérjék felszaporodása. Az útvonal sorsmeghatározó lépése a mitokondrium külső membránjának a permeabilizációja, melyet a Bcl-2 családba tartozó pro- és antiapoptotikus fehérjék egymáshoz viszonyított egyensúlya dönt el. A mitokondriumok több olyan fehérjét tartalmaznak, melyek a sejt normális, egészséges működéséhez elengedhetetlenek, ugyanakkor a citoplazmába kijutva proapoptotikus hatásúak (például citokróm c, apoptosis-inducing factor (AIF), endonukleáz G, SMAC (más néven DIABLO), high temperature requirement protein A2 (HtrA2/ Omi)).

A pro-apoptotikus Bak és Bax mint pórusformáló fehérjék ismertek, melyek aktivációjukat követően (ami jellemzően homodimerizációt jelent) képesek permeabilizálni a mitokondrium külső membránját, ezáltal proapoptotikus fehérjék citoszolba történő kiszabadulását idézik elő. A gátlásukért főképp az antiapoptotikus Bcl-2 tagok a felelősek, melyek gátolhatják közvetlen a Bak-ot és a Bax-ot (heterodimereket képezve velük), de megakadályozhatják az aktivációjukért felelős csak BH3 domént tartalmazó proapoptotikus Bcl-2 tagok aktivitását is (melyekkel szintén heterodimereket képezhetnek). Ez a gátlás feloldható egyrészt a pro-apoptotikus Bcl-2 fehérjék mennyiségének vagy aktivitásának növelésével, de az antiapoptotikus tagok poszttranszlációs módosításán keresztül is. A Bcl-2 család tagjai között létrejövő interakciók, melyek meghatározzák, hogy megvalósuljon-e az apoptózis mitokondriális útvonala, mindig a tagok adott helyzetben meglévő minőségétől (poszttranszlációs állapotától) és mennyiségétől (expresziójának mértékétől) függenek.

1.6. A kaszpáz-9 szerkezete és aktiválódása

A kaszpázok olyan cisztein proteáz enzimek, melyek szubsztrátjukat egy jellemzően 4 aminosavból álló motívum mentén hasítják melynek utolsó tagja egy aszparaginsav. A hasítás minden esetben ezen motívumok (általában szubsztrátonként egy darab) mentén rendkívül pontosan és csak részlegesen történik (limitált proteolízis). Az emberi szervezetben megjelenő 12féle kaszpáz közül mintegy 7 kap szerepet apoptózis során, melyeket funkciójuk szerint iniciátor (2, 8, 9 és 10), valamint effektor (3, 6 és 7) kaszpázoknak

nevezünk. Minden kaszpáz közös jellemzője, hogy inaktív (zimogén) formában szintetizálódnak, és hogy strukturálisan egy N terminálison elhelyezkedő prodoménból és az ezt követő nagy valamint kis alegységből állnak. Aktivációjuk prokaspáz-prokaspáz dimerek képződésével (melyben a prodomén mint interakciós doménként funkcionál), majd ezt követő limitált proteolízissel történik.

A kaszpáz-9 az apoptózis intrinsic útvonalának iniciátor kaszpáza. Ezt az útvonalat rendkívül sok féle stimulus indíthatja el melyek eredményeként a Bcl-2 családba tartozó Bak és Bax hatására a mitokondrium külső membránja permeabilizálódik. Ekkor egy sor proapoptotikus fehérje szabadul ki, többek között a citokróm c, ami az apoptotic protease activating factor 1-gyel (Apaf-1) heterodimert képez. Az Apaf-1-citokróm c komplexe az interakciójukat követően oligomerizálódik, és egy kerék alakú konformációt felvéve alkotja meg az apoptoszómát. A prokaspáz-9 az apoptoszómához kapcsolódik oly módon, hogy a caspase recruitment doménje (CARD) az Apaf-1 CARD doménjével létesít kapcsolatot.

Bár az apoptózis mitokondriális útvonala már régóta ismert, a prokaspáz-9 aktivációjának pontos és részletes mechanizmusát még mindig nem sikerült teljes egészében feltárni. Jelenleg két elmélet ismert a szakirodalomban: az „indukált konformációváltozás modell” és az „indukált közelségi modell”. Az eddig megjelent publikációkban számtalan egyik vagy másik modellt igazoló eredmények vannak, de jelenleg egyik modell sem képes önmagában minden eredményt magyarázni. Az „indukált konformációváltozás modell” szerint az Apaf-1-hez kötődő prokaspáz-9 fehérjék az interakció miatt esnek át olyan konformációváltozáson, mely esszenciális az aktivációjukhoz. Az „indukált közelségi modell” szerint viszont az apoptoszóma csak platformként szolgál annak érdekében, hogy sok prokaspáz-9 kerüljön egymás közelébe, és ezáltal lehetőség nyíljon a dimerizációra és a limitált proteolízisre.

A mitokondriális apoptózis iniciátoraként a kaszpáz-9 esszenciális szerepet tölt be az apoptózis kialakulásában. Éppen ezért döntő fontossággal bír a prokaspáz-9 aktiváció minden lépésének szabályozása és finomhangolása, mert ezen folyamatok nélkül nagyon könnyen sérül a szervezet homeosztázisának fenntartása.

1.7. A kaszpáz-9 expressziója fiziológias és patológias állapotokban

A soksejtű organizmusok élete során alapvető fontossággal bír a normál szöveti turnover. A felesleges, elöregedett, funkcióképtelen vagy a szervezetre veszélyt jelentő sejtek eltávolítása jelentős részben mitokondriális apoptózis révén valósul meg. A kaszpáz-9 a

szervezet szinte minden sejtjében megtalálható és expressziójának zavarai fejlődési rendellenességekhez, daganatos megbetegedésekhez és degeneratív folyamatokhoz vezetnek.

Transzgén egereken szerzett tapasztalatok alapján a kaszpáz-9 egész testes leütése, bár nem 100%-os penetranciával, de az egerek perinatális korban történő halálához vezet. Az embriók vizsgálata során azt találták, hogy legfőképp agyi defektusok alakulnak ki (agyi hiperplázia, melyet az apoptózisra képtelen sejtek, elsősorban neuronok felszaporodása okoz).

A tumoros transzformáción áteső sejtek egyik jellemző menekülési és túlélési mechanizmusa, hogy gátolja a különféle szabályozott sejthalálútvonalakat. A tüdőt, húgyhólyagot, gyomrot, vastagbelet, végbélet és a hasnyálmirigyet érintő tumorokban is megfigyelték a kaszpáz-9 aktivációjának zavarait vagy egy pontos nukleotid polimorfizmusait, melyek funkcióképtelen fehérje expressziójához vezettek, ami egyrészt hozzájárul a daganatos sejtek túléléséhez, másrészt rákterápiás szerekekkel szemben mutatott rezisztenciájukhoz is.

A stresszindukált apoptózis gátlása mellett a jelátvitel túlműködése is kóros állapotokat idéz elő. A Huntington-kór a központi idegrendszert érintő rendellenesség, amelyet az agysejtek progresszív degenerációja okoz. A végstádiumú betegekben jelentősen emelkedett aktív kaszpáz-9 és kaszpáz-3 szintet mutattak ki, amely arra utal, hogy a betegség utolsó stádiumához a neuronok túlzott mértékű apoptózisa is hozzájárul.

Ezek az eredmények igazolják, hogy a kaszpáz-9 esszenciális szerepet tölt be a szervezet homeosztázisának fenntartásában.

2. Célkitűzés

Az eddigi nemzetközi eredmények alapján viszonylag jól ismert az extrinsic apoptózis és a nekroptózis kapcsolata: a nekroptózis előfeltétele a kaspáz-8 hiánya, enzimaktivitásának gátlása, vagy a prokaspáz-8 aktivációjában részt vevő FADD defektusa. A mitokondriális apoptózis és a nekroptózis kapcsolatáról azonban jelenleg nagyon kevés adat áll a rendelkezésünkre. Bár kaspáz-8 több szubsztrátját (RIPK1, RIPK3, CYLD, TRIF) írták már le, mint a nekroptózis kritikus regulátorát, azonban a legismertebb kaspáz-8 célpontok, vagyis a downstream kaspázok funkcióját nekroptózis során szinte alig vizsgálták. Szakirodalmi adatok alapján a kaspáz-3 vagy-7 csendesítése nem befolyásolta a TNF receptor aktivációját követő nekroptózis mértékét, de a kaspáz-9 szerepe a nekroptózis jelátvitelében eddig egyáltalán nem vizsgált terület.

Hipotézisünk szerint a kaspáz-9 nélkülözhetetlen a nekroptózis jelátviteli mechanizmusában, illetve a mitokondriális apoptózis és nekroptózis átmenet szabályozásában.

Kutatómunkánk során vad típusú és kaspáz-9 hiányos sejtvonal párokat (humán és egér eredetű) használva vizsgáltuk, hogy

- van-e szerepe a kaspáz-9-nek a sejthalál receptorok és mintázatfelismerő receptorok aktiválásakor kialakuló nekroptózis jelátvitelében során?
- a nekroptózis jelátvitelének jelenleg ismert lépései (molekuláris komplexek kialakulása, poszttranszlációs módosítások) közül melyek bizonyulnak kaspáz-9 függőnek?
- mely molekulák kapcsolódnak a kaspáz-9-hez a jelátvitel során?
- milyen funkciót betöltve vesz részt a kaspáz-9 a nekroptózisban?
- a kaspáz-9 acinar sejt specifikus deléciója mérsékli-e a cerulein indukált akut pankreatitisz súlyosságát?

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejttenyésztés

Kísérleteinkhez JA3 Jurkat (humán T-limfocita), JA3-C9 (kaspáz-9 negatív Jurkat), JA3 retr (vad típusú kaspáz-9-cel retranszfektált JA3-C9), MEF (egér embrionális fibroblaszt), MEF-C9 (kaspáz-9 negatív MEF), HEK 293FT (SV40 T antigénnel transzformált HEK 293 T, humán embrionális vesesejt) sejtvonalakat használtunk. MEF és MEF-C9 sejteket DMEM low glucose (Sigma-Aldrich, #D5546) médiumban tenyésztettük 50 μ M merkaptopetenollal kiegészítve, a HEK 293FT sejteket DMEM high glucose (Sigma-Aldrich, #D5796), míg a többi sejtvonalat RPMI (Sigma-Aldrich, #R5886) médiumban tartottuk 37 °C-on, 5% CO₂ és 100%-os relatív páratartalom mellett. Minden sejttenyésztő tápfolyadékot a felsoroltakon kívül még 10% foetális borjú szérummal, 292 mg/l L-glutaminnal és 40 mg/l gentamicinnel egészítettünk ki.

3.2. Sejthalál mérése

Az áramlási citometriás mérések során mintánként 5×10^5 db sejtet használtunk. A sejteket 10-50 μ M Z-VAD (ApexBio, #A1902), 1 μ M BV6 (Genentech cég ajándéka), 0,4 μ g/ml cycloheximide (Sigma-Aldrich, #C6255), 2,5 μ M CCT137690 (ApexBio, #A4132), 20 μ M AR-A014418 (Selleck Chemicals, #S7435), 100 ng/ml rekombináns flagellin (Sigma-Aldrich, #SRP8029-10UG), 40 μ M necrostatin-1 (Abcam, #ab141053), 1 μ M necrosulfonamide (Tocris Bioscience, #5025) vagy 7,5 μ M GSK'872 (Selleck Chemicals, #S8465) kombinációjával 1 órát előkezeltük, majd 30 ng/ml anti-FLAG M2 antitesttel (Sigma-Aldrich, #F1804) keresztkötött FasL-dal (Enzo Life Sciences, #ALX-522-001-C010), 40 ng/ml anti-FLAG M2 antitesttel keresztkötött Trail-lel (Enzo Life Sciences, #ALX-522-003-C010), 50 ng/ml humán TNF α -val (BioLegend, #570104), 400 μ M H₂O₂-dal (Sigma-Aldrich, #H1009), 0,74-6,7 μ M ionomycinnel (Sigma-Aldrich, #I0634), 100 ng/ml LPS-sel (Sigma-Aldrich, #L8643) aktiváltuk, vagy megfertőztük humán herpeszvírus 1-gyel (ATCC-VR-1493). A sejthalál mértékét propidium-jodid (Sigma-Aldrich, #P4170) festéssel detektáltuk 24 órával az aktivációt követően.

A méréseket FACS Calibur áramlási citométerrel (BD Biosciences) végeztük, a kapott adatokat FlowJo programmal értékeltük ki (FlowJo X, verziószám: v10.0.7r2, Tree Star).

3.3. Effektor kaspázok aktivációjának mérése

A kaspáz-3 és a kaspáz-7 enzimaktivitásának méréséhez Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay kitet (Promega, #G7792) használtuk. A kísérlethez az előzetesen aktivált

Jurkat sejtekből 2×10^4 db-ot használtunk fel, melyeket mérés előtt 96 lyukú fekete színű sejtenyésző platere (SPL Life Sciences, #31296) helyeztünk. Az effektor kaszpázok aktivitásának detektálásához szükséges reakciókat a gyártó utasításainak megfelelően hajtottuk végre. A minták fluoreszcencia intenzitását Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader készülékkel mértük, melynek során 485 ± 20 nm gerjesztési és 528 ± 20 nm detektálási hullámhosszokat alkalmaztunk.

3.4. SDS-PAGE és Western Blot

A stimulációt követően a sejteket összegyűjtöttük és 10^6 db sejthez 100 μ l 2x Laemmli-féle minta puffert (65,8 mM Tris/HCl (pH 6,8), 2,1% SDS, 26,3% glicerol, 0,01% brómfenolkék) adtunk, majd 5 percig 95 °C-on megfőztük.

Az elektroforézist követően a mintákat nitrocellulóz membránra blottoltuk, amit az alábbi, 1000x-esre hígított elsődleges antitestek egyikével inkubáltunk overnight 4 °C-on: kaszpáz-9 (MBL Life science, #M054-3), RIPK1 (BD Biosciences, #610459), RIPK3 (Cell Signaling Technology, #13526), GSK3 β (Cell Signaling Technology, #9315), Aurora A (Cell Signaling Technology, #14475), pRIPK1 (Cell Signaling Technology, #65746), pRIPK3 (Abcam, #ab209384), Phospho-Aurora A (Thr288)/Aurora B (Thr232)/Aurora C (Thr198) (Cell Signaling Technology, #2914) és β -aktin (Santa Cruz Biotechnology, #sc-47778).

Másnap a membránt háromszor mostuk TBS-Tween pufferrel (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,5), majd 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk tormaperoxidáz enzimmal konjugált anti-nyúl (GE Healthcare, #NA934), anti-egér (GE Healthcare, #NA931) vagy anti-patkány (Sigma-Aldrich, #A9037) másodlagos antitestekkel, melyeket előzőleg 5000x-esre hígítottunk 5 m/v%-os sovány tejben (50 ml TBS-Tween puffer+2,5 g sovány tejpor). Ezután a membránt hatszor mostuk, végül kemilumineszcens reagenssel reagáltatva röntgenfilmen hívtuk elő.

3.5. Fehérjeinterakciók vizsgálata immunprecipitációval

A kísérlethez mintánként 5×10^7 db Jurkat sejtet használtunk fel, melyeket az aktivációt követően lecentrifugáltunk, majd a pelletet 500 μ l 1% Triton X-et (Sigma-Aldrich, #T8787), proteázgátlót (Sigma-Aldrich; #P8340) és foszfátázgátlót (Sigma-Aldrich; #P2850) tartalmazó lízis pufferben (30 mM Tris, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 2 mM Na₄P₂O₇, pH 7,6) lizáltuk jégen 30 percig. A mintákból azonos mennyiségű fehérjét tartalmazó felülúszót mértünk az alábbi antitestekkel fedett protein A/G PLUS-agarose (Santa Cruz Biotechnology; #sc-2003) gyöngyökhöz, melyeket ezután 4 °C-on

folyamatosan forgatva overnight inkubáltunk: kaszpáz-9 (LifeSpan BioSciences; #LS-C148248), RIPK1 (BD Biosciences; #610459), RIPK3 (Cell Signaling Technology; #13526) és Aurora A (Cell Signaling Technology; #14475). Másnap a gyöngyöket négyszer mostuk lízis pufferrel, majd ezt követően minden mintához 30 µl 2x Laemmli-féle puffert adtunk, majd 5 percig 95 °C-on megfőztük. A mintákban lévő fehérjéket western blottal azonosítottuk, melyhez az alábbi könnyűlánc specifikus, tormaperoxidáz enzimmel konjugált másodlagos antitesteket használtunk, melyeket előzőleg 5000x-esre hígítottunk 5 m/v%-os sovány tejben: anti-nyúl (Merck; #MAB201) vagy anti-egér (Merck; #AP200P).

3.6. Plazmidok és konstruktok

A RIPK1 és RIPK3 indukálható overexpressziójához szükséges konstruktokhoz az alábbi plazmidokat használtuk fel templátként: pCR3-FLAGhRIP1 (Cabri, #LMBP4850), hRIP3 GFP wt (Addgene, #41387). A RIPK1 és RIPK3 szekvenciáját először a pENTR4-FLAG (Addgene, #17423) Gateway donor (klónozó) vektorba ligáltuk, majd ezt követően átrekombináltuk a pCW57.1 (Addgene, #41393) vektorba, mely egy lentivirális „All-in-one” tetraciklin/ doxiciklin indukálható Gateway célvektor (expressziós vektor, mely lehetővé teszi az indukálható expresszióhoz szükséges reverz tetraciklin transzaktivátor (rtTA) és a célgén egyidejű bevitelét). Minden klónozási lépést restriktációs hasítással és szekvenálással is megerősítettünk.

3.7. Vírustermelés és target sejtek fertőzése

A transzdukcióhoz használt replikációra képtelen lentivírusok létrehozásához az alábbi csomagolóvektorokat használtuk, melyeket kalcium-foszfát transzfekcióval juttattunk be a vírustermelésre használt HEK 293FT sejtekbe: VSV-G envelopot kódoló pMD2.G (Addgene, #12259) és psPAX2 (Addgene, #12260), mely tartalmazza a Gag, Pol, Rev, and Tat géneket. A szükséges plazmidokat (22 µg transzferálandó gént tartalmazó lentivirális vektor, 15 µg pMD2G, 5 µg psPAX2) egy 50 ml-es centrifugacsőbe mértük, amit kiegészítettünk 1,35 ml steril Milli-Q vízzel és 150 µl 2,5 M CaCl₂-oldattal.

Az így elkészített elegyhez lassan, cseppenként hozzáadtunk 1,5 ml 2x HEBS oldatot (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,0) miközben azt autoklávozott üveg Pasteur-pipetta és pipettor segítségével levegőt buborékolgatva folyamatosan kevertük. 30 perc inkubálás után 1,5 ml transzfekciós oldatot csepegtettünk a T75-ös sejttenyésztő flakában lévő HEK 293FT sejtekre. A következő nap leszívtuk a sejtekről a transzfekciós

tápfolyadékot és lecseréltük 10 ml komplett DMEM-re. Az ezt követő 24 és 48 órában gyűjtöttük a sejtekről a vírusokat tartalmazó felülúszókat

A target sejteket a fertőzés napján 12 lyukú sejttenyésztő plate-re helyeztük és minden lyukhoz hozzáadtunk 1 ml vírust tartalmazó felülúszót 4 µg/ml polybrene (Sigma-Aldrich; #H9268) jelenlétében. Másnap reggel a sejteken a médiumot lecseréltük 4 ml 5 µg/ml puromicint (Santa Cruz Biotechnology; #sc-108071) tartalmazó komplett médiumra. Ezután a médiumot minden második nap lecseréltük addig, amíg a vírusos transzdukción át nem esett sejtek elpusztultak (4-7 nap).

3.8. Akut pankreatitisz modell

Az akut pankreatitisz tüneteinek súlyosságát a vad típusú és kaszpáz-9 deficiens egerekben Dr. Pallagi Petra, Dr. Tél Bálint és Dr. Maléth József kollaborációs partnereink vizsgálták (Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. számú Belgyógyászati Klinika és Népegészségtani Intézet, MTA-SZTE Lendület Eпитél Sejt Szignalizáció és Szekréció Kutatócsoport).

A Cre rekombinááz expressziója 125 mg/testtömeg-kilogramm tamoxifen orális adásával lett indukálva 5 egymást követő napon keresztül. Ezt követően nyolc órán át, óránként 50 mg/testtömeg-kilogramm cerulein intraperitoneális adásával történt az akut pankreatitisz kiváltása. Az állatokat 12 óra múlva túlaltatással termináltuk, majd ezt követően vér- és szövetmintákat gyűjtöttünk.

A gyűjtött vérmintákból a szérumot centrifugálással izoláltuk, majd felhasználásig –20 °C-on tároltuk. A szérum amiláz aktivitást kolorimetriás kittel (Diagnosticum; #47462) határoztuk meg. A reakciókat a gyártó utasításának megfelelően hajtottuk végre, az abszorbanciát 405 nm-en detektáltuk FLUOstar OPTIMA Microplate Reader készülékkel (BMG Labtech). A szövetmintákat 4%-os formaldehid oldattal fixáltuk és felhasználásig 4 °C-on tároltuk. Paraffinba történő ágyazást követően a mintákat 4 µm-es darabokra metsztettük kriosztáttal, melyet hematoxin-eozin festés követett. A gyulladásos sejtek infiltrációját, a nekrosis és ödéma mértékét három független kutató értékelte (0-5 pontos skálán).

A kísérleti állatokat általános állatházi körülmények között (22-24 °C-os helyiségben, 12 órás világos-sötét ciklust tartva, szabvány ketrecekben, 4-6 egeret ketrecenként) tartottuk a Debreceni Egyetem, Élettudományi Épület Kísérleti Állatházában (Nyilvántartási szám: III/4-KÁT/2015). Minden állat részére konvencionális sterilizált ételhez és autoklávozott vízhez való szabad hozzáférést biztosítottunk. Az állatkísérleteket a National Institutes of Health

(NIH) előírásainak megfelelően és a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelve szerint hajtottuk végre az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács engedélyével (a kísérletek engedélyszáma: XXI./1542/2020).

3.9. Fehérje izolálás hasnyálmirigy szövetmintákból

A fehérje izolálást cerulein kezelt és a kezeletlen egerek hasnyálmirigyéből Dr. Pallagi Petra, Dr. Tél Bálint és Dr. Maléth József kollaborációs partnereink valósították meg.

Az állatokat a cerulein kezelést követően 12 óra múlva túlaltatással termináltuk. Az izolált hasnyálmirigyeket ezt követően szikepengével apró darabokra vágtuk, melyeket 1 ml proteázgátló koktéllal kiegészített RIPA pufferben lizáltunk. Az így kapott mintát jégen tartva szonikálással (Branson Sonifier SFX150) homogenizáltuk, majd lecentrifugáltuk, végül a kapott felülúszót „snap-freeze” módszerrel gyorsfagyasztottuk.

3.10. Statisztikai analízis

A kísérleti adatok statisztikai elemzésére kétszemponos varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk Tukey post-hoc tesztel. A statisztikai számítások elvégzéséhez GraphPad Prism programot használtunk (verziószám: 6.01, La Jolla). Azokat a változásokat tekintettük szignifikánsnak, ahol $p < 0,05$ volt. Az ábrákon látható szignifikanciaszinteket az alábbiak szerint ábrázoltuk: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,005$, **** $P < 0,001$.

4. Eredmények

4.1. A kaszpáz-9 hiánya gátolja a nekroptózist humán Jurkat sejtekben

Munkánk első lépéseként Jurkat sejtvonal különféle változatain indukáltunk sejthalál ligandok adásával nekroptózist JA3 (vad típusú Jurkat), kaszpáz-9-et nem tartalmazó JA3 (JA3-C9) és vad típusú kaszpáz-9-cel retranszfektált JA3-C9 (JA3 retr) sejtvonalakon.

Első lépésként igazoltuk, hogy az általunk használt kaszpáz-9 negatív sejtvonal valóban nem expresszál kaszpáz-9-et, míg az eredeti vad típusú és a retranszfektált sejtvonalak igen. Kimutattuk továbbá azt is, hogy a kaszpáz-9 hiánya nem befolyásolta más, nekroptózisban kulcsszerepet játszó fehérjék expresszióját. Eredményeink szerint a RIPK1, RIPK3, MLKL, CYLD, kaszpáz-8 és TAK1 fehérjék ugyanolyan mértékben kerültek expresszióra a JA3, a JA3-C9 és a JA3 retr sejtekben is.

A nekroptózis indukálásakor a sejteket 1 órával a ligandok adását megelőzően teljes spektrumú kaszpázgátlóval (Z-VAD) előkezeltük, hogy megakadályozzuk a kaszpáz-8 aktivációját és így a nekroptózis gátlását. Optimális nekroptózis abban az esetben figyelhető meg, ha a RIPK1 nincs ubiquitinálva. Ezért a sejteket a RIPK1 ubiquitinálását végző IAP fehérjék lebomlását elősegítő IAP antagonistával (BV6) is előkezeltük. A sejthalál nekroptózis voltát egy specifikus nekroptózis gátló, a necrostatin-1 (Nec1) adásával igazoltuk. Az előkezeléseket követően a sejteket TNF, FasL vagy Trail sejthalál ligandok adásával aktiváltuk 24 órán keresztül.

Eredményeink szerint mindhárom sejthalálligand adásával nagyarányú nekroptózis alakult ki a vad típusú sejteken, azonban a kaszpáz-9 hiányában ez a hatás nem volt megfigyelhető. A kaszpáz-9 retranszfekeciójával sikerült helyreállítanunk a sejtek érzékenységét mindhárom stimulussal szemben. A kiváltott sejthalált a Nec1 teljesen gátolta, igazolva ezzel a sejthalál nekroptózis voltát. Összegzésképpen tehát megállapítható, hogy a kaszpáz-9 esszenciális szerepet tölt be a sejthalálreceptorok aktivációjával kiváltott nekroptózis jelátvitelében humán Jurkat sejteken.

4.2. A kaszpáz-9 nekroptózisban betöltött szerepének vizsgálata MEF sejteken

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a sejthalálreceptorok kaszpázgátlók jelenlétében nekroptózist indukálnak egér fibroblaszt sejteken. Ezért a következőkben kaszpáz-9-et expresszáló és nem expresszáló MEF sejtek viselkedését hasonlítottuk össze TNF, illetve Fas ligand indukált nekroptózis esetén. A nekroptózis aktivációja előtt a Jurkat sejtekhez hasonlóan, itt is igazoltuk, hogy a MEF-C9-es sejtek valóban nem expresszálták a kaszpáz-9-

et, míg a vad típusúak igen. A főbb nekroptózis kulcsmolekulák (RIPK1, RIPK3, MLKL, CYLD, kaszpáz-8, TAK1) expressziója itt is megegyezett a két sejtvonal között.

A Jurkat sejtekkel összhangban itt is azt tapasztaltuk, hogy a kaszpáz-9 negatív sejtek minden használt stimulus esetén rezisztensebbnek bizonyultak, mint vad típusú társaik. Sikerült tehát igazolnunk, hogy a kaszpáz-9-nek fontos szerep jut a nekroptózis során nemcsak emberi, hanem egér sejtekben is.

4.3. A kaszpáz-9 nem játszik szerepet a RIPK1 függő apoptózisban

Felmerülhet a kérdés, hogy vajon a kaszpáz-9 hatása nekroptózis specifikus-e? A TNF receptor aktivációja a jel minőségének függvényében vezethet sejttaktivációhoz, RIPK1 függő és független apoptózishoz, illetve nekroptózishoz is.

Kísérleteink során a TNF receptor aktivációja IAP antagonistá jelenlétében erőteljes effektor kaszpáz aktivációhoz vezetett, ami igazolja, hogy ezeken a mintákon bizonyítottan apoptózis indukálódott. A publikált adatoknak megfelelően, erre nem volt hatással a kaszpáz-9 jelenléte, illetve hiánya, valamint a necrostatin-1 előkezelés sem volt képes gátolni. Igazoltuk tehát, hogy a RIPK1 függő apoptózisban nem játszik szerepet a kaszpáz-9.

4.4. Az ionomycin és a hidrogén-peroxid indukált nekrozis kaszpáz-9 független

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy a kaszpáz-9 csak a nekroptózisra van-e hatással, vagy pedig általánosságban képes a nekrozis szabályozására JA3 és JA3-C9 sejteket ionomycin, illetve hidrogén-peroxid kezelésnek vetettük alá. Az ionomycin kalcium ionofórként ismert. Míg alacsony koncentrációban (<250 nM) apoptózist indukál, addig mikromólos koncentrációja már a sejtet érő ozmotikus stressz miatt klasszikus nekrozishoz vezet. Az ionomycin mellett, a hidrogén-peroxidról is ismert, hogy képes mindkét útvonalat bekapcsolására az általunk választott 400 µM-os dózisban.

A Jurkat sejteken az ionomycin kezelés nagy arányú nekrozis kialakulásához vezetett melynek mértékét nem befolyásolta a kaszpáz-9 hiánya. A mitokondriális apoptózis iniciátoraként jól ismert a kaszpáz-9 szerepe és ezzel összhangban, apoptózist (kaspáz gátló nélkül kialakuló sejthalál komponens) csak a vad típusú sejteken indukált a H₂O₂. Kaspázgátló adásával, a H₂O₂ hatására csakis nekrozis képes kialakulni, mely ugyanakkora volt mindkét sejtben, amiről tehát igazoltuk, hogy ez a nekroptózissal szemben nem kaszpáz-9 függő sejthalál folyamat.

4.5. A kaszpáz-9 szerepe a Toll-like receptorok által indukált nekroptózisban

Ismert, hogy a sejthalálreceptorok mellett a mintázatfelismerő receptorok aktiválásával is indukálható nekroptózis. A szakirodalomban több olyan intracelluláris patogén ismert, melyek fertőzése a nekroptózis aktivációjához vezet. Kutatásunk következő szakaszában MEF és MEF-C9 sejteket kaszpázgátlóval történő előkezelést követően LPS-sel aktiváltuk, vagy megfertőztük herpes simplex vírussal.

Mind az LPS kezelés, mind pedig a HSV-1 fertőzés következtében a vad típusú sejteken nagyarányú nekroptózis alakult ki, míg ez a hatás kaszpáz-9-et expresszáló párjukon elmaradt. Sikertelenül tehát bebizonyítanunk, hogy nem csak a sejthalálreceptorok, de egy teljesen más receptorcsalád jelátvitelében is fontos szerepe van a kaszpáz-9-nek nekroptózis során.

4.6. A TLR5 aktiváció hatása a nekroptózisra

Egy szervezetben épp zajló fertőzéskor a gyulladt szövetben ott találjuk a PAMP-ok és DAMP-ok mellett az aktiválódott immunsejtek által termelt citokineket és sejthalálligandókat is (TNF, FasL). A fertőzött sejtek eliminálása az esetek többségében FasL mediált apoptózissal valósul meg, de egy fertőzött sejtben ezzel párhozamosan aktiválódhatnak, vagy már eleve aktívak lehetnek a mintázatfelismerő receptorok mediálta útvonalak is a jelen lévő PAMP-ok és esetleg DAMP-ok miatt. Éppen ezért, bár igen gyakori jelenség, de jelenleg még nem teljesen tisztázott, hogy a mintázatfelismerő és a sejthalálreceptorok egyidejű aktivációja milyen hatással van a sejthalál folyamatokra.

Kutatócsoportunk arra volt kíváncsi, hogy a TLR5 receptor aktivációja befolyásolja-e a sejthalálreceptorok indukálta apoptózist, valamint hogy ez a hatás mely molekulán, mely útvonalon keresztül valósul meg. Ezért JA3 és RIPK1 deficiens JA3 sejteket (JA3-RIPK1) rekombináns flagellinnel 1 órát előkezeltük, majd ezt követően FasL-dal, TNF-fel vagy fitohemagglutininnel aktivált T-sejtek felülszójával aktiváltuk 24 órán keresztül. Eredményeink szerint az általunk alkalmazott kezeléseknek köszönhetően nagy arányú apoptózis alakult ki a Jurkat sejteken, melyet a rekombináns flagellinnel történő előkezelés képes volt még tovább növelni. Ez a hatás azonban RIPK1 hiányában nem volt megfigyelhető, mely igazolja, hogy a TLR5 aktivációja RIPK1 függő módon képes segíteni a sejthalálreceptor indukálta apoptózist.

Ezen túl kíváncsiak voltunk arra is, hogy a TLR5 és a Fas receptorok ko-aktivációja hasonló hatással van a nekroptózis mértékére. Kísérleteink során a WSU-FasL sejtvonallal ko-kultúrában tartott JA3 sejteken a flagellin előkezelés nagyobb mértékű nekroptózis kialakulását indukálta kaszpázgátló jelenlétében.

Ezen eredmények alátámasztják, hogy a flagellinnel történő elkökezelés elősegíti mind az apoptózis mind pedig a nekroptózis kialakulását humán Jurkat sejteken.

4.7. A kaszpáz-9 interakciós partnereinek felderítése immunprecipitációval

Mivel nekroptózis csak kaszpáz gátolt körülmények között valósulhat meg, ezért feltételeztük, hogy a kaszpáz-9 a jelátvitelben, enzimaktivitásának hiányában, mint adapter fehérje vesz részt. A jelátvitel feltérképezése során elsőként azt vizsgáltuk, hogy a kaszpáz-9-hez kötődik-e a nekroszóma valamely kezdeti komponense, vagyis a RIPK1, RIPK3 vagy az MLKL. Ezért a JA3 sejteken Z-VAD, IAP antagonisták és TNF liganddal kombinációjával nekroptózist váltottunk ki, majd ezt követően immunprecipitációval több időpontban vizsgáltuk a fehérjék közötti interakciókat.

Bár nem tudtunk kimutatni semmilyen interakciót a kaszpáz-9 és a RIPK1, illetve kaszpáz-9 és az MLKL között, de felfedeztünk egy gyenge és tranzienst kapcsolatot a kaszpáz-9 és a RIPK3 között, mely az aktivációt követő 3 óránál tetőzött. Ezt a kötődést a RIPK3 antitesttel végzett immunprecipitáció is megerősítette, igazolva, hogy a kaszpáz-9 nekroptózis során képes a RIPK3-mal kapcsolatba kerülni.

4.8. A nekroszóma létrejöttének és aktivációjának vizsgálata

A többféle jellel elindítható nekroptózist közvetítő jelpályák végső soron a nekroszóma összeszerelődéséhez vezetnek, melynek első lépése a RIPK1-RIPK3 kapcsolat létrejötte, majd ezen fehérjék foszforilációja és oligomerizációja. A következőkben vizsgáltuk, hogy részt vesz-e a kaszpáz-9 a nekroszóma összeszerelődésének szabályozásában. Ezért az előzőekkel összhangban JA3 és JA3-C9 sejteken nekroptózist váltottunk ki TNFR aktivációjával és vizsgáltuk a RIPK1-RIPK3 fehérjék közötti interakciót, valamint az aktivációjuk kinetikáját is.

Eredményeink szerint míg a vad típusú sejtekben jól láthatóan létrejött a RIPK1-RIPK3 kapcsolat a ligand adását követő 3 és 6 óra között, addig ez kaszpáz-9 hiányában egyik mért időpontban sem volt megfigyelhető. Megvizsgálva a fehérjék aktivációját, látható, hogy a RIPK1 valamint a RIPK3 fehérjék foszforilációja is csak a JA3 sejtekben történt meg. Beigazolódott tehát, hogy a nekroszóma összeszerelődése és a komponensek ezt követő foszforilációja is kaszpáz-9 függő folyamat.

4.9. A RIPK1 és RIPK3 overexpressziója helyreállítja a nekroptózist

Annak érdekében, hogy megerősítsük a kaszpáz-9 nekroptózis jelátvitelében betöltött pozícióját, overexpresszáltattuk vad típusú és kaszpáz-9 hiányos sejtekben a RIPK1-et és RIPK3-at egy tetraciklin indukálható rendszerben (Tet-On). A sejtvonalak kialakítását követően megnéztük, hogy ezen fehérjék overexpressziója, hogyan befolyásolja a nekroptózist kaszpáz-9 hiányában. Ezért a fertőzött és nem fertőzött JA3 és JA3-C9 sejteken 1 nappal az aktiváció előtt beindítottuk az overexpressziót doxiciklinnel, majd Z-VAD és BV6 kombinációjával történő előkezelést követően TNF-fel indukáltuk a nekroptózist.

A nem overexpresszált sejteken a doxiciklin előkezelés nem volt hatással a sejthalál intenzitására, a nem fertőzött JA3-C9 sejtek továbbra sem voltak érzékenyek a stimulussal szemben. Azonban a fertőzött és szelektált sejteken a doxiciklin kezelés beindította a RIPK1, illetve a RIPK3 overexpresszióját (melyet Western Blottal erősítettünk meg), ennek hatására pedig helyreállt a kaszpáz-9 hiányos sejteken a nekroptózis. Ezen eredmények megerősítik az immunprecipitációs kísérletek esetén látottakat, és igazolják, hogy a nekroptózis downstream mechanizmusai továbbra is funkcionálisak, így a kaszpáz-9 vélhetően a RIPK1-RIPK3 szintjén, vagy azoktól upstream szabályozhatja a nekroptózist.

4.10. Az AURKA és a kaszpáz-9 kapcsolódik nekroptózis során

Irodalmi adatok szerint az AURKA és szubsztrátja a GSK3 β fontos szabályozóként működnek a sejtekben, hogy stimuláció hiányában ne alakulhasson ki spontán nekroptózis. Annak vizsgálatához, hogy az AURKA szerepet játszik-e a nekroptózis kaszpáz-9 általi szabályozásában, első lépésként a kaszpáz-9-AURKA kapcsolatot vizsgáltuk meg.

Eredményeink szerint TNF aktiváció hatására az AURKA specifikus antitesttel végzett immunblotton határozottan megjelent a kaszpáz-9 sávja a ligand adását követő 3-6 órán belül. Ezt a kapcsolatot a kaszpáz-9 immunprecipitációs blott is megerősítette, igazolva, hogy sikeresen azonosítottuk a kaszpáz-9-et, mint az AURKA egy eddig ismeretlen interakciós partnerét. Az AURKA foszforilációját vizsgálva azt találtuk, hogy a fehérje aktivációja vad típusú sejtekben 6 órával a TNF adását követően megemelkedik, vélhetően a kaszpáz-9-cel történt kapcsolat következtében, mivel a JA3-C9-es sejteken ez az aktiváció nem megfigyelhető. Ezen kísérletek arra utalhatnak, hogy a kaszpáz-9 az AURKA által irányított nekroptózis gátlás ellen hatva segítheti a nekroptózis kialakulását.

4.11. AURKA és GSK3 β gátlók helyreállítják a nekroptózist kaszpáz-9 hiányában

A kaszpáz-9-AURKA kapcsolat felderítését követően arra voltunk kíváncsiak, hogy hogyan befolyásolja az AURKA, illetve szubsztrátjának a GSK3 β -nek a gátlása kaszpáz-9 jelenlétében és hiányában a sejthalálreceptor indukálta nekroptózis kialakulását. A következőkben megvizsgáltuk, hogy befolyásolja-e a nekroptózist az AURKA, vagy GSK3 β gátlókkal történő előkezelés.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy AURKA és a GSK3 β gátlók alkalmazásával egyrészt nagyobb mértékű nekroptózis alakult ki a vad típusú sejteken, másrészt mind a két gátló adása sikeresen helyreállította a kaszpáz-9 hiányos sejtek nekroptózis érzékenységét. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a kaszpáz-9 az AURKA-GSK3 β útvonal ellen hatva elősegíti a nekroptózis létrejöttét és az AURKA-GSK3 β nekroptózist gátló szabályzó mechanizmus kaszpáz-9 hiányában túlműködik.

4.12. Kaszpáz-9 nekroptotikus funkciójának igazolása akut pankreatitisz modellben

Mivel publikált adatok szerint a RIPK3 és az MLKL leütése egerekben megakadályozta a cerulein indukált akut pankreatitisz kialakulását, ezért szerettük volna egy hasonló modellben megvizsgálni a kaszpáz-9 nekroptotikus szerepét. Mivel azonban a kaszpáz-9 egész testes leütése az egerek embrionális halálához vezet, ezért hasnyálmirigy acinar sejt specifikus deléciót valósítottunk meg tamoxifen indukálható rendszerben, melyben összehasonlítottuk a cerulein indukálta akut pankreatitisz súlyosságát vad típusú egerekhez képest.

Ehhez első lépésként 5 napon át tartó tamoxifen adásával indukáltuk a Cre rekombináz expresszióját. Ezt követően történt az akut pankreatitisz kiváltása, amihez nyolc órán keresztül óránként adtuk intraperitoneálisan a ceruleint az egereknek. A kontroll csoportot cerulein helyett fiziológiás sóoldattal kezeltük, az állatokat 12 óra múlva túlaltatással termináltuk. A pankreatitisz tüneteinek súlyosságát hematoxin-eozin festett hasnyálmirigy metszeteken vizsgáltuk, valamint meghatároztuk a szérumban lévő amiláz aktivitás mértékét is, mely az akut hasnyálmirigy-gyulladás egyik indikátora.

A fiziológiás sóoldatot kapott kontroll csoportban a hasnyálmirigy szövettani képe normál morfológiát mutatott, míg cerulein kezelés hatására a vad típusú egerekben nagyarányú sejt és szövetpusztulás figyelhető meg, amit a nekrotikus területek nagysága, az ödéma kialakulása, a gyulladásos sejtek infiltrációja és a megnövekedett amiláz aktivitás is igazolt. Ezzel szemben a hasnyálmirigy acinar sejt specifikus kaszpáz-9 leütés szignifikánsan mérsékelte minden mérési módszer esetén a szöveti destrukciót. Jóval kisebb ödéma alakult

ki, kevesebb volt a gyulladásos sejtek száma, alacsonyabb volt a szérum amiláz szintje, a nekrozis mértéke pedig szinte a kontroll szintjén maradt. Összességében a kaszpáz-9 hiányában jelentősen csökkent az akut pankreatitisz súlyossága, mely egyértelműen alátámasztja a kaszpáz-9 in vivo szerepét a nekroptózis jelátvitelében.

4.13. Nekroptotikus fehérjék aktivációjának vizsgálata cerulein kezelést követően

Bár széleskörűen elfogadott, hogy az általunk használt cerulein indukált akut pankreatitisz modellben a nekroptózis aktivációja felelős a hasnyálmirigy pusztulásáért és ezzel összefüggésben a jellemző klinikai tünetek megjelenéséért, de igazolni szeretnénk volna, hogy az egerek cerulein kezelése valóban nekroptózis és nem pedig más sejthalálforma kialakulását idézte elő. Ennek érdekében a kezeléseket követően gyűjtött pankreasz szövetmintákból fehérjeizolálást követően megvizsgáltuk a RIPK1 és RIPK3 aktivációját, foszfospecifikus antitestek segítségével.

Eredményeink szerint a cerulein kezelés nagymértékű RIPK1 és RIPK3 aktivációhoz vezetett a vad típusú egerekben a kontroll, fizioológias sóoldattal kezelt állatokhoz képest. A kaszpáz-9 deficiens egerek esetén a RIPK1 foszforilációja jelentősen csökkent, míg foszfo-RIPK3 nem volt detektálható. Ez a kísérlet igazolja, hogy a cerulein kezelés valóban nekroptózis kialakulásához vezet, melyben a kaszpáz-9 esszenciális szerepet tölt be.

5. Eredmények megbeszélése

A sejthalál egy nélkülözhetetlen folyamat, mely az emberi szervezet több ezer milliárd sejtjét érinti naponta. Ez a folyamat segít fenntartani a szervezet homeosztázisát, hozzájárul az akut sérülésekből való felépüléshez, a patogének eliminációjához és az immunrendszer megfelelő szabályozásához. Amit korábban pusztán két különálló folyamatnak gondoltak, (apoptózis és nekrozis), az ma már egy dinamikusan fejlődő önálló tudományág. A terület elmúlt 20 év rohamos fejlődésének köszönhetően, ma már tudjuk, hogy a sejtek eltávolítása potenciálisan több, egymástól jól elkülöníthető sejthalálformán át is megvalósulhat.

Egyre több tudományos bizonyíték van arra vonatkozólag, hogy az egymástól gyakran teljesen eltérő sejthalálfolyamatokat végrehajtó, igen szerteágazó jelátviteli folyamatok jóval több ponton kapcsolódnak egymáshoz, mint ahogyan azt korábban feltételeztük. Bizonyos körülmények között például az apoptózis és az autofágia szinergisztikus kapcsolatban van egymással, addig más szituációkban autofágia csak akkor jöhet létre, mikor az apoptózis gátolva van. A nekroptózisra, nagyon sokszor még mindig mint az apoptózis tartalék útvonalaként tekintenek. Azonban egy rákterápiás szer, a shikonin önmagában képes az apoptózist megkerülve, direkt módon nekroptózist elindítani a sejtben, amit Nec1 előkezeléssel át lehet fordítani apoptózissá, így ebben az esetben az apoptózis válik a tartalék útvonallá. A korábbi fejezetekben már ismertettem, hogy milyen sok receptor aktivációja vezethet a nekroptózis kialakulásához, azonban ezek a stimulusok sokszor más útvonalak kiindulópontjai is. Míg a kaspáz-8 aktiválódása az extrinsic apoptózishoz köthető, addig ugyanez a fehérje képes az inflammaszoma összeszerelődését előidézve piroptózist is indukálni. Hasonló módon, egér csontvelői makrofágokon ugyanaz az LPS kezelés a IAP-ok és a kaspáz-8 állapotától függően vezethet sejtaktivációhoz (ha a IAP-ok nincsenek gátolva), apoptózishoz és NLRP3 függő piroptózishoz (IAP-ok hiányában), valamint nekroptózishoz is (IAP-ok és kaspáz-8 együttes gátlásakor). Mind a négy esetben érdekes módon nagyon hasonló komplexek szerelődnek össze melyekben közös molekulák vesznek részt. A mitokondriális apoptózis iniciátoraként felfedezett kaspáz-9-ről is igazolták már, hogy rendelkezik más, nem apoptotikus funkciókkal, valamint hogy szerepet kap autofágia során is. Publikált adatok szerint, Fas ligand és kaspázgátló vagy citotoxikus T-sejtek által kiváltott nekrotikus sejthalál mértéke is alacsonyabb kaspáz-9 hiányos sejtekben.

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy van-e bármilyen szerepe a kaspáz-9-nek a nekroptózis jelátvitelében. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy sikerült bizonyítanunk több sejtvonalon is, hogy kaspáz-9 esszenciális szerepet tölt be nekroptózis során. Ezt a tényt több sejthalál és mintázatfelismerő receptor aktiválásával, valamint HSV1 fertőzés során is

igazoltuk. Mivel kísérleteink során a nekroptózis kiváltása kaszpáz-gátolt körülmények között valósult meg, ezért a kaszpáz-9 a nekroptózisban vélhetően, mint adapter molekula vesz részt. Ez összhangban van a nemzetközi szakirodalomban publikált eredményekkel is, hiszen több kutatócsoport is arra az eredményre jutott, hogy a kaszpáz-9 enzimaktivitásának gátlása nincs hatással a nekroptózisra.

A nekroptózis *in vivo* kialakulása arra enged következtetni, hogy működése során a kaszpázok általi mechanizmusok mellett, kaszpázoktól független irányító folyamatok is jelen vannak. A kulcsfehérjék expressziója, az interakciós partnerek, a poszttranszlációs módosítások és a komponensek intracelluláris lokalizációja is egy jól irányított folyamat részeként vannak szabályozva. Kutatómunkánk során igyekeztünk minél alaposabban felderíteni a kaszpáz-9 pronekroptotikus funkciójának pontos molekuláris mechanizmusát. Vizsgálataink szerint bár a kaszpáz-9 hiánya nem befolyásolta a kulcs nekroptotikus molekulák expresszióját, de szükséges volt a nekroszóma összeszerelődéséhez, vagyis a RIPK1 és a RIPK3 összekapcsolódásához. Fontos kiemelni, hogy míg a különféle sejthalálreceptorok aktivációja során kiváltott nekroptózisban a RIPK1 felelős a RIPK3 megkötéséért és aktivációjáért, addig mintázatfelismerő receptorok által irányított nekroptózis során a RIPK1 gátolja a RIPK3 spontán aktivációját. Ezek függvényében úgy gondoltuk, hogy vélhetően a kaszpáz-9 inkább a RIPK3-on keresztül hathat. Ezt a feltételezésünket immunprecipitációs kísérletekkel meg tudtuk erősíteni és azonosítottuk a kaszpáz-9-et, mint a RIPK3 egy eddig nem ismert interakciós partnerét. Publikált adatok szerint a nekroszóma összeépülése szükséges a RIPK1 és RIPK3 fehérjék aktivációjához. Az általunk kapott eredmények egybevágnak a szakirodalmi adatokkal, hiszen kísérleteink során a két kináz foszforilációja is csak a kaszpáz-9-et expresszáló sejtekben volt megfigyelhető. A nekroptózis aktivációját követően az egyik sorsmeghatározó lépés a RIPK3 foszforilációját követő RIPK3 oligomerizáció. Sikeresen overexpresszáltattuk a RIPK1, valamint a RIPK3 fehérjéket, ami eredményeink alapján képes volt helyreállítani a kaszpáz-9 hiányos sejtek nekroptózis érzékenységét.

Az aurora kinázokról (aurora A/ B/ C) ismert, hogy a mitózisban és a meiózisban fontos irányító szerepet játszanak. Túlzott aktivációjuk sok daganatos megbetegedésben kimutatható, mely rámutat, potenciális onkogén szerepükre. Ennél fogva az aurora kinázok ígéretes rákterápiás célpontként szolgálnak. Napjainkig több aurora kináz gátlót sikerült már létrehozni, közülük többeket (AT9283, AZD1152, Danusertib, MLN8054) már klinikai kísérletek során vizsgálnak. Az AURKA fehérjéről ismert, hogy a sejtosztódásban játszott szerepén túl, a RIPK1-nek és a RIPK3-nak is az interakciós partnere és szubsztrátjával, a

GSK3 β -vel együttműködve a nekroptózis egyik negatív szabályozója. Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy módosul-e kaszpáz-9 hiányában az AURKA/ GSK3 β útvonal. Immunprecipitációs eredményeink egyértelműen igazolják, hogy a RIPK3-mal való kapcsolata mellett, az AURKA nekroptózis során kötődik a kaszpáz-9-hez is. A jelátviteli lépéseket tovább vizsgálva az AURKA foszforilációja kaszpáz-9 függőnek bizonyult. Végezetül hasonlóan a RIPK1 és RIPK3 overexpressziójához, az AURKA vagy a GSK3 β gátlása is képes volt helyreállítani a kaszpáz-9 hiányos sejteken a nekroptózist. Az eredményeinket összefoglalva kijelenthető, hogy a kaszpáz-9 a nekroptózis egy újonnan felfedezett regulátora és szerepet játszik a jelátvitel finomhangolásában és az apoptózis-nekroptózis átmenet szabályozásában.

Bizonyos sejthalál típusok képesek a környező sejtek, szövetek gyulladásos válaszára kiváltására. Az ilyen „lítikus” sejthalál folyamatok közös jellemzője, hogy a citoplazmamembrán integritásának megszűnésével rengeteg DAMP szabadul ki a környező szövetbe. A DAMP-ok normál esetben a sejtek belsejében találhatóak és mind szerkezetileg, mind funkcionalitás szempontjából nagyon változatos molekulák. Egészséges körülmények között a sejtek életfolyamataikhoz nélkülözhetetlenek, de bizonyos hatásokra (mint például fizikai trauma, sugárzás, ozmotikus stressz, toxinok, hipoxia, patogén fertőzés) kikerülnek az extracelluláris térbe, ahol elsősorban mintázatfelismerő receptorokon keresztül más sejtek gyulladásos válaszát indukálják.

A sejthalál lehet a következménye, de ugyanakkor az oka is a kialakult gyulladásnak. A legismertebb, DAMP keletkezéssel járó sejthalálforma a nekrozis, melynek során a membrán felszakadása miatt nagyon változatos DAMP-ok szabadulnak fel. Ugyanakkor ismertek olyan DAMP-ok, melyek csak egy-egy bizonyos sejthalál típus (nekroptózis, apoptózis, ferroptózis, piroptózis és netózis) kialakulására jellemzőek, így az egyes sejthalálformák más-más útvonalon vezethetnek gyulladás kialakulásához. Apoptózis például a kromatin kondenzálódása és a DNS fragmentációja következtében főképp sejtmag eredetű fehérjék kiszabadulásához vezet. A neutrofil extracelluláris csapdák (NET) közelében jellemzően antimikrobiális peptideket és nukleáris fehérjéket találni. A DAMP-ok vizsgálata lehetőséget adhat a különféle sejthalálok elkülönítésére is. Apoptotikus sejtekből kijutó DNS fragmentek mérete jellemzően 180 bázispár körül mozog, míg nekrozis során ezek akár 10 000 bp hosszúak is lehetnek. A piroptózis során kikerülő high-mobility group protein 1 (HMGB1) jellemzően hiperacetilált, míg ez nem figyelhető meg sem apoptózis sem nekroptózis során.

A proinflammatorikus jelátviteli útvonalak aktivációja az egyik legkorábbi esemény az immunválasz során. Az akut gyulladás egy fontos védelmi mechanizmus, melyet jellemzően a szövetek között jelenlévő immunsejtek (makrofágok vagy hízósejtek) váltanak ki, a sejtfelszíni vagy intracelluláris receptoraikhoz kötődő PAMP-ok, vagy DAMP-ok hatására. A veszély eliminálását követően nagyon fontos lépés a gyulladásos folyamatok leállítása, hogy helyreálhasson a normál szöveti környezet. Ha ez a lépés valami miatt nem jöhet létre, például a gyulladás kialakulásában szerepet játszó pozitív visszacsatolási mechanizmusok túlműködése miatt, akkor az akut gyulladás krónikussá válik, melynek során az immunválasz folytatódik, az egészséges szöveti sejtek további pusztulását és végül krónikus gyulladással járó megbetegedéseket okozva. Nagyon sok külső és belső testfelszín, mint például a béltraktus (Crohn betegség, colitis ulcerosa) vagy bőrt (ekcéma, pszoriázis) érintő betegség közös jellemzője a krónikus gyulladás. A reumás megbetegedések, mint szisztémás lupusz eritematózus, reumatoid arthritisz, pszoriázisos arthritisz, oszteoarthritisz, spondilitisz ankilopoetika (Bechterew kór) vagy a köszvény patomechanizmusát vizsgálva is gyakran ott találni a kiváltó okok között a krónikus gyulladást. Ezért az ilyen betegségekben a gyulladással járó, lítikus sejthalál típusok átkapcsolása más, tolerogén sejthalál folyamatokká kiemelt terápiás jelentőséggel bírna.

A nekroptózis in vivo szerepét és patológiás állapotokhoz való hozzájárulását több transzgen egérben is sikerült már igazolni. Számos betegségmodellben a nekroptózis kulcsmolekulák leütése drasztikusan mérsékelte a patológiás állapotban létrejövő károsodásokat. Az általunk is használt cerulein indukálta akut pankreatitisz modellben bizonyítottan hatástalannak bizonyultak a különféle kaszpázgátlók, viszont a RIPK3 vagy az MLKL deléciójával, vagyis a nekroptózis megakadályozásával jelentősen mérséklődtek a betegség tünetei. Ezt a modellt átvéve, a kaszpáz-9 in vivo funkciójának megerősítéséhez kutatócsoportunk létrehozott egy egyedi transzgenikus egértörzset. Eredményeink szerint a hasnyálmirigy acinar sejteken a kaszpáz-9 leütése szignifikánsan mérsékelte minden mérési módszer esetén a szöveti destrukciót. Jóval kisebb ödéma alakult ki, kevesebb volt a hasnyálmirigybe infiltrálódott gyulladásos sejtek száma, szignifikánsan csökkent a nekrotikus területek nagysága és alacsonyabb volt a szérumban lévő amiláz szintje is. Összességében a kaszpáz-9 hiányában jelentősen csökkent az akut pankreatitisz súlyossága, mely egyértelműen alátámasztja a kaszpáz-9 in vivo szerepét a nekroptózis során.

A sejthalálútvonalak túlműködése (neurodegeneratív megbetegedések) épp olyan káros hatással jár, mint a nem megfelelő szabályozás miatti alulműködés (bakteriális és vírusos fertőzések, daganatok kialakulása). Egy külön csoportot képviselnek azok a megbetegedések,

ahol az apoptózis-nekroptózis egyensúlya erősen a nekroptózis irányába tolódik el. Emiatt a sejtek eltávolítása nem a tolerogén módon, hanem valamilyen sejt lízisével járó úton valósul meg, ami gyulladásához és erős autoimmunitáshoz vezethet. A terápiás lehetőségek között szerepelhetnek a sejthalál gátlók (necrostatinok), illetve a különböző kemoterápiás szerek. Dacára annak, hogy milyen hatalmas lehetőséggel bírna, a különféle sejthalálútvonalak átkapcsolása jelenleg még nagyon messze áll a klinikai felhasználástól. Ehhez mindenekelőtt arra lenne szükség, hogy felderítsük a sejthalálformák közötti közös molekulákat és megtaláljuk a lehetséges átkapcsolási mechanizmusokat. Bízunk benne, hogy munkánk során sikerült hozzájárulnunk a mitokondriális apoptózis és a nekroptózis közötti párbeszéd megismeréséhez és ez által közelebb kerültünk a krónikus gyulladással járó állapotok hatékonyabb kezeléséhez.

6. Összefoglalás

A sejthalálnak kiemelt szerepe van a degeneratív megbetegedések, autoimmun folyamatok, krónikus gyulladásal járó állapotok, valamint a tumorok kialakulásában és az immunrendszer általi észlelésében. Az elmúlt évtizedekben több, az apoptózistól független sejthalálformát fedeztek fel, köztük a nekroptózist is, mely egy szabályozott, gyulladásal járó sejthalál folyamat. Jelenlegi ismereteink szerint a nekroptózis az apoptózis tartalék útvonalának tekinthető, mely csak abban az esetben aktiválódhat, ha a sejthalálreceptor indukált apoptózis gátolt vagy hiányzik. Az utóbbi években az extrinsic apoptózis iniciátorának, a kaszpáz-8-nak több szubsztrátját (RIPK1, RIPK3 vagy a CYLD) is leírták, mint a nekroptózis kritikus regulátorát, de a legismertebb kaszpáz-8 célpontok, vagyis a downstream kaszpázok funkcióját nekroptózis során szinte alig vizsgálták. Mint az egyik legtöbbet vizsgált iniciátor kaszpáz, a kaszpáz-9 a mitokondriális apoptózis iniciátoraként széles körben ismert. Számos stresszhatásra aktiválódhat, mint például a hipoxia, a sugárzás és a kemoterápiás szerekekkel való kezelés. Aktivációjának defektusai súlyos zavarokhoz vezetnek, mint a degeneratív kórképek, fejlődési rendellenességek és a rákos megbetegedések.

A különféle sejthalálformák átkapcsolásában lévő hatalmas klinikai potenciál ellenére, mellyel elkerülhetők lennének a nem kívánt gyulladásal járó állapotok, a mitokondriális apoptózisban részt vevő fehérjék nekroptotikus funkciójáról jelenleg nagyon kevés adat áll a rendelkezésünkre. Munkánk során elsőként sikerült igazolnunk, hogy a sejthalál és mintázatfelismerő receptorok aktivációja kaszpázgátolt körülmények között nekroptózishoz vezet vad típusú Jurkat és MEF sejteken, de ugyanazok a stimulusokkal szemben a kaszpáz-9 deficiens párjaik érzéketlennek bizonyultak. Ésszerű és logikus feltételezés, hogy a különböző sejthalálformák közötti átmenet a jelátvitelükben szerepet játszó közös molekulákon keresztül valósul meg. Ily módon a kaszpáz-9, mely esszenciális szerepet tölt be apoptózisban és eredményeink szerint nekroptózis során is, ígéretes terápiás célpontként szolgálhat. Megvizsgáltuk a kaszpáz-9 szerepét a cerulein indukált akut pankreatitisz során, mely jelenleg az egyik legismertebb és leggyakrabban használt gyulladásos állatmodell. Eredményeink szerint a kaszpáz-9 hasnyálmirigy acinar sejt specifikus deléciójával jelentősen mérséklődtek a pankreatitisz tünetei. A nekroptózis jelátvitel több szinten, nagyon összetett folyamatok segítségével szabályozott, úgymint a részt vevő fehérjék expressziója, azok poszttranszlációs módosítása, ezek stabilitása és intracelluláris lokalizációja, valamint az interakciós partnereik elérhetősége. Eredményeink szerint kaszpáz-9 hiányában sérül a nekroszóma összeépülése, vagyis RIPK1 és a RIPK3 összekapcsolódása és gátlódnak az ezt követő foszforilációs

lépések is. A RIPK3 dimerizációja a nekroptózis egyik kritikus kulcsmomentuma és publikációk szerint a RIPK3 túlzott mértékű expressziója képes a spontán RIPK3 oligomerek képződését és így a nekroptózist indukálni. Munkánk során bemutattuk, hogy a RIPK1 vagy a RIPK3 overexpressziója helyreállította a kaspáz-9 hiányos sejtek nekroptózis érzékenységét és képes volt a kaspáz-9 általi szabályozás megkerülésére. Ismert, hogy az AURKA-GSK3 β útvonal gátolja a nekroszóma összeszerelődését. Kísérleteinkben az AURKA-nak vagy a szubsztrátjának, a GSK3 β -nek a gátlása helyreállította a nekroptózist a kaspáz-9 hiányos sejtekben. Ez arra utal, hogy a kaspáz-9 és az AURKA által irányított jelátviteli útvonalak egymásra hatva szabályozzák a nekroptózist. Eredményeink szerint tehát sikerült azonosítanunk a kaspáz-9-cet, mint a nekroptózis egy új, eddig nem ismert szabályozóját, mely ígéretes terápiás célpontként szolgálhat a sejthalálfolyamatok immunológiai kimenetelének befolyásolásában.

7. Publikációk listája



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/301/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Molnár Tamás

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Molnár, T.**, Pallagi, P., Tél, B., Király, R., Csoma, E., Jenei, V., Varga, Z., Gogolák, P., Odile Hueber, A., Máté, Z., Erdélyi, F., Szabó, G., Pettkó-Szandtner, A., Bácsi, A., Virág, L., Maléth, J., Koncz, G.: Caspase-9 acts as a regulator of necroptotic cell death.
FEBS J. [Epub ahead of print], 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/febs.15898>
IF: 4.392 (2019)
2. Hancz, D., Szabó, A., **Molnár, T.**, Varga, Z., Hancz, A., Gregus, A., Hueber, A. O., Rajnavölgyi, É., Koncz, G.: Flagellin increases death receptor-mediated cell death in a RIP1-dependent manner.
Immunol. Lett. 193, 42-50, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.11.007>
IF: 2.552

További közlemények

3. Varga, Z., Rácz, E., Türk-Mázló, A., Korodi, M., Szabó, A., **Molnár, T.**, Szöör, Á., Veréb, Z., Bácsi, A., Koncz, G.: Cytotoxic activity of human dendritic cells induces RIPK1-dependent cell death.
Immunobiology. 226 (1), 1-7, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2020.152032>
IF: 2.788 (2019)
4. Varga, Z., **Molnár, T.**, Türk-Mázló, A., Kovács, R., Jenei, V., Kerekes, K., Bácsi, A., Koncz, G.: Differences in the sensitivity of classically and alternatively activated macrophages to TAK1 inhibitor-induced necroptosis.
Cancer Immunol. Immunother. 8, 1-15, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-020-02623-7>
IF: 5.442 (2019)





5. Molnár, T., Türk-Mázló, A., Tslaf, V., Szöllősi, A. G., Emri, G., Koncz, G.: Current translational potential and underlying molecular mechanisms of necroptosis.
Cell Death Dis. 10 (11), 1-21, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-2094-z>
IF: 6.304

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,478

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6,944**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.05.17.



8. Kulcsszavak

Nekroptózis

Apoptózis

Sejthalál

Kaspáz-9

Aurora kináz A

Pankreatitisz

Gyulladás

Köszönetnyilvánítás

Első között szeretnék köszönetet mondani *Dr. Koncz Gábornak*, aki BSc-s, MSc-s és doktorandusz éveim alatt végig mellettem állt, hogy tanácsaival és iránymutatásával segítette és a mai napig segíti a munkámat. Hálás lehetek neki mindazért a tudásért, amit az évek alatt tőle kaptam. E néhány sor adta lehetőség kevés a köszönetem kifejezésére.

Köszönettel tartozom kollaborációs partnerünknek, *Dr. Király Róbertnek* a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetből, akinek köszönhetően megtanulhattam a klónozás és lentivirális transzfekció alapműveleteit, és akihez a mai napig bármikor fordulhatok szakmai segítségért.

Köszönetemet szeretném kifejezni az MTA-KOKI munkatársainak, *Dr. Máté Zoltánnak*, *Dr. Erdélyi Ferencnek* és *Dr. Szabó Gábornak* a kaszpáz-9 „floxolt” egértörzs kialakításáért, valamint *Dr. Pallagi Petrának*, *Dr. Tél Bálintnak* és *Dr. Maléth Józsefnek* a SZTE I. számú Belgyógyászati Klinika munkatársainak az akut pankreatitisz modell megvalósításáért és a kézirat publikálásában nyújtott segítségükért!

Munkám nem jöhetett volna létre közvetlen kollégáim segítségével nélkül, akik mindig gondoskodtak róla, hogy a munka inkább szórakozásnak tűnjön és akiknek most köszönetet mondok: *Dr. Varga Zsófia*, *Dr. Türk-Mázló Anett*, *Szabó Anikó*, *Rácz Evelin*, *Földvári István* és *Burai Sára*. Köszönettel tartozom fantasztikus tanítványaimnak: *Torma Tímeának*, *Kaszanyi Fanninak*, *Jenei Viktóriának* és húgomnak *Molnár Krisztinának*! Külön köszönet jár *Bíró-Debreceni Zsuzsanna* klinikai kutatólaboratóriumi analitikusnak az évek alatt nyújtott segítségért és a sok nevetésért!

Kutatómunkám 10 évig tartó periódusa alatt a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karának Immunológiai Intézetében nap mint nap szerető és gondoskodó bánásmódban részesülhettem, amiért az *Intézet minden munkatársának* köszönettel tartozom!

Sorrendiség állítása nehéz és sok tekintetben nem is lehetséges. Hálámat fejezem ki *szüleimnek* a tanulmányaim során nyújtott támogatásukért, odaadó *feleségemnek* a támogató türelméért az időigényes munkák miatt és csodálatos fiaimnak *Máténak* és *Balázsnak* a sok-sok szeretetért és az élet értelméért!

A kutatás az ÚNKP-20-4, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, GINOP-2.3.2-15-2016-00050 és NKFIH 125224 projektek támogatásával és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap, valamint az Innovációs és Technológiai Minisztérium támogatásával valósult meg.