EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A szabályozott nekrózis jelátvitelének tanulmányozása

Molnár Tamás

Témavezető: Dr. Koncz Gábor



Debreceni Egyetem

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

Tartal	lomjegyzék	1
Gyakı	ran előforduló rövidítések jegyzéke	3
1. B	Bevezetés	7
2. Iı	rodalmi áttekintés	8
2.1	. A sejthalálról szabadon	8
2.2	. A nekroptózis	9
2.3	. A TNF receptor jelátvitele	10
2	2.3.1. Iniciációs lépések	10
2	2.3.2. Nekroszóma és a downstream lépések	13
2.4	. A Toll-like receptorok és szerepük a nekroptózisban	14
2.5	. A nekroptózis szabályozása	17
2.6	. Nekroptózis szerepe a patológiás folyamatokban	21
2.7	. In vivo egérmodellek	23
2.9	. Az apoptózis aktivációjához vezető útvonalak	25
2.1	0. A kaszpáz-9 szerkezete, aktiválódása és szabályozása	30
2.1	1. A kaszpáz-9 expressziója fiziológiás és patológiás állapotokban	34
3. C	Célkitűzés	
4. A	Anyagok és módszerek	
4.1	. Reagensek	
4.2	. Módszerek	
Z	4.2.1. Sejttenyésztés	
Z	4.2.2. Sejthalál mérése	
Z	4.2.3. Effektor kaszpázok aktivációjának mérése	
Z	4.2.4. Életképesség meghatározása CCK8 assay módszerrel	39
Z	4.2.5. SDS-PAGE és Western Blot	39
Z	4.2.6. Fehérjeinterakciók vizsgálata immunprecipitációval	40
Z	4.2.7. Plazmidok és konstruktok	40
Z	4.2.8. Polimeráz láncreakció	41
Z	4.2.9. PCR termék tisztítása és DNS extrakciója agaróz gélből	41
Z	4.2.10. Agaróz gélelektroforézis	42
Z	4.2.11. Restrikciós hasítás	42
Z	4.2.12. Ligáz reakció	42
Z	4.2.13. Kompetens baktérium transzformálása	43
Z	1.2.14. Szekvenálás	43
Z	4.2.15. Gateway rekombináció	44
Z	4.2.16. Vírustermelés és target sejtek fertőzése	44
Z	4.2.17. Kaszpáz-9 kondícionális leütése egér hasnyálmirigy acinar sejtekben	45

	4.2.18. Akut pankreatitisz modell	.47		
	4.2.19. Immunfluoreszcens jelölés			
	4.2.20. Fehérje izolálás hasnyálmirigy szövetmintákból			
	4.2.21. Statisztikai analízis	. 49		
5.	Eredmények	. 50		
5	1. A kaszpáz-9 hiánya gátolja a nekroptózist humán Jurkat sejtekben	. 50		
5	2. A IAP antagonista nélkül kiváltott nekroptózis is kaszpáz-9 függő folyamat	. 52		
5	3.3. Nekroptózis aktiválása kaszpáz-8 gátló segítségével Jurkat sejteken	. 52		
5	.4. A kaszpáz-9 nekroptózisban betöltött szerepének vizsgálata MEF sejteken	. 53		
5	5.5. A kaszpáz-9 nem játszik szerepet a RIPK1 függő apoptózisban	. 55		
5	.6. Az ionomycin és a hidrogén-peroxid indukált nekrózis kaszpáz-9 független	. 56		
5	7. A kaszpáz-9 szerepe a Toll-like receptorok által indukált nekroptózisban	. 56		
5	8.8. A TLR5 aktiváció hatása a nekroptózisra	. 57		
5	9.9. A kaszpáz-9 jelátvitelben betöltött helyének meghatározása	. 59		
	5.9.1. A kaszpáz-9 interakciós partnereinek felderítése immunprecipitációval	. 59		
	5.9.2. A nekroszóma létrejöttének és aktivációjának vizsgálata	. 60		
	5.9.3. RIPK1, RIPK3 indukálható overexpressziója	. 61		
	5.9.3.1. Konstruktok létrehozása és a sejtvonalak kialakítása	. 61		
	5.9.3.2. Az overexpresszió tesztelése a létrehozott sejtvonalakon	. 63		
	5.9.3.3. A RIPK1 és RIPK3 overexpressziója helyreállítja a nekroptózist	. 64		
	5.9.4. A kaszpáz-9 nekroptotikus funkciójának felderítése	. 65		
	5.9.4.1. Az AURKA és a kaszpáz-9 kapcsolódik nekroptózis során	. 65		
	5.9.4.2. AURKA és GSK3ß gátlók helyreállítják a nekroptózist kaszpáz-9 hiányában.	. 66		
	5.9.5. A kaszpáz-9 szerepének megerősítése in vivo	. 68		
	5.9.5.1. A kaszpáz-9 kondícionális leütése egér hasnyálmirigy acinar sejteken	. 68		
	5.9.5.2. Kaszpáz-9 nekroptotikus funkciójának igazolása akut pankreatitisz modellber	ı 69		
	5.9.5.3. Nekroptotikus fehérjék aktivációjának vizsgálata cerulein kezelést követően.	. 71		
6.	Eredmények megbeszélése	. 72		
7.	Összefoglalás	. 78		
8.	Summary	. 80		
9.	Irodalomjegyzék	. 82		
10.	Publikációk listája	104		
11.	Az értekezéshez kapcsolódó konferencia előadások és poszterek	106		
12.	Kulcsszavak	107		
13.	Keywords	107		
14.	Köszönetnyilvánítás	108		

Gyakran előforduló rövidítések jegyzéke

4HBD:	Four-helix bundle domain
AIF:	Apoptosis-inducing factor
ALS:	Amyotrophic lateral sclerosis
AIM2:	Absent in melanoma 2
AP-1:	Activator protein 1
Apaf-1:	Apoptotic protease activating factor 1
AURKA:	Aurora kinase A
Bad:	Bcl-2-associated death promoter
Bak:	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax:	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2:	B-cell lymphoma 2
Bcl-2A1:	Bcl-2-related protein A1
Bcl-2L10:	Bcl-2-like protein 10
Bcl-w:	Bcl-2-like protein 2
Bcl-xL:	B-cell lymphoma-extra large
Bcl-G:	Apoptosis facilitator Bcl-2-like protein 14
BH:	Bcl-2 homology domain
Bid:	BH3 interacting-domain death agonist
Bim:	Bcl-2-like protein 11
Bik:	Bcl-2-interacting killer
BIR3:	Baculovirus inhibitory repeat domain 3
Blk:	B Lymphoid Tyrosine Kinase
Bmf:	Bcl-2-modifying factor
Bok:	Bcl-2 related ovarian killer
CARD:	Caspase recruitment domain
CDK1:	Cyclin-dependent kinase 1
cGAS:	Cyclic GMP-AMP Synthase
cIAP1:	Cellular inhibitor of apoptosis protein-1
cIAP2:	Cellular inhibitor of apoptosis protein-2
CK2:	Casein kinase 2
CHX:	Cycloheximide
DCC:	Deleted in colorectal cancer
CYLD:	Cylindromatosis
DAMP:	Damage-associated molecular pattern

DD:	Death domain
DEFCAP:	Death effector filament-forming Ced4-like apoptosis protein
DISC:	Death-inducing signaling complex
DYRK1A:	Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A
ERK1:	Extracellular signal-regulated kinase 1
ERK2:	Extracellular signal-regulated kinase 2
EPEC:	Enteropathogenic E. coli
FADD:	Fas-associated death domain protein
FasR:	Fas receptor
FasL:	Fas ligand
Flip _{L:}	FLICE-like inhibitory protein, long isoform
GSK3ß:	Glycogen synthase kinase 3 beta
HAX-1:	HS-1-associated protein-1
HBXIP:	Hepatitis B X-interacting protein
HECTD3:	HECT domain E3 ubiquitin protein ligase 3
HIV-1:	Human immunodeficiency virus type 1
HMGB1:	High-mobility group protein 1
Hrk:	Harakiri
HSP:	Heat shock protein
HSV-1:	Herpes simplex virus 1
HSV-2:	Herpes simplex virus 2
HtrA2:	High temperature requirement protein A2
IFN _γ :	Interferon gamma
IR:	Ischemia-reperfusion
IRF:	Interferon regulatory factor
JAK1:	Janus kinase 1
JNK:	c-Jun N-terminal kinase
IKK:	IkB kinase
ΙΚΚα:	Inhibitor of nuclear factor kappa-b kinase subunit alpha
ΙΚΚβ:	Inhibitor of nuclear factor kappa-b kinase subunit beta
LPS:	Lipopolysaccharide
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
MCL1:	Bcl-2-like protein 3
MCMV:	Mouse Cytomegalovirus
MLKL:	Mixed lineage kinase domain-like protein

MK2:	Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase 2
MYD88:	Myeloid differentiation primary response 88
NAC:	NACHT- and CARD-containing protein
Nec1:	Necrostatin-1
NEMO:	NF-κB essential modulator
NF-κB:	Nuclear factor-ĸb
NSA:	Necrosulfonamide
Optn:	Optineurin
PAMP:	Pathogen associated molecular pattern
PELI1:	Pellino E3 Ubiquitin Protein Ligase 1
PKA:	Protein kinase A
ΡΚϹζ:	Protein kinase C zeta
PMAIP1:	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
PPM1b:	Protein phosphatase 1 b
PUMA:	p53 upregulated modulator of apoptosis
RHIM:	RIP homotypic interaction motif
RIG1:	Retinoic-acid inducible gene I
RIPK1:	Receptor-interacting protein kinase 1
RIPK3:	Receptor-interacting protein kinase 3
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
SM:	Sclerosis multiplex
SMAC:	Second mitochondria derived activator of caspase
SODD:	Silencer of death domain
SP1:	Specificity protein 1
STAT1:	Signal transducer and activator of transcription 1
STING:	Stimulator of interferon genes
STUB1:	STIP1 homology and U-Box containing protein 1
TAB:	TAK1-binding protein
TAK1:	Transforming growth factor beta activated kinase-1
TetO:	Tetracycline operator
TetR:	Tetracycline repressor
TIR:	Toll/interleukin-1 receptor homologous region
TIRAP:	TIR domain containing adaptor protein
TNF:	Tumor necrosis factor
TNFR:	Tumor necrosis factor receptor

TLR2:	Toll-like receptor 2
TLR3:	Toll-like receptor 3
TLR4:	Toll-like receptor 4
TLR5:	Toll-like receptor 5
TLR9:	Toll-like receptor 9
TRADD:	TNF receptor associated death domain
TRAF2:	TNF receptor associated factor 2
TRAF5:	TNF receptor associated factor 5
Trail:	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TrailR:	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor
TRAM:	TRIF-related adaptor molecule
TRIF:	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
TUCAN:	Tumor-up-regulated CARD-containing antagonist of caspase nine
TWEAK:	TNF-related weak inducer of apoptosis
UNC5B:	Unc-5 netrin receptor B
UDP-GlcNAc:	Uridine diphosphate N-acetylglucosamine
UHRF1:	Ubiquitin-like PHD and RING finger domain-containing protein 1
vICA:	Viral inhibitor of caspase-8 activation
vIRA:	Viral inhibitor of RIP activation
VV:	Vaccinia virus
WNV:	West Nile virus
XIAP:	X-linked inhibitor of apoptosis protein
ZBP1:	Z-DNA-binding protein 1

1. Bevezetés

Régóta ismert, hogy a sejtproliferáció és a sejthalál szabályozása, egyensúlyban tartása minden soksejtű élőlény számára létfontosságú. A nem apoptotikus alternatív sejthalál útvonalak megismerése egyre nagyobb hangsúlyt kap olyan betegségek kezelésében, mint a neurodegeneratív kórképek, autoimmun folyamatok, túlzott gyulladással járó állapotok vagy a különféle daganatos megbetegedések. A programozott nekrózis vagy nekroptózis egy szigorú program szerint lejátszódó, immunogén sejthalálforma. Az eddigi nemzetközi eredmények alapján viszonylag jól ismert az extrinsic apoptózis és a nekroptózis kapcsolata, azonban a mitokondriális apoptózis és a nekroptózis kapcsolatáról jelenleg nagyon kevés adat áll a rendelkezésünkre. Bár a kaszpáz-8 több szubsztrátját írták már le, mint a nekroptózis kritikus regulátorát, azonban a legismertebb kaszpáz-8 célpontok, a downstream kaszpázok funkcióját nekroptózis során szinte alig vizsgálták.

Munkánk során a mitokondriális apoptózis iniciátor kaszpázának, a kaszpáz-9-nek a szerepét vizsgáltuk a nekroptózis jelátvitelében. Kísérleteink során humán és egér eredetű kaszpáz-9 deficiens sejtvonalakat használtunk fel, melyekben a nemzetközi szakirodalomban széleskörűen használt stimulusokat alkalmazva indukáltunk nekroptózist több sejthalál- és mintázatfelismerő receptor aktiválásával. A kaszpáz-9 jelátvitelben betöltött helyének és szerepének vizsgálata során immunprecipitáció segítségével sikeresen azonosítottuk a kaszpáz-9 interakciós partnereit, valamint ezt követően meghatároztuk, hogy a jelátvitel mely lépései bizonyultak kaszpáz-9 függőnek. A nekroptózis kulcsmolekuláinak overexpressziójával sikerült megerősítenünk a kaszpáz-9 jelátvitelben betöltött pozícióját. Hogy eredményeinket in vivo is igazolni tudjuk létrehoztunk egy egyedi, hasnyálmirigy acinar sejt specifikus kaszpáz-9 hiányos transzgenikus egértörzset, melyekben összehasonlítottuk a cerulein indukált pankreatitisz súlyosságát a vad típusú egerekhez képest.

Ésszerű és logikus feltételezés, hogy a különféle sejthalálformák közötti átmenet a közöttük lévő közös molekuláikon keresztül valósul meg, így a kaszpáz-9 – mely esszenciális szerepet tölt be a mitokondriális apoptózisban és eredményeink szerint a nekroptózisban is – ígéretes célpontként szolgálhat minden olyan kórkép kezelésében, ahol az apoptózis-nekroptózis átmenet szabályozásának zavara figyelhető meg.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A sejthalálról szabadon

A sejthalált közvetítő jelpályák a kezdeti iniciációs lépéseket követően irreverzibilis folyamatokat eredményeznek. Ez lehet egy erőteljes kaszpáz 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.^[1]

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.^[2]

Azok a sejtek, melyeket extrém fizikai (nyomás, hőmérséklet vagy ozmotikus stressz), kémiai (extrém pH) vagy mechanikai hatások érnek, nem szabályozott módon pusztulnak el.^[3,4] Sejtszerkezetük menthetetlenül károsodik, emiatt maga a sejthalál nem elkerülhető, a sejt teljesen passzív elszenvedője 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.^[5] 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.^[6-8] Másrészről szabályozott sejthalál kialakulhat a belső vagy külső mikrokörnyezetből eredő stimulusok által is, melyek specifikus receptorok aktivációjával jelátviteli folyamatokat indítanak el.^[4,5]

Immunológiai kimenetelt tekintve a sejthalál lehet pro- vagy antiinflammatorikus, illetve tolerogén vagy immunogén.^[9,10] 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,

-8-

úgy a nekroptotikus sejtekből kiszabaduló veszélyszignálok képesek aktiválni az adaptív immunrendszert és indukálhatják, segíthetik a dendritikus sejtek keresztprezentációját.^[11,12]

Az utóbbi 20 év sejthalálkutatásainak eredményeképpen számos apoptózistól független szabályozott sejthalálformát fedeztek fel és különítettek el morfológiai sajátságaik és molekuláris mintázatuk szerint.^[5,13]

2.2. A nekroptózis

A programozott nekrózis vagy nekroptózis egyike az utóbbi években felfedezett szabályozott sejthalálformáknak. Morfológiáját tekintve leginkább a nekrózisra hasonlít, hiszen sejtduzzadás, a sejtmembrán felszakadása, damage-associated molecular pattern (DAMP) kiszabadulás és gyulladás jellemzi. Mechanizmusában pedig klasszikus szabályozott sejthalál, 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.^[14] A jelenlegi szakirodalomban számos nekroptózist kiváltani képes tényező ismert. Ilvenek például a seithalál receptorok ligandiai: 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, adhéziós receptorok aktivációja, illetve sok tumor terápiában használt szer (például mitoxantrone, ciszplatin, dasatinib, shikonin, GX15-070).^[15,16] 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) receptorokokról is ismert, hogy képesek bekapcsolni a nekroptotikus programot.^[17]

A különféle receptorok nekroptotikus jelátvitele, bár egymástól sokszor eltérő lépéseken és molekulákon keresztül valósul meg, de végső soron egy közös pontba jut el, nevezetesen a receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) és RIPK3 összekapcsolódásához.^[18,19] A két kináz ezt követően konformációváltozáson és foszforiláción esik át, melynek eredményeképpen aktiválódnak. Ez előfeltételként szolgál egy másik fehérje, az MLKL komplexbe történő épüléséhez, mely ezt követően szintén foszforilálódik, aktiválódik és oligomereket képez.^[20] Az így létrejövő MLKL oligomerek a következő lépésben leválnak a komplexről és a membránokba ágyazódva pórusokat hoznak létre.^[21] Ennek következtében folyadék és ionok szabad áramlása figyelhető meg a sejt és környezete között. Az így létrejövő ozmotikus stressz vezet a nekroptózis jellemző morfológiai változásaihoz.^[22]

A nekroptózis előfeltétele a kaszpáz-8 hiánya, enzimaktivitásának gátlása, vagy a prokaszpáz-8 aktivációjában részt vevő Fas-associated protein with death domain (FADD) defektusa.^[19,23] A kaszpáz-8 ugyanis az apoptózisban betöltött funkcióján túl, a nekroptózis negatív szabályozójaként is ismert. Aktivációját követően elhasítja a nekroptózis kulcsmolekuláit, a RIPK1 és RIPK3 kinázokat, ezáltal biztosítva az apoptózis dominanciáját a nekroptózis felett.^[24-26] Kaszpázaktivitás hiányában a RIPK1-RIPK3 összekapcsolódik, és megalkotják a nekroszóma nevű fehérjekomplexet, mely a nekroptózis jelátvitel lentebbi lépéseit koordinálja.^[15] A kaszpázok enzimaktivitása sokféle módon gátolható, például genetikusan (mutációk vagy RNS interferencia), farmakológiailag (Z-VAD, Z-DEVD), bizonyos patogének (HSV-1, MCMV, Shigella felxneri) által, illetve gyakran megfigyelhető tumorokban is.^[27-29]

Munkánk során főképp a sejthalál receptorok ligandjai (FasL, TNF, Trail) által kiváltott nekroptózist vizsgáltuk. Ezen receptorok mind a tumor nekrózis szupercsaládba tartoznak, és a sejthalál kiváltásán kívül szerepük van a sejtproliferációban és a differenciációs folyamatokban.^[30] Szerkezetüket tekintve egy extracelluláris ligandkötő, egy transzmembrán és egy intracellulárisan elhelyezkedő haláldoménből (death domain, DD) állnak.^[31] A receptor aktivációját a specifikus ligand bekötődéseként létrejövő receptor oligomerizáció váltja ki, ami elindítja a jelátviteli kaszkádot. 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.

2.3. A TNF receptor jelátvitele

2.3.1. 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-κB útvonalat, a RIPK1 függő és független extrinsic apoptózist – mely antiinflammatorikus és tolerogén módon vezet a sejt eliminálásához – illetve a gyulladáskeltő és immunogén nekroptózist is **(1. ábra)**.^[15]



1. ábra | A TNF receptorból induló útvonalak iránya határozza meg a sejt sorsát.^[15]A TNF bekötődése a receptor oligomerizációját, így aktivációját váltja ki, ami intracellulárisan egy többlépcsős folyamatban a RIPK1 kapcsolódásához és ubiquitinációjához vezet. A poliubiquitinálódott RIPK1 megköti az NF-kB útvonal aktivációjáért felelős NEMO-t, ami végül túlélési és más sejtaktivációt követő gének átíródásához vezet (komplex I). A sejtaktivációt követően a jelátviteli platform leválik a receptorról, a komplex I komponenseire esik szét, melyek ezt követően más komplexek, mint például komplex IIa (RIPK1, TRADD, FADD, FLIP_L) létrehozásában vehetnek részt. A kompex IIa kialakulása a prokaszpáz-8 fehérjék bekötődéséhez, aktivációjához, ezáltal az apoptózishoz vezet, valamint ezt követően nekroptotikus fehérjék elhasításához is. A deubiquitinázokról ismert, hogy a poliubiquitin lánc lehasításával destabilizálhatják a komplexet I-et, mely szintén a komplex IIa összeépüléséhez vezethet. A RIPK1 ubiquitinációs defektusai (IAP-ok deficienciája vagy gátlása) a RIPK1, RIPK3, FADD, FLIP_L és prokaszpáz-8 vagyis a komplex IIb kialakulását indukálja, mely a prokaszpáz-8 aktivációjáh keresztül szintén apoptózis létrejötthez és a nekroptózis gátlásához vezet. Ha a prokaszpáz-8 aktivációja nem valósulhat meg, akkor a RIPK1 a RIPK3/MLKL-dependent (necrosome) feliratként szerepel) létrejöttéhez és nekroptózis kialakulásához járul hozzá.

A TNF bekötődésének hatására a receptor trimerizálódik és konformáció-változást szenved, aminek következtében a haláldoménjéről (DD) leválik annak gátló fehérjéje, a silencer of death domain (SODD).^[32] A gátlás alól felszabadult receptorhoz kötődik a TNF receptor associated death domain (TRADD), ami magához toborozza a RIPK1, a TNF receptor associated factor 2 (TRAF2) és TRAF5 fehérjéket.^[33] A TRAF2 a cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP1) és cIAP2 E3 ubiquitin ligázokat is a komplexhez kapcsolja.^[15] A cIAP1 poliubiquitinálja (K63-as ubiquitin láncot alkotva) a RIPK1-et annak 377-es lizinjén keresztül, ami így már scaffoldként szolgál 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 (IKKα), IKKβ és az NF-kappa-B essential modulator (NEMO).^[34] 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 signalregulated 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-κB útvonalat is bekapcsolják.^[35] Ez az úgynevezett I-es típusú komplex, mely sejtaktivációt, gyulladási citokinek szintézisét és túlélési szignálokat közvetít.^[15]

Az NF-kB kaszkád aktivációját követően idővel a TNF receptorból érkező jel lecsendesedik, az intracelluláris jelátvivő komplex internalizálódik és komponensekre esik szét.^[36] Ez lehetőséget teremt egy más típusú kompex, 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 prokaszpáz-8-cal képez egységet.^[37] Ez a komplex a prokaszpáz-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, biztosítva, hogy két sejthalál program ne futhasson párhuzamosan.^[26] Ismert továbbá, hogy nemcsak az aktív kaszpáz-8 látja el ezt a feladatot, hanem már a komplex IIa összeszerelődésekor a Flipi, és a prokaszpáz-8 is heterodimert képezve, hasonló módon képes hasítani a RIPK1-et és a RIPK3-at.^[38,39] A kompex IIa mediálta apoptózist az esetek nagy részében az aktiválódott NF-κB útvonal a FLIPL expresszióján és a RIPK1 K63-as ubiquitinációján keresztül gátolja.^[36,40] Ilv módon a seitek normál esetben védettek a TNF indukált apoptózissal szemben, mely csak akkor jöhet létre, ha a FLIP_L expressziója gátolt, például fehérjeszintézis gátló – cycloheximide (CHX) – vagy IKK inhibitorok adásakor, valamint ha a RIPK1 ubiquitinációja nem valósulhat meg. Ez utóbbi elérhető a TRAF2 leütésével, de több ubiquitinázról (CYLD, A20) is leírták, hogy bizonvos NF-kB komponensek deubiquitinációjával képesek megakadályozni az NF-kB útvonal aktivációját.^[41]

A RIPK1 deubiquitinációja megfigyelhető akkor is, mikor a mitokondriális second mitochondria derived activator of caspase (SMAC) összekapcsolódik a cIAP1 és cIAP2 fehérjékkel és aktiválja az E3 ubiquitin ligáz aktivitásukat, ami e fehérjék autoubiquitinációját és így proteolitikus degradációját idézi elő.^[42,43] 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 prokaszpáz-8 fehérjéket, aminek eredményeként RIPK1 függő apoptózis jön létre. Az ekkor összeszerelődő komplex IIb-re gyakran ripoptoszómaként hivatkoznak.^[33] Meg kell említeni, hogy a RIPK1 IAP-ok általi ubiquitinációjának nem csak az NF-κB útvonal aktiválása a feladata, hanem hogy gátolja a prokaszpáz-8 és a FADD RIPK1-hez való kötődését is, ezáltal az apoptózis aktivációját.^[44] Így tehát a RIPK1 ubiquitinációja a ripoptoszóma létrejöttének és

aktivációjának is fontos szabályozási eleme, amiben fontos szerepük van a különféle deubiquitinázoknak (A20, CYLD).^[45]

Ezeken túlmenően nekroptózis is kialakulhat, de pillanatnyi tudásunk szerint csak abban az esetben, ha a RIPK1 deubiquitinálva, a kaszpáz-8 pedig gátolva van. Ekkor jöhet csak létre a nekroptózis jelátviteléért felelős nekroszóma (komplex IIc).^[15]

2.3.2. 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.^[46] Nekroptotikus stimulusokat követően több RIPK1 és RIPK3 fehérje kapcsolódik össze oligomereket képezve ezen doménjükön keresztül és egy amyloid szerű mikrofilamentózus komplexet hoznak létre, mely a nekroszóma strukturális gerincét alkotja.^[47] Bár széles körben elfogadott a RIPK1 és RIPK3 fehérjék oligmerizációja és az azt követő multimer filamentózus hálózat kialakulása, az egyelőre nem teljesen tisztázott, hogy ezen hálózat kialakításában milyen arányban vesz részt a két kináz. 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).^[48-50] Bár mindkét fehérje rendelkezik egy N-terminális kináz doménnel, jelenlegi tudásunk szerint a RIPK1 csak önmagát képes foszforilálni, míg a RIPK3 bár néhány esetben leírt, hogy képes a RIPK1 foszforilációjára, nekroptózis szempontjából a saját maga, valamint az MLKL foszforilációja az esszenciális.^[51,52] Ezek ellenére katalitikusan inaktív RIPK1-et expresszáló sejtekben, vagy RIPK1 gátlókkal (necrostatinokkal) történő előkezelést követően nem váltható ki sejthalálreceptor indukálta nekroptózis.^[53,54] A katalitikus aktivitáson túl, a RIPK3 kináz doménje interakciós részként is funkcionál a RIPK3-MLKL interakció során.^[55] Az MLKL egy pszeudokináz, mely egy N terminálison elhelyezkedő oligomerizációban és plazmamembránokkal való asszociációban kulcsszerepet játszó fourhelix bundle doménből (4HBD), egy C terminális pszeudokináz doménből, valamint a kettőt összekötő kapocsrégióból áll.^[56] A pszeudokináz domén, ahogy a neve is sugallja, bár topológiailag hasonlít egy klasszikus fehérje kináz doménre, de a katalitikus aktivitáshoz szükséges kulcsaminosavak hiánya miatt nem képes kinázként funkcionálni. 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.^[57] 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 helvezkedik 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.^[56] Fontos lépés még a foszforilációt követően az MLKL-ek oligomerizációja, melynek során ezen fehérjék egér sejtekben jellemzően trimerekbe, míg humán sejtekben tetramerekbe állnak össze, de megfigyeltek már magasabb szerveződési szinteket is (hexamerek, oktamerek és polimerek).^[21,58,59] Az aktiváción és oligomerizáción átesett MLKL-ek ezt követően leválnak a nekroszómáról és a membránokhoz transzlokálódnak, ahol pórust formálnak.^[22,60] Az így létrejövő víz és ion beáramlás hatására összeomlik a sejt ozmotikus homeosztázisa, ami a sejt duzzadásához és a nekrózisra jellemző morfológiai változásokhoz vezet.^[21,22,61]

2.4. A Toll-like receptorok és szerepük a nekroptózisban

A sejteket érő stresszhatások, károsodások és fertőzések felismerésében nélkülözhetetlen szerepük van a mintázatfelismerő receptoroknak. Ezen fehérjék képesek a patogén mikroorganizmusokra jellemző evolúciósan konzervált patogén asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) és a saját sejtekből sérülés vagy más események hatására kiszabaduló DAMP-ok felismerésére is. Az emlősök sejtjei által expresszált mintázatfelismerő receptorok közé tartoznak a TLR-ek, RIG-1 receptorok, Nod-like receptorok, AIM2-like receptorok, C-típusú lektin receptorok, valamint számos intracelluláris DNS szenzor is (például cGAS-STING útvonal vagy ZBP1/ DAI). ^[62-64]

A Toll-like receptorcsalád jelenlegi tudásunk szerint emberi sejtekben 10 tagból áll (TLR1-TLR10), míg egerekben 12 féle receptor expresszálódhat (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13).^[65] Elhelyezkedésük szerint megkülönböztetünk sejtfelszíni receptorokat (1, 2, 4, 5, 6, és 10), melyek jellemzően a patogének sejtfalát vagy membránját alkotó lipideket, lipoproteineket vagy fehérjéket ismerik fel, valamint megtalálhatóak intracelluláris vezikulumokban is (3, 7, 8, 9, 11, 12, 13), melyek ligandjai jellemzően virális vagy bakteriális egy- illetve kétszálú nukleinsavak, de képesek patológiás állapotokban (például autoimmunitásban) megjelenő saját nukleinsavak felismerésére is.^[66] Strukturálisan tartalmaznak egy patkó alakú, leucingazdag ismétléseket tartalmazó ligandkötésért felelős ektodomént, egy transzmembrán domént és egy jelátvitelért felelős Toll és Il-1 receptor (TIR) domént.^[67] PAMP vagy DAMP felismerést követően TIR domént tartalmazó adaper fehérjéket toboroznak, mint például myeloid differentiation primary response 88 (MYD88), TIR-domaincontaining adapter-inducing interferon- β (TRIF), TRIF-related adaptor molecule (TRAM) vagy TIR Domain Containing Adaptor Protein (TIRAP, más néven MAL) melyek aktiválva az

Nf-Kb, IRF és MAP kináz útvonalakat végül citokinek, kemokinek és I-es típusú interferonok szintéziséhez és szekréciójához vezetnek.^[68] A különféle TLR-ek más-más TIR doménnel rendelkező adaptereket használnak. A TLR3 kivételével, mely a TRIF-et használja, minden más tag az MYD88-on keresztül közvetít a jelátvitel során. A TLR4 pedig az egyetlen, ami képes mindkét útvonal bekapcsolására, amihez nélkülözhetetlen a két hídként szolgáló adapter, a TIRAP és a TRAM.

A sejthalálreceptor indukált nekroptózis során a RIPK1 és RIPK3 kinázok a RHIM interakciós doménjükön keresztül kapcsolódnak és hozzák létre a nekroszómát. Azonban rajtuk kívül még más fehérjék is rendelkeznek RHIM doménnel, mint például a TLR3 és TLR4 jelátvitelében közreműködő TRIF, vagy pedig ZBP1/DAI intracelluláris DNS szenzor, így ezek a fehérjék képesek iniciálni egy úgynevezett nem klasszikus nekroszóma összeépülését.^[69-71] A duplaszálú RNS aktiválta TLR3 vagy LPS aktiválta TLR4 által megkötött TRIF képes kapcsolódni RHIM doménjén keresztül a RIPK1-gyel és a RIPK3-mal. Kaszpáz-8 aktivitás hiányában ez a kapcsolat a két kináz aktivációjához és a nekroszóma összeépüléséhez vezet.^[39,72] A kaszpáz-8 azonban képes a RIPK1, RIPK3, CYLD mellett a TRIF hasítására is. Érdekes tény, hogy bizonyos sejtekben (fibroblasztok, endotél sejtek) TLR3 aktivációjakor kialakuló nekroptózis során nincs szükség a RIPK1 enzimaktivitására és aktivációjára, ellenben a RIPK3 aktivációja és oligomerizációja elengedhetetlen.^[71] Mivel a TRIF a RIPK1-el szemben nem rendelkezik kináz aktivitással, így a RIPK3-TRIF interakció ebben az esetben valamilyen más módon vezet a RIPK3 aktivációjához, mint a RIPK1-RIPK3 komplex.

A vírusok replikációja és terjedése nagyban függ a megfertőzött sejt és a vírus közötti interakcióktól. Az eukarióta sejtekben számos virális replikációt gátló mechanizmus alakult ki az evolúció során. Egy ilyen kontroll mechanizmus, hogy a megfertőzött sejtben aktiválódnak a sejthalál útvonalak, ellehetetlenítve ezáltal a vírusok szaporodását. Elkerülő mechanizmusként azonban a vírusok úgy adaptálódtak, hogy képesek kikapcsolni ezeket az útvonalakat. Rágcsáló cytomegalovírus (MCMV) fertőzés során például a viral inhibitor of caspase-8 activation (vICA) virális fehérje képes megakadályozni a prokaszpáz-8 (így pedig az apoptózis) aktivációját, míg a viral inhibitor of RIP activation (vIRA) mely egy RHIM domént tartalmazó fehérje a RIPK3 és a ZBP1/DAI interakciójának (valamint sejthalálreceptor aktiváció indukálta RIPK1-RIPK3 kapcsolat) gátlásával a nekroptózist kapcsolja ki.^[73]



2. ábra | Egyes patogén mikroorganizmusok aktiválják, mások gátolják a nekroptózist.^[74] Az endoszómális TLR3 (duplaszálú RNS) vagy TLR4 (LPS) aktivációját követően a TRIF adapter fehérjék receptorokhoz kapcsolódása lehetőséget teremt a RIPK1 és RIPK3 bekötődésének, ami kaszpáz-8 aktivitás hiányában nekroptózishoz vezethet. A TRIF egy más útvonalon az NF-kB és az IRF3 transzkripciós faktorokat is képes indukálni (nem szerepel az ábrán). MCMV fertőzés során termelődő vICA virális fehérje felel a kaszpáz-8, míg a vIRA a RIPK3 gátlásáért. A HSV-1 eredetű ICP6 fehérje megakadályozza a prokaszpáz-8 és RIPK3 aktivációját.

Más vírusok is képesek a nekroptózis gátlására, mint például a humán herpes simplex vírus 1 (HSV1) és HSV2, melvek RHIM doménhez hasonló részt kódoló fehérjéket expresszáltatnak (HSV1-ICP6, míg HSV2-ICP10), melyek emberi sejteken hozzákötődnek a RIPK1 és RIPK3 kinázokhoz megakadályozva ezzel az aktivációjukat.^[75] Egerekben és egér eredetű sejtvonalakban azonban ennek ellentétét igazolták, vagyis a HSV1 által kódolt ICP6 a RIPK1-hez és RIPK3-hoz kapcsolódva azok oligomerizációját idézi elő, ami a nekroptózis aktivációjához és a sejt halálához vezet.^[76,77] Ez a hatás ICP6 mutáns vírusok esetén nem figyelhető meg, valamint a RIPK1 leütése részleges, míg a RIPK3 és az MLKL hiánya teljes védelmet biztosított a HSV1 indukált nekroptózissal szemben in vitro és in vivo kísérletek során is.^[78] Ezek a kutatások azt igazolják, hogy míg egerekben a HSV1-gyel szemben a gazdaszervezet a sejt nekroptózisával harcol a fertőzés leküzdése érdekében, addig emberi sejtek esetén a vírus úgy adaptálódott, hogy elkerülje ezt a nekroptózis mediálta replikáció gátlást. A vírusok ezeken túl arra is képesek, hogy megakadályozzák a DAMP-ok kiszabadulását, illetve a DAMP-ok és a PAMP-ok kötődését a mintázatfelismerő receptorokhoz. Például a vaccinia vírus A52R fehérjéje képes blokkolni a TLR2, TLR4 és TLR9 jelátvitelét, míg a nyugat-nílusi vírus NS1 fehérjéjéről kimutatták, hogy a TLR3 aktivációját gátolja.^[79,80]

A vírusokhoz hasonlóan az intracelluláris baktériumok szaporodásának sikere is nagyban függ a nekroptózis gátlásától. Az enteropatogén Escherichia coli (EPEC) által termelt NleB1 glikoziltranszferáz a FADD és RIPK1 haláldomének arginin oldalláncainak módosításával inaktiválja ezen fehérjéket, ezáltal pedig gátolja mind az apoptózis mind pedig a nekroptózis kialakulását.^[81] Az NleB1 fontosságát igazolja, hogy NleB1 deficiens EPEC törzs képtelen volt kolonizálni a vékonybél epitél sejtjeit.^[82] Ez rávilágít arra is, hogy milyen fontos a patogén baktériumok indukálta nekroptózis a fertőzések megakadályozása szempontjából. Ismert, hogy a TNF szekréciója kiemelten fontos a makrofágok aktivációjához és a mycobacterium tuberculosis fertőzés leküzdéséhez.^[83] De súlyos fertőzés esetén ugyanakkor a magas TNF koncentráció hatására aktiválódik a makrofágokban a RIPK1-RIPK3 útvonal, ami a súlyosan fertőzött makrofágok nekroptózisához, így a mikobaktériumok kiszabadulásához vezet.^[84]

Kaszpáz-8 vagy FADD hiányában az I-es és II-es típusú interferonokról is leírták, hogy képesek indukálni a RIPK1-RIPK3 összekapcsolódását, valamint számos sejtben bizonyos citokinek autokrin termelése egy további szabályozási lehetőséget biztosít.^[85] Makrofágokban például TLR3, TLR4 vagy TNF receptor aktiváció hatására kialakuló nekroptózisban leírták az I-es típusú interferon receptorok szerepét, továbbá TLR2, TLR5, TLR9 ligandok adása, vagy etopozid kezelés autokrin TNF termeléshez vezetett, mely IAP antagonisták vagy kaszpáz-8 hiányában érzékenyítette a sejteket a nekroptózissal szemben.^[86,87] Ezek alapján jól látható, hogy a nekroptózis aktivációja és annak szabályozása kiemelten fontos nem csak a sejthalálreceptorok aktivációjakor, de a mintázatfelismerő receptorok jelátvitelében is.

2.5. A nekroptózis szabályozása

A különféle szabályozott sejthalálfolyamatok megjelenése szükségszerű velejárója volt a többsejtű élőlények evolúciójának, hiszen a funkciót vesztett, autoreaktív vagy tumoros sejtek eltávolítása, az intracelluláris patogénekkel szembeni védekezés, tehát tulajdonképpen a szervezet homeosztázisának fenntartása mind elképzelhetetlen lenne e programok jelenléte nélkül. Amennyire szükségesek a sejthalálprogramok a szervezet fennmaradásának érdekében, annyira nélkülözhetetlen ezek specifikus gátlása is, amikor épp nincs rájuk szükség.

Több mint 70 humán molekuláról ismert, hogy szerepet játszik a nekroptózis szabályozásában a kulcsmolekulák expressziójának kontrollálásától kezdve, azok poszttranszlációs módosításán át, egészen a molekulák közötti interakciók befolyásolásáig.^[16]

Az expressziós szabályozás megvalósulhat transzkripciós szinten, például a specificity protein 1 (SP1) transzkripciós faktor elősegíti a RIPK3 expresszióját.^[88] Az IFN-γ indukált nekroptózis során pedig kimutatták, hogy megemelkedik a RIPK3 és az MLKL expressziója,

melyhez elengedhetetlenek a JAK1, STAT1 és IRF fehérjék.^[85,87,89] A tumorképződés során ismert, hogy az apoptózis mellett más sejthalálútvonalak is gátlódnak, mely egy fontos állomás a rákos sejt szabályozó mechanizmusok alóli kiszabadulásának. Többféle daganatban kimutatták, hogy a RIPK3 promótere hipermetilálódik az ubiquitin-like PHD and RING finger domain-containing protein 1 (UHRF1) fehérje által, aminek eredményeképp eltűnik a sejtből a RIPK3, ezáltal nem alakulhat ki nekroptózis.^[88,90-92]

A molekulák transzkripciós szabályozásán túl fontos szabályozási szerepet kap ezen fehérjék stabilitásának a biztosítása is. A hősokkfehérjék (heat shock protein-HSP) apoptózisban betöltött gátló szerepe már régóta ismert, de az utóbbi pár évben kimutatták, hogy fontosak más sejthalálfolyamatok szabályozásában is. A HSP90, ko-chaperonjával (CDC37) komplexben képes megnövelni a nekroptózis kulcsfehérjéinek (RIPK1, RIPK3, MLKL) a stabilitását.^[93-95] Egy másik hősokkfehérje, a HSP70 viszont antinekroptotikus és antiapoptotikus hatással bír, mert a túlélő szignált közvetítő fehérjék (IAP-ok és cFLIP) stabilitását növeli.^[96]

A jelátvitel gátlása megvalósulhat a kulcsfehérjék hasításával, vagy proteaszómális degradációjával is. A nekroptózis gátlásának legismertebb útvonala a már korábban említett kaszpáz-8, illetve prokaszpáz-8 – Flip_L heterodimer, melyek a RIPK1, RIPK3 és a CYLD hasításával meggátolják a nekroptotikus program bekapcsolását, ha az apoptózis már iniciálódott.^[26,97,98] A proteaszómális lebontás első lépése, a fehérjék kijelölése ubiquitináció által. Számos K48 ubiquitin ligázt derítettek már fel, melyek képesek ezen útvonalra determinálni a nekroptózis kulcsfehérjéit, ezáltal gátolni a nekroptózist: a RIPK1-et az A20, a STIP1 homology and U-Box containing protein 1 (STUB1 más néven CHIP), az optineurin (Optn), a Triad3a; a RIPK3-at a STUB1, az Optn, a Pellino E3 Ubiquitin Protein Ligase 1 (PELI1); az MLKL-t pedig az Optn.^[99-103] Ezen ubiquitin ligázok leütése vagy gátlása számos in vitro és in vivo esetben szenzitizált a nekroptotikus stimulusokkal szemben.

Bár a nekroszóma összeépülésének és a jelátvitel továbbhaladásának előfeltétele a központi komponensek (RIPK1, RIPK3, MLKL) foszforilációja, számos bizonyíték van arra vonatkozólag, hogy ezeken túl más pozíciókban is megvalósulhat poszttranszlációs módosítás, mely elengedhetetlen a nekroptózis finomhangolásához (**3. ábra**).

Nektoptotikus stimulust követően a RIPK1 és RIPK3 összekapcsolódik, majd ezt követően foszforilálódnak (humán RIPK1 a 14-es, 15-ös, 161-es és 166-os szerineken, míg a humán RIPK3 a 199-es, 227-es és 277-es szerineken).^[18,49,104] A RIPK1 TAK1 áltai átmeneti foszforilációja a 321-es szerinen RIPK1 független apoptózishoz vezet, míg a 321-es, 332-es, 334-es és 336-os szerinek stabil foszforilációja aktiválja a RIPK1-et.^[105] Az IKKα/IKKβ kinázok a 25-ös szerin, az MK2 a 321-es és 336-os szerinek, míg egy eddig ismeretlen kináz a

89-es szerin foszforilációján keresztül képesek gátolni a RIPK1-et.^[52,106-111] A PELI a RIPK1 115-ös, míg a cIAP1, cIAP2 és Parkin a 377-es lizinjének ubiquitinációjával képesek elősegíteni a nekroptózist, míg a RIPK3 ubiquitinációja a 363-es lizinjén gátolja azt.^[112-114] A RIPK1 és RIPK3 összekapcsolódása és aktivációja után az MLKL is a komplexhez kapcsolódik, amit humán sejtekben a RIPK3 duplán foszforilál a 357-es treoninján és 358-as szerijén.^[56,60,115] Az MLKL 376-os tirozinjának foszforilációjával a TAM kinázok (Tyro3, Axl, MerTK) képesek elősegíteni annak aktivációját és oligomerizációját, valamint egy eddig ismeretlen kináz is képes aktiválni az MLKL-t a 441-es szerinjének foszforilációjával.^[116,117] A kaszpáz-8 mint a nekroptózis negatív szabályozójaként is ismert, mert aktivációját követően képes elhasítani a RIPK1-et a 324-es és RIPK3-at a 328-as aszparaginsava mentén.^[24-26]



3. ábra | A nekroszóma komponensek szerkezeti felépítése és poszttranszlációs szabályozása.^[16] A RIPK1 rendelkezik egy N terminálison elhelyezkedő kináz doménnel, egy C terminálison található haláldoménnel és a két régió között lévő RHIM doménnel. A RIPK3 egy N terminális kináz és egy C terminális RHIM doménből épül fel. Az MLKL egy C terminális 4HB doménből, egy N terminális pszeudokináz doménből és a kettőt összefogó kapocsrégióból áll. Szürke szín jelöli a foszforilációs, piros az ubiquitinációs és sárga az O-típusú N-acetilglükózamin módosítás helyeket. Az apoptózis során aktiválódó kaszpáz-8 az effektor kaszpázokon túl, hasítja a 324-es aszparaginsavnál a RIPK1-et, míg a 328-as aszparaginsavnál a RIPK3-at, ezáltal megakadályozza a nekroptózis kialakulását.

A sejtek elsődleges energia-és metabolitforrásaként ismert glükóz három útvonalon hasznosulhat: a glikolízisben, a pentóz-foszfát úton, valamint a hexózamin bioszintézis útvonalon, mely utóbbi végterméke az uridin difoszfo-N-acetil-glükózamin (UDP-GlcNAc). Ez egyrészt prekurzorként szerepel glikoproteinek, glikolipidek és proteoglikánok bioszintézisében, valamint alapanyagként szolgál az O-GlcNAc traszferáz számára is, mely fehérjék (transzkripciós faktorok, kinázok és más enzimek) O-típusú N-acetilglükózamin módosítását végzi. Publikációk szerint, β-N-acetil-glükózamin O helyzetű kötődése a RIPK3 467-es treoninján gátolta a RIPK1-RIPK3 hetero- és a RIPK3-RIPK3 homo-interakciók létrejöttét, így pedig gátolta a nekroptózis kialakulását.^[118]

A nekroszóma komponensek aktivitását és egymáshoz való kötődését ezeken túl még számos molekula szabályozza fehérje-fehérje interakciókon keresztül (**4. ábra**). Jelen kutatási téma szempontjából a legfontosabbak ezek közül azok a fehérjék, melyek nyugalmi állapotban képesek kötődni a RIPK1, RIPK3 és MLKL fehérjékhez. A korábban már említett HSP90-CDC37 komplex mindhárom kulcsfehérjéhez képes kötődni megnövelve ezen fehérjék stabilitását, féléletidejét.^[93-95] A HSP90 gátlása, vagy expressziójának csökkentése a RIPK1, RIPK3 és MLKL degradációját okozza és ily módon a nekroptózis ellen hat.^[119,120]



4. ábra | **A nekroszómát alkotó fehérjék interakciós szabályozó partnerei.**^[16] A nekroptózis jelátvitelében számos szabályozó funkcióval rendelkező fehérjét azonosítottak, melyek RIPK1-hez (kék háttér), RIPK3-hoz (zöld háttér) vagy az MLKL-hez (narancssárga háttér) kötődve pozitívan vagy negatívan befolyásolják a jelátvitelt. A kulcsfehérjék közötti közös partnerek a metszetekben találhatóak, pirossal a pro-nekroptotikus, míg kékkel az antinekroptotikus szereplők vannak jelezve.

A protein phosphatase 1 b (PPM1b) és aurora kinase A (AURKA) fehérjéknek fontos szerepük van a spontán nekroptózis kialakulásának elkerülésében. A protein foszfatáz 2 C családba tartozó PPM1b a p38, MAPK és az NF-κB útvonal negatív regulátoraként ismert, de a szakirodalom szerint, képes megakadályozni a spontán RIPK3 autofoszforilációt és az ezt követő RIPK3-MLKL interakciót.^[121] Az aurora kinázok a szerin/ treonin kinázok közé tartoznak, és fontos szerepük van a sejtciklus szabályozásában. Három képviselőjük ismert:

aurora kináz A, mely a centroszómák érésében, szétválásában és az osztódási orsó összeszerelődésében játszik szerepet, aurora kináz B, mely elengedhetetlen a kromoszómapárok szétválásában, valamint aurora kináz C, mely csak a herékben kerül expresszióra, és jelen tudásunk szerint ugyanazt a feladatot látja el, mint az aurora kináz B, amennyiben az valamiért erre képtelen.^[122] Az AURKA-ról ismert, hogy szubsztrátjával a glikogén szintáz kináz 3ß-vel (GSK3ß) részt vesz a nekroptózis szabályozásában is, mert képesek megakadályozni a RIPK1-RIPK3 és a RIPK3-MLKL kapcsolat kialakulását.^[123] Az AURKA gátlása, expressziójának csökkentése vagy a GSK3ß gátlása is spontán nekroptózishoz vezet.^[123]

2.6. Nekroptózis szerepe a 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.^[16]

A sejtek a környezetből érkező fizikai vagy kémiai stressz hatására nagyon sokféle védekező folyamatot indítanak el, hogy fenntartsák az intracelluláris homeosztázisukat. Sok esetben ezen környezeti változások képesek érzékenyítni a sejteket egyik vagy másik sejthalálformával szemben. Tartós hiperglikémia (35-40 mM) hatására például megemelkedik a RIPK3 expressziója, ezáltal a sejt érzékenyebbé válik a nekroptotikus stimulusokkal szemben.^[124-126] A nekroptózis kutatások jelentős része foglalkozik a hipoxia következtében fellépő sejthalállal, hiszen napjaink vezető halálozási okaiként tartják számon az érelzáródással járó folyamatokat, mint a miocardialis infarktus, stroke, tüdőembólia.^[127,128] A műtéti beavatkozások során számos alkalommal egy-egy érszakasz időleges lezárásával, majd újranyitásával kell számolni (ischaemia-reperfúzió, IR).^[129-131] Ezekben az esetekben is kimutatták, hogy megemelkedik a sejtekben a pro-nekroptotikus fehérjék (RIPK1, RIPK3, MLKL) expressziója.^[132-134] Ismert továbbá, hogy a sejtek tartós éhezése során (glükóz és oxigén megvonás) lecsökken a nekroptózis negatív regulátorának, a kaszpáz 8-nak a szintje.^[135]

Több neurodegeneratív megbetegedésben megfigyelték a sejthalál útvonalak abnormális túlműködését.^[136] A nekroptózis bizonyítottan hozzájárul olyan betegségek kialakulásához, mint az Alzheimer-kór, szklerózis multiplex (SM) vagy amiotrófiás laterálszklerózis (ALS).^[16] SM betegekből származó mintákban kimutatták a RIPK1, RIPK3 és az MLKL fehérjék abnormálisan magas aktivációját, valamint ezzel együtt a kaszpáz-8

aktivációjának defektusait.^[137] ALS-ben szenvedő páciensekben igazolták a nekroszóma fehérjék túlzott mértékű expresszióját, valamint ezek foszforilációját.^[99] Kiemelt fontosságú, hogy pMLKL-t a fehér állományban sikerült kimutatniuk, ahol a betegség miatt fellépő demyelinizáció is történt.^[99]

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 gyulladáshoz vezet, mely jellemzően az emésztőrendszert, veséket, bőrt és a légzőrendszert érinti.^[16] 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, míg xenobiotikumok indukálta májbetegségben az MLKL expressziója és foszforilációja volt emelkedett az egészséges mintákhoz képest.^[60,138-140] Szintén magas RIPK3 és/vagy MLKL szint, valamint csökkent kaszpáz-8 expresszió tapasztalható Crohn-betegek ileum végi szakaszán, gyulladásos bélbetegségben vagy allergiás colitisben szenvedő betegek mintáiban.^[138,141,142] Érgyulladás, fekélyes vastagbélgyulladás és pszoriázis során a gyulladt szövetbe infiltrálódó neutrofil granulocitákban megnőtt a pMLKL szintje, ami azt mutatja, hogy az ilyen szövetbe érkező immunsejtekben is aktiválódhat a környezet hatására a nekroptózis.^[143,144] A bőrt érintő betegségek közül a szájüregi Lichen Planusban valamint szisztémás lupusz eritematózusban mutattak ki jelentős RIPK3 foszforilációt, mely utal a nekroptózis túlműködésére.^[145,146]

A bakteriális és virális fertőzések egyik kulcsmomentuma, hogy elnyomják a gazdasejt saját védekező és önmegsemmisítő programját. A patogének gátolhatják a jelátviteli kaszkádot (kaszpázok gátlása, mitokondriális pro-apoptotikus fehérjék felszabadulásának gátlása, egyéb pro-apoptotikus fehérjék gátlása és/vagy lebontása, RIP kinázok gátlása, deubiquitinázok gátlása) vagy overexpresszáltathatják a túlélési és antiapoptotikus faktorokat (cIAP1, cIAP2, x-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL)), ami által a jelátvitelt az NF-κB útvonal irányába tolják el.^[72,147-149] Ahogy említettük, számos patogénről bebizonyosodott, hogy szerepet játszik a nekroptózis kialakulásában (HIV-1, HSV-1, WNV, VV, MCMV, Neisseria gonorrhoeae, Porphyromonas gingivalis, Klebsiella pneumoniae, Shigella flexneri, Mycobacterium tuberculosis, Toxoplasma gondii, Bordetella bronchiseptica).^[49,150-161] A patogének gazdasejt sejthalálprogramjára gyakorolt hatásának megértése, esetlegesen a gátolt sejthalálfolyamatok esetében egy alternatív útvonal bekapcsolása segítséget hozhat ezen fertőzések leküzdésében és megelőzésében.

A tumorsejtekről szintén ismert a sejthalálfolyamatok 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.^[162,163] Egyrészt nagyon sok féle daganatos mintában azt tapasztalták, hogy a RIPK3 és/ vagy az MLKL fehérjék szintje csökkent, vagy pedig funkcióképtelen változataik kerültek expresszióra.^[92,164-166] Összességében a nekroptózis gátlása a tumorokban igen általános jelenség mely hozzájárul a daganatok kialakulásához és a tumorterápiában használt szerekkel szemben mutatott rezisztenciához. Ezekkel szemben több tanulmány számol be arról, hogy a nekroptózis által okozott gyulladás elősegíti a tumorok fejlődését és hozzájárul a tumor mikrokörnyezet kialakulásához.^[167,168] Arról is vannak adatok, hogy a tumorok képesek indukálni a közeli endotél sejtek nekroptózisát, mely hozzájárul a tumorok terjedéséhez, metasztázisok kialakulásához.^[169]

Nagy potenciált jelentene olyan terápiák kidolgozása, melyek képesek nemcsak elpusztítani a tumoros sejtet, hanem ezzel együtt aktiválni az immunrendszert is. Nekroptózis során mivel megszűnik a citoplazmamembrán integritása, nagyon sok DAMP szabadul fel, ami elősegíti a CD8+ T-limfociták aktivációját a dendritikus sejtek keresztprezentációjának elősegítésén, fokozásán keresztül.^[11,170]

Bár jelenleg nincs elfogadott specifikus nekroptózist szabályozó terápiás szer, több mint 20 olyan elfogadott és más betegségek kezelésében már használt szer ismert, melyek képesek befolyásolni (gátolni vagy indukálni) a nekroptózist.^[16] Mivel rengeteg betegségben játszik szerepet ez a sejthalálforma érdemes lenne átgondolni és protokollokat kidolgozni, hogy hogyan lehetne ezeket a szereket használni más betegségek kezelésben is. A kaszpáz-9 szerepének bizonyítása a nekroptózis folyamataiban egyrészt újdonságot jelent a nekroptózis jelátvitelének vizsgálatában, másrészt kulcsfontosságú lehet a mitokondriális apoptózis és nekroptózis egymásra hatásának megértésében.

2.7. In vivo egérmodellek

A kaszpáz-8 két, látszólag ellentétes funkcióval rendelkezik: mint az extrinsic apoptózis iniciátor kaszpáza esszenciális szerepet tölt be a sejthalálban, azonban fontos túlélési faktorként is működik az embrionális fejlődés során, mivel gátolja a nekroptózist. ^[171-173] A kaszpáz-8 hiánya vagy enzimaktivitásának defektusa az egerek embrionális halálához vezet a 10. és 12. nap között, melynek során érfejlődési, szív-, valamint hematopoetikus rendellenességeket figyeltek meg.^[171-176]

A sejthalálreceptorok jelátvitelében kiemelt fontossággal bír az adapterként funkcionáló FADD, melynek elsődleges feladata a prokaszpáz-8 molekulák összegyűjtése, lehetőséget teremtve a prokaszpáz-8-prokaszpáz-8 homodimerek képződésére és az ezt követő autoproteolitikus aktivációra.^[177,178] Bár a sejthalálreceptorok nem szükségesek az embrionális fejlődéshez, a FADD hiánya mégis embrionális halálhoz vezet, mert nélküle nincs lehetőség a

prokaszpáz-8 fehérjék aktivációjára, ezáltal pedig sérül a nekroptózis egyik kulcsszabályozási pontja, vagyis, a RIPK1 és RIPK3 és CYLD hasítása.^[179-181]

A cFLIP fehérjének eddig három izoformáját azonosították (L, S, R), melyek közös jellemzője, hogy strukturálisan a prokaszpáz-8 és -10 inaktív (enzimaktivitás nélküli) homológjai. Tartalmaznak egy N terminális DED interakciós domént (hasonlóan a prokaszpáz-8-hoz és -10-hez) és mindhárman képesek heterodimert képezni a prokaszpáz-8-cal, és így gátolni annak aktivációját.^[182] Míg a cFLIP_s és cFLIP_R izoformák csak az apoptózis gátlásához járulnak hozzá, ezáltal elősegítik a nekroptózis létrejöttét, addig a cFLIP_L heterodimert képezve a prokaszpáz-8-cal lehetővé teszi annak részleges hasítását és aktivációját, de megváltoztatja annak szubsztrátspecificitását oly módon, hogy a heterodimer a prokaszpáz-8-at nem, de a RIPK1 és RIPK3 valamint a CYLD fehérjéket még képes legyen hasítani. Így egyidejűleg kikapcsolja az apoptózist és a nekroptózist is, vagyis a túlélés és a sejtaktiváció irányába tolja el a jelátvitelt.^[183]

A kaszpáz-8 és a FADD deléciójához hasonlóan a FLIP leütése is az egerek embrionális halálához vezet, azonban amíg a kaszpáz-8 és a FADD hiánya túlzott mértékű nekroptózishoz vezet, addig FLIP KO esetén az embrionális pusztulásban a túlzott mértékű kaszpáz-8 mediálta apoptózis is szerepet játszik.^[184] Ennek bizonyítéka, hogy a kaszpáz-8 vagy FADD hiányos heterozigóta egerek és RIPK1,^[185] RIPK3^[186-188] vagy MLKL^[189] heterozigóta KO egerek többszöri keresztezésével létrejövő homozigóta dupla KO egerek életképesek, addig a FLIP-RIPK3 dupla KO egerek nem.^[188] A FLIP KO állatok csak akkor maradhatnak életben, ha a FLIP mellett még a FADD és a RIPK3 is leütésre kerül (FADD-FLIP-RIPK3 tripla KO).^[188]

A RIPK1, RIPK3 és MLKL nekroptózisban betöltött szerepét és patológiás állapotokhoz való hozzájárulását több transzgén egérben is sikerült már igazolni. Mivel a RIPK1 túlélési és sejthalálútvonalak csomópontjában helyezkedik el, ezért expressziója esszenciális a szervezet szempontjából. Egerekben a RIPK1 egész testes leütése embrionális korban történő halálhoz vezet, azonban, ha a RIPK1 mellett még a RIPK3-at és a kaszpáz-8-at is leütötték, akkor ez a hármas deléció már megóvta az egereket a korai embrionális haláltól, ami jól mutatja, hogy a RIPK1 fontos szabályozójaként működik mind az apoptózisnak, mind pedig a nekroptózisnak, sőt adott esetben a nekroptózis negatív regulátora is lehet.^[190-193] Katalitikusan inaktív RIPK1-et expresszáló transzgén egerek megjelenése lehetővé tette a RIPK1 kináz független adapter funkcióinak (NF-κB és MAPK útvonalak aktiválása) a tanulmányozását, függetlenül azoktól melyekhez ez nélkülözhetetlen (nekroptózis). Publikált adatok szerint D138N vagy K45A katalitikusan inaktív RIPK1-gyel rendelkező egerek életképesek, védettek a TNF receptor, TLR3 aktiváció vagy vaccinia virus fertőzés indukált nekroptózissal szemben.^[192,194,195]

A RIPK1 hiányával szemben a RIPK3 vagy az MLKL leütése nem okoz kóros fenotípusos változásokat, mivel nem befolyásolja az NF-kB és a MAPK útvonalak aktivációját.^[18,115,194,196,197] Viszont az utóbbi években több kutatócsoportnak is sikerült igazolnia különféle betegségmodelleken, hogy a RIPK3, illetve az MLKL hiánya jelentősen mérsékel bizonyos szövetkárosodásokat az egerekben, ahogyan a RIPK1 gátlása is. Egy makuladegenerációs modellben például duplaszálú RNS (polyI:C) retinába történő injektálása a pigment epitélsejtek nekrózisához és makrofágok infiltrációjához vezetett. Ugyanakkor ez a kezelés RIPK3 hiányos egérben nem okozott azonban szöveti károsodást, megóvva az egereket a retinadegenerációtól.^[198] Ezeken túl a RIPK3 leütése bizonvítottan megmenti az egereket a TNF vagy TNF és kaszpázgátló (Z-VAD) kombinált kezelés hatására kialakuló szeptikus sokktól, vagy a vakbél átszúrásával kiváltott, baktériális (LPS mediált) szepszistől.^[192,195,199,200] A Gaucher-kór egy recesszív módon öröklődő lipidtárolási betegség, ahol glükocerebrozidáz enzim defektusa miatt bizonyos lipidek (glükocerebrozidok) kóros mértékben halmozódnak fel a lépben, májban, agyban és a csontvelőben, ami hepatosplenomegáliához, vérszegénységhez, vérzékenységhez, csontritkuláshoz és neurológiai károsodáshoz vezet. RIPK3 KO egérben jelentősen csökkent a neuronok pusztulása és a Gaucher-kór klinikai tüneteinek jelentős része.^[201] Vese és szívátültetés során is jelentősen mérsékelte a RIPK3 hiánya az IR következtében kialakuló szöveti károsodásokat és a gyulladás mértékét, javítva az átültetés sikerességét.^[202-204] Publikációk szerint a RIPK3 vagy az MLKL leütése megvédi az egereket a cerulein indukálta akut pankreatitisz kialakulásától.^[196,205]

2.9. 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.^[206] Bár az eltelt évek során több szabályozott sejthalálformát is leírtak, az apoptózis azóta is referenciapontként szolgál más sejthalálútvonalak megértésében.^[13] Morfológiáját tekintve a sejteken az alábbi változások figyelhetőek meg: az elhaló sejt elveszíti a kapcsolatot az extracelluláris mátrixszal, lekerekedik; citoplazmamembránján kitüremkedések, blebek jelennek meg; a sejtmaganyag kondenzálódik, majd feldarabolódik; a citoplazmamembán felszínére foszfatidil szerin csoportok transzlokálódnak, fagocitózist indukálva.^[207,208] Szemben a nekrózissal, ahol a membrán felszakadása miatt jellemzően rengeteg DAMP kerül ki az extracelluláris térbe, apoptózis során a sejtmembrán jellemzően végig intakt marad, a sejt pedig apoptotikus testekbe csomagolódik.^[208,209]

Elsősorban e mechanizmus miatt, széles körben elfogadott, hogy apoptózis során sem gyulladás, sem pedig immunválasz nem alakul ki. Ismert azonban, hogy ezen túl az apoptózison

áteső sejtek immunmoduláló citokinek szekréciójával vagy pedig a környező fagocita sejtek tolerogén irányba történő differenciáltatásával aktívan is képesek egy tolerogén mikrokörnyezet megteremtésére.^[210] Napjainkban a tumorterápiában használt kemoterápiás szerek szinte mindegyike apoptózis kiváltásán keresztül próbálja meg eliminálni a rákos sejteket. De az apoptotikus sejtek és apoptotikus testek fagocitózisa a gyulladás megelőzésén keresztül hozzájárul tolerogén tumor mikrokörnvezet fenntartásához, ezáltal a tumor növekedéséhez.^[211] Publikált adatok szerint az apoptotikus sejtek a tumor közelében elősegítik a tumor növekedését, az érképződést és a tumor asszociált makrofágok differenciációját.^[212] Az is ismert, hogy sugárterápiát követően az apoptotikus testekből kaszpáz-3 függő módon arachidonsav és prosztaglandin E2 szabadul fel, mely hozzájárul a kezelést túlélő rákos sejtek növekedéséhez.^[213] Más tanulmányok ugyanakkor arra világítanak rá, hogy az apoptotikus sejtekből származó antigéneket felvett dendritikus sejtek képesek ezeket keresztprezentálni a citotoxikus T-sejteknek, ami az immunválasz elindításához vezet.^[214,215] Kutatási adatok szerint bizonvos rákterápiás szerek (antraciklinek, oxaliplatin, bortezomib, stb.), y-sugárzás valamint a fotodinamikus terápia is mind képesek egy speciális típusú apoptózis indukálására, melyet immunogén apoptózisnak neveztek el. utalva annak immunrendszert aktiváló képességére.^{[216-}

^{218]} Több kísérlet rávilágított arra, hogy egereket immunizálni lehet immunogén apoptózison átesett rákos sejtekkel, ugyanis ez az immunizálás képes volt megakadályozni, hogy a beoltott állatokban daganatok alakuljanak ki akkor, amikor az egerekbe olyan rákos sejteket injektáltak, amelyekből az úgynevezett vakcina készült.^[219-221] Igazolták azt is, hogy bár az immunogén apoptózison áteső sejtek ugyan azokat a morfológiai változásokat mutatják, mint a klasszikus apoptózison átesők, de mégis immunogén apoptózis során megfigyelhető volt bizonyos DAMP-ok (kalretikulin, high-mobility group protein 1 (HMGB1), ATP) jelenléte.^[222] Ezen DAMP-ok, a sejtekből származó tumorantigénekkel együtt erős stimulusként szolgáltak a dendritikus sejtek aktivációjához, elősegítették az érésüket és keresztprezentáló képességük bekapcsolását, ezáltal hozzájárultak az adaptív immunrendszer aktivációjához és a tumorspecifikus immunválasz kialakulásához. Ezen eredmények tehát rávilágítanak, hogy a korábban csakis tolerogén kimenettel jellemzett apoptózis nem mindig jellemezhető immunológiailag csendes folyamatként.^[223,224]

Az apoptózis jelátviteli útvonalának végrehajtó molekulái a kaszpázok, melyek olyan cisztein proteáz enzimek, amik szubsztrátjukat egy jellemzően 4 aminosavból álló motívum mentén hasítják úgy, hogy ennek utolsó tagja minden esetben egy aszparaginsav.^[225] A hasítás kizárólag csakis ezen motívumok (általában szubsztrátonként egy darab) mentén rendkívül pontosan és csak részlegesen történik (limitált proteolízis). Az emberi szervezetben megjelenő 12 féle 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.^[226] 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.^[227] Aktivációjuk prokaszpáz-prokaszpáz dimerek képződésével (melyben a prodomén mint interakciós doménként funckionál), majd ezt követő limitált proteolízissel történik.^[228]



5. ábra | A kaszpázok aktivációjának főbb útvonalai.^[227] A kaszpázok aktivációjához vezető útvonalak külső jellel elinduló, úgynevezett extrinsic részét (1-es útvonal) a sejthalálreceptorok (Fas, TNFR, TrailR) ligandkötése indítja el, mely a receptorok oligomerizációjához, majd pedig intracelluláris részük konformációváltozásához vezet. Ezt követően a receptorok adapter molekulákat (mint például TRADD, FADD) toboroznak, ami egy többlépcsős folyamatban a DISC összeszerelődéséhez és a prokaszpáz-8 és -10 fehérjék beködődéséhez, dimerizációjához és aktivációjához vezet. Az aktivált kaszpáz-8 ezt követően aktiválja az effektor kaszpázokat (3 és 7), melyek ezt követően végrehajtják az apoptotikus programot. Bizonyos sejtekben a sejthalálreceptorok ligandkötését követően aktiválódott kaszpáz-8 molekulák a BID hasításával képesek bekapcsolni a mitokondriális apoptózist, mivel a hasított BID a mitokondrium permeabilizácóját és a citokróm c kiszabadulását idézi elő. A belső szignállal elinduló, intrinsic útvonalat (2-es útvonal) számos stresszhatás, sérülés, vagy farmakológiai ágens aktiválhatja, melyeket a Bcl-2 családba tartozó fehérjék képesek érzékelni. A sejt sorsát végső soron, a család proés antiapoptotikus tagjainak egymáshoz viszonvított egyensúlya fogja eldönteni. Kellően erős stimulus a proapoptotikus tagok aktivációjához és/ vagy expressziójuk növekedéséhez vezet, mely a mitokondrium permeabilizálódásához, számos mitokondriális fehérie kiszabadulásához és az apoptoszóma létrejöttéhez, végső soron pedig a prokaszpáz-9 fehérjék aktivációjához vezet. Az aktív kaszpáz-9 molekulák szubsztrátjaik hasításán keresztül tovább viszik a jelátvitelt. A kaszpázaktiváció granzim B proteázoktól függő útjának (3-as útvonal) első lépése a citotoxikus T sejtek, valamint a természetes ölősejtek aktivációja és citotoxikus granulumaik szekréciója. A célsejt membránjában oligomerizálódó szekretált perforin molekulák lehetővé teszik, hogy a granzim B fehérjék bejuthassanak a sejtbe és ott proteáz aktivitásuk révén közvetlenül az effektor kaszpázokat (3 és 7) aktiválják. Alternatív módon (az ábrán nem szereplő 4-es útvonal) a kaszpázok proteolítikus hasítása és így aktivációja megvalósulhat közvetlenül a dependence receptorokon keresztül is, ha ezen receptorok ligandja egy kritikus érték alá esik.

Az apoptózis kialakulhat a külső és a belső mikrokörnyezetből érkező jelek hatására is (5. ábra). 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 prokaszpáz-8 és 10 aktivációjához vezet.^[229-232] A jelátvitel sejttípustól függően ezt követően két módon mehet tovább: az I-es típusú sejtekben nagy mennyiségű aktív kaszpáz-8 keletkezik, melvek ezt követően azonnal aktiválják az effektor kaszpázokat (prokaszpáz-3 és -7). A II-es típusú sejtekben azonban nem elég hatékony a DISC összeszerelődése, emiatt pedig késleltetett vagy gyenge prokaszpáz-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).^[233,234] Alternatív módon az extrinsic apopotózis megvalósulhat a dependence receptorokon (Patched, deleted in colorectal cancer (DCC), Unc-5 netrin receptor B (UNC5B)) keresztül is, melyek akkor aktiválódnak, ha ligandjuk koncentrációja egy kritikus érték alá esik, ami pedig az egyes receptoroknál némileg eltérő módokon keresztül, de végül nagyarányú kaszpáz-3 aktivációt idéz elő.^[235,236]

Az apoptózis belső vagy más néven mitokondriális útvonalát nagyon sok féle 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.^[237-242] Az útvonal sorsmeghatározó lépése a mitokondrium külső membránjának a permeabilizációja, melyet a Bcl-2 családba tartozó proés antiapoptotikus fehérjék egymáshoz viszonyított egyensúlya dönt el.^[243,244] A család tagjai strukturálisan egy vagy több Bcl- 2 homológia (BH) doménből épülnek fel, e szerint is történik a csoportosításuk.^[245-247] Az antiapoptotikus hatású molekulák mind a 4 BH doménnel rendelkeznek, valamint tartalmaznak egy C terminálison elhelyezkedő transzmembrán régiót is, ami nagyban meghatározza intracelluláris lokalizációjukat (jellemzően a sejtmag, endoplazmatikus retikulum és mitokondrium külső membránjában találhatóak).^[248] A Bcl-2 mellett ide tartoznak a Bcl-xL, a Bcl-2-like protein 2 (Bcl-w), a Bcl-2-like protein 3 (MCL1), a Bcl-2-related protein A1 (Bcl-2A1), valamint a Bcl-2-like protein 10 (Bcl-2L10). A proapoptotikus tagok két csoportba sorolhatók: az egyik csoport tagjai (ide tartozik a Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bak), Bcl-2-associated X protein (Bax), Bcl-2 related ovarian killer (Bok), Bcl-xS, apoptosis facilitator Bcl-2-like protein 14 (Bcl-G)) három darab BH domént tartalmaznak (BH1-3). A másik csoport csak BH3 doménnel rendelkező tagokból áll (Bcl-2-associated death promoter (Bad), Bcl-2-like protein 11 (Bim), Bid, Bcl-2-interacting

killer (Bik), p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA), Phorbol-12-myristate-13acetate-induced protein 1 (PMAIP1 vagy más néven Noxa), Bcl-2-modifying factor (Bmf), B Lymphoid Tyrosine Kinase (Blk), harakiri (Hrk)). 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)).^[246,249] Az AIF (apoptosis inducing factor) egy NADH-oxidáz, mely normál körülmények között a külső és belső membránok közötti intermembrán térben található.^[250] A mitokondriális lokalizációs szignálszekvenciája mellett rendelkezik sejtmagi lokalizációs szekvenciával is, így a mitokondriumból kijutva a sejtmagba vándorol, ahol a ciklofilin A-val komplexben részt vesz a DNS szétdarabolásában.^[250] Az AIF-hez nagyon hasonló útvonalat jár be az endonukleáz G is, mely a seitmagban szintén a DNS fragmentálásáért felel.^[251-253] A SMAC az apoptózis gátló fehérjék (IAP-ok) gátlásával, degradációjával elősegíti a kaszpázok aktivációját.^[254-256] A IAP-oknak a sejtaktivációban betöltött szerepükön kívül fontos funkciójuk van a spontán aktiválódott kaszpázok gátlásában is.^[257] Az Omi/HtrA2 egy szerin proteáz enzim, melv tartalmaz egy N terminálisan elhelvezkedő IAP kötő motívumot, melvnek segítségével képes a IAP-okhoz kötődni, amiket ezt követően elhasítva inaktivál.^[258-260] A citokróm c a mitokondriális elektrontranszport lánc esszenciális alkotóeleme, ami ezen túlmenően a mitokondriumból kijutva képes az apoptotic protease activating factor 1-gyel (Apaf-1) heterodimert képezni, mely fontos lépés a prokaszpáz-9 aktivációjáért felelős platform, az apoptoszóma összeszerelődésében.^[261,262] A mitokondrium külső membránjának intaktságáért, valamint áteresztőképességének változtatásáért a Bcl-2 család pro- és antiapoptotikus tagjai a felelősek.

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.^[263-265] Publikációk szerint Bak és Bax hiányos sejtek rezisztensnek bizonyultak számos olyan stimulussal szemben, melyek a mitokondriális úton keresztül váltanak ki apoptózist, ami igazolja, hogy megkerülhetetlen funkciót töltenek be.^[266] A sejtekben inaktív formában fordulnak elő (a Bak rezidens mitokondriális membránfehérje, míg a Bax transzmembrán doménje, csak aktiváció hatására kerül a molekula felszínére), aktivitásukat számos fehérje szabályozza direkt vagy indirekt módokon.^[267] A gátlásukért főképp az antiapoptotikus Bcl-2 tagok a felelősek, melyek gátolhatják direktben 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).^[268,269] Ez a gátlás feloldható egyrészt a pro-apoptotikus Bcl-2 fehérjék mennyiségének vagy aktivitásának növelésével, de az antiapoptotikus tagok poszttranszlációs módosításán keresztül is.^[5,248] A csak BH3 domént tartalmazó proapoptotikus Bcl-2 fehérjék a belső apoptotikus szignálok szenzoraiként funkcionálnak, mint például a mikrotubuláris hálózat szétesése (Bim), Bad defoszforilációja, Bid limitált proteolízise, növekedési faktorok hiánya (Hrk).^[270] Aktivációjukat követően, a mitokondrium külső membránjához kötődnek, melyet szerkezeti átrendezés követ, ami lehetővé teszi, hogy egyrészt az antiapoptotikus Bcl-2 fehérjékkel heterodimereket képezve felszabadítsák a Bak-ot és a Bax-ot a gátlásuk alól, másrészt a család több tagja képes direkt aktiválni is mind a két fehérjét előidézve azok homodimerizációját, oligomerizációját.^[271,272] A Bak és Bax oligomerek által képzett transzmembrán pórusokon keresztül pedig ezt követően apoptotikus faktorok jutnak ki a mitokondriumból a citoszolba.^[263-265] 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.

2.10. A kaszpáz-9 szerkezete, aktiválódása és szabályozása

A kaszpáz-9 az apoptózis intrinsic útvonalának iniciátor kaszpáza. Ezt az útvonalat nagyon sok féle stimulus indíthatja el melyek eredményeként a Bcl-2 családba tartozó Bak és Bax hatására a mitokondrium külső membránja permeabilizálódik.^[273] Ekkor egy sor proapoptotikus fehérje szabadul ki, többek között a citokróm c, ami az Apaf-1-gyel heterodimert képez.^[274] Az Apaf-1 rendelkezik egy N terminálisán elhelvezkedő caspase recruitment interakciós doménnel (CARD), egy középen elhelyezkedő nukleotidkötő résszel, ami ADP/ATP megkötésére alkalmas, valamint a C terminálison egy hosszú repetitív szekvenciákból álló WD-40 doménnel. Zimogén formában termelődik, stimuláció hiánvában a CARD doménje és a WD40 szekvenciája összekapcsolódva egy gyűrűt formálva hozza létre a zárt, inaktív térszerkezetet.^[275-277] Apoptotikus stimulust követően azonban egy ADP/ATP cserét követően a zárt konformáció átalakul, a CARD és a WD40 domének közötti interakció felbomlik és a molekula aktív állapotba kerül, mely már alkalmas a mitokondriumból kiszabadult citokróm c megkötésére.^[278-280] Az Apaf-1-citokróm c komplexe az interakciójukat követően oligomerizálódik, és egy kerék alakú konformációt felvéve alkotja meg az apoptoszómát, mely egyenként 7 darab Apaf-1-citokróm c-ATP egységből áll.^[281,282] A prokaszpáz-9 az apoptoszómához kapcsolódik oly módon, hogy a CARD doménje az Apaf-1 CARD doméniével létesít kapcsolatot.^[273]

Bár az apoptózis mitokondriális útvonala már régóta ismert, a prokaszpáz-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 prokaszpáz-9 fehérjék az interakció miatt esnek át olvan konformációváltozáson, mely esszenciális az aktivációjukhoz.^[283-286] Ezt támasztja alá, hogy az Apaf-1-prokaszpáz-9 interakció nem csak a CARD doménjeiken keresztül valósul meg, hanem a prokaszpáz-9 katalitikus része is kötődik a platformhoz.^[287] Továbbá indukált dimerizációs kísérletekkel igazolták, hogy a kaszpáz-9 dimerek katalitikus aktivitása nem sokkal nagyobb, mint a prokaszpáz-9 monomereké és messze elmarad az apoptoszómában lévő kaszpáz-9-ekétől.^[285] Az "indukált közelségi modell" szerint viszont az apoptoszóma csak platformként szolgál annak érdekében, hogy sok prokaszpáz-9 kerüljön egymás közelébe, és ezáltal lehetőség nyíljon a dimerizációra és a limitált proteolízisre.^[288-290] Rekombináns fehériékkel igazolták, hogy ugyanarról a plazmid konstruktból bakteriális vagy emlős expressziós rendszerben egyszerre izolálható mind inaktív zimogén, mind pedig aktív kaszpáz (legalábbis a kaszpáz 3, 7, 8 és 9 esetében).^[284,291,292] Igazolták azt is, hogy míg rövidebb expresszió indukciós idők (<30 perc) a zimogén formák, addig hosszabb idők (>3óra) az aktív enzimek izolálásához vezetnek. Szintén indukálható dimerizációs kísérletek bebizonyították, a dimerizációs ágens adását követően a dimerizálódó kaszpáz-8 vagy -9 fehérjék apoptózishoz vezettek több seitvonalon.^[290,293]

Az Apaf-1-hez kötődött prokaszpáz-9 hasítódik a 315-ös aszparaginsava mentén egy nagy (p35) és egy kis (p12) alegységet képezve (p35/p12).^[284,294,295] Az ily módon már aktiválódott kaszpáz-9 elhasítja a prokaszpáz-3-at a 175-ös aszparaginsava mentén, ami egyrészt további lépéseket követően végrehajtja az intrinsic apoptotikus programot, másrészt egy pozitív visszacsatolási mechanizmusként képes hasítani mind az aktív kaszpáz-9-et, mind pedig annak pro formáját a 330-as aszparaginsava mentén p35/p10; p37/p10 heterodimerek képződését indukálva.^[295-297] Ez mintegy nyolcszorosára képes növelni a kaszpáz-9 enzimaktivitását és így annak hatékonyságát is.^[298]

A kaszpáz-9 aktivációja és későbbi aktivitása jelenlegi ismereteink szerint több ponton is szabályozott. Az egyik, hogy az aktivált kaszpáz-9 csak az apoptoszómához kötődve aktív, arról leválva inaktiválódik.^[273,294,299] A prokaszpáz-9 affinitása viszont jóval nagyobb (mintegy tízszerese) az Apaf-1 CARD doménja iránt, ezért az folyamatosan szorítja le az aktív kaszpáz-9-et az apoptoszómáról, ami ily módon egyfajta molekuláris időzítőként működik.^[273,276] A sejtben jelen lévő prokaszpáz-9-ek mennyisége határozza meg a helyettesítés dinamikáját és a működési idejét. Miután az összes prokaszpáz-9 molekula processzálódott, a kezdeti robosztus aktiváció lassan lecsökken, míg beáll egy egyensúlyi állapot, melyben csak egy nagyon kis mennyiségű kaszpáz-9 marad apoptoszómához kötődve és így aktív állapotban.^[276,300] Ezt a modellt több kutatási eredmény is alátámasztja, valamint kiemeli, hogy a helyettesítési dinamika működéséhez elengedhetetlen a prokaszpáz-9-ek aktivációja. Ugyanis a hasadni képtelen mutáns kaszpáz-9-ek a kísérletek során nem váltak le és inaktiválódtak az apoptoszómáról, hanem megőrizték alap, prokaszpázra jellemző aktivitásukat.^[301] Ugyanerre az eredményre vezettek azok a kísérletek, melyekben a kaszpáz-9 aktivációját vagy kaszpázgátlókkal vagy pedig XIAP overexpressziójával gátolták.^[276,300,302,303]



6. ábra | A kaszpáz-9 szerkezete és poszttranszlációs szabályozása. (A) A kaszpáz-9 három fő részből, egy N terminális CARD, egy ezt követő nagy alegységből, mely az enzimatikus helyet tartalmazza (C287, kék színnel jelölve), egy C terminális kis alegységből és az ezeket összekötő linker szakaszokból áll. Jelenlegi tudásunk szerint a kaszpáz-9 aktivitását számos fehérje szabályozza foszforiláción (sárgával jelölve), ubiquitináción (zölddel jelölve) és proteolitikus hasításon (ollóval jelölve) keresztül. (B) A kaszpáz-9 proteolitikus aktivációjának függvényében többféle kaszpáz-9 fragment is keletkezhet, azonban ezek mindegyikét képes gátolni a XIAP fehérje-fehérje interakción keresztül.

Az autokatalitikusan aktiválódott kaszpáz-9 (p35/p12) kis alegysége tartalmaz egy 316-319-es aminosavig tartó ATPF szekvenciát az N terminális végén.^[304] Ehhez a szekvenciához az XIAP tud kötődni a baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat 3 (BIR3) doménjével, és képes gátolni az aktiválódott kaszpáz-9-et.^[304] A kaszpáz-9 tartalmaz még egy 331-334-es aminosavig tartó AISS szakaszt is, mely a kaszpáz-3 hasítását követően válik fontossá, mivel ehhez szintén képes kötődni a XIAP a BIR3 doménjén keresztül, ezáltal tehát a XIAP mindhárom lehetséges kaszpáz-9 konformációt (p37/p10; p35/p10; p35/p12) képes inaktiválni **(6. ábra).**^[298,305]

A kaszpáz-9 szabályozásában igen fontos szerepet tölt be a különféle jelátviteli útvonalakon keresztül történő, protein kinázok általi foszforiláció.^[306] Több kinázról (ERK, dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A), cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), P38a MAPK) is leírták, hogy képesek megakadályozni a kaszpáz-9 aktivációját a 125-ös treonin foszforilációjával.^[307-311] Más enzimek, mint például a protein kinase C zeta (PKCζ) a 144-es, míg az Akt kináz a 196-os szerint foszforilálva gátolja a kaszpáz-9-et.^[312,313] A protein kinase A-ról (PKA) ismert, hogy több helyen (99-es, 183-mas és 195-ös szerineken) is képes a kaszpáz-9-et foszforilálni, mely szintén az aktivációját akadályozza meg.^[314] A casein kinase 2 (CK2) a nagy és kis alegységek közötti linker régió foszforilálásával (302-es, 307-es és 310-es szerinek) úgy változtatja meg a kaszpáz-9 szerkezetét, hogy azt más kaszpázok ne tudják hasítani és aktiválni.^[315] A c-Abl kináz a 397-es tirozin foszforilációjával képes gátolni a kaszpáz-9-et.^[316,317] A foszforiláción túl a kaszpáz-9 szabályozásában fontos szerepet kap az ubiquitináció is. Ismertek gátló hatással bíró helyek, mint például az apollon ubiquitin konjugáló enzim, mely képes a SMAC-hoz és a kaszpáz-9hez is kötődni és azokat ubiquitinálva proteaszómális degradációra ítélni, ezáltal gátolva az apoptózist.^[318] Laphámsejtes nyelőcsőrák daganatokban kimutatták a HECT Domain E3 Ubiquitin Protein Ligase 3 (HECTD3) túlzott mértékű expresszióját és aktivációját (melyet az ERK 157-es treoninon keresztüli foszforilációja kapcsol be). Az aktivált HECTD3 képes több helyen is a kaszpáz-9 ubiquitinációjával megakadályozni, hogy az apoptoszómába kötődhessen és aktiválódhasson. Ez a mechanizmus pedig jelentősen hozzájárul az apoptózis gátlásához és ezen daganatok cisplatinnal és más kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztenciájához.^[319] De az ubiquitináció nem minden esetben gátló hatású, ugyanis publikációk szerint a patched dependence receptor az aktivációját követően a kaszpáz-9 ubiquitinációján keresztül váltja ki apoptózist.^[320] Hogy az apoptotikus program mindig a megfelelő időben aktiválódjon és a megfelelő módon fusson, a jelátvitel nemcsak poszttranszlációsan, de fehérje-fehérje interakciókon keresztül is szabályozott. Ilyen szabályozás az előzőekben már ismertetett, XIAP általi gátlás, de ezen túl más fehérjékről is leírtak hasonló mechanizmusokat. A HS-1-associated protein-1 (HAX-1) a kaszpáz-9 enzimaktivitásának gátlásával, míg a tumor-up-regulated CARD-containing antagonist of caspase nine (TUCAN) és a hepatitis B X-interacting protein (HBXIP) az Apaf-1-kaszpáz-9 interakció megakadályozásával gátolja az apoptózist.^[321-324] Ezekkel szemben más fehérjék, mint a NACHT- and CARD-containing protein (NAC) és a death effector filament-forming Ced4-likeapoptosis protein (DEFCAP) pont, hogy segítik ezt

az interakciót, illetve a nucling fehérjéről ismert, hogy az apoptoszóma stabilitásának növelésével járul hozzá és erősíti az apoptotikus szignálokat.^[325,326]

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

2.11. A kaszpáz-9 expressziója fiziológiás és patológiás 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.^[7,327] A kaszpáz-9 a szervezet szinte minden sejtjében megtalálható és expressziójának zavarai vagy mutációi fejlődési rendellenességekhez, daganatos megbetegedésekhez és degeneratív folyamatokhoz vezetnek.^[226,327]

Transzgén egereken szerzett tapasztalatok alapján a kaszpáz-9 egész testes leütése, bár nem 100%-os penetranciával, de az egerek perinatális korban történő halálához vezet.^[226,327,328] Az embriók vizsgálata során azt találták, hogy legfőképp agyi defektusok alakulnak ki (agyi hiperplázia, melyet az apoptózisra képtelen sejtek, elsősorban neuronok felszaporodása okoz).^[329,330] A kevés megszületett kaszpáz-9 hiányos egérből izolált sejtek (őssejtek, fibroblasztok) jellemzően rezisztensek voltak számos mitokondriális apoptózist kiváltó citotoxikus droggal, illetve UV és γ -sugárzással szemben.^[329,330]

A tumoros transzformáción áteső sejtek egyik jellemző menekülési és túlélési mechanizmusa, hogy gátolja a különféle szabályozott sejthalálútvonalakat. A tüdőt, húgyhólyagot, gyomrot, vastagbelet, végbelet és a hasnyálmirigyet érintő tumorokban is megfigyelték a kaszpáz-9 aktivációjának zavarait vagy egypontos nukleotid polimorfizmusait, melyek funkcióképtelen fehérje expressziójához vezettek, ami egyrészt hozzájárul a daganatos sejtek túléléséhez, másrészt rákterápiás szerekkel szemben mutatott rezisztenciájukhoz is.^[331-335] A fejen és nyakon kialakuló laphámsejtes daganatokban, valamint a heretumorokban az Apaf-1 expressziójának és a kaszpáz-9 aktivitásának defektusait mutatták ki, melyek hozzájárultak a cisplatinnal szemben mutatott rezisztenciához.^[336-338] Egy tanulmány szerint, mely 36 apoptózishoz köthető gént vizsgált, non-Hodgkin limfómák esetén igazolta a kaszpáz-9 csíravonalbeli vagy egypontos nukleotid mutációit.^[339] Egy másik tanulmány is hasonló eredményre vezetett, melyben 1946 non-Hodgkin limfómákban szenvedő beteg és 1808 kontroll mintát hasonlítottak össze, melynek során a 12 kaszpáz gént vizsgálva, azt állapították meg, hogy a kaszpáz-1, kaszpáz-8 és kaszpáz-9 fehérjékben mutációk alakultak ki.^[340]

A stresszindukált apoptózis gátlása mellett a jelátvitel túlműködése is kóros állapotokat idéz elő, mert ilyen esetekben megnő a sejtek érzékenysége az apoptotikus stimulusokkal szemben (csökken az aktivációs küszöbérték) és ennek eredményeként egészséges és még funkcionális sejtek is eliminálódnak.^[341-343] A Huntington-kór a központi idegrendszert érintő olyan 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.^[344]

Ezek az eredmények igazolják, hogy a kaszpáz-9 esszenciális szerepet tölt be a szervezet homeosztázisának fenntartásában. Az embrionális fejlődés kezdetén fontos szerepe van a felesleges sejtek eliminálásában, ugyanakkor a későbbi életkorban is nélkülözhetetlen a túlzott sejtburjánzással járó állapotok elkerülésében.
3. Célkitűzés

Az eddigi nemzetközi eredmények alapján viszonylag jól ismert az extrinsic apoptózis és a nekroptózis kapcsolata: a nekroptózis előfeltétele a kaszpáz-8 hiánya, enzimaktivitásának gátlása, vagy a prokaszpáz-8 aktivációjában részt vevő FADD defektusa.^[19,23,345] A mitokondriális apoptózis és a nekroptózis kapcsolatáról azonban jelenleg nagyon kevés adat áll a rendelkezésünkre. Bár kaszpáz-8 több szubsztrátját (RIPK1, RIPK3, CYLD, TRIF) írták már le, mint a nekroptózis kritikus regulátorát, azonban a legismertebb kaszpáz-8 célpontok, vagyis a downstream kaszpázok funkcióját nekroptózis során szinte alig vizsgálták.^[19,39,97,98] Szakirodalmi adatok alapján a kaszpáz-3 vagy-7 csendesítése nem befolyásolta a TNF receptor aktivációját követő nekroptózis mértékét, de a kaszpáz-9 szerepe a nekroptózis jelátvitelében eddig egyáltalán nem vizsgált terület.^[200]

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

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

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

4. Anyagok és módszerek

4.1. Reagensek

A dolgozatban bemutatott kísérletek során az alábbi reagenseket használtuk fel: Z-VAD (ApexBio, #A1902), Q-IETD-Oph (BioVision, #1176), Cycloheximide (Sigma-Aldrich, #C6255), Necrostatin-1 (Abcam, #ab141053), Necrosulfonamide (Tocris Bioscience, #5025), CCT137690 (ApexBio, #A4132), AR-A014418 (Selleck Chemicals, #S7435), TNFα (BioLegend, #570104), FasL (Enzo Life Sciences, #ALX-522-001-C010), Trail (Enzo Life Sciences, #ALX-522-003-C010), Ionomycin (Sigma-Aldrich, #I0634), H₂O₂ (Sigma-Aldrich, #H1009), LPS (Sigma-Aldrich, #L8643), Flagellin (Sigma-Aldrich, #SRP8029-10UG), Polybrene (Sigma-Aldrich, #H9268), Doxiciklin (Duchefa Biochemie, #D0121), Puromicin (Santa Cruz Biotechnology, #sc-108071), EcoRI-HF (New England Biolabs, #R3101), NotI-HF (New England Biolabs, #R3189), 10x Cutsmart buffer (New England Biolabs, #B7204), Q5 DNS polimeráz (New England Biolabs, #M0491), Q5 Reaction Buffer (New England Biolabs, #B9027), T4 DNS ligáz (New England Biolabs, #M0202), 10X T4 DNA Ligase Reaction Buffer (New England Biolabs, #B0202), dNTP Mix (Thermo Fisher Scientific, #R0191), GatewayTM LR ClonaseTM II Enzyme mix (Thermo Fisher Scientific, #11791020). A IAP antagonista BV6 a Genentech cég ajándéka volt.

4.2. Módszerek

4.2.1. Sejttenyésztés

Kísérleteinkhez JA3 Jurkat (humán T-limfocita), JA3-C9 (kaszpáz-9 negatív Jurkat), JA3 retr (vad típusú kaszpáz-9-cel retranszfektált JA3-C9), MEF (egér embrionális fibroblaszt), MEF-C9 (kaszpáz-9 negatív MEF), HEK 293FT (SV40 T antigénnel transzformált HEK 293 T, humán embrionális vesesejt), WSU (humán B-limfocita) és WSU-FasL (Fas ligandot expresszáló WSU) sejtvonalakat használtunk. A módosított Jurkat, MEF, HEK és WSU sejtvonalak a munkacsoportban már rendelkezésre álltak. A MEF és MEF-C9 sejteket tenyésztő flaskákban DMEM low glucose (Sigma-Aldrich, #D5546) médiumban tenyésztettük 50 μM merkaptoetenollal 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.

4.2.2. Sejthalál mérése

Az áramlási citometriás mérések során mintánként 5×10^5 db sejtet használtunk, melyeket a kísérlet időtartama alatt FACS csövekben (úszó sejtek esetén) vagy sejttenyésztő plateken (letapadó sejteknél) tartottunk, a végső mintatérfogatot 500 µl-re állítottuk be. A sejteket 10-50 µM Z-VAD, 1 µM BV6, 0,4 µg/ml cycloheximide, 2,5 µM CCT137690, 20 µM AR-A014418, 100 ng/ml rekombináns flagellin, 40 uM necrostatin-1, 1 uM necrosulfonamide vagy 7.5 µM GSK'872 kombinációjával 1 órát előkezeltük, majd 30 ng/ml anti-FLAG M2 antitesttel (Sigma-Aldrich, #F1804) keresztkötött FasL-dal, 40 ng/ml anti-FLAG M2 antitesttel keresztkötött Trail-lel, 50 ng/ml humán TNFα-val, 400 μM H₂O₂-dal, 0,74-6,7 μM ionomycinnel, 100 ng/ml LPS-sel aktiváltuk, illetve Cell Tracker Green (Thermo Fisher Scientific; #C7025) fluoreszcens festékkel megjelölt WSU-FasL sejtekkel ko-kultúrában tartottuk, vagy megfertőztük humán herpeszvírus 1-gyel (ATCC-VR-1493). A sejthalál mértékét a citoplazmamembrán integritásának mérésével detektáltuk 24 órával az aktivációt követően, melvhez a mintáinkat 5000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk (letapadó sejtek esetén ezt a lépést megelőzően a sejteket 0,05%-os Trypsin-EDTA segítségével szuszpenzióba vittük), maid a felülúszó eldobása után a seiteket tartalmazó pelletet fellazítottuk és végül minden mintához 300 µl 10 µg/ml-es propidium-jodid (Sigma-Aldrich, #P4170) oldatot adtunk. A propidium-jodid az ép sejtmembrán számára átjárhatatlan, csak a membránintegritás sérülésével (mely a sejthalál sajátsága) képes a sejtekbe jutni, ahol a DNS kis árkához kötődve fluoreszcenciát mérő módszerekkel detektálható.

Hogy a mérés során el tudjuk különíteni a ko-kultúrában tartott Jurkat és WSU-FasL sejteket egymástól, a WSU-FasL sejteket előzetesen megjelöltük 10 ng/ml Cell Tracker Green fluoreszcens festékkel 37 °C-on 30 percen keresztül. A nem kötődött festék alapos kimosását követően 2,5x10⁶ megjelölt WSU-FasL sejtet mértünk hozzá 5x10⁵ darab jelöletlen, előkezelt Jurkat sejthez. A sejthalál intenzitását 24 órával később határoztuk meg propidium-jodid festéssel, csak a Cell Tracker Green negatív populációban.

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

4.2.3. Effektor kaszpázok aktivációjának mérése

A kaszpáz-3 és a kaszpáz-7 enzimaktivitásának méréséhez Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega, #G7792) kitet használtuk. A kísérlethez az előzetesen aktivált Jurkat sejtekből 2x10⁴ db-ot használtunk fel, melyeket mérés előtt 96 lyukú fekete színű sejttenyésztő 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 \pm 20 nm gerjesztési és 528 \pm 20 nm detektálási hullámhosszokat alkalmaztuk.

4.2.4. Életképesség meghatározása CCK8 assay módszerrel

2x10⁴ db Jurkat sejtet 1,25-80 μM CCT137690-el vagy 10-640 μM AR-A014418-cal kezeltünk 96 lyukú sejttenyésztő platen (Sigma-Aldrich, #Z707902-108EA) 24 órán keresztül. A sejtek életképességét Cell Counting Kit–8 (CCK8; ApexBio; #K1018) módszerrel határoztuk meg a gyártó utasításainak megfelelően. Röviden: 100 μl sejtkultúrához 10 μl CCK8 reagenst adtunk, amiket ezt követően 4 órán keresztül termosztátban inkubáltunk. Az abszorbancia mértékét EnVision® 2105 multimode plate reader (PerkinElmer) készülékkel mértük le 450 nm-es hullámhosszon. A kísérletek során a különféle kezelések esetén 4 párhuzamos mintával dolgoztunk és a sejtek életképességét (%) a kontroll mintákhoz viszonyítva adtuk meg.

4.2.5. SDS-PAGE és Western Blot

A stimulációt követően a sejteket összegyűjtöttük és 10⁶ db sejthez 100 µl 2x Laemmliféle 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 főztük és ezt követően a mintákat azonnal felhasználtuk vagy pedig -20 °C-on tároltuk.

Az elkészült lizátumokból 25 μl-t, míg a protein markerből (Thermo Fisher Scientific, #26616) 5 μl-t vittünk fel az előzőleg megöntött és megszilárdult 10%-os poliakrilamid gélre. A futtatást kezdetben 80, majd 110 V-on végeztük összesen 2 órán keresztül elektroforézis futtató pufferben (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS, pH 8.5).

Az elektroforézist követően a mintákat nitrocellulóz membránra blottoltuk (Bio-Rad Laboratories, #1620115), amit 200 mA konstans áramerősségen, 90 percig, 4 °C-on végeztünk transzfer pufferben (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20 % metanol, pH 8,3). A membránt ezt követően TBS-Tween pufferben (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,5) való öblítés után az alábbi TBS-Tween pufferben 1000x-esre hígított elsődleges antitestek egyikével inkubáltuk overnight 4 °C-on: kaszpáz-9 (MBL Life science, #M054-3), RIPK1 (BD Biosciences, #610459), RIPK3 (Cell Signaling Technology, #13526), GSK3β (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 10 percig mostuk TBS-Tween pufferrel, majd 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk tormaperoxidáz enzimmel 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 10 percig az előzőekhez hasonlóan, végül kemilumineszcens reagenssel (Thermo Fisher Scientific, #34580 és #34095) reagáltatva röntgenfilmen hívtuk elő.

4.2.6. Fehérjeinterakciók vizsgálata immunprecipitációval

A kísérlethez mintánként 5×10^7 db Jurkat sejtet használtunk fel, melyeket az aktivációt követően 1500 rpm-en 10 percig centrifugáltunk, majd a pelletet 500 µl 1% Triton X-et (Sigma-Aldrich, #T8787), proteázgátlót (Sigma-Aldrich; #P8340) és foszfatázgátlót (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 mintákat ezt követően 10 percig 15000 rpm-en centrifugáltuk, majd megállapítottuk a fehérje koncentrációjukat melvhez Pierce[™] BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific; #23227) kitet használtunk, a lépéseket a gyártó utasításának megfelelően hajtottuk végre. 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 a szárazra szívott gyöngyökhöz 30 µl 2x Laemmli-féle minta puffert mértünk, majd 5 percig 95 °C-on főztük és ezt követően a mintákat azonnal felhasználtuk vagy pedig -20 °C-on tároltuk. 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).

4.2.7. Plazmidok és konstruktok

A RIP1 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 restrikciós hasítással és szekvenálással is megerősítettünk.

4.2.8. Polimeráz láncreakció

A reakciókhoz szükséges primereket manuálisan terveztük meg az alapvető tervezési szabályok figyelembevételével. A primereket friss TE pufferben (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,0) oldottuk be 100 µM-os koncentrációban, majd ezt követően PCR csőben, a mintákat végig jégen tartva összemértük reakciónként az alábbi mixet, majd a megadott PCR profilt alkalmazva elindítottuk a reakciót:

Templát (500 ng)	változó	<u>PC</u>	<u>R profil:</u>
5X Q5 reakció puffer	20 µl	1,	30 mp 98 °C
100 µM Forward Primer	0,5 µl	2,	ر 10 mp 98 °C −
100 µM Reverse Primer	0,5 µl		30 mp 55 °C > 30 x
10 mM dNTP mix	2 µl		x perc 72 °C
Nukleázmentes víz (NFW)	változó	3,	2 perc 72 °C
Q5 DNS Polimeráz	1 µl	4,	$\infty 4 \ ^{o}C$
Σ	100 µl		

x (ciklusidő) = 20-30 mp/ insert (kilobázis)

A reakció végén a képződött terméket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, melyhez 2 μl terméket, 8 μl nukleázmentes vizet és 2 μl 6x Loading puffert (Thermo Fisher Scientific, #R0621) kevertünk össze, majd vittünk fel a gélre.

4.2.9. PCR termék tisztítása és DNS extrakciója agaróz gélből

A polimeráz láncreakciót követően a képződött PCR terméket a reakció során használt reagensektől NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel; #740609.50) kit segítségével tisztítottuk ki a gyártó utasításának megfelelően.

Restrikciós hasítást követően a hasított DNS fragmenteket a tisztítás előtt először etídium-bromidot nem tartalmazó 1,5%-os agaróz gélen megfuttattuk. A gélt 50 ml 1x-es 50 µl 5 mg/ml-es etídium-bromidot tartalmazó TAE pufferben utófestettük szobahőmérsékleten 20 percig, majd transzilluminátor alatt a megfelelő sávokat steril szikepenge segítségével a gélből

kivágtuk és steril eppendorf csövekbe raktuk, melyek tömegét előtte megmértük. Ezt követően az eppendorf csövek tömegének újbóli megmérésével kiszámítható a hasított mintát tartalmazó agaróz géldarab tömege. A gélből a DNS-t NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel; #740609.50) kit segítségével tisztítottuk ki a gyártó utasításának megfelelően.

4.2.10. Agaróz gélelektroforézis

A PCR reakció után a primereket és a templátot a felhasználni kívánt terméktől, illetve restrikciós hasítást követően a hasadt fragmenteket 1,5%-os agaróz gélen választottuk el egymástól. Ehhez 0,750 g agarózt 50 ml 1x-es TAE pufferben (40 mM Tris, 20 mM ecetsav, 1 mM EDTA) feloldunk mikrohullámú sütőben való melegítéssel, majd mikor az agaróz kézmelegre hűlt, hozzáadtunk 50 µl 0,5 mg/ml-es etídium-bromid oldatot (Sigma-Aldrich, #E7637). A gélre dermedést követően felvittük a mintákat és 5 µl tömeglétrát (Thermo Fisher Scientific, #SM0403), majd 90 mV-on 1,5 óráig futtattuk a gél 2/3-áig.

4.2.11. Restrikciós hasítás

A mintákat PCR csőben mértük össze jégen az alábbiak szerint, majd 37 °C-on, 2 órát inkubáltuk, végül 4 µl 6x Loading puffert adtunk a mintákhoz. A hasítás sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

Templát (200 ng)	változó
10x Cutsmart puffer	10 µl
NFW	változó
Restrikciós enzim	0,2 µl
Σ	20 µl

4.2.12. Ligáz reakció

A reakcióhoz szükséges insert mennyiségét az alábbi képlet segítségével határoztuk meg: [Vektor (ng)+Insert (Kb)/Vektor (Kb)]*[Insert (Mol)/Vektor (Mol)]=Insert (ng)

Vektor (50 ng)	változó
Insert	változó
10x T4 DNS ligáz puffer	2 µl
NFW	változó
T4 DNS ligáz	1 µl
Σ	20 µl

A mintákat PCR csőben jégen összemértük, majd szobahőmérsékleten 5 percet, 4 °C-on overnight inkubáltuk. A kontroll reakcióhoz nem adtunk insertet. Ezt követően mintáinkat kompetens baktériumba transzformáltuk (6 µl minta+100 µl baktérium).

4.2.13. Kompetens baktérium transzformálása

A transzformáláshoz kompetens E. coli DH5α vagy lentivirális célvektorok esetén E. coli Stbl3 törzset használtunk, melyek a munkacsoportban már rendelkezésre álltak. Első lépésben a -70 °C-ról kivett baktériumot 30 percig jégen inkubálva felolvasztottuk, majd egy steril eppendorf csőben összemértünk 100 µl-t az amplifikálandó vektorral, illetve a ligálás vagy rekombinálás utáni mintával. 1 órás jégen történt inkubálást követően hősokkot alkalmaztunk 42 °C-on 80 másodpercig, majd a mintákat jégen pihentettük 2 percig, végül mindegyikhez 1 ml 37 °C-ra előmelegített LB-t (20 g/l Lysogeny broth; Sigma-Aldrich, #L7658) mértünk és 1 órán keresztül 37 °C-on 250 rpm-el rázogatva inkubáltuk. Ezt követően a baktériumokat szelekciós antibiotikumot (50 µg/ml kanamycint vagy 100 µg/ml ampicillint) tartalmazó, 1,5%-os agar (20 g/l Lysogeny broth, 15 g Agar; Sigma-Aldrich, #05040) platere (szélesztettük és overnight növesztettük fejjel lefelé 37°C-os, száraz termosztátban. A kinőtt telepekből a további kísérletek során egyedi telepeket használtunk fel.

4.2.14. Szekvenálás

PCR csőben, a mintákat végig jégen tartva összemértük reakciónként az alábbi elegyet, majd a megadott PCR profilt alkalmazva elindítottuk a reakciót:

Templát (500 ng)	változó	PCR profil:
5x Szekvenáló puffer	5 µl	1, 30 másodperc 96 °C
1,6 µM Primer	2 µl	2, 10 másodperc 96 °C \neg
NFW	változó	5 másodperc 50 °C > 25x
Ready Reaction Mix	1,5 µl	4 perc 60 °C
Σ	20 µl	3, ∞4 °C

A reakció végén a mintákat az UD-GenoMed (Medical Genomic Technologies) Kft. (Debrecen) tisztította és hajtotta végre a kapilláris szekvenálást. A kapott szekvencia adatokat Chromas lite (verziószám: 2.1.1, Technelysium Pty Ltd) programmal elemeztük.

4.2.15. Gateway rekombináció

A Gateway klónozás lehetővé teszi egy Gateway donorvektorban (Entry) lévő insert gyors, egyszerű és nagyon pontos átvitelét egy tetszőleges Gateway célvektorba (Destination), mely rendelkezik a fehérje expressziójához szükséges genetikai elemekkel. A reakciót a gyártó utasításának megfelelően az alábbiak szerint mértük össze PCR csőben, majd 2,5 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk.

Célvektor (150 ng)	változó
Donorvekor (100 ng)	változó
NFW	változó
LR clonase	1 µl
Σ	5 µl

Ezt követően az elegyhez hozzáadtunk 0,5 µl proteinase-K enzimet, mely a reakció leállításáért felelős és 20 percig 37 °C-on inkubáltuk. A mintát végső lépésben kompetens Stbl3 baktériumba transzformáltuk.

4.2.16. 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 sejteket úgy növesztettük, hogy a kísérlet tervezett napjára 70%-os konfluenciát érjenek el. Transzfektálás előtt 6 órával lecseréltük a tápfolyadékot és csak 10 ml komplett DMEM-et adtunk a sejtekhez. A szükséges plazmidokat egy 50 ml-es centrifugacsőbe mértük:

- 22 µg transzferálandó gént tartalmazó lentivirális vektor
- 15 µg pMD2G
- 5 μg psPAX2

Ezt követően a következő reagenseket adtuk hozzá az alábbi sorrendben:

- 1,35 ml steril Milli-Q víz
- 150 µl 2,5 M CaCl₂-oldat

Az elegyhez cseppenként hozzáadtunk 1,5 ml 2x HEBS oldatot (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,0) miközben azt folyamatosan kevertük. Az így kapott oldatot 30 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Állás után 1,5 ml transzfekciós oldatot csepegtettünk egy T75-ös sejttenyésztő edényben lévő HEK 293FT sejtekre. Ezután a sejteket

másnap reggelig inkubáltuk termosztátban (kb. 14-16 óra), majd ezt követően a transzfekciós tápfolyadékot és lecseréltük 10 ml komplett DMEM-re. Az ezt követő 24 és 48 órában gyűjtöttük a sejtekről a vírusokat tartalmazó felülúszókat, melyeket 1500 RPM-el centrifugáltunk 5 percig, 4 °C-on, majd 0,45 µm PVDF fecskendőszűrőn átszűrtük. Az átszűrt felülúszókat vagy azonnal felhasználtuk vagy -70 °C-on tároltuk.

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). Ezután a szelekciós komponenst a felére csökkentettük a médiumban.

4.2.17. Kaszpáz-9 kondícionális leütése egér hasnyálmirigy acinar sejtekben

A kaszpáz-9 "floxolt" egértörzset Dr. Máté Zoltán, Dr. Erdélyi Ferenc és Dr. Szabó Gábor kollaborációs partnereink hozták létre (Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Orvosi Géntechnológiai Részleg, Budapest). Ehhez CRISPR/Cas9 módszerrel két darab loxP szekvencia lett beillesztve a kaszpáz-9 második exonját határoló intronikus régiókba (7. ábra). Az intron régióra specifikus irányító RNS-ek szintetizálása in vitro történt. A loxP szekvenciát hordozó templátok és a homológia alapú rekombinációt (homology directed repair – HDR) lehetővé tevő homológ karok egyszálú oligomerekként (ssODN) lettek szintetizáltatva. A két irányító RNS (50-50 ng/ml), a két ssODN (15-15 ng/ml) és a Cas9 mRNS (TriLink Biotechnologies, 60 ng/ml) FVB/Ant egerek (Jackson Laboratory, FVB.129P2-Pde6b+ Tyrcch/AntJ, #004828) megtermékenyített pronukleuszába lettek injektálva.



7. ábra | Kaszpáz-9 floxolt egértörzs módosítási stratégiája. A két darab beillesztett LoxP hely, a kaszpáz-9 második, mintegy 400 bázispár hosszú exonját határolja. Ez az exon az összes eddig ismert kaszpáz-9 transzkript variánsban megtalálható, így eltávolításával minden variáns expressziója megakadályozható. Amennyiben a

második exon kivágódik, úgy az azt követő exonok kiesnek a helyes "frame"-ből, vagyis a kereteltolódás miatt egy korai stop kodon alakul ki. Így az eredetileg 454 aminosavból álló fehérjéből egy mindössze 73 aminosavból álló termék marad, ami az első 44 aminosavban (első exon) egyezik meg az eredeti fehérjével. Nagy valószínűséggel ez a rövid N-terminális fehérje sem képződik, mivel a "nonsense" mutációt tartalmazó mRNS-ek egy "nonsense mediated mRNA decay" mechanizmussal degradálódnak.

A sikeres beillesztés PCR-ral lett megerősítve (a szekvenciák beillesztése bázistöbbletet okoz, mely specifikus primerekkel detektálható). Végső ellenőrzésként megszekvenáltuk a loxP helyek által közrefogott régiót, ami megerősítette, hogy a módosítás sikeres volt. Ezt követően az eddig használt FVB/Ant egértörzset (mely már hordozta a loxP helyeket) nyolc generáción át visszakereszteztük C57BL/6J egerekkel (Jackson Laboratory, C57BL/6J, #000664). Erre a lépésre azért volt szükség, mert ezt követően a kaszpáz-9 floxolt egereket hasnyálmirigy acinar sejt specifikus tamoxifen indukálható rendszerű, Cela1 promóter transzkripciós szabályozása alatt álló Cre rekombinázt expresszáló egértörzzsel (Jackson Laboratory, Tg(Cela1-cre/ERT)1Lgdn/J, #025736) kereszteztük, mely szintén C57BL/6J hátterű **(8. ábra)**. A későbbi kísérletek során loxP homozigóta és cre heterozigóta állatokat használtunk.



8. ábra | A kaszpáz-9 floxolt és a szövetspecifikus Cre rekombinázt expresszáló egerek keresztezése. A kaszpáz-9 hasnyálmirigy acinar sejt specifikus deléciójához a floxolt egereket olyan egértörzzsel kereszteztük, melyben a cre rekombináz, az acinar sejtekben aktív Cela1 promóter transzkripciós kontrollja alatt áll. A későbbi kísérletek során LoxP/ LoxP homozigóta, Cre/ 0 heterozigóta állatokat használtunk.

A kísérleti állatokat általános állatázi 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).

4.2.18. Akut pankreatitisz modell

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

A Cre rekombináz expressziója 125 mg/testtömeg-kilogramm tamoxifen (5 mg/ml napraforgó olajban oldva) orális adásával (gavage) lett indukálva 5 egymást követő napon keresztül. Ezt követően nyolc órán át, óránként 50 mg/testtömeg-kilogramm cerulein (Bachem; #H-3220) intraperitoneális adásával történt az akut pankreatitisz kiváltása **(9. ábra).** Az állatokat 12 óra múlva túlaltatással termináltuk, majd ezt követően vér- és szövetmintákat gyűjtöttünk.



9. ábra | Kaszpáz-9 kondícionális leütése, valamint az akut pankreatitisz kiváltásának sematikus ábrája. A Cre rekombináz expressziójához az egereket 125 mg/testtömeg-kilogramm tamoxifennel kezeltük 5 napon keresztül. Az akut pankreatitiszt a hatodik napon 50 mg/testtömeg-kilogramm cerulein intraperitoneális adásával váltottuk ki, melyből minden egér összesen nyolc dózist kapott óránként. Az állatokat az első adag ceruleint követően 12 óra múlva túlaltatással termináltuk.

A gyűjtött vérmintákból a szérumot centrifugálással izoláltuk (4 °C-on, 2500 RCF-en, 15 percig), 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 metszettük kriosztáttal, melyet hematoxilin-eozin festés követett. A gyulladásos sejtek infiltrációját, a nekrózis és ödéma mértékét három független kutató értékelte (0-5 pontos skálán).

4.2.19. Immunfluoreszcens jelölés

A kaszpáz-9 hasnyálmirigy acinar sejtekben való leütésének sikerességét Dr. Pallagi Petra, Tél Bálint és Dr. Maléth József kollaborációs partnereink mutatták ki (Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. számú Belgyógyászati Klinika és Népegészségtani Intézet, MTA-SZTE Lendület Epitél Sejt Szignalizáció és Szekréció Kutatócsoport).

Ehhez először 125 mg/testtömeg-kilogramm tamoxifen 5 egymást követő napon keresztül történő adásával indukáltuk a Cre rekombináz expresszióját, majd az állatokat túlaltatással termináltuk. Ezt követően hasnyálmirigy szövetmintákat izoláltunk, melyeket Shandon Cryomatrix médiumban (ThermoFisher Scientific, #6769006) lefagyasztottunk és kriosztáttal (Leica CM 1860 UV) 7 µm-es darabokra metszettünk. 4% paraformaldehid fixálást és blokkolást követően a mintákat 100x-osra hígított kaszpáz-9 specifikus antitesttel (Abcam, #ab202068) jelöltük overnight 4 °C-on. Másodlagos antitestként Alexa Fluor 488 konjugált IgG antitestet (ThermoFisher Scientific, #61034) használtunk, a sejtmagot Hoechst-33342 festékkel (ThermoFisher Scientific, #62249) jelöltük. Fluoromount mounting médiummal (Sigma-Aldrich, #F4680) való fedést követően a képeket Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal készítettük 40x-es olaj immerziós objektívet használva (Zeiss, NA: 1.4).

4.2.20. Fehérje izolálás hasnyálmirigy szövetmintákból

A fehérje izolálást cerulein kezelt és a kezeletlen egerek hasnyálmirigyéből Dr. Pallagi Petra, Tél Bálint és Dr. Maléth József kollaborációs partnereink valósították meg (Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. számú Belgyógyászati Klinika és Népegészségtani Intézet, MTA-SZTE Lendület Epitél Sejt Szignalizáció és Szekréció Kutatócsoport).

Az állatokat a cerulein kezelést követően 12 óra múlva túlaltatással termináltuk, majd ezt követően izoláltuk a hasnyálmirigyet, amit ezt követően szikepengével apró darabokra vágtunk. A hasnyálmirigy szövetdarabokat ezt követően 1 ml proteázgátló koktéllal (EASYpack Protease Inhibitor Cocktail; Roche; #05892970001) kiegészített RIPA pufferben (Merck Millipore; #20-188) lizáltuk. Az így kapott mintát jégen tartva szonikálással (Branson Sonifier SFX150) homogenizáltuk, majd 4 °C-on 3500 rpm-en 10 percig centrifugáltuk. Az így kapott felülúszót "snap-freeze" módszerrel gyorsfagyasztottuk, majd felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

4.2.21. Statisztikai analízis

A kísérleti adatok statisztikai elemzésére kétszempontos varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk Tukey post-hoc teszttel. 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.

5. Eredmények

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

Az extrinsic apoptózis dominanciája a nekroptózis felett régóta ismert, de a mitokondriális apoptózis és a nekroptózis kapcsolatának mechanizmusáról jelenleg nagyon kevés adat áll a rendelkezésünkre. A kaszpáz-8-at, mint a nekroptózis legfőbb gátlóját tartják számon, de a mitokondriális apoptózis iniciátor kaszpázának, a kaszpáz-9-nek a nekroptózisban betöltött szerepét még senki nem vizsgálta.

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 **(10/A ábra)**.

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 az irodalmi modelleknek megfelelően a RIPK1 ubiquitinálását végző IAP fehérjék lebomlását elősegítő IAP antagonistával (BV6) is előkezeltük.^[346,347] A sejthalál nekroptózis voltát egy specifikus nekroptózis gátló, a necrostatin-1 (Nec1) adásával igazoltuk, melyről ismert, hogy a RIPK1-hez szelektíven kötődik és azt egy inaktív konformációban tartja, ezáltal egyrészt megakadályozza, hogy interakcióba léphessen más fehérjékkel, másrészt gátolja annak a kináz aktivitását is, ami így képtelen foszforilálni a RIPK3-at, ennek következtében pedig a downstream jelátviteli lépések sem jöhetnek létre.^[50,348] A Z-VAD, IAP antagonista, illetve a Nec1, valamint ezek kombinációi sejthalálligandok nélkül sem itt, sem a további kísérletekben nem okoztak mérhető különbségeket a kezeletlen, kontroll sejtekhez képest (nem mutatott adatok).

Az előkezeléseket követően a sejteket TNF (10/B ábra), FasL (10/C ábra) vagy Trail (10/D ábra) sejthalál ligandok adásával aktiváltuk 24 órán keresztül.



10. ábra | **A kaszpáz-9 hiánya gátolja a sejthalálligand indukálta nekroptózist humán Jurkat sejteken.** (A) Az ábrákon feltüntetett fehérjék expresszióját western blot segítségével igazoltuk. Az ábra három független kísérlet egyikét mutatja. (B) JA3, JA3-C9 és JA3 retr sejteket 10 μ M Z-VAD, 1 μ M BV6 és 38,5 μ M Nec1 kombinációjával 1 órát előkezeltük, majd 50 ng/ml TNF (TBZ), (C) anti-flag ellenanyaggal (M2) keresztkötött 30 ng/ml FasL (FBZ) vagy (D) anti-flag ellenanyaggal (M2) keresztkötött 40 ng/ml Trail liganddal (TrBZ) 24 órán keresztül inkubáltuk. A sejtek életképességének mértékét PI festéssel detektáltuk áramlási citométerben, Az oszlopokon látható szórást három különálló kísérlet eredményeiből számoltuk, a szignifikanciát kétutas faktoriális ANOVA-val határoztuk meg. Az ábrákon látható szignifikanciaszinteket az alábbiak szerint ábrázoltuk: **P <0,001; ***P <0,005, ****P <0,001.

A kísérlet eredményeként jól látszik, hogy mindhárom sejthalálligand adásával nagyarányú nekroptózis indukálódott a vad típusú sejteken, azonban a kaszpáz-9 hiányában ez a hatás nem volt megfigyelhető. A kaszpáz-9 retranszfekciójával sikerült helyreállítanunk a sejtek érzékenységét mindhárom stimulussal szemben. A kiváltott sejthalált a Nec1 teljesen gátolta, igazolva ezzel a sejthalál nekroptózis voltát. Kaszpázaktivitás a Z-VAD-dal kezelt minták esetében sem itt, sem a további kísérletekben nem volt megfigyelhető (nem mutatott adatok). Összegzésképpen tehát megállapítható, hogy a kaszpáz-9 esszenciális szerepet tölt be a sejthalálreceptorok aktivációjával kiváltott nekroptózis jelátvitelében humán Jurkat sejteken.

5.2. A IAP antagonista nélkül kiváltott nekroptózis is kaszpáz-9 függő folyamat

Munkánk következő szakaszában IAP antagonista segítsége nélkül kívántunk nekroptózist indukálni, hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy a kaszpáz-9 esetleg befolyásolja a BV6 működését. A nekroptózis indukálása azonban relatíve magas halálligand koncentrációt igényel, aminek oka elsősorban a Z-VAD használata.

Ismert, hogy a FasL-ot nagy arányban expresszáló sejtek erősebb sejthalál stimulust indukálnak, mint a rekombináns ligandumok, feltehetően a receptorok nagyfokú keresztkötését előidézve.^[349,350] Ezért a JA3 és JA3-C9 sejteket az előkezelést követően Fas ligandot expresszáló WSU-FasL sejtvonallal (wFasL) ko-kultúrában tartottuk 24 órán át **(11. ábra)**. Ahhoz, hogy a target, Jurkat sejtjeinket el tudjuk különíteni a WSU sejtektől és specifikusan csak a rájuk jellemző sejthalált tudjuk detektálni, az utóbbi sejtvonalat megfestettük "Cell Tracker Green" fluoreszcens festékkel. Ezt követően már csak a Jurkat sejtekből származó propidium-jodid fluoreszcenciát vettük alapul. A Fas ligandot nem expresszáló WSU sejtekkel ko-kultúrában tartott Jurkat sejtek életképessége nem csökkent a kontroll, ko-kultúra nélküli sejtekhez képest (nem mutatott adat).



11. ábra | A kaszpáz-9 IAP antagonista nélkül indukált nekroptózisban is esszenciális. JA3 és JA3-C9 sejtvonalakat 10 μ M Z-VAD és 38,5 μ M Nec1 kombinációjával 1 órát előkezeltük, majd 2,5x10⁶ darab Cell Tracker Green fluoreszcens festékkel jelölt WSU-FasL sejttel (wFZ) 24 órán keresztül inkubáltuk. A sejthalál mértékét PI festéssel detektáltuk áramlási citométerben. Az oszlopokon látható szórást három különálló kísérlet eredményeiből számoltuk, a szignifikanciát kétutas faktoriális ANOVA-val határoztuk meg. Az ábrán látható szignifikanciaszinteket az alábbiak szerint ábrázoltuk: **P <0,01; ***P <0,005.

A grafikonokon jól látszik, hogy IAP antagonista nélkül is jelentős sejthalál indukálódott a vad típusú sejteken, míg ez a hatás kaszpáz-9 hiányában nem volt megfigyelhető. A vad típusú sejteken kialakult nekroptózis itt is gátolható volt Nec1-gyel. Eredményeink alapján tehát a IAP antagonista nélkül is indukálható nekroptózis, mely az eddigiekkel összhangban szintén kaszpáz-9 függőnek bizonyult.

5.3. Nekroptózis aktiválása kaszpáz-8 gátló segítségével Jurkat sejteken

Az apoptotikus útvonalak során aktiválódó kaszpáz-8 az egyik legkorábban azonosított nekroptózis regulátor molekula, mely aktivációját követően képes elhasítani a nekroptózis

kulcsmolekuláit (RIKP1, RIPK3, CYLD), megakadályozva ezzel, hogy párhuzamosan fusson a tolerogén apoptózis és az immunogén nekroptózis.^[26,97,98] Kísérleti adatok szerint nekroptózis csak abban az esetben jöhet létre, ha a kaszpáz-8 aktivitása gátolt. Mivel kísérleteink során Z-VAD-ot, egy pán-kaszpáz gátlót használtunk, így felmerülhet a gyanú, hogy az általunk tapasztalt kaszpáz-9 pronekroptotikus funkció egy Z-VAD közvetített aspecifikus hatás eredménye. Ennek kizárására, a sejtek előkezelése során Z-VAD-ot vagy Q-IETD-Oph-t (egy specifikus kaszpáz-8 gátlót) használtunk, BV6 és necrosulfonamide (NSA, specifikus MLKL inhibitor) mellett. A nekroptózist az előkezeléseket követően TNF receptor aktiválásával váltottuk ki (**12. ábra**).



12. ábra | A teljes spektrumú kaszpázgátló és a specifikus kaszpáz-8 gátló használatával is indukálható nekroptózis vad típusú Jurkat sejteken. JA3 és JA3-C9 sejtvonalakat 10 μ M Z-VAD (TBZ), 10 μ M Q-IETD-Oph (TBQ), 1 μ M BV6 és 1 μ M NSA kombinációjával 1 órát előkezeltük, majd 50 ng/ml TNF liganddal 24 órán keresztül inkubáltuk. A sejthalál mértékét PI festéssel detektáltuk áramlási citométerben. Az oszlopokon látható szórást három különálló kísérlet eredményeiből számoltuk, a szignifikanciát kétutas faktoriális ANOVA-val határoztuk meg. Az ábrán látható szignifikanciaszinteket az alábbiak szerint ábrázoltuk: ****P <0,001.

Az ábrán látható, hogy a TNF és BV6 stimulus mind a teljes spektrumú kaszpázgátlót (TBZ) mind pedig a kaszpáz-8 gátlót tartalmazó kezelést (TBQ) követően nekroptózis kialakulásához vezetett a JA3 sejteken. A vártnak megfelelően kaszpáz-9 hiányában egyik stimulus sem volt képes nekroptózist előidézni. Ezeken túlmenően mindkét kezeléssel kiváltott sejthalál sikeresen gátolható volt NSA-dal, ami igazolja, hogy a kezelések nekroptózis kialakulásához vezettek. A kísérlet igazolja, hogy nekroptózis kiváltásához teljes spektrumú kaszpázgátló és kaszpáz-8 specifikus gátló is egyaránt használható.

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

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a sejthalálreceptorok kaszpázgátlók jelenlétében nekroptózist indukálnak egér fibroblaszt sejteken.^[351] 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 (13/A ábra). Ezt követően a sejteket a szokásos módon Z-VAD, BV6 és Nec1 kombinációjával előkezeltük, majd ezt követően TNF-fel (13/B ábra) vagy FasL-dal (13/C ábra) 24 órán keresztül inkubáltuk. Az előzőekhez hasonlóan, MEF sejteken is szerettünk volna nekroptózist indukálni IAP antagonista nélkül. Ennek érdekében egyes mintákban az előkezelés során BV6 helyett fehérjeszintézis gátlót (CHX) is adtunk alacsony koncentrációban, melyre azért volt szükség, mert a jelátviteli útvonalat a sejthalál felé tolja el. (13/D ábra).



13. ábra | **A kaszpáz-9 az egér fibroblaszt sejteken indukált nekroptózisban is esszenciális.** (A) Az ábrákon feltüntetett fehérjék expresszióját western blot segítségével igazoltuk. Az ábra három független kísérlet egyikét mutatja. (B) MEF és MEF-C9 sejteket 10 μM Z-VAD, 1 μM BV6 és 38,5 μM Nec1 kombinációjával 1 órát előkezeltük, majd 20 ng/ml TNF-fel (TBZ) vagy (C) anti-flag ellenanyaggal (M2) keresztkötött 40 ng/ml FasL-dal (FBZ) 24 órán keresztül inkubáltuk. (D) MEF és MEF-C9 sejteket 10 μM Z-VAD, 0,4 μg/ml CHX és 38,5 μM Nec1 kombinációjával 1 órát előkezeltük, majd 40 ng/ml TNF-fel (TCZ) 24 órán keresztül inkubáltuk. A sejthalál mértékét PI festéssel detektáltuk áramlási citométerben. Az oszlopokon látható szórást három különálló

kísérlet eredményeiből számoltuk, a szignifikanciát kétutas faktoriális ANOVA-val határoztuk meg. Az ábrákon látható szignifikanciaszinteket az alábbiak szerint ábrázoltuk: *P <0,05; **P <0,01; ***P <0,005, ****P <0,001.

A Jurkat sejtekkel összhangban itt is azt tapasztaltuk, hogy mind a IAP antagonista jelenlétében, mint pedig annak hiányában történt aktiváció során a kaszpáz-9 negatív sejtek 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.

5.5. 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 sejtaktivációhoz, RIPK1 függő és független apoptózishoz, illetve nekroptózishoz is. A RIPK1 függő apoptózis előfeltétele, hogy a RIPK1 deubiquitinált állapotban legyen, ennek érdekében a következőkben IAP antagonista jelenlétében és kaszpázgátló hiányában indukáltunk RIPK1 függő apoptózist és vizsgáltuk, hogy befolyásolja-e a mértékét a kaszpáz-9 hiánya, vagy sem. A bal oldali grafikonon a kaszpáz aktivációt tüntettük fel (14/A ábra), míg a jobb oldali grafikon a sejthalál intenzitását mutatja (14/B ábra).



14. ábra | IAP antagonista jelenlétében indukált apoptózis kaszpáz-9 független folyamat. (A) JA3 és JA3-C9 sejteket 1 μM BV6 és 38,5 μM Nec1 kombinációjával 1 órát, majd 50 ng/ml TNF-fel (TB) 24 órán keresztül inkubáltuk. A sejthalál mértékét PI festéssel detektáltuk áramlási citométerben. (B) Az apoptózis aktivációját az effektor kaszpázok (kaszpáz-3 és -7) aktivációjának mérésével igazoltuk, fluoreszcens kaszpáz szubsztrátot használva. Az oszlopokon látható szórást három különálló kísérlet eredményeiből számoltuk, a szignifikanciát kétutas faktoriális ANOVA-val határoztuk meg. Az ábrákon látható szignifikanciaszinteket az alábbiak szerint ábrázoltuk: ****P <0,001.

TNF receptor aktivációja IAP antagonista jelenlétében jól látható módon erőteljes effektor kaszpáz aktivációhoz vezetett, így 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.^[352] Igazoltuk tehát, hogy a RIPK1 függő apoptózisban nem játszik szerepet a kaszpáz-9.

5.6. Az ionomycin és a hidrogén-peroxid indukált nekrózis kaszpáz-9 független

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy a kaszpáz-9 csak a nekroptózisra van-e hatással, vagy pedig általánosságban képes a nekrózis szabályozására JA3 és JA3-C9 sejteket ionomycin, illetve hidrogén-peroxid kezelésnek vetettük alá.

Az ionomycin kalcium ionofórként ismert, intracelluláris kalciumfüggő jelátviteli folyamatok tanulmányozásában széleskörűen használják. Míg alacsony koncentrációban (<250 nM) apoptózist indukál, addig mikromólos koncentrációja már a sejtet érő ozmotikus stressz miatt klasszikus nekrózishoz vezet (15/A ábra).^[353] Az ionomycin mellett, a hidrogénperoxidról is ismert, hogy képes mindkét útvonalat bekapcsolására Jurkat sejteken, az általunk választott 400 μM-os dózisban bizonyítottan mitokondriális apoptózis és nekrózis is kialakul párhuzamosan (15/B ábra).^[354]



15. ábra | Az ionomycin és a hidrogén-peroxid kaszpázgátló jelenlétében nekrózist indukál kaszpáz-9 jelenlétében és hiányában is. (A) JA3 és JA3-C9 sejteket 1 órát előkezeltük 10 μ M Z-VAD-dal, majd az ábrán feltüntetett dózisú ionomycinnel vagy (B) 400 μ M hidrogén-peroxiddal 24 órán át inkubáltuk. A sejthalál mértékét PI festéssel detektáltuk áramlási citométerben. Az oszlopokon látható szórást három különálló kísérlet eredményeiből számoltuk, a szignifikanciát kétutas faktoriális ANOVA-val határoztuk meg. Az ábrákon látható szignifikanciaszinteket az alábbiak szerint ábrázoltuk: *P <0,05; **P <0,01; ***P <0,005, ****P <0,001.

Látható, hogy az alkalmazott magas dózisú ionomycin nagy arányú nekrózis kialakulásához vezetett a Jurkat sejteken és annak mértékét nem befolyásolta a kaszpáz-9 hiánya. A mitokondriális apoptózis iniciátoraként jól ismert a kaszpáz-9 szerepe és ezzel összhangban, apoptózist (kaszpáz gátló nélkül kialakuló sejthalál komponenst) csak a vad típusú sejteken indukált a H₂O₂, az kaszpáz-9 hiányában nem jöhetett létre. Kaszpázgátló adásával, a H₂O₂ hatására csakis nekrózis képes kialakulni, mely ugyanakkora volt mindkét sejten, tehát látható, hogy ez a nekroptózissal szemben nem kaszpáz-9 függő sejthalál folyamat.

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

Ismert, hogy a sejthalálreceptorok mellett a mintázatfelismerő receptorok aktiválásával is nekroptózis indukálható.^[71] Ennek általánosan elfogadott modellje fibroblaszt sejtek LPS-sel való kezelése kaszpázgátló jelenlétében. Ezért a következőkben MEF és MEF-C9 sejteket kaszpázgátlóval történő előkezelést követően LPS-sel aktiváltuk (**16/A ábra**). A

szakirodalomban több olyan intracelluláris patogén ismert, melyek fertőzése a nekroptózis aktivációjához vezet. Kísérleteinkben az eredeti sejtszámhoz képest tízszeres mennyiségű herpes simplex vírussal fertőztük meg a MEF és MEF-C9-es sejteket Z-VAD-dal történt előkezelést követően (16/B ábra). A sejtek fertőzése szérummentes médiumban történt 1 órán keresztül, majd pedig ezt követően a médiumot komplett DMEM-re cseréltük és a mintákat 24 órát inkubáltuk termosztátban.



16. ábra | **A kaszpáz-9 szerepet játszik a Toll-like receptorok indukálta nekroptózisban is.** (A) MEF és MEF-C9 sejtvonalakat 50 μM Z-VAD-dal 1 órát előkezeltük, majd 100 ng/ml LPS-sel (B) vagy 10-szeres mennyiségű HSV-1-gyel 24 órán keresztül inkubáltuk. A sejthalál mértékét PI festéssel detektáltuk áramlási citométerben. Az oszlopokon látható szórást három különálló kísérlet eredményeiből számoltuk, a szignifikanciát kétutas faktoriális ANOVA-val határoztuk meg. Az ábrákon látható szignifikanciaszinteket az alábbiak szerint ábrázoltuk: ***P <0,005, ****P <0,001.

Látható, hogy 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 nem expresszáló párjukon elmaradt. Sikerült tehát bebizonyítanunk, hogy nem csak a sejthalálreceptorok jelátvitelében, de egy teljesen más receptorcsalád esetén is fontos szerephez jut a kaszpáz-9 nekroptózis indukciójakor.

5.8. A TLR5 aktiváció hatása a nekroptózisra

A mintázatfelismerő receptorokról leírák, hogy aktivációjukat követően képesek a sejtaktiváció mellett kaszpáz-8 függő apoptózist, valamint ezek mellett még nekroptózist is indukálni, ha a prokaszpáz-8 aktivációja valami miatt nem jöhet létre. A TLR3 és TLR4 jelátvitelében kulcsszerepet játszó TRIF adapter fehérje a RIPK1 és RIPK3 kinázokhoz hasonlóan tartalmaz RHIM interakciós domént, mely kaszpáz-8 aktivitás hiányában mintegy hídként szolgálva képes összekapcsolni a RIPK1 és RIPK3 fehérjéket, ezáltal indukálni egy nem klasszikus nekroszóma összeszerelődését.^[69,71] Az MYD88-at használó TLR-ek és a nekroptózis kapcsolata azonban jelenleg még nem teljesen ismert.

Kutatócsoportunk arra volt kíváncsi, hogy a TLR5 receptor aktivációja befolyásolja-e a sejthalálreceptorok indukálta apoptózist, képes-e szinergisztikus módon növelni annak szintjét, valamint, hogy ez a hatás mely molekulán, mely útvonalon keresztül valósul meg. Ezért JA3 és

RIPK1 deficiens Jurkat sejteket (JA3-RIPK1) rekombináns flagellinnel 1 órát előkezeltük, majd ezt követően FasL-dal (17/A ábra), TNF-fel (17/B ábra) vagy fitohemagglutininnel aktivált T-sejtek felülúszójával (17/C ábra) 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.

Ezeken túl kíváncsiak voltunk arra is, hogy a TLR5 és a Fas receptorok ko-aktivációja milyen hatással van a nekroptózis kialakulásra. Ennek megfelelően a rekombináns flagellinnel előkezelt JA3 sejteket Z-VAD és Nec1 kombinációjával 1 órát termosztátban inkubáltuk, majd WSU-FasL sejtvonallal ko-kultúrában tartottuk 24 órán át (17/D ábra).



17. ábra | **Rekombináns flagellin előkezelés RIPK1 függő módon növeli sejthalálreceptor indukált apoptózis és nekroptózis mértékét.** (A) Vad típusú és RIPK1 deficiens Jurkat sejteket 100 ng/ml rekombináns flagellinnel 1 órát előkezeltük, majd anti-flag ellenanyaggal (M2) keresztkötött 20 ng/ml FasL, (B) 10 ng/ml TNF vagy (C) fitohemagglutininnel aktivált T-sejtek felülúszójával aktiváltuk 24 órán keresztül (D) JA3 sejteket 100 ng/ml rekombináns flagellinnel 1 órát előkezeltük, majd 10 μM Z-VAD és 38,5 μM Nec1 kombinációjával további 1 órát inkubáltuk termosztátban, végül 2,5x10⁶ darab Cell Tracker Green fluoreszcens festékkel jelölt WSU-FasL sejttel 24 órán keresztül ko-kultúrában tartottunk. A sejthalál mértékét PI festéssel detektáltuk áramlási citométerben, a sejthalál nekroptózis voltát a specifikus inhibitor segítségével igazoltuk. Az oszlopokon látható szórást három különálló kísérlet eredményeiből számoltuk, a szignifikanciát kétutas faktoriális ANOVA-val határoztuk meg. Az ábrákon látható szignifikanciaszinteket az alábbiak szerint ábrázoltuk: *P <0,05; ***P <0,005.

A kaszpázgátlót kapott mintákon nekroptózis alakult ki, melynek mértékét az apoptotikus mintákhoz hasonlóan szintén tovább tudta növelni a rekombináns flagellinnel történt előkezelés. A necrostatin-1 előkezelés megakadályozta a nekroptózis kialakulását flagellin jelenlétében és hiányában is, igazolva, hogy ezeken a mintákon bizonyítottan nekroptózis indukálódott. A flagellinnek önmagában nem volt citotoxikus hatása sem Z-VAD jelenlétében, sem annak hiányában. Ezen eredmények alátámasztják, hogy a flagellinnel történő elkőkezelés elősegíti mind az apoptózis mind pedig a nekroptózis kialakulását humán Jurkat sejteken.

5.9. A kaszpáz-9 jelátvitelben betöltött helyének meghatározása

Kutatómunkánk során sikerült bebizonyítanunk több sejtvonalon is, változatos stimulusokat követően, hogy a kaszpáz-9 fontos szerepet játszik a nekroptózis folyamatában. A következő lépésként fel szerettük volna térképezni, hogy kaszpáz-9 a nekroptózis jelátvitelében pontosan hol helyezkedik el az eddig ismert komponensekhez képest, illetve kötődik-e annak valamely eleméhez, elemeihez.

5.9.1. A kaszpáz-9 interakciós partnereinek felderítése immunprecipitációval

Mivel nekroptózis csak kaszpázgátolt körülmények között valósulhat meg, ezért feltételeztük, hogy a kaszpáz-9 a jelátvitelben, enzimaktivitásának hiányában, mint adapter fehérje vesz részt. Elsőként vizsgáltuk, hogy a kaszpáz-9-hez kötődik-e a nekroptózis jelátviteli gerincét képző nekroszóma valamely kezdeti komponense, vagyis a RIPK1, RIPK3 és az MLKL. Ezért a JA3 sejteket Z-VAD és IAP antagonista kombinációjával előkezeltük, majd TNF liganddal aktiváltuk. Az aktivációt követően több időpontban vizsgáltuk immunprecipitáció segítségével a fehérjék közötti interakciókat (18/A, B ábra).



18. ábra | **Nekroptózis stimuláció hatására a kaszpáz-9 a RIPK3-hoz kapcsolódik.** (A) JA3 sejteket 10 μM Z-VAD és 1 μM BV6 kombinációjával 1 órát előkezeltük, majd 50 ng/ml TNF liganddal aktiváltuk a jelzett időtartamokig. Anti-RIPK3-mal vagy (B) anti-kaszpáz-9-cel végzett immunprecipitációt követően a gyöngyökön lévő fehérjéket western blottal mutattuk ki. Az ábrák három független kísérlet egyikét mutatják.

Bár nem tudtunk kimutatni semmilyen interakciót a kaszpáz-9 és a RIPK1, illetve kaszpáz-9 és az MLKL között (nem mutatott adatok), de megfigyelhető egy gyenge és tranziens kapcsolat a kaszpáz-9 és a RIPK3 között, mely az aktivációt követő 3 óránál tetőzött (18/A ábra). Ezt a kötődést a RIPK3 antitesttel végzett immunprecipitáció is megerősítette (18/B ábra), igazolva, hogy a kaszpáz-9 nekroptózis során képes a RIPK3-mal kapcsolatba kerülni.

5.9.2. 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 vesze a kaszpáz-9 a nekroszóma összeszerelődésének szabályozásában, vagyis befolyásolja-e a RIPK1-RIPK3 kapcsolat kialakulását, valamint az ezt követő foszforilációt. Ezért a kaszpázgátló és IAP antagonista kombinációjával előkezelt JA3 és JA3-C9 sejteken nekroptózist váltottunk ki TNFR aktivációjával. A RIPK1-RIPK3 fehérjék között lévő interakciót immunprecipitációval vizsgáltuk (19/A, B ábra), az aktivációjuk kinetikáját pedig foszfospecifikus antitestek segítségével határoztuk meg (19/C, D ábra).



19. ábra | A kaszpáz-9 hiánya gátolja a RIPK1-RIPK3 kapcsolat kialakulását és az ezt követő foszforilációs lépéseket (A) JA3 és JA3-C9 sejteket 10 μ M Z-VAD és 1 μ M BV6 kombinációjával 1 órát előkezeltük, majd 50 ng/ml TNF liganddal aktiváltuk. Anti-RIPK1-gyel vagy (B) anti-RIPK3-mal végzett immunprecipitációt követően a gyöngyökön lévő fehérjéket western blottal mutattuk ki. (C-D) JA3 és JA3-C9 sejteket 10 μ M Z-VAD és 1 μ M BV6 kombinációjával 1 órát előkezeltük, majd 50 ng/ml TNF liganddal aktiváltuk. A RIPK1 (S166) és RIPK3 (S227) foszforilációját teljes lizátumokból western blottal mutattuk ki. Az ábrák három független kísérlet egyikét mutatják.

Eredményeink szerint míg a TNF aktiváció hatására 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.

5.9.3. RIPK1, RIPK3 indukálható overexpressziója

5.9.3.1.Konstruktok létrehozása és a sejtvonalak kialakítása

Annak érdekében, hogy megerősítsük a kaszpáz-9 nekroptózis jelátvitelében betöltött pozícióját, overexpresszálni szerettük volna a vad típusú és kaszpáz-9 hiányos sejtekben a RIPK1-et és RIPK3-at, mivel ilyen sejtvonalak használatával igazolható, hogy ezen komponensek a kaszpáz-9-től upstream, illetve downstream helyezkednek-e el.

Ehhez először beklónoztuk a RIPK1, valamint a RIPK3 szekvenciáit a pENTR4F-FLAG Gateway donorvektorba (Entry) EcoRI és NotI restrikciós hasítóhelyeket használva. A klónozás sikerességét restrikciós hasítással (20. ábra) és szekvenálással is megerősítettük.



20. ábra | A hasított vektor és insertek ellenőrzése. A létrehozott konstruktokból 200 ng-ot EcoRI-HF és NotI-HF enzimekkel 37 °C-on 2 óriáig inkubáltunk, majd 1,5 %-os 0,5 µg/ml-es koncentrációban etídium-bromidot tartalmazó agaróz gélen megfuttattuk 70 V-on 1,5 órán keresztül. A sávokat transzilluminátor alatt vizsgáltuk.

Az ellenőrzés során megbizonyosodhattunk róla, hogy mindkét insert sikeresen beligálódott a PENTR4F-FLAG vektorba, valamint méretük is megfelelt a vártnak (RIPK1-2016 bp, RIPK3-1557 bp). Ezt a szekvenálás kiértékelése is megerősítette, valamint azt is igazolta, hogy az amplifikálási és klónozási folyamatok során nem sérültek a szekvenciák és nem keletkeztek bennük mutációk sem. A következő lépésben átrekombináltuk a RIPK1 és RIPK3 szekvenciáját a pCW57.1 lentivirális Gateway célvektorba (Destination).

A Gateway klónozás szekvencia specifikus rekombináción alapszik, mely homológ szekvencák között zajlik (AttL-AttR vagy AttB-AttP) és lehetővé teszi insertek gyors, hatékony és biztonságos mozgatását donor/ belépő (Entry) és cél (Destination) vektorok között. Irodalmi

adatok alapján ismert, hogy a nekroptotikus molekulák túlzott mértékű kifejeződése képes beindítani a nekroptózist, ezért a RIPK1 és RIPK3 overexpresszióját mindenképpen indukálható rendszerben terveztük megvalósítani.^[98,355,356]

A rekombinálás során a Gateway® LR Clonase® II enzimkeverék katalizálja az *in vitro* rekombinációt pENTR4F (amely tartalmazza az AttL szekvenciát) és a pCW57.1 célvektor között (amely attR helyeket tartalmazza). Ezek mellett a vektor tartalmaz egy Tet-On rendszert, mely a Tet represszor protein (TetR) és a tet operátor (TetO) DNS elemeken alapul, melyek lehetővé teszik a génexpresszió aktiválását tetraciklin – vagy származékaik, például doxiciklin – hatására **(21. ábra)**.



21. ábra | A pCW57.1 lentivirális célvektor térképe. (https://www.addgene.org/41393/) Az általunk választott lentivektor három nagyon fontos tulajdonsággal is rendelkezik: 1) Mint Gateway vektor rendelkezik AttR szekvenciákkal, melyek közé átrekombinálható a célgén szekvenciája. 2) Lentivirális vektorként rendelkezik a lentivírusok létrehozásához szükséges összes genetikai elemmel, valamint több más az expressziós hatékonyságot növelő járulékos szekvenciával is. 3) Mint "All-in-one Tet-On" vektor tartalmazza az indukálható expresszióhoz szükséges genetikai elemeket is (rtTA, TRE promóter, TetO). Használatával egy lépésben létrehozható a célgén indukálható expresszióját lehetővé tevő rendszer (régebbi vektorok esetén ezeket az elemeket egy külön vektor tartalmazta).

A rekombinációt követően az elkészült plazmidot betranszformáltuk kompetens Stbl3 baktériumba, és ampicillint tartalmazó agar plate-re szélesztettük. A kinőtt egyedi telepekből ezt követően izoláltuk a kész konstrukokat, melyeket ezt követően restrikciós hasítással (22. ábra) és szekvenálással is ellenőriztünk.



22. ábra | **A rekombinálás hatékonyságának ellenőrzése.** A konstruktokból 200 ng-ot EcoRI-HF és NotI-HF enzimekkel 37 °C-on 2 óriáig inkubáltuk, majd 1,5 %-os 0,5 μg/ml-es koncentrációban etídium-bromidot tartalmazó agaróz gélen megfuttattuk 70 V-on 1,5 órán keresztül. A sávokat transzilluminátor alatt vizsgáltuk.

Az agarózgélről készült képeken látható, hogy mindkét fehérje szekvenciája sikeresen átrekombinálódott a pCW57.1 vektorba és minden sáv megfelelő magasságban volt látható. A rekombináció sikerességét a szekvenálás is megerősítette és igazolta, hogy a szekvenciák épek, bennük sem mutáció, sem pedig extra bázisok nem találhatóak. Ezt követően történt a vírustermelés és a sejtvonalak kialakítása. Ennek során a JA3 és a JA3-C9 sejteket megfertőztük a konstruktjainkat hordozó vírusfelülúszóval, majd elkezdtük a sejtek szelektálását 0,4 µg/ml puromicinnel. A szelekciót addig folytattuk, míg a nem transzdukált sejtek el nem pusztultak, a fertőzöttek pedig fel konfluenssé nem váltak.

5.9.3.2. Az overexpresszió tesztelése a létrehozott sejtvonalakon

Az antibiotikum szelekción átesett sejteken ezt követően leteszteltük a fehérjék indukálható expresszióját. Ehhez fertőzött és nem fertőzött JA3 és JA3-C9 sejteket 24 és 48 órás doxiciklin kezelésnek vetettünk alá, majd western blottal vizsgáltuk a RIPK1 (23/A ábra) és RIPK3 fehérjék (23/B ábra) expresszióját.



23. ábra | **A RIPK1 és RIPK3 indukálható overexpressziójának tesztelése** Fertőzött és nem fertőzött JA3 és JA3-C9 sejteket 2 μg/ml doxiciklinnel aktiváltuk 24 és 48 órán keresztül. A fehérjék expresszióját teljes sejtlizátumból western blot segítségével igazoltuk. Az ábra három független kísérlet egyikét mutatja.

Míg a nem fertőzött sejteken a doxiciklin adása nem volt hatással a RIPK1 és a RIPK3 expressziójára, addig a fertőzött és szelekción átesett sejtekben nagy arányú expressziót okozott, már 24 órával az aktivációt követően, ami igazolja, hogy sikeres volt a sejtvonalak kialakítása.

5.9.3.3.A RIPK1 és RIPK3 overexpressziója helyreállítja a nekroptózist

Miután sikerült igazolnunk az általunk létrehozott rendszer működését, arra a kérdésre kerestük a választ, hogy ezen fehérjék overexpressziója, hogyan befolyásolja a nekroptózist a kaszpáz-9 hiányos sejtekben. 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 váltottuk ki a nekroptózist (24. ábra).



24. ábra | **A RIPK1 és RIPK3 overexpressziója helyreállítja JA3-C9 sejteken a nekroptózist.** (A) RIPK1 vagy (B) RIPK3 konstrukttal fertőzött és nem fertőzött JA3 és JA3-C9 sejteket 2 μg/ml doxiciklinnel aktiváltunk 1 nappal az aktiváció előtt, majd 10 μM Z-VAD és 1 BV6 antagonista kombinációjával 1 órát előkezeltük, ezt követően 50 ng/ml TNF-fel 24 órán aktiváltuk. A sejthalál mértékét PI festéssel detektáltuk áramlási citométerben. Az oszlopokon látható szórást három különálló kísérlet eredményeiből számoltuk, a szignifikanciát kétutas

faktoriális ANOVA-val határoztuk meg. Az ábrákon látható szignifikanciaszinteket az alábbiak szerint ábrázoltuk: *P <0,05; **P <0,01; ****P <0,001.

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, aminek hatására 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.

5.9.4. A kaszpáz-9 nekroptotikus funkciójának felderítése

Sikeresen igazoltuk, hogy a kaszpáz-9 a nekroptózis kezdeti lépéseit szabályozza, de mivel csak egy gyenge és átmeneti interakció figyelhető meg közte és a RIPK3 között, ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy hatását vélhetően más, a nekroszóma összeszerelődését szabályozó molekulákon keresztül fejti ki. Az AURKA a nekroptózis negatív regulátoraként ismert, mely szubsztrátjával a GSK3ß-vel képes megakadályozni a RIPK1-RIPK3 és a RIPK3-MLKL kapcsolat kialakulását.^[123]

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

Irodalmi adatok szerint az AURKA és szubsztrátja a GSK3ß fontos szabályozóként működnek a sejtekben, hogy stimuláció hiányában ne alakulhasson ki spontán nekroptózis. Publikációk szerint AURKA gátlása, expressziójának csökkentése vagy a GSK3ß gátlása is spontán nekroptózishoz vezet.^[123]

Annak vizsgálatához, hogy az AURKA szerepet játszik-e a nekroptózis kaszpáz-9 általi szabályozásában, első lépésként a kaszpáz-9-AURKA kapcsolatot vizsgáltuk meg. Ehhez a JA3 és JA3-C9 sejteken TNF liganddal, Z-VAD-dal és BV6-tal nekroptózist aktiváltunk, majd a sejtek lizálását követően a fehérjék között lévő interakciókat immunprecipitációval vizsgáltuk (25/A, B ábra), míg az AURKA foszforilációjának az ellenőrzése foszfospecifikus antitestek segítségével történt (25/C ábra).



25. ábra | Nekroptózis aktivációja a kaszpáz-9-AURKA kapcsolat kialakulásához és az AURKA foszforilációjához vezet. (A) JA3 és JA3-C9 sejteket 10 μ M Z-VAD és 1 μ M BV6 kombinációjával 1 órát előkezeltük, majd 50 ng/ml TNF liganddal aktiváltuk. Anti-AURKA vagy (B) anti-C9 specifikus antitesttel végzett immunprecipitációt követően a gyöngyökön lévő fehérjéket western blottal mutattuk ki. (C) JA3 és JA3-C9 sejteket 10 μ M Z-VAD és 1 μ M BV6 kombinációjával 1 órát előkezeltük, majd 50 ng/ml TNF liganddal aktiváltuk. Anti-AURKA vagy (B) anti-C9 specifikus antitesttel végzett immunprecipitációt követően a gyöngyökön lévő fehérjéket western blottal mutattuk ki. (C) JA3 és JA3-C9 sejteket 10 μ M Z-VAD és 1 μ M BV6 kombinációjával 1 órát előkezeltük, majd 50 ng/ml TNF liganddal aktiváltuk. Az AURKA (T288) foszforilációját teljes lizátumokból western blottal mutattuk ki. Az ábrák három független kísérlet egyikét mutatják.

TNF aktiváció hatására a AURKA specifikus antitesttel végzett immunblotton határozottan megjelenik a kaszpáz-9 sávja a ligand adását követő 3-6 órán belül. Ezt a kapcsolatot a kaszpáz-9 immunprecipitációs blott is megerősíti, igazolva, hogy sikeresen azonosítottuk a kaszpáz-9-et, mint az AURKA egy eddig ismeretlen interakciós partnerét. Az AURKA foszforilációját vizsgálva látható, 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.

5.9.4.2.AURKA és GSK3ß 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 GSK3ß-nek a gátlása kaszpáz-9 jelenlétében és hiányában a sejthalálreceptor indukálta nekroptózis kialakulását. Felmerülhet ugyanis, hogy a kaszpáz-9 nélkül az AURKA-GSK3ß spontán nekroptózis kialakulását biztosító háttérgátló funkció abnormálisan túlműködhet, ami a kaszpáz-9 hiányos sejtek nekroptózis rezisztenciáját okozhatja.

Ehhez először vizsgáltuk a AURKA és a GSK3ß gátlókszerek dózisfüggését Jurkat sejteken, hogy megtaláljuk azt a koncentrációt, mely még nem toxikus a sejtek számára. JA3

és JA3-C9-es sejteket emelkedő dózisú AURKA (26/A, B ábra), illetve GSK3β gátlóval (26/C, D ábra) kezeltük 24 órán keresztül termosztátban.



26. ábra | **Magas dózisban alkalmazva az AURKA és GSK3ß gátlók növelik a sejtek citotoxicitását**(A) JA3 és JA3-C9 sejteket 1,25-80 μM CCT137690-nel (AURKA gátló), illetve (B) 10-640 μM AR-A014418-cal (GSK3ß gátló) kezeltük 24 órán keresztül. A sejthalál mértékét PI festéssel detektáltuk áramlási citométerben (A, C), az életképességet CCK8 módszerrel határoztuk meg (B, D), a sejtek életképességét (%) a kontroll mintákhoz viszonyítva adtuk meg. Az oszlopokon látható szórást három különálló kísérlet eredményeiből számoltuk.

A mérések eredményeként látható, hogy mindkét mérési módszer esetén alacsony dózisú AURKA (<2,5 μ M), illetve GSK3ß gátló használata (<20 μ M) nem csökkentette érdemben a sejtek életképességét, azonban magas dózisban alkalmazva mind az AURKA (<2,5 μ M), mint pedig a GSK3ß (<20 μ M) gátló az irodalmi adatoknak megfelelően sejthalál kialakulásához vezetett.^[123] Így a további kísérleteink során az AURKA gátlót 2,5 μ M-os, míg a GSK3ß gátlót 20 μ M-os dózisban alkalmaztuk.

A következőkben megvizsgáltuk, hogy befolyásolja-e a TNF, IAP antagonista és kaszpázgátló adásával aktivált nekroptózis mértékét az AURKA (27/A ábra), vagy GSK3ß gátlókkal történő előkezelés (27/B ábra). Bár publikált adatok szerint az AURKA és a GSK3ß gátlása is nekroptózishoz vezet, de szerettük volna több specifikus nekroptózis inhibitororral is igazolni, hogy AURKA és a GSK3ß gátlószerek jelenlétében valóban nekroptózis alakul ki nem pedig valamely más sejthalálforma. Ennek érdekében a kezelések során Nec1, NSA vagy egy specifikus RIPK3 gátló (GSK872) adásával egészítettük ki a kezeléseket.



27. ábra | **AURKA és GSK3ß gátlók helyreállítják a nekroptózist kaszpáz-9 hiányában.** (A) JA3 és JA3-C9 sejteket 10 μ M Z-VAD, 1 μ M BV6, 1 μ M NSA, 38,5 μ M Nec1, 7,5 μ M GSK872, 2,5 μ M CCT137690 (A), illetve 20 μ M AR-A014418 (B) kombinációjával 1 órát előkezeltük, ezt követően 50 ng/ml TNF-fel 24 órán át aktiváltuk. A sejthalál mértékét PI festéssel detektáltuk áramlási citométerben. Az oszlopokon látható szórást három különálló kísérlet eredményeiből számoltuk, a szignifikanciát kétutas faktoriális ANOVA-val határoztuk meg. Az ábrákon látható szignifikanciaszinteket az alábbiak szerint ábrázoltuk: ***P <0,005, ****P <0,001.

Ez a kezelés nagyarányú nekroptózis kialakulásához vezetett a vad típusú sejteken, míg ugyanez a kaszpáz-9 hiányában továbbra sem indukált nekroptózist. AURKA és a GSK3ß 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. Fontos eredmény, hogy mind a három specifikus nekroptózis gátló (Nec1, NSA, GSK872) sikeresen gátolta az AURKA és a GSK3ß gátlók jelenlétében és hiányában is a sejthalált, igazolva, hogy az általunk használt stimulusok mindegyike valóban nekroptózis kialakuláshoz vezetett.

Ezen eredmények arra utalnak, hogy a kaszpáz-9 az AURKA-GSK3ß útvonal ellen hatva elősegíti a nekroptózis létrejöttét és az AURKA-GSK3ß nekroptózist gátló szabályzó mechanizmus kaszpáz-9 hiányában túlműködik.

5.9.5. A kaszpáz-9 szerepének megerősítése in vivo

Eddigi kísérleteink során sikerült igazolnunk, hogy a kaszpáz-9 esszenciális része a nekroptózis jelátvitelének, azonban ezt a hatást eddig csak in vitro körülmények között sikerült bizonyítanunk. További kísérleteink során a nemzetközi szakirodalomban már jól ismert nekroptózis modellt átvéve indukáltunk nekroptózist egér acinar sejtekben.

5.9.5.1.A kaszpáz-9 kondícionális leütése egér hasnyálmirigy acinar sejteken

Mivel a 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.^[18,104,196] Mivel azonban a

kaszpáz-9 egész testes leütése az egerek embrionális halálához vezet, ezért sejt specifikus deléciót valósítottunk meg tamoxifen indukálható rendszerben.

Az egerek létrehozását, majd keresztezését követően első lépésben ellenőriztük a kaszpáz-9 indukálható leütését. Ehhez az egereket 5 napon keresztül tamoxifennel kezeltük, majd az állatokat túlaltatással termináltuk. Az izolált a hasnyálmirigy szövetmintákból, a kaszpáz-9 expresszióját immunfluoreszcens festéssel mutattuk ki **(28. ábra)**.



28. ábra | **Kaszpáz-9 szövetspecifikus expressziójának csökkentése.** A kaszpáz-9 deléciójához a Cre rekombináz expresszióját 125 mg/testtömeg-kilogramm tamoxifen orális adásával indukáltuk 5 egymást követő napon keresztül. Az izolált hasnyálmirigy szövetmintákon a kaszpáz-9 leütés sikerességét immunfluoreszcens jelöléssel vizsgáltuk. Ehhez másodlagos antitestként Alexa Fluor 488 konjugált IgG antitestet használtunk (zöld), a sejtmagot Hoechst-33342 (kék) festékkel jelöltük. A képeket Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal készítettük 40x-es olaj immerziós objektívet használva. Méretarány vonal = 100 μm.

A hasnyálmirigyből készült metszeteken a jelölés igazolja, hogy míg a vad típusú állatokban jelentős kaszpáz-9 expresszió figyelhető meg, addig a kaszpáz-9 deficiens egerekben szinte teljesen megszűnt az expressziója, csak a kék színnel jelölt sejtmagok láthatók. Sikerült tehát létrehoznunk a kaszpáz-9 hasnyálmirigy acinar sejtekben történő specifikus delécióját egy tamoxifen indukálható rendszerben, mely alkalmasnak bizonyult a további kísérletek elvégzésére, vagyis a kaszpáz-9 nekroptózisban betöltött funkciójának in vivo igazolására.

5.9.5.2.Kaszpáz-9 nekroptotikus funkciójának igazolása akut pankreatitisz modellben

A kaszpáz-9 in vivo funkciójának igazolásához összehasonlítottuk a cerulein indukálta akut pankreatitisz súlyosságát vad típusú egerekben és hasnyálmirigy acinar sejt specifikus kaszpáz-9 leütését követően. A kísérlethez 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 (8. ábra). A kontroll csoportot cerulein helyett fiziológiás sóoldattal kezeltük, az állatokat 12 óra múlva túlaltatással termináltuk. A pankreatitisz tüneteinek súlyosságát hematoxilin-eozin festett hasnyálmirigy metszeteken vizsgáltuk (29/A ábra), melyek alapján meghatároztuk a

nekrotikus területek százalékát (29/B ábra), a kialakult ödéma nagyságát (29/C ábra) és a szövetek közé infiltrálódott fehérvérsejtek számának mértékét (29/D ábra). Az állatokból gyűjtött vérmintákban pedig ezzel párhuzamosan meghatároztuk a szérumban lévő amiláz aktivitását is, mely az akut hasnyálmirigy-gyulladás egyik indikátora (29/E ábra).



29. ábra | Kaszpáz-9 expressziójának csökkentése enyhíti a cerulein indukálta akut pankreatitisz tüneteit hasnyálmirigy acinar sejteken. (A) Az akut pankreatitisz kiváltása 125 mg/ttKg tamoxifen kondícionálást követően nyolcszori, óránként történő 50 mg/ttKg cerulein adásával történt. Az állatok 12 óra múlva történő terminálását követően a szövetmintákból készült metszeteket hematoxilin-eozinnal festettük. (B-D). A nekrotikus terület nagyságát, az ödéma mértékét és a gyulladásos sejtek infiltrációját három független kutató értékelte 5 pontos skálán. (E) A gyűjtött vérmintákból a szérum amiláz aktivitást kolorimetriás kittel határoztuk meg. Az oszlopokon látható szórást három különálló kísérlet eredményeiből számoltuk, a szignifikanciát kétutas faktoriális ANOVA-val határoztuk meg. Az ábrákon látható szignifikanciaszinteket az alábbiak szerint ábrázoltuk: *P <0,05; **P <0,01; ****P <0,001. Méretarány vonal= 100 µm.

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 sejtekben a kaszpáz-9 leütése 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 nekrózis 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.

5.9.5.3.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 szerettük volna, hogy az egerek cerulein kezelése valóban nekroptózis és nem pedig más sejthalálforma kialakulását idézte elő.^[18,196] Ennek értekében a kezeléseket követően gyűjtött pankreasz szövetmintákból fehérjeizolálást követően megvizsgáltuk a RIPK1 és RIPK3 aktivációját, foszfospecifikus antitestek segítségével **(30. ábra)**.



30. ábra | A cerulein kezelés hatására kaszpáz-9 függő módon megemelkedett a RIPK1 és RIPK3 fehérjék foszforilációja. (A) Az akut pankreatitisz kiváltása 125 mg/ttKg tamoxifen kondícionálást követően nyolcszori, óránként történő 50 mg/ttKg cerulein adásával történt. Az állatok 12 óra múlva történő terminálását követően a hasnyálmirigy szövetmintákból teljes sejtlizátumot készítettünk, melyben a RIPK1 (S166) vagy (B) RIPK3 (Thr231/Ser232) fehérjék foszforilációját western blottal mutattuk ki. Az ábrák három független kísérlet egyikét mutatják.

A blottokon látható, hogy a cerulein kezelés nagymértékű RIPK1 és RIPK3 aktivációhoz vezetett a vad típusú egerekben a kontroll, fiziológiás 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.
6. 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 nekrózis), 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 **(31. ábra)**.



31. ábra | **Az eddig megismert szabályozott sejthalálformák nevezéktana.** A külső vagy belső térből érkező zavarok hatására az eukarióta sejtekben a több lehetséges sejthalálprogram közül egy aktiválódik, mely végül a sejt pusztulásához vezet. A sejthalálformák mindegyike egy egyedi jelátviteli útvonalon keresztül vezet a sejt eliminálásához, melynek során a program függvényében széles határok között változhat a sejt morfológiája, gyulladás kialakulása, valamint az immunológiai kimenete is.

Egyre több tudományos bizonyíték van arra vonatkozólag is, hogy az egymástól gyakran teljesen eltérő sejthalálfolyamatokat végrehajtó, igen szerteágazó jelátviteli folyamatok jóval több ponton kapcsolódnak egymáshoz, mint ahogyan azt korábban feltételeztük.^[3] 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.^[357,358] A nekroptózisra, nagyon sokszor még mindig mint az apoptózis tartalék útvonalaként tekintenek. Azonban egy rákterápiás szer, a shikonin önmagában képes az apotózist megkerülve, direkt módon nekroptózist elindítani a sejtben, amit Nec1 előkezeléssel át lehet fordítani apoptózissá, így ebben az esetben az apoptózis válik a tartalák útvonallá.^[359] 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 prokaszpáz-8 aktiválódása az extrinsic apoptózishoz köthető, addig ugyanez a fehérje képes az inflammaszóma összeszerelődését előidézve piroptózist is indukálni.^[360] Hasonló módon, egér csontvelői makrofágokon ugyanaz az LPS kezelés a IAP-ok és a kaszpáz-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 kaszpáz-8 együttes gátlásakor).^[361] Mind a négy esetben érdekes módon nagyon hasonló komplexek szerelődnek össze melyekben közös molekulák vesznek részt. A mitokondriális apoptózis iniciátoraként felfedezett kaszpáz-9-ről is igazolták már, hogy rendelkezik más, nem apoptotikus funkciókkal, valamint hogy szerepet kap autofágia során is.^[362-365] Publikált adatok szerint, Fas ligand és kaszpázgátló vagy citotoxikus T-sejtek által kiváltott nekrotikus sejthalál mértéke is alacsonyabb kaszpáz-9 hiányos sejtekben.^[366,367]

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy van-e bármilyen szerepe a kaszpáz-9-nek a nekroptózis jelátvitelében. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy sikerült bizonyítanunk több sejtvonalon is, hogy kaszpáz-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.^[368,369]

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.^[16] 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.^[370] 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.^[49] Az általunk kapott adatok 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.[104,371] 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.^[372] 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.^[373] Az AURKA fehérjéről ismert, hogy a sejtosztódásban játszott szerepén túl, a RIPK1-nek és a RIPK3-nak is az interakciós partnere és szubsztrátjával, a GSK3B-vel együttműködve a nekroptózis egyik negatív szabályozója.^[123] Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy módosul-e kaszpáz-9 hiányában az AURKA/ GSK3ß 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 GSK3ß gátlása is képes volt helvreállítani a kaszpáz-9 hiánvos seiteken 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 (32. ábra).

Bizonyos sejthalál típusok képesek a környező sejtek, szövetek gyulladásos válaszának kiváltására. Az ilyen "lítikus" sejthalálfolyamatok közös jellemzője, hogy a citoplazmamembrán integritásának megszűnésével rengeteg DAMP szabadul ki a környező szövetbe.^[374] A DAMP-ok normál esetben a sejtek belsejében találhatóak és mind szerkezetileg, mind funkcionalitás szempontjából nagyon változatos molekulák. Egészséges körülmények között a sejtek életfolyamataihoz 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.^[375,376]



32. ábra | **A kaszpáz-9 szerepe nekroptózisban.** A sejtek halálát több, egymással szorosan együttműködő sejthalálprogram hajtja végre. Az extrinsic apoptózis dominanciája a nekroptózis felett fontos a nem kívánt gyulladás elkerülésében. Eredményeink szerint a mitokondriális apoptózis iniciátor kaszpáza, a kaszpáza-9 esszenciális szerepet tölt be a sejthalál- és mintázatfelismerő receptorok aktivációja során kialakuló nekroptózisban. Így a kaszpáz-9 döntő szereppel bírhat a mitokondriális apoptózis és a nekroptózis közötti átmenet szabályozásában és a sejthalál tolerogen/ immunogén kimenetének eldöntésében.

A sejthalál lehet a következménye, de ugyanakkor az oka is a kialakult gyulladásnak. A legismertebb, DAMP keletkezéssel járó sejthalálforma a nekrózis, melynek során a membrán felszakadása miatt nagyon változatos DAMP-ok szabadulnak fel.^[374] Ugyanakkor ismertek olyan DAMP-ok, melyek csak egy-egy bizonyos sejthalál típus (nekroptózis, apoptózis, ferroptózis, piroptózis és netózis) kialakulására jellemzőek, így az egyes sejthalálformák másmás útvonalon vezethetnek gyulladás kialakulásához. Apoptózis például a kromatin kondenzálódása és a DNS fragmentációja következtében főképp sejtmag eredetű fehérjék kiszabadulásához vezet.^[377] A neutrofil extracelluláris csapdák (NET) közelében jellemzően antimikrobiális peptideket és nukleáris fehérjéket találni.^[375,378] A DAMP-ok vizsgálata lehetőséget adhat a különféle sejthalálok elkülönítésére is. Apoptotikus sejtekből kijutó DNS fragmentek mérete jellemzően 180 bázispár körül mozog, míg nekrózis során ezek akár 10 000 bp hosszúak is lehetnek.^[379] A piroptózis során kikerülő HMGB1 jellemzően hiperacetilált, míg ez nem figyelhető meg sem apoptózis sem nekroptózis során, de a HMGB1 redox állapota is nagyon beszédes lehet: piroptotikus sejtekben jellemzőn diszulfid állapotban van, nekrózis során megfigyeltek teljesen redukált és diszulfid formát is, míg apoptózis során kizárólag a teljesen oxidált (szulfonil) HMGB1-et találni.^[380]

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.^[381] Egy szervezetben épp zajló fertőzéskor a gyulladt szövetben ott találjuk a PAMP-ok és DAMP-ok mellett az aktiválódott immunseitek által termelt citokineket és sejthalálligandokat is (TNF, FasL).^[382-384] 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 a jelen lévő PAMP-ok és esetleg DAMP-ok miatt.^[382,385,386] Éppen ezért, bár igen gyakori jelenség, de jelenleg még nem teljesen tisztázott, hogy a mintázatfelismerő és a sejthalálreceptorok egyidejű aktivációja milven hatással van a sejthalálfolyamatokra. Ismert, hogy a rekombináns flagellin vagy flagellint expresszáló baktériumok jelenléte gátolja az apoptózist neutrofil és endotél sejteken, míg ez a hatás nem volt megfigyelhető flagellin hiányos baktériumot használva.^[387-389] Ugyanakkor arra is van bizonvíték, hogy a flagellin képes az apopotózis kiváltására humán primer makrofágokon, valamint HeLa és vékonvbél epitél seiteken.^[389-391] Munkánk során megvizsgáltuk, hogy a TLR5 receptor aktivációja hatással van-e a sejthalálreceptorok jelátvitelére. Eredményeink szerint a flagellin képes növelni a TNF, FasL vagy az aktivált Tsejtek felülúszója által aktivált apoptózis és a FasL indukálta nekroptózis mértékét. Mivel ezt a jelenséget csak RIPK1-et expresszáló sejtekben tudtuk detektálni, így ez arra utal, hogy a TLR5 aktivációja a RIPK1 függő sejthalálútvonalakat képes felerősíteni.

A veszély eliminálását követően nagyon fontos lépés a gyulladási 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.^[381] Nagyon sok külső és belső testfelszínt, mint például a béltraktust (Crohn betegség, colitis ulcerosa) vagy bőrt (ekcéma, pszoriázis) érintő betegség közös jellemzője a krónikus gyulladás. A reumás megbetegedések, mint szisztémás lupusz eritematózus, reumatoid artritisz, pszoriázisos artritisz, oszteoartritisz, spondilitisz ankilopoetika (Bechterew kór) vagy a köszvény patomechanizmusát vizsgálva is gyakran ott találni a kiváltó okok között a krónikus gyulladást.^[381] 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 transzgén egérben is sikerült már igazolni.^[16] 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.^[18,196,205] 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 virális fertőzések, daganatok kialakulása).^[16] 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 gyulladáshoz 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 közöttti párbeszéd megismeréséhez és ez által közelebb kerültünk a krónikus gyulladással járó állapotok hatékonyabb kezeléséhez.

7. Összefoglalás

A sejthalálnak kiemelt szerepe van a degeneratív megbetegedések, autoimmun folyamatok, krónikus gyulladással 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, gyulladással 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 szerekkel 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 gyulladással járó állapotok, a mitokondriális apoptózisban résztvevő 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 ugyanazon 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 jelátvitele 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 kaszpáz-9 hiányos sejtek nekroptózis érzékenységét és képes volt a kaszpáz-9 általi szabályozás megkerülésére. Ismert, hogy az AURKA-GSK3ß útvonal gátolja a nekroszóma összeszerelődését. Kísérleteinkben az AURKA-nak vagy a szubsztrátjának, a GSK3ß-nek a gátlása helyreállította a nekroptózist a kaszpáz-9 hiányos sejtekben. Ez arra utal, hogy a kaszpáz-9 és az AURKA által irányított jelátviteli útvonalak egymásra hatva szabályozzák a nekroptózist. Eredményeink szerint tehát sikerült azonosítanunk a kaszpáz-9-cet, mint a nekroptózis egy új, eddig nem ismert szabályozóját, mely ígéretes terápiás célpontként szolgálhat a sejthalálfolyamatok immunológiai kimenetelének befolyásolásában.

8. Summary

Cell death has a fundamental impact on the evolution of degenerative disorders, autoimmune processes, inflammatory diseases, tumor formation and immune surveillance. Over the past couple of decades extensive studies have uncovered novel cell death pathways, which are independent of apoptosis. Among these is necroptosis, a tightly regulated, inflammatory form of cell death. Based on current data, necroptosis serves as a backup mechanism when death receptor-induced apoptosis is inhibited or absent. Several substrates of Caspase-8 have been documented as critical regulators of necroptosis (such as RIPK1, RIPK3 and CYLD), however the necroptotic role its most well-known substrates, the downstream caspases, have been only marginally studied. As the most widely studied initiator caspase, Caspase-9 is a key player in the intrinsic or mitochondrial apoptotic pathway which is involved in many various stimuli, among them hypoxia, radiation and chemotherapeutic agents. Deficiencies in the Caspase-9 activation has profound physiological and pathophysiological outcomes, leading to degenerative diseases, developmental defects and even cancer.

Despite the huge clinical potential of switching between cell death modalities to avoid the unwanted inflammatory outcome of cell death in various inflammatory diseases, the necroptotic role of the proteins involved in mitochondrial apoptosis has not been investigated. Here we demonstrated for the first time that the stimulation of several death and pattern recognition receptors induced necroptosis under caspase-compromised conditions in wild type, but not in Caspase-9 negative human Jurkat and murine MEF cells. It is reasonable to assume that the common molecules of different cell death signals regulate the transition for one cell death form to another and thus Caspase-9 poses an attractive target for pharmacological interventions. We checked the role of Caspase-9 in one of the most intensely studied inflammatory disorders, acute pancreatitis. According to our results, cerulein-induced pancreatitis was significantly reduced in mice with acinar cell restricted Caspase-9 gene knockout. The signaling pathway of necroptosis is regulated on multiple levels, from the transcription, to the stability and posttranslational modifications of the necrosome components, to the availability of molecular interaction partners and the localization of RIPK1, RIPK3 and MLKL. We demonstrated that the absence of Caspase-9 led to impaired association of RIPK1 and RIPK3 and resulted in decreased phosphorylation of RIP kinases. RIPK3 dimerization is the most critical points of necroptosis induction and increased expression of RIPK3 can induce its oligomerization and can initiate necroptosis. Here we have shown that the overexpression of RIPK1 or RIPK3 restored the necroptosis sensitivity of Caspase-9 deficient cells and can bypass Caspase-9-mediated regulation of necroptosis. It has been published that AURKA-GSK3ß axis downregulates necrosome formation. Inhibition of either AURKA or its known substrate, GSK3ß restored necroptosis sensitivity of Caspase-9 deficient cells, indicating an interplay between Caspase-9 and AURKA-mediated pathways to regulate necroptosis. Our findings suggest that Caspase-9 acts as a newly identified regulator of necroptosis and thus Caspase-9 provides a promising therapeutic target to manipulate the immunological outcome of cell death.

9. Irodalomjegyzék

- 1 Kroemer, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation* **16**, 3-11, doi:10.1038/cdd.2008.150 (2009).
- 2 Sender, R. & Milo, R. The distribution of cellular turnover in the human body. *Nat Med* **27**, 45-48, doi:10.1038/s41591-020-01182-9 (2021).
- 3 Galluzzi, L. *et al.* Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell death and differentiation* **22**, 58-73, doi:10.1038/cdd.2014.137 (2015).
- 4 Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Kepp, O. & Kroemer, G. Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cell Mol Life Sci* **73**, 2405-2410, doi:10.1007/s00018-016-2209-y (2016).
- 5 Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation* **25**, 486-541, doi:10.1038/s41418-017-0012-4 (2018).
- 6 Haanen, C. & Vermes, I. Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 64, 129-133, doi:10.1016/0301-2115(95)02261-9 (1996).
- 7 Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**, 495-516, doi:10.1080/01926230701320337 (2007).
- 8 Conradt, B. Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annu Rev Genet* **43**, 493-523, doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091533 (2009).
- 9 Kepp, O. *et al.* Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* **3**, e955691, doi:10.4161/21624011.2014.955691 (2014).
- 10 Galluzzi, L., Buque, A., Kepp, O., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol* **17**, 97-111, doi:10.1038/nri.2016.107 (2017).
- 11 Yatim, N. *et al.* RIPK1 and NF-kappaB signaling in dying cells determines crosspriming of CD8(+) T cells. *Science* **350**, 328-334, doi:10.1126/science.aad0395 (2015).
- 12 Kaczmarek, A., Vandenabeele, P. & Krysko, D. V. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* **38**, 209-223, doi:10.1016/j.immuni.2013.02.003 (2013).
- 13 Tang, D., Kang, R., Berghe, T. V., Vandenabeele, P. & Kroemer, G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell research* **29**, 347-364, doi:10.1038/s41422-019-0164-5 (2019).
- 14 Rudolf, E. & Cervinka, M. Cytoskeletal changes in non-apoptotic cell death. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **49**, 123-128 (2006).
- 15 Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. & Vandenabeele, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 135-147, doi:10.1038/nrm3737 (2014).
- 16 Molnar, T. *et al.* Current translational potential and underlying molecular mechanisms of necroptosis. *Cell death & disease* **10**, 860, doi:10.1038/s41419-019-2094-z (2019).
- 17 Vanlangenakker, N., Vanden Berghe, T. & Vandenabeele, P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell death and differentiation* **19**, 75-86, doi:10.1038/cdd.2011.164 (2012).
- 18 He, S. *et al.* Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* **137**, 1100-1111, doi:10.1016/j.cell.2009.05.021 (2009).
- 19 Holler, N. *et al.* Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature immunology* **1**, 489-495, doi:10.1038/82732 (2000).

- 20 Zhao, J. *et al.* Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 5322-5327, doi:10.1073/pnas.1200012109 (2012).
- 21 Cai, Z. *et al.* Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nature cell biology* **16**, 55-65, doi:10.1038/ncb2883 (2014).
- 22 Chen, X. *et al.* Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell research* **24**, 105-121, doi:10.1038/cr.2013.171 (2014).
- Vercammen, D. *et al.* Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *The Journal of experimental medicine* 187, 1477-1485, doi:10.1084/jem.187.9.1477 (1998).
- 24 Ch'en, I. L., Tsau, J. S., Molkentin, J. D., Komatsu, M. & Hedrick, S. M. Mechanisms of necroptosis in T cells. *The Journal of experimental medicine* **208**, 633-641, doi:10.1084/jem.20110251 (2011).
- 25 Vanden Berghe, T., Kaiser, W. J., Bertrand, M. J. & Vandenabeele, P. Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling. *Molecular & cellular oncology* **2**, e975093, doi:10.4161/23723556.2014.975093 (2015).
- 26 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* **13**, 2514-2526, doi:10.1101/gad.13.19.2514 (1999).
- Ekert, P. G., Silke, J. & Vaux, D. L. Caspase inhibitors. *Cell death and differentiation* 6, 1081-1086, doi:10.1038/sj.cdd.4400594 (1999).
- 28 Faherty, C. S. & Maurelli, A. T. Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection. *Trends in microbiology* **16**, 173-180, doi:10.1016/j.tim.2008.02.001 (2008).
- Richard, A. & Tulasne, D. Caspase cleavage of viral proteins, another way for viruses to make the best of apoptosis. *Cell death & disease* 3, e277, doi:10.1038/cddis.2012.18 (2012).
- 30 Guicciardi, M. E. & Gores, G. J. Life and death by death receptors. *FASEB J* 23, 1625-1637, doi:10.1096/fj.08-111005 (2009).
- 31 Lavrik, I., Golks, A. & Krammer, P. H. Death receptor signaling. *J Cell Sci* **118**, 265-267, doi:10.1242/jcs.01610 (2005).
- 32 Tschopp, J., Martinon, F. & Hofmann, K. Apoptosis: Silencing the death receptors. *Curr Biol* **9**, R381-384, doi:10.1016/s0960-9822(99)80233-4 (1999).
- 33 Wilson, N. S., Dixit, V. & Ashkenazi, A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature immunology* **10**, 348-355, doi:10.1038/ni.1714 (2009).
- 34 Vandenabeele, P., Declercq, W., Van Herreweghe, F. & Vanden Berghe, T. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Science signaling* **3**, re4, doi:10.1126/scisignal.3115re4 (2010).
- 35 Sabio, G. & Davis, R. J. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin Immunol* **26**, 237-245, doi:10.1016/j.smim.2014.02.009 (2014).
- 36 Brenner, D., Blaser, H. & Mak, T. W. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol* **15**, 362-374, doi:10.1038/nri3834 (2015).
- 37 Moquin, D. M., McQuade, T. & Chan, F. K. CYLD deubiquitinates RIP1 in the TNFalpha-induced necrosome to facilitate kinase activation and programmed necrosis. *PloS one* **8**, e76841, doi:10.1371/journal.pone.0076841 (2013).
- 38 Yu, J. W., Jeffrey, P. D. & Shi, Y. Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 8169-8174, doi:10.1073/pnas.0812453106 (2009).

- 39 Tummers, B. & Green, D. R. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev* 277, 76-89, doi:10.1111/imr.12541 (2017).
- 40 Annibaldi, A. & Meier, P. Checkpoints in TNF-Induced Cell Death: Implications in Inflammation and Cancer. *Trends in molecular medicine* **24**, 49-65, doi:10.1016/j.molmed.2017.11.002 (2018).
- 41 Lork, M., Verhelst, K. & Beyaert, R. CYLD, A20 and OTULIN deubiquitinases in NF-kappaB signaling and cell death: so similar, yet so different. *Cell death and differentiation* **24**, 1172-1183, doi:10.1038/cdd.2017.46 (2017).
- 42 Varfolomeev, E. *et al.* IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NFkappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**, 669-681, doi:10.1016/j.cell.2007.10.030 (2007).
- 43 Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42, doi:10.1016/s0092-8674(00)00008-8 (2000).
- 44 Bertrand, M. J. *et al.* cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Molecular cell* **30**, 689-700, doi:10.1016/j.molcel.2008.05.014 (2008).
- 45 Vucic, D., Dixit, V. M. & Wertz, I. E. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 439-452, doi:10.1038/nrm3143 (2011).
- 46 Sun, X., Yin, J., Starovasnik, M. A., Fairbrother, W. J. & Dixit, V. M. Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptorinteracting protein (RIP) by RIP3. *The Journal of biological chemistry* **277**, 9505-9511, doi:10.1074/jbc.M109488200 (2002).
- 47 Li, J. *et al.* The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell* **150**, 339-350, doi:10.1016/j.cell.2012.06.019 (2012).
- 48 Chen, W. *et al.* Diverse sequence determinants control human and mouse receptor interacting protein 3 (RIP3) and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) interaction in necroptotic signaling. *The Journal of biological chemistry* **288**, 16247-16261, doi:10.1074/jbc.M112.435545 (2013).
- 49 Cho, Y. S. *et al.* Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* **137**, 1112-1123, doi:10.1016/j.cell.2009.05.037 (2009).
- 50 Degterev, A. *et al.* Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature chemical biology* **4**, 313-321, doi:10.1038/nchembio.83 (2008).
- 51 Liu, X. *et al.* Post-translational modifications as key regulators of TNF-induced necroptosis. *Cell death & disease* **7**, e2293, doi:10.1038/cddis.2016.197 (2016).
- 52 McQuade, T., Cho, Y. & Chan, F. K. Positive and negative phosphorylation regulates RIP1- and RIP3-induced programmed necrosis. *The Biochemical journal* **456**, 409-415, doi:10.1042/BJ20130860 (2013).
- 53 Moriwaki, K. & Chan, F. K. RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev* **27**, 1640-1649, doi:10.1101/gad.223321.113 (2013).
- 54 Delanghe, T., Dondelinger, Y. & Bertrand, M. J. M. RIPK1 Kinase-Dependent Death: A Symphony of Phosphorylation Events. *Trends in cell biology* **30**, 189-200, doi:10.1016/j.tcb.2019.12.009 (2020).
- 55 Zhang, J., Yang, Y., He, W. & Sun, L. Necrosome core machinery: MLKL. *Cell Mol Life Sci* **73**, 2153-2163, doi:10.1007/s00018-016-2190-5 (2016).
- 56 Sun, L. *et al.* Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* **148**, 213-227, doi:10.1016/j.cell.2011.11.031 (2012).

- 57 Xie, T. *et al.* Structural insights into RIP3-mediated necroptotic signaling. *Cell reports* 5, 70-78, doi:10.1016/j.celrep.2013.08.044 (2013).
- 58 Huang, D. *et al.* The MLKL Channel in Necroptosis Is an Octamer Formed by Tetramers in a Dyadic Process. *Molecular and cellular biology* **37**, doi:10.1128/MCB.00497-16 (2017).
- 59 Murphy, J. M. *et al.* Insights into the evolution of divergent nucleotide-binding mechanisms among pseudokinases revealed by crystal structures of human and mouse MLKL. *The Biochemical journal* **457**, 369-377, doi:10.1042/BJ20131270 (2014).
- 60 Wang, H. *et al.* Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Molecular cell* **54**, 133-146, doi:10.1016/j.molcel.2014.03.003 (2014).
- 61 Xia, B. *et al.* MLKL forms cation channels. *Cell research* **26**, 517-528, doi:10.1038/cr.2016.26 (2016).
- 62 Kuriakose, T. & Kanneganti, T. D. ZBP1: Innate Sensor Regulating Cell Death and Inflammation. *Trends Immunol* **39**, 123-134, doi:10.1016/j.it.2017.11.002 (2018).
- 63 Motwani, M., Pesiridis, S. & Fitzgerald, K. A. DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease. *Nat Rev Genet* **20**, 657-674, doi:10.1038/s41576-019-0151-1 (2019).
- 64 Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820, doi:10.1016/j.cell.2010.01.022 (2010).
- 65 Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**, 335-376, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126 (2003).
- 66 Kawasaki, T. & Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* **5**, 461, doi:10.3389/fimmu.2014.00461 (2014).
- 67 Botos, I., Segal, D. M. & Davies, D. R. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure* **19**, 447-459, doi:10.1016/j.str.2011.02.004 (2011).
- 68 Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Semin Immunol* **19**, 24-32, doi:10.1016/j.smim.2006.12.004 (2007).
- 69 Hu, H. *et al.* RIP3-mediated necroptosis is regulated by inter-filament assembly of RIP homotypic interaction motif. *Cell death and differentiation* **28**, 251-266, doi:10.1038/s41418-020-0598-9 (2021).
- 70 Rebsamen, M. *et al.* DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB. *EMBO Rep* **10**, 916-922, doi:10.1038/embor.2009.109 (2009).
- 71 Kaiser, W. J. *et al.* Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *The Journal of biological chemistry* **288**, 31268-31279, doi:10.1074/jbc.M113.462341 (2013).
- 72 Dhuriya, Y. K. & Sharma, D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *J Neuroinflammation* **15**, 199, doi:10.1186/s12974-018-1235-0 (2018).
- 73 Upton, J. W., Kaiser, W. J. & Mocarski, E. S. DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell host & microbe* **11**, 290-297, doi:10.1016/j.chom.2012.01.016 (2012).
- 74 Newton, K. & Manning, G. Necroptosis and Inflammation. *Annu Rev Biochem* **85**, 743-763, doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014830 (2016).
- 75 Guo, H. *et al.* Herpes simplex virus suppresses necroptosis in human cells. *Cell host & microbe* **17**, 243-251, doi:10.1016/j.chom.2015.01.003 (2015).
- 76 Guo, H. *et al.* Species-independent contribution of ZBP1/DAI/DLM-1-triggered necroptosis in host defense against HSV1. *Cell death & disease* **9**, 816, doi:10.1038/s41419-018-0868-3 (2018).

- Huang, Z. *et al.* RIP1/RIP3 binding to HSV-1 ICP6 initiates necroptosis to restrict virus propagation in mice. *Cell host & microbe* 17, 229-242, doi:10.1016/j.chom.2015.01.002 (2015).
- 78 Wang, X. *et al.* Direct activation of RIP3/MLKL-dependent necrosis by herpes simplex virus 1 (HSV-1) protein ICP6 triggers host antiviral defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 15438-15443, doi:10.1073/pnas.1412767111 (2014).
- 79 Bowie, A. G. & Unterholzner, L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **8**, 911-922, doi:10.1038/nri2436 (2008).
- 80 Aravalli, R. N., Hu, S. & Lokensgard, J. R. Inhibition of toll-like receptor signaling in primary murine microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* **3**, 5-11, doi:10.1007/s11481-007-9097-8 (2008).
- 81 Pearson, J. S. *et al.* A type III effector antagonizes death receptor signalling during bacterial gut infection. *Nature* **501**, 247-251, doi:10.1038/nature12524 (2013).
- Li, S. *et al.* Pathogen blocks host death receptor signalling by arginine GlcNAcylation of death domains. *Nature* **501**, 242-246, doi:10.1038/nature12436 (2013).
- 83 Clay, H., Volkman, H. E. & Ramakrishnan, L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity* **29**, 283-294, doi:10.1016/j.immuni.2008.06.011 (2008).
- 84 Roca, F. J. & Ramakrishnan, L. TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species. *Cell* **153**, 521-534, doi:10.1016/j.cell.2013.03.022 (2013).
- 85 Thapa, R. J. *et al.* Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, E3109-3118, doi:10.1073/pnas.1301218110 (2013).
- 86 Biton, S. & Ashkenazi, A. NEMO and RIP1 control cell fate in response to extensive DNA damage via TNF-alpha feedforward signaling. *Cell* **145**, 92-103, doi:10.1016/j.cell.2011.02.023 (2011).
- 87 McComb, S. *et al.* Type-I interferon signaling through ISGF3 complex is required for sustained Rip3 activation and necroptosis in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E3206-3213, doi:10.1073/pnas.1407068111 (2014).
- 88 Yang, C. *et al.* Regulation of RIP3 by the transcription factor Sp1 and the epigenetic regulator UHRF1 modulates cancer cell necroptosis. *Cell death & disease* **8**, e3084, doi:10.1038/cddis.2017.483 (2017).
- 89 Sarhan, J. *et al.* Constitutive interferon signaling maintains critical threshold of MLKL expression to license necroptosis. *Cell death and differentiation* **26**, 332-347, doi:10.1038/s41418-018-0122-7 (2019).
- 90 Yang, Z. *et al.* 2-HG Inhibits Necroptosis by Stimulating DNMT1-Dependent Hypermethylation of the RIP3 Promoter. *Cell reports* **19**, 1846-1857, doi:10.1016/j.celrep.2017.05.012 (2017).
- 91 Morgan, M. J. & Kim, Y. S. The serine threonine kinase RIP3: lost and found. *BMB Rep* **48**, 303-312, doi:10.5483/bmbrep.2015.48.6.068 (2015).
- 92 Dziedzic, S. A. *et al.* ABIN-1 regulates RIPK1 activation by linking Met1 ubiquitylation with Lys63 deubiquitylation in TNF-RSC. *Nature cell biology* **20**, 58-68, doi:10.1038/s41556-017-0003-1 (2018).
- Zhao, X. M. *et al.* Hsp90 modulates the stability of MLKL and is required for TNF-induced necroptosis. *Cell death & disease* 7, e2089, doi:10.1038/cddis.2015.390 (2016).

- 94 Wang, Z. *et al.* Inhibition of HSP90alpha protects cultured neurons from oxygenglucose deprivation induced necroptosis by decreasing RIP3 expression. *J Cell Physiol* **233**, 4864-4884, doi:10.1002/jcp.26294 (2018).
- 95 Lewis, J. *et al.* Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *The Journal of biological chemistry* 275, 10519-10526, doi:10.1074/jbc.275.14.10519 (2000).
- 96 Srinivasan, S. R. *et al.* Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Suppresses RIP1-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cascades. *Mol Cancer Res* **16**, 58-68, doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0408 (2018).
- 97 O'Donnell, M. A. *et al.* Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nature cell biology* **13**, 1437-1442, doi:10.1038/ncb2362 (2011).
- 98 Feng, S. *et al.* Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cell Signal* **19**, 2056-2067, doi:10.1016/j.cellsig.2007.05.016 (2007).
- 99 Ito, Y. *et al.* RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS. *Science* **353**, 603-608, doi:10.1126/science.aaf6803 (2016).
- 100 Choi, S. W. *et al.* PELI1 Selectively Targets Kinase-Active RIP3 for Ubiquitylation-Dependent Proteasomal Degradation. *Molecular cell* **70**, 920-935 e927, doi:10.1016/j.molcel.2018.05.016 (2018).
- 101 Alturki, N. A. *et al.* Triad3a induces the degradation of early necrosome to limit RipK1-dependent cytokine production and necroptosis. *Cell death & disease* **9**, 592, doi:10.1038/s41419-018-0672-0 (2018).
- 102 Seo, J. *et al.* CHIP controls necroptosis through ubiquitylation- and lysosomedependent degradation of RIPK3. *Nature cell biology* **18**, 291-302, doi:10.1038/ncb3314 (2016).
- 103 Wertz, I. E. *et al.* De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* **430**, 694-699, doi:10.1038/nature02794 (2004).
- 104 Zhang, D. W. *et al.* RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* **325**, 332-336, doi:10.1126/science.1172308 (2009).
- 105 Geng, J. *et al.* Regulation of RIPK1 activation by TAK1-mediated phosphorylation dictates apoptosis and necroptosis. *Nature communications* **8**, 359, doi:10.1038/s41467-017-00406-w (2017).
- 106 Menon, M. B. *et al.* p38(MAPK)/MK2-dependent phosphorylation controls cytotoxic RIPK1 signalling in inflammation and infection. *Nature cell biology* **19**, 1248-1259, doi:10.1038/ncb3614 (2017).
- 107 Dondelinger, Y. *et al.* MK2 phosphorylation of RIPK1 regulates TNF-mediated cell death. *Nature cell biology* **19**, 1237-1247, doi:10.1038/ncb3608 (2017).
- 108 Dondelinger, Y. *et al.* Serine 25 phosphorylation inhibits RIPK1 kinase-dependent cell death in models of infection and inflammation. *Nature communications* **10**, 1729, doi:10.1038/s41467-019-09690-0 (2019).
- 109 Koppe, C. *et al.* IkappaB kinasealpha/beta control biliary homeostasis and hepatocarcinogenesis in mice by phosphorylating the cell-death mediator receptor-interacting protein kinase 1. *Hepatology* **64**, 1217-1231, doi:10.1002/hep.28723 (2016).
- 110 Dondelinger, Y. *et al.* NF-kappaB-Independent Role of IKKalpha/IKKbeta in Preventing RIPK1 Kinase-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cell Death during TNF Signaling. *Molecular cell* **60**, 63-76, doi:10.1016/j.molcel.2015.07.032 (2015).
- 111 Jaco, I. *et al.* MK2 Phosphorylates RIPK1 to Prevent TNF-Induced Cell Death. *Molecular cell* **66**, 698-710 e695, doi:10.1016/j.molcel.2017.05.003 (2017).

- 112 Wei, R. *et al.* SPATA2 regulates the activation of RIPK1 by modulating linear ubiquitination. *Genes Dev* **31**, 1162-1176, doi:10.1101/gad.299776.117 (2017).
- 113 Wang, Y., Shan, B., Liang, Y., Wei, H. & Yuan, J. Parkin regulates NF-kappaB by mediating site-specific ubiquitination of RIPK1. *Cell death & disease* 9, 732, doi:10.1038/s41419-018-0770-z (2018).
- 114 Wang, H. *et al.* PELI1 functions as a dual modulator of necroptosis and apoptosis by regulating ubiquitination of RIPK1 and mRNA levels of c-FLIP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, 11944-11949, doi:10.1073/pnas.1715742114 (2017).
- 115 Murphy, J. M. *et al.* The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity* **39**, 443-453, doi:10.1016/j.immuni.2013.06.018 (2013).
- 116 Ying, Z. *et al.* Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Breaks Down Myelin following Nerve Injury. *Molecular cell* 72, 457-468 e455, doi:10.1016/j.molcel.2018.09.011 (2018).
- Najafov, A. *et al.* TAM Kinases Promote Necroptosis by Regulating Oligomerization of MLKL. *Molecular cell* **75**, 457-468 e454, doi:10.1016/j.molcel.2019.05.022 (2019).
- 118 Li, X. *et al.* O-GlcNAc Transferase Suppresses Inflammation and Necroptosis by Targeting Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 3. *Immunity* **50**, 576-590 e576, doi:10.1016/j.immuni.2019.01.007 (2019).
- 119 Wang, Z., Feng, J., Yu, J. & Chen, G. FKBP12 mediates necroptosis by initiating RIPK1-RIPK3-MLKL signal transduction in response to TNF receptor 1 ligation. J Cell Sci 132, doi:10.1242/jcs.227777 (2019).
- 120 Li, D. *et al.* A cytosolic heat shock protein 90 and cochaperone CDC37 complex is required for RIP3 activation during necroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 5017-5022, doi:10.1073/pnas.1505244112 (2015).
- 121 Chen, W. *et al.* Ppm1b negatively regulates necroptosis through dephosphorylating Rip3. *Nature cell biology* **17**, 434-444, doi:10.1038/ncb3120 (2015).
- 122 Magnaghi-Jaulin, L., Eot-Houllier, G., Gallaud, E. & Giet, R. Aurora A Protein Kinase: To the Centrosome and Beyond. *Biomolecules* 9, doi:10.3390/biom9010028 (2019).
- 123 Xie, Y. *et al.* Inhibition of Aurora Kinase A Induces Necroptosis in Pancreatic Carcinoma. *Gastroenterology* **153**, 1429-1443 e1425, doi:10.1053/j.gastro.2017.07.036 (2017).
- 124 Liang, W. *et al.* A novel damage mechanism: Contribution of the interaction between necroptosis and ROS to high glucose-induced injury and inflammation in H9c2 cardiac cells. *Int J Mol Med* **40**, 201-208, doi:10.3892/ijmm.2017.3006 (2017).
- 125 Lin, J., Li, X., Lin, Y., Huang, Z. & Wu, W. Exogenous sodium hydrosulfide protects against high glucoseinduced injury and inflammation in human umbilical vein endothelial cells by inhibiting necroptosis via the p38 MAPK signaling pathway. *Mol Med Rep* 23, 1, doi:10.3892/mmr.2020.11706 (2021).
- 126 Lin, J. *et al.* Exogenous hydrogen sulfide protects human umbilical vein endothelial cells against high glucoseinduced injury by inhibiting the necroptosis pathway. *Int J Mol Med* **41**, 1477-1486, doi:10.3892/ijmm.2017.3330 (2018).
- 127 Fallach, R. *et al.* Cardiomyocyte Toll-like receptor 4 is involved in heart dysfunction following septic shock or myocardial ischemia. *Journal of molecular and cellular cardiology* **48**, 1236-1244, doi:10.1016/j.yjmcc.2010.02.020 (2010).
- 128 Oerlemans, M. I. *et al.* Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo. *Basic research in cardiology* **107**, 270, doi:10.1007/s00395-012-0270-8 (2012).

- 129 Xu, X. *et al.* Synergistic protective effects of humanin and necrostatin-1 on hypoxia and ischemia/reperfusion injury. *Brain research* **1355**, 189-194, doi:10.1016/j.brainres.2010.07.080 (2010).
- Smith, C. C. *et al.* Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent? *Cardiovascular drugs and therapy* 21, 227-233, doi:10.1007/s10557-007-6035-1 (2007).
- 131 Northington, F. J. *et al.* Necrostatin decreases oxidative damage, inflammation, and injury after neonatal HI. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **31**, 178-189, doi:10.1038/jcbfm.2010.72 (2011).
- 132 Zhou, Y. *et al.* The degradation of mixed lineage kinase domain-like protein promotes neuroprotection after ischemic brain injury. *Oncotarget* **8**, 68393-68401, doi:10.18632/oncotarget.19416 (2017).
- 133 Yang, X. S. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 alpha is involved in RIP-induced necroptosis caused by in vitro and in vivo ischemic brain injury. *Scientific reports* **7**, 5818, doi:10.1038/s41598-017-06088-0 (2017).
- 134 Huang, C. Y., Kuo, W. T., Huang, Y. C., Lee, T. C. & Yu, L. C. Resistance to hypoxia-induced necroptosis is conferred by glycolytic pyruvate scavenging of mitochondrial superoxide in colorectal cancer cells. *Cell death & disease* 4, e622, doi:10.1038/cddis.2013.149 (2013).
- 135 Vieira, M. *et al.* Ischemic insults induce necroptotic cell death in hippocampal neurons through the up-regulation of endogenous RIP3. *Neurobiology of disease* **68**, 26-36, doi:10.1016/j.nbd.2014.04.002 (2014).
- 136 Artal-Sanz, M. & Tavernarakis, N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS letters* **579**, 3287-3296, doi:10.1016/j.febslet.2005.03.052 (2005).
- 137 Ofengeim, D. *et al.* Activation of necroptosis in multiple sclerosis. *Cell reports* **10**, 1836-1849, doi:10.1016/j.celrep.2015.02.051 (2015).
- 138 Jouan-Lanhouet, S. *et al.* Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models. *Seminars in cell & developmental biology* **35**, 2-13, doi:10.1016/j.semcdb.2014.08.010 (2014).
- 139 Afonso, M. B. *et al.* Necroptosis is a key pathogenic event in human and experimental murine models of non-alcoholic steatohepatitis. *Clinical science* **129**, 721-739, doi:10.1042/CS20140732 (2015).
- 140 Saeed, W. K. *et al.* Decrease in fat de novo synthesis and chemokine ligand expression in non-alcoholic fatty liver disease caused by inhibition of mixed lineage kinase domain-like pseudokinase. *Journal of gastroenterology and hepatology* 34, 2206-2218, doi:10.1111/jgh.14740 (2019).
- 141 Pierdomenico, M. *et al.* Necroptosis is active in children with inflammatory bowel disease and contributes to heighten intestinal inflammation. *The American journal of gastroenterology* **109**, 279-287, doi:10.1038/ajg.2013.403 (2014).
- 142 Afonso, M. B. *et al.* Activation of necroptosis in human and experimental cholestasis. *Cell death & disease* 7, e2390, doi:10.1038/cddis.2016.280 (2016).
- 143 Wang, X., Yousefi, S. & Simon, H. U. Necroptosis and neutrophil-associated disorders. *Cell death & disease* 9, 111, doi:10.1038/s41419-017-0058-8 (2018).
- 144 Wang, X., He, Z., Liu, H., Yousefi, S. & Simon, H. U. Neutrophil Necroptosis Is Triggered by Ligation of Adhesion Molecules following GM-CSF Priming. *Journal of immunology* 197, 4090-4100, doi:10.4049/jimmunol.1600051 (2016).
- 145 Lauffer, F. *et al.* Type I Immune Response Induces Keratinocyte Necroptosis and Is Associated with Interface Dermatitis. *The Journal of investigative dermatology* **138**, 1785-1794, doi:10.1016/j.jid.2018.02.034 (2018).

- 146 Guo, C. *et al.* Pathogenesis of lupus nephritis: RIP3 dependent necroptosis and NLRP3 inflammasome activation. *Journal of autoimmunity* **103**, 102286, doi:10.1016/j.jaut.2019.05.014 (2019).
- 147 Zhou, W. & Yuan, J. Necroptosis in health and diseases. *Seminars in cell & developmental biology* **35**, 14-23, doi:10.1016/j.semcdb.2014.07.013 (2014).
- 148 Xia, X., Lei, L., Wang, S., Hu, J. & Zhang, G. Necroptosis and its role in infectious diseases. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **25**, 169-178, doi:10.1007/s10495-019-01589-x (2020).
- 149 Nailwal, H. & Chan, F. K. Necroptosis in anti-viral inflammation. *Cell death and differentiation* **26**, 4-13, doi:10.1038/s41418-018-0172-x (2019).
- 150 Stockbauer, K. E., Foreman-Wykert, A. K. & Miller, J. F. Bordetella type III secretion induces caspase 1-independent necrosis. *Cellular microbiology* **5**, 123-132, doi:10.1046/j.1462-5822.2003.00260.x (2003).
- 151 Zhao, Y. O., Khaminets, A., Hunn, J. P. & Howard, J. C. Disruption of the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole by IFNgamma-inducible immunityrelated GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. *PLoS pathogens* 5, e1000288, doi:10.1371/journal.ppat.1000288 (2009).
- 152 Lee, J., Remold, H. G., Ieong, M. H. & Kornfeld, H. Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of Mycobacterium tuberculosis is mediated by a novel caspase-independent pathway. *Journal of immunology* **176**, 4267-4274, doi:10.4049/jimmunol.176.7.4267 (2006).
- 153 Carneiro, L. A. *et al.* Shigella induces mitochondrial dysfunction and cell death in nonmyleoid cells. *Cell host & microbe* **5**, 123-136, doi:10.1016/j.chom.2008.12.011 (2009).
- 154 Willingham, S. B. *et al.* NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and independent pathways. *Journal of immunology* **183**, 2008-2015, doi:10.4049/jimmunol.0900138 (2009).
- 155 Huang, M. T. *et al.* Critical role of apoptotic speck protein containing a caspase recruitment domain (ASC) and NLRP3 in causing necrosis and ASC speck formation induced by Porphyromonas gingivalis in human cells. *Journal of immunology* 182, 2395-2404, doi:10.4049/jimmunol.0800909 (2009).
- 156 Duncan, J. A. *et al.* Neisseria gonorrhoeae activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. *Journal of immunology* **182**, 6460-6469, doi:10.4049/jimmunol.0802696 (2009).
- 157 Mack, C., Sickmann, A., Lembo, D. & Brune, W. Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 3094-3099, doi:10.1073/pnas.0800168105 (2008).
- 158 Chan, F. K. *et al.* A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *The Journal of biological chemistry* **278**, 51613-51621, doi:10.1074/jbc.M305633200 (2003).
- 159 Arjona, A. *et al.* West Nile virus envelope protein inhibits dsRNA-induced innate immune responses. *Journal of immunology* **179**, 8403-8409, doi:10.4049/jimmunol.179.12.8403 (2007).
- 160 Peri, P., Nuutila, K., Vuorinen, T., Saukko, P. & Hukkanen, V. Cathepsins are involved in virus-induced cell death in ICP4 and Us3 deletion mutant herpes simplex virus type 1-infected monocytic cells. *The Journal of general virology* 92, 173-180, doi:10.1099/vir.0.025080-0 (2011).
- 161 Lenardo, M. J. *et al.* Cytopathic killing of peripheral blood CD4(+) T lymphocytes by human immunodeficiency virus type 1 appears necrotic rather than apoptotic and does

not require env. *Journal of virology* **76**, 5082-5093, doi:10.1128/jvi.76.10.5082-5093.2002 (2002).

- 162 Messmer, M. N., Snyder, A. G. & Oberst, A. Comparing the effects of different cell death programs in tumor progression and immunotherapy. *Cell death and differentiation* **26**, 115-129, doi:10.1038/s41418-018-0214-4 (2019).
- 163 Qin, X., Ma, D., Tan, Y. X., Wang, H. Y. & Cai, Z. The role of necroptosis in cancer: A double-edged sword? *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer* 1871, 259-266, doi:10.1016/j.bbcan.2019.01.006 (2019).
- 164 Cerhan, J. R. *et al.* Genetic variation in 1253 immune and inflammation genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **110**, 4455-4463, doi:10.1182/blood-2007-05-088682 (2007).
- 165 Hu, B. *et al.* Prognostic and clinicopathological significance of MLKL expression in cancer patients: a meta-analysis. *BMC cancer* **18**, 736, doi:10.1186/s12885-018-4655-4 (2018).
- 166 Conev, N. V. *et al.* RIPK3 expression as a potential predictive and prognostic marker in metastatic colon cancer. *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale* **42**, E31-E38, doi:10.25011/cim.v42i1.32390 (2019).
- 167 Wang, W. *et al.* RIP1 Kinase Drives Macrophage-Mediated Adaptive Immune Tolerance in Pancreatic Cancer. *Cancer cell* **34**, 757-774 e757, doi:10.1016/j.ccell.2018.10.006 (2018).
- 168 Jiao, D. *et al.* Necroptosis of tumor cells leads to tumor necrosis and promotes tumor metastasis. *Cell research* **28**, 868-870, doi:10.1038/s41422-018-0058-y (2018).
- 169 Strilic, B. *et al.* Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature* **536**, 215-218, doi:10.1038/nature19076 (2016).
- 170 Snyder, A. G. *et al.* Intratumoral activation of the necroptotic pathway components RIPK1 and RIPK3 potentiates antitumor immunity. *Science immunology* **4**, doi:10.1126/sciimmunol.aaw2004 (2019).
- 171 Varfolomeev, E. E. *et al.* Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* **9**, 267-276, doi:10.1016/s1074-7613(00)80609-3 (1998).
- 172 Oberst, A. & Green, D. R. It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 757-763, doi:10.1038/nrm3214 (2011).
- 173 Salmena, L. *et al.* Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cellmediated immunity. *Genes Dev* **17**, 883-895, doi:10.1101/gad.1063703 (2003).
- 174 Kang, T. B. *et al.* Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *Journal of immunology* **173**, 2976-2984, doi:10.4049/jimmunol.173.5.2976 (2004).
- 175 Chun, H. J. *et al.* Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* **419**, 395-399, doi:10.1038/nature01063 (2002).
- 176 Juo, P., Kuo, C. J., Yuan, J. & Blenis, J. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* **8**, 1001-1008, doi:10.1016/s0960-9822(07)00420-4 (1998).
- 177 Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512, doi:10.1016/0092-8674(95)90071-3 (1995).
- 178 Boldin, M. P. *et al.* A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *The Journal of biological chemistry* **270**, 7795-7798, doi:10.1074/jbc.270.14.7795 (1995).
- 179 Yeh, W. C. *et al.* FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* **279**, 1954-1958, doi:10.1126/science.279.5358.1954 (1998).

- 180 Lee, P. *et al.* Dynamic expression of epidermal caspase 8 simulates a wound healing response. *Nature* **458**, 519-523, doi:10.1038/nature07687 (2009).
- 181 Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H. & Winoto, A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392, 296-300, doi:10.1038/32681 (1998).
- 182 Tsuchiya, Y., Nakabayashi, O. & Nakano, H. FLIP the Switch: Regulation of Apoptosis and Necroptosis by cFLIP. *Int J Mol Sci* **16**, 30321-30341, doi:10.3390/ijms161226232 (2015).
- 183 Pop, C. *et al.* FLIP(L) induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity. *The Biochemical journal* **433**, 447-457, doi:10.1042/BJ20101738 (2011).
- 184 Yeh, W. C. *et al.* Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptorinduced apoptosis and embryonic development. *Immunity* **12**, 633-642, doi:10.1016/s1074-7613(00)80214-9 (2000).
- 185 Zhang, H. *et al.* Functional complementation between FADD and RIP1 in embryos and lymphocytes. *Nature* **471**, 373-376, doi:10.1038/nature09878 (2011).
- 186 Kaiser, W. J. *et al.* RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature* **471**, 368-372, doi:10.1038/nature09857 (2011).
- 187 Oberst, A. *et al.* Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3dependent necrosis. *Nature* **471**, 363-367, doi:10.1038/nature09852 (2011).
- 188 Dillon, C. P. *et al.* Survival function of the FADD-CASPASE-8-cFLIP(L) complex. *Cell reports* 1, 401-407, doi:10.1016/j.celrep.2012.03.010 (2012).
- 189 Alvarez-Diaz, S. *et al.* The Pseudokinase MLKL and the Kinase RIPK3 Have Distinct Roles in Autoimmune Disease Caused by Loss of Death-Receptor-Induced Apoptosis. *Immunity* **45**, 513-526, doi:10.1016/j.immuni.2016.07.016 (2016).
- 190 Dillon, C. P. *et al.* RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase-8 and RIPK3. *Cell* **157**, 1189-1202, doi:10.1016/j.cell.2014.04.018 (2014).
- 191 Rickard, J. A. *et al.* RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis. *Cell* **157**, 1175-1188, doi:10.1016/j.cell.2014.04.019 (2014).
- 192 Polykratis, A. *et al.* Cutting edge: RIPK1 Kinase inactive mice are viable and protected from TNF-induced necroptosis in vivo. *Journal of immunology* **193**, 1539-1543, doi:10.4049/jimmunol.1400590 (2014).
- 193 Kaiser, W. J. et al. RIP1 suppresses innate immune necrotic as well as apoptotic cell death during mammalian parturition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111, 7753-7758, doi:10.1073/pnas.1401857111 (2014).
- 194 Takahashi, N. *et al.* RIPK1 ensures intestinal homeostasis by protecting the epithelium against apoptosis. *Nature* **513**, 95-99, doi:10.1038/nature13706 (2014).
- 195 Newton, K. *et al.* Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science* **343**, 1357-1360, doi:10.1126/science.1249361 (2014).
- 196 Wu, J. *et al.* Mlkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mlkl in necroptosis. *Cell research* **23**, 994-1006, doi:10.1038/cr.2013.91 (2013).
- 197 Khan, N., Lawlor, K. E., Murphy, J. M. & Vince, J. E. More to life than death: molecular determinants of necroptotic and non-necroptotic RIP3 kinase signaling. *Curr Opin Immunol* **26**, 76-89, doi:10.1016/j.coi.2013.10.017 (2014).
- 198 Murakami, Y. *et al.* Programmed necrosis, not apoptosis, is a key mediator of cell loss and DAMP-mediated inflammation in dsRNA-induced retinal degeneration. *Cell death and differentiation* **21**, 270-277, doi:10.1038/cdd.2013.109 (2014).

- 199 Sharma, A., Matsuo, S., Yang, W. L., Wang, Z. & Wang, P. Receptor-interacting protein kinase 3 deficiency inhibits immune cell infiltration and attenuates organ injury in sepsis. *Critical care* **18**, R142, doi:10.1186/cc13970 (2014).
- 200 Duprez, L. *et al.* RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity* **35**, 908-918, doi:10.1016/j.immuni.2011.09.020 (2011).
- 201 Vitner, E. B. *et al.* RIPK3 as a potential therapeutic target for Gaucher's disease. *Nat Med* **20**, 204-208, doi:10.1038/nm.3449 (2014).
- 202 Pavlosky, A. *et al.* RIPK3-mediated necroptosis regulates cardiac allograft rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **14**, 1778-1790, doi:10.1111/ajt.12779 (2014).
- 203 Lau, A. *et al.* RIPK3-mediated necroptosis promotes donor kidney inflammatory injury and reduces allograft survival. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **13**, 2805-2818, doi:10.1111/ajt.12447 (2013).
- 204 Salvadori, M., Rosso, G. & Bertoni, E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World journal of transplantation* **5**, 52-67, doi:10.5500/wjt.v5.i2.52 (2015).
- 205 Louhimo, J., Steer, M. L. & Perides, G. Necroptosis Is an Important Severity Determinant and Potential Therapeutic Target in Experimental Severe Pancreatitis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 2, 519-535, doi:10.1016/j.jcmgh.2016.04.002 (2016).
- 206 Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**, 239-257, doi:10.1038/bjc.1972.33 (1972).
- 207 Kroemer, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell death and differentiation* **12 Suppl 2**, 1463-1467, doi:10.1038/sj.cdd.4401724 (2005).
- 208 Majno, G. & Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* **146**, 3-15 (1995).
- 209 Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G. & Gabai, V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental cell research* **283**, 1-16, doi:10.1016/s0014-4827(02)00027-7 (2003).
- Vandenabeele, P., Vandecasteele, K., Bachert, C., Krysko, O. & Krysko, D. V.
 Immunogenic Apoptotic Cell Death and Anticancer Immunity. *Adv Exp Med Biol* 930, 133-149, doi:10.1007/978-3-319-39406-0_6 (2016).
- Gregory, C. D. & Pound, J. D. Cell death in the neighbourhood: direct microenvironmental effects of apoptosis in normal and neoplastic tissues. *J Pathol* 223, 177-194, doi:10.1002/path.2792 (2011).
- 212 Ford, C. A. *et al.* Oncogenic properties of apoptotic tumor cells in aggressive B cell lymphoma. *Curr Biol* **25**, 577-588, doi:10.1016/j.cub.2014.12.059 (2015).
- 213 Huang, Q. *et al.* Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med* **17**, 860-866, doi:10.1038/nm.2385 (2011).
- 214 Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 685-711, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040 (2003).
- 215 Heath, W. R. & Carbone, F. R. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* **19**, 47-64, doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.47 (2001).
- 216 Garg, A. D., Krysko, D. V., Vandenabeele, P. & Agostinis, P. The emergence of phox-ER stress induced immunogenic apoptosis. *Oncoimmunology* 1, 786-788, doi:10.4161/onci.19750 (2012).

- 217 Obeid, M. *et al.* Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gammairradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* **14**, 1848-1850, doi:10.1038/sj.cdd.4402201 (2007).
- 218 Casares, N. *et al.* Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *The Journal of experimental medicine* **202**, 1691-1701, doi:10.1084/jem.20050915 (2005).
- 219 Panaretakis, T. *et al.* Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* **28**, 578-590, doi:10.1038/emboj.2009.1 (2009).
- 220 Krysko, D. V. *et al.* Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **12**, 860-875, doi:10.1038/nrc3380 (2012).
- 221 Garg, A. D. *et al.* A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J* **31**, 1062-1079, doi:10.1038/emboj.2011.497 (2012).
- 222 Garg, A. D., Dudek-Peric, A. M., Romano, E. & Agostinis, P. Immunogenic cell death. *Int J Dev Biol* **59**, 131-140, doi:10.1387/ijdb.150061pa (2015).
- 223 Yatim, N., Cullen, S. & Albert, M. L. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat Rev Immunol* **17**, 262-275, doi:10.1038/nri.2017.9 (2017).
- 224 Green, D. R., Ferguson, T., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* **9**, 353-363, doi:10.1038/nri2545 (2009).
- 225 Goodsell, D. S. The molecular perspective: caspases. *The oncologist* **5**, 435-436, doi:10.1634/theoncologist.5-5-435 (2000).
- 226 McIlwain, D. R., Berger, T. & Mak, T. W. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, a008656, doi:10.1101/cshperspect.a008656 (2013).
- 227 Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 231-241, doi:10.1038/nrm2312 (2008).
- 228 Riedl, S. J. & Shi, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 897-907, doi:10.1038/nrm1496 (2004).
- 229 von Karstedt, S., Montinaro, A. & Walczak, H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nature reviews. Cancer* **17**, 352-366, doi:10.1038/nrc.2017.28 (2017).
- 230 Wajant, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* **296**, 1635-1636, doi:10.1126/science.1071553 (2002).
- 231 Aggarwal, B. B., Gupta, S. C. & Kim, J. H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* **119**, 651-665, doi:10.1182/blood-2011-04-325225 (2012).
- 232 Strasser, A., Jost, P. J. & Nagata, S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* **30**, 180-192, doi:10.1016/j.immuni.2009.01.001 (2009).
- 233 Krammer, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795, doi:10.1038/35037728 (2000).
- 234 Ozoren, N. & El-Deiry, W. S. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia* **4**, 551-557, doi:10.1038/sj.neo.7900270 (2002).
- 235 Mehlen, P. & Bredesen, D. E. Dependence receptors: from basic research to drug development. *Science signaling* **4**, mr2, doi:10.1126/scisignal.2001521 (2011).
- 236 Gibert, B. & Mehlen, P. Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands. *Cancer research* 75, 5171-5175, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3652 (2015).
- Brumatti, G., Salmanidis, M. & Ekert, P. G. Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals. *Cell Mol Life Sci* 67, 1619-1630, doi:10.1007/s00018-010-0288-8 (2010).

- 238 Nunez, G. *et al.* Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *Journal of immunology* **144**, 3602-3610 (1990).
- 239 Vitale, I., Manic, G., De Maria, R., Kroemer, G. & Galluzzi, L. DNA Damage in Stem Cells. *Molecular cell* **66**, 306-319, doi:10.1016/j.molcel.2017.04.006 (2017).
- 240 Roos, W. P., Thomas, A. D. & Kaina, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nature reviews. Cancer* **16**, 20-33, doi:10.1038/nrc.2015.2 (2016).
- 241 Pihan, P., Carreras-Sureda, A. & Hetz, C. BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell death and differentiation* **24**, 1478-1487, doi:10.1038/cdd.2017.82 (2017).
- 242 Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews*. *Molecular cell biology* **15**, 49-63, doi:10.1038/nrm3722 (2014).
- 243 Galluzzi, L., Kepp, O. & Kroemer, G. Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control. *Microbial cell* **3**, 101-108, doi:10.15698/mic2016.03.483 (2016).
- 244 Tait, S. W. & Green, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11, 621-632, doi:10.1038/nrm2952 (2010).
- 245 Budd, R. C. Activation-induced cell death. *Curr Opin Immunol* **13**, 356-362, doi:10.1016/s0952-7915(00)00227-2 (2001).
- 246 Germain, M. & Shore, G. C. Cellular distribution of Bcl-2 family proteins. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2003**, pe10, doi:10.1126/stke.2003.173.pe10 (2003).
- 247 Petros, A. M., Olejniczak, E. T. & Fesik, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1644**, 83-94, doi:10.1016/j.bbamcr.2003.08.012 (2004).
- 248 Ola, M. S., Nawaz, M. & Ahsan, H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry* **351**, 41-58, doi:10.1007/s11010-010-0709-x (2011).
- 249 Hengartner, M. O. & Horvitz, H. R. C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* **76**, 665-676, doi:10.1016/0092-8674(94)90506-1 (1994).
- 250 Susin, S. A. *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446, doi:10.1038/17135 (1999).
- 251 van Loo, G. *et al.* Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell death and differentiation* **8**, 1136-1142, doi:10.1038/sj.cdd.4400944 (2001).
- 252 Ohsato, T. *et al.* Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space. *European journal of biochemistry* **269**, 5765-5770, doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03238.x (2002).
- 253 Bajt, M. L., Cover, C., Lemasters, J. J. & Jaeschke, H. Nuclear translocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor during acetaminophen-induced liver cell injury. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 94, 217-225, doi:10.1093/toxsci/kf1077 (2006).
- 254 Wilkinson, J. C. *et al.* Neutralization of Smac/Diablo by inhibitors of apoptosis (IAPs). A caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition. *The Journal of biological chemistry* **279**, 51082-51090, doi:10.1074/jbc.M408655200 (2004).
- 255 Kominsky, D. J., Bickel, R. J. & Tyler, K. L. Reovirus-induced apoptosis requires mitochondrial release of Smac/DIABLO and involves reduction of cellular inhibitor of

apoptosis protein levels. *Journal of virology* **76**, 11414-11424, doi:10.1128/jvi.76.22.11414-11424.2002 (2002).

- 256 Verhagen, A. M. *et al.* Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53, doi:10.1016/s0092-8674(00)00009-x (2000).
- 257 Hrdinka, M. & Yabal, M. Inhibitor of apoptosis proteins in human health and disease. *Genes and immunity* **20**, 641-650, doi:10.1038/s41435-019-0078-8 (2019).
- 258 Martins, L. M. *et al.* The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *The Journal of biological chemistry* **277**, 439-444, doi:10.1074/jbc.M109784200 (2002).
- 259 Verhagen, A. M. *et al.* HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *The Journal of biological chemistry* **277**, 445-454, doi:10.1074/jbc.M109891200 (2002).
- 260 Suzuki, Y. *et al.* A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Molecular cell* **8**, 613-621, doi:10.1016/s1097-2765(01)00341-0 (2001).
- 261 Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R. & Newmeyer, D. D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136, doi:10.1126/science.275.5303.1132 (1997).
- 262 Pellegrini, L. & Scorrano, L. A cut short to death: Parl and Opa1 in the regulation of mitochondrial morphology and apoptosis. *Cell death and differentiation* **14**, 1275-1284, doi:10.1038/sj.cdd.4402145 (2007).
- 263 Kuwana, T. *et al.* Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**, 331-342, doi:10.1016/s0092-8674(02)01036-x (2002).
- 264 Basanez, G. *et al.* Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *The Journal of biological chemistry* **277**, 49360-49365, doi:10.1074/jbc.M206069200 (2002).
- 265 Mikhailov, V. *et al.* Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *The Journal of biological chemistry* **278**, 5367-5376, doi:10.1074/jbc.M203392200 (2003).
- Wei, M. C. *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-730, doi:10.1126/science.1059108 (2001).
- Youle, R. J. & Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 47-59, doi:10.1038/nrm2308 (2008).
- Letai, A. *et al.* Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer cell* **2**, 183-192, doi:10.1016/s1535-6108(02)00127-7 (2002).
- 269 Lovell, J. F. *et al.* Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* **135**, 1074-1084, doi:10.1016/j.cell.2008.11.010 (2008).
- 270 Lomonosova, E. & Chinnadurai, G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* **27** Suppl 1, S2-19, doi:10.1038/onc.2009.39 (2008).
- 271 Popgeorgiev, N., Jabbour, L. & Gillet, G. Subcellular Localization and Dynamics of the Bcl-2 Family of Proteins. *Frontiers in cell and developmental biology* **6**, 13, doi:10.3389/fcell.2018.00013 (2018).
- 272 Bouillet, P. & Strasser, A. BH3-only proteins evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* **115**, 1567-1574 (2002).
- 273 Wurstle, M. L., Laussmann, M. A. & Rehm, M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the

apoptosome. *Experimental cell research* **318**, 1213-1220, doi:10.1016/j.yexcr.2012.02.013 (2012).

- 274 Bratton, S. B. & Salvesen, G. S. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci* **123**, 3209-3214, doi:10.1242/jcs.073643 (2010).
- 275 Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of biological chemistry* **274**, 11549-11556, doi:10.1074/jbc.274.17.11549 (1999).
- 276 Malladi, S., Challa-Malladi, M., Fearnhead, H. O. & Bratton, S. B. The Apaf-1*procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer. *The EMBO journal* **28**, 1916-1925, doi:10.1038/emboj.2009.152 (2009).
- 277 Li, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489, doi:10.1016/s0092-8674(00)80434-1 (1997).
- 278 Chandra, D. *et al.* Intracellular nucleotides act as critical prosurvival factors by binding to cytochrome C and inhibiting apoptosome. *Cell* **125**, 1333-1346, doi:10.1016/j.cell.2006.05.026 (2006).
- 279 Jiang, X. & Wang, X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *The Journal of biological chemistry* 275, 31199-31203, doi:10.1074/jbc.C000405200 (2000).
- 280 Cain, K. *et al.* Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *The Journal of biological chemistry* **275**, 6067-6070, doi:10.1074/jbc.275.9.6067 (2000).
- 281 Zhou, M. *et al.* Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1. *Genes Dev* 29, 2349-2361, doi:10.1101/gad.272278.115 (2015).
- Acehan, D. *et al.* Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell* **9**, 423-432, doi:10.1016/s1097-2765(02)00442-2 (2002).
- 283 Shiozaki, E. N., Chai, J. & Shi, Y. Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 4197-4202, doi:10.1073/pnas.072544399 (2002).
- 284 Stennicke, H. R. *et al.* Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *The Journal of biological chemistry* **274**, 8359-8362, doi:10.1074/jbc.274.13.8359 (1999).
- 285 Chao, Y. *et al.* Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. *PLoS biology* **3**, e183, doi:10.1371/journal.pbio.0030183 (2005).
- 286 Shi, Y. Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* **117**, 855-858, doi:10.1016/j.cell.2004.06.007 (2004).
- 287 Hu, Q. *et al.* Molecular determinants of caspase-9 activation by the Apaf-1 apoptosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 16254-16261, doi:10.1073/pnas.1418000111 (2014).
- 288 Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S. & Salvesen, G. S. The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Molecular cell* 22, 269-275, doi:10.1016/j.molcel.2006.03.009 (2006).
- Boatright, K. M. *et al.* A unified model for apical caspase activation. *Molecular cell* 11, 529-541, doi:10.1016/s1097-2765(03)00051-0 (2003).
- 290 Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 10964-10967, doi:10.1073/pnas.96.20.10964 (1999).
- 291 Stennicke, H. R. *et al.* Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *The Journal of biological chemistry* **273**, 27084-27090, doi:10.1074/jbc.273.42.27084 (1998).

- 292 Zhou, Q. & Salvesen, G. S. Activation of pro-caspase-7 by serine proteases includes a non-canonical specificity. *The Biochemical journal* **324** (**Pt 2**), 361-364, doi:10.1042/bj3240361 (1997).
- 293 MacCorkle, R. A., Freeman, K. W. & Spencer, D. M. Synthetic activation of caspases: artificial death switches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3655-3660, doi:10.1073/pnas.95.7.3655 (1998).
- 294 Rodriguez, J. & Lazebnik, Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **13**, 3179-3184, doi:10.1101/gad.13.24.3179 (1999).
- 295 Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. S. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Molecular cell* 1, 949-957, doi:10.1016/s1097-2765(00)80095-7 (1998).
- 296 Fujita, E., Egashira, J., Urase, K., Kuida, K. & Momoi, T. Caspase-9 processing by caspase-3 via a feedback amplification loop in vivo. *Cell death and differentiation* 8, 335-344, doi:10.1038/sj.cdd.4400824 (2001).
- 297 Slee, E. A. *et al.* Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of cell biology* **144**, 281-292, doi:10.1083/jcb.144.2.281 (1999).
- Zou, H. *et al.* Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *The Journal of biological chemistry* 278, 8091-8098, doi:10.1074/jbc.M204783200 (2003).
- 299 Bratton, S. B. *et al.* Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *The EMBO journal* **20**, 998-1009, doi:10.1093/emboj/20.5.998 (2001).
- 300 Saikumar, P., Mikhailova, M. & Pandeswara, S. L. Regulation of caspase-9 activity by differential binding to the apoptosome complex. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **12**, 3343-3354, doi:10.2741/2317 (2007).
- 301 Hu, Q., Wu, D., Chen, W., Yan, Z. & Shi, Y. Proteolytic processing of the caspase-9 zymogen is required for apoptosome-mediated activation of caspase-9. *The Journal of biological chemistry* 288, 15142-15147, doi:10.1074/jbc.M112.441568 (2013).
- 302 Shiozaki, E. N. *et al.* Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Molecular cell* **11**, 519-527, doi:10.1016/s1097-2765(03)00054-6 (2003).
- 303 Renatus, M., Stennicke, H. R., Scott, F. L., Liddington, R. C. & Salvesen, G. S. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14250-14255, doi:10.1073/pnas.231465798 (2001).
- 304 Srinivasula, S. M. *et al.* A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**, 112-116, doi:10.1038/35065125 (2001).
- 305 Eckelman, B. P., Salvesen, G. S. & Scott, F. L. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* **7**, 988-994, doi:10.1038/sj.embor.7400795 (2006).
- 306 Allan, L. A. & Clarke, P. R. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *The FEBS journal* **276**, 6063-6073, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07330.x (2009).
- 307 Allan, L. A. & Clarke, P. R. Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *Molecular cell* 26, 301-310, doi:10.1016/j.molcel.2007.03.019 (2007).
- 308 Seifert, A. & Clarke, P. R. p38alpha- and DYRK1A-dependent phosphorylation of caspase-9 at an inhibitory site in response to hyperosmotic stress. *Cell Signal* **21**, 1626-1633, doi:10.1016/j.cellsig.2009.06.009 (2009).

- Seifert, A., Allan, L. A. & Clarke, P. R. DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is potently inhibited in human cells by harmine. *The FEBS journal* 275, 6268-6280, doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06751.x (2008).
- 310 Martin, M. C., Allan, L. A., Mancini, E. J. & Clarke, P. R. The docking interaction of caspase-9 with ERK2 provides a mechanism for the selective inhibitory phosphorylation of caspase-9 at threonine 125. *The Journal of biological chemistry* 283, 3854-3865, doi:10.1074/jbc.M705647200 (2008).
- 311 Allan, L. A. *et al.* Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nature cell biology* **5**, 647-654, doi:10.1038/ncb1005 (2003).
- 312 Brady, S. C., Allan, L. A. & Clarke, P. R. Regulation of caspase 9 through phosphorylation by protein kinase C zeta in response to hyperosmotic stress. *Molecular and cellular biology* 25, 10543-10555, doi:10.1128/MCB.25.23.10543-10555.2005 (2005).
- 313 Cardone, M. H. *et al.* Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**, 1318-1321, doi:10.1126/science.282.5392.1318 (1998).
- 314 Martin, M. C. *et al.* Protein kinase A regulates caspase-9 activation by Apaf-1 downstream of cytochrome c. *The Journal of biological chemistry* **280**, 15449-15455, doi:10.1074/jbc.M414325200 (2005).
- 315 McDonnell, M. A. *et al.* Phosphorylation of murine caspase-9 by the protein kinase casein kinase 2 regulates its cleavage by caspase-8. *The Journal of biological chemistry* **283**, 20149-20158, doi:10.1074/jbc.M802846200 (2008).
- 316 Raina, D. *et al.* c-Abl tyrosine kinase regulates caspase-9 autocleavage in the apoptotic response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry* **280**, 11147-11151, doi:10.1074/jbc.M413787200 (2005).
- 317 Serrano, B. P., Szydlo, H. S., Alfandari, D. & Hardy, J. A. Active site-adjacent phosphorylation at Tyr-397 by c-Abl kinase inactivates caspase-9. *The Journal of biological chemistry* 292, 21352-21365, doi:10.1074/jbc.M117.811976 (2017).
- 318 Hao, Y. *et al.* Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. *Nature cell biology* **6**, 849-860, doi:10.1038/ncb1159 (2004).
- 319 Li, Y. *et al.* The E3 ligase HECTD3 promotes esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) growth and cell survival through targeting and inhibiting caspase-9 activation. *Cancer letters* **404**, 44-52, doi:10.1016/j.canlet.2017.07.004 (2017).
- 320 Fombonne, J. *et al.* Patched dependence receptor triggers apoptosis through ubiquitination of caspase-9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 10510-10515, doi:10.1073/pnas.1200094109 (2012).
- 321 Yan, J., Ma, C., Cheng, J., Li, Z. & Liu, C. HAX-1 inhibits apoptosis in prostate cancer through the suppression of caspase-9 activation. *Oncology reports* **34**, 2776-2781, doi:10.3892/or.2015.4202 (2015).
- 322 Han, Y. *et al.* Overexpression of HAX-1 protects cardiac myocytes from apoptosis through caspase-9 inhibition. *Circulation research* **99**, 415-423, doi:10.1161/01.RES.0000237387.05259.a5 (2006).
- 323 Marusawa, H. *et al.* HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *The EMBO journal* **22**, 2729-2740, doi:10.1093/emboj/cdg263 (2003).
- Pathan, N. *et al.* TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer. *The Journal of biological chemistry* 276, 32220-32229, doi:10.1074/jbc.M100433200 (2001).
- 325 Sakai, T. *et al.* Nucling recruits Apaf-1/pro-caspase-9 complex for the induction of stress-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **279**, 41131-41140, doi:10.1074/jbc.M402902200 (2004).
- Chu, Z. L. *et al.* A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 276, 9239-9245, doi:10.1074/jbc.M006309200 (2001).

- 327 Garrido, C. & Kroemer, G. Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosisexecuting proteins. *Current opinion in cell biology* **16**, 639-646, doi:10.1016/j.ceb.2004.09.008 (2004).
- 328 Galluzzi, L. *et al.* No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell death and differentiation* **15**, 1113-1123, doi:10.1038/cdd.2008.28 (2008).
- Hakem, R. *et al.* Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* **94**, 339-352, doi:10.1016/s0092-8674(00)81477-4 (1998).
- 330 Kuida, K. *et al.* Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* **94**, 325-337, doi:10.1016/s0092-8674(00)81476-2 (1998).
- 331 Theodoropoulos, G. E. *et al.* Polymorphisms of caspase 8 and caspase 9 gene and colorectal cancer susceptibility and prognosis. *International journal of colorectal disease* **26**, 1113-1118, doi:10.1007/s00384-011-1217-5 (2011).
- 332 Liamarkopoulos, E. *et al.* Caspase 8 and caspase 9 gene polymorphisms and susceptibility to gastric cancer. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* **14**, 317-321, doi:10.1007/s10120-011-0045-1 (2011).
- 333 Theodoropoulos, G. E., Michalopoulos, N. V., Panoussopoulos, S. G., Taka, S. & Gazouli, M. Effects of caspase-9 and survivin gene polymorphisms in pancreatic cancer risk and tumor characteristics. *Pancreas* 39, 976-980, doi:10.1097/MPA.0b013e3181d705d4 (2010).
- 334 Gangwar, R., Mandhani, A. & Mittal, R. D. Caspase 9 and caspase 8 gene polymorphisms and susceptibility to bladder cancer in north Indian population. *Annals* of surgical oncology **16**, 2028-2034, doi:10.1245/s10434-009-0488-3 (2009).
- 335 Park, J. Y. *et al.* Caspase 9 promoter polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Human molecular genetics* **15**, 1963-1971, doi:10.1093/hmg/ddl119 (2006).
- 336 Chee, J. L. *et al.* Wild-type and mutant p53 mediate cisplatin resistance through interaction and inhibition of active caspase-9. *Cell cycle* **12**, 278-288, doi:10.4161/cc.23054 (2013).
- 337 Mueller, T. *et al.* Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer. *Cancer research* **63**, 513-521 (2003).
- Kuwahara, D. *et al.* Inhibition of caspase-9 activity and Apaf-1 expression in cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma cells. *Auris, nasus, larynx* 30 Suppl, S85-88, doi:10.1016/s0385-8146(02)00129-3 (2003).
- 339 Kelly, J. L. *et al.* Germline variation in apoptosis pathway genes and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **19**, 2847-2858, doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0581 (2010).
- Lan, Q. *et al.* Genetic variation in caspase genes and risk of non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis of 3 population-based case-control studies. *Blood* **114**, 264-267, doi:10.1182/blood-2009-01-198697 (2009).
- 341 Kroemer, G. & Reed, J. C. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* **6**, 513-519, doi:10.1038/74994 (2000).
- 342 Andreoli, V. *et al.* CASP-9: A susceptibility locus for multiple sclerosis in Italy. *Journal of neuroimmunology* **210**, 100-103, doi:10.1016/j.jneuroim.2009.03.013 (2009).
- 343 Sang, T. K. *et al.* Inactivation of Drosophila Apaf-1 related killer suppresses formation of polyglutamine aggregates and blocks polyglutamine pathogenesis. *Human molecular genetics* **14**, 357-372, doi:10.1093/hmg/ddi032 (2005).

- 344 Kiechle, T. *et al.* Cytochrome C and caspase-9 expression in Huntington's disease. *Neuromolecular medicine* **1**, 183-195, doi:10.1385/NMM:1:3:183 (2002).
- 345 Zhao, Q. *et al.* RIPK3 Mediates Necroptosis during Embryonic Development and Postnatal Inflammation in Fadd-Deficient Mice. *Cell reports* **19**, 798-808, doi:10.1016/j.celrep.2017.04.011 (2017).
- 346 Murai, S. *et al.* A FRET biosensor for necroptosis uncovers two different modes of the release of DAMPs. *Nature communications* **9**, 4457, doi:10.1038/s41467-018-06985-6 (2018).
- 347 Yoon, S., Bogdanov, K., Kovalenko, A. & Wallach, D. Necroptosis is preceded by nuclear translocation of the signaling proteins that induce it. *Cell death and differentiation* **23**, 253-260, doi:10.1038/cdd.2015.92 (2016).
- 348 Xie, T. *et al.* Structural basis of RIP1 inhibition by necrostatins. *Structure* **21**, 493-499, doi:10.1016/j.str.2013.01.016 (2013).
- 349 Hedlund, T. E. *et al.* Adenovirus-mediated expression of Fas ligand induces apoptosis of human prostate cancer cells. *Cell death and differentiation* **6**, 175-182, doi:10.1038/sj.cdd.4400477 (1999).
- 350 Kim, K. M., Lee, K., Hong, Y. S. & Park, H. Y. Fas-mediated apoptosis and expression of related genes in human malignant hematopoietic cells. *Exp Mol Med* 32, 246-254, doi:10.1038/emm.2000.41 (2000).
- 351 Zhang, D. W. *et al.* Multiple death pathways in TNF-treated fibroblasts: RIP3- and RIP1-dependent and independent routes. *Cell research* **21**, 368-371, doi:10.1038/cr.2011.3 (2011).
- 352 Petersen, S. L. *et al.* Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis. *Cancer cell* **12**, 445-456, doi:10.1016/j.ccr.2007.08.029 (2007).
- 353 Gwag, B. J. *et al.* Calcium ionophores can induce either apoptosis or necrosis in cultured cortical neurons. *Neuroscience* **90**, 1339-1348, doi:10.1016/s0306-4522(98)00508-9 (1999).
- 354 Saito, Y. *et al.* Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free radical research* **40**, 619-630, doi:10.1080/10715760600632552 (2006).
- 355 Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E. & Seed, B. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* **81**, 513-523, doi:10.1016/0092-8674(95)90072-1 (1995).
- 356 Geserick, P. *et al.* Absence of RIPK3 predicts necroptosis resistance in malignant melanoma. *Cell death & disease* 6, e1884, doi:10.1038/cddis.2015.240 (2015).
- 357 Gonzalez-Polo, R. A. *et al.* The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci* **118**, 3091-3102, doi:10.1242/jcs.02447 (2005).
- 358 Amelio, I., Melino, G. & Knight, R. A. Cell death pathology: cross-talk with autophagy and its clinical implications. *Biochemical and biophysical research communications* **414**, 277-281, doi:10.1016/j.bbrc.2011.09.080 (2011).
- 359 Han, W., Xie, J., Li, L., Liu, Z. & Hu, X. Necrostatin-1 reverts shikonin-induced necroptosis to apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **14**, 674-686, doi:10.1007/s10495-009-0334-x (2009).
- 360 Pierini, R. *et al.* AIM2/ASC triggers caspase-8-dependent apoptosis in Francisellainfected caspase-1-deficient macrophages. *Cell death and differentiation* **19**, 1709-1721, doi:10.1038/cdd.2012.51 (2012).
- 361 Lawlor, K. E. *et al.* RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL. *Nature communications* **6**, 6282, doi:10.1038/ncomms7282 (2015).

- 362 An, H. K. *et al.* CASP9 (caspase 9) is essential for autophagosome maturation through regulation of mitochondrial homeostasis. *Autophagy* **16**, 1598-1617, doi:10.1080/15548627.2019.1695398 (2020).
- 363 Han, J. et al. A Complex between Atg7 and Caspase-9: A NOVEL MECHANISM OF CROSS-REGULATION BETWEEN AUTOPHAGY AND APOPTOSIS. The Journal of biological chemistry 289, 6485-6497, doi:10.1074/jbc.M113.536854 (2014).
- Jager, R. & Zwacka, R. M. The enigmatic roles of caspases in tumor development. *Cancers* **2**, 1952-1979, doi:10.3390/cancers2041952 (2010).
- 365 Sperandio, S., de Belle, I. & Bredesen, D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 14376-14381, doi:10.1073/pnas.97.26.14376 (2000).
- 366 Koncz, G. *et al.* Vesicles released by activated T cells induce both Fas-mediated RIPdependent apoptotic and Fas-independent nonapoptotic cell deaths. *Journal of immunology* **189**, 2815-2823, doi:10.4049/jimmunol.1102827 (2012).
- 367 Samraj, A. K., Keil, E., Ueffing, N., Schulze-Osthoff, K. & Schmitz, I. Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 281, 29652-29659, doi:10.1074/jbc.M603487200 (2006).
- 368 Guo, R. *et al.* Inhibition of caspase-9 aggravates acute liver injury through suppression of cytoprotective autophagy. *Scientific reports* **6**, 32447, doi:10.1038/srep32447 (2016).
- McComb, S. *et al.* Cathepsins limit macrophage necroptosis through cleavage of Rip1 kinase. *Journal of immunology* 192, 5671-5678, doi:10.4049/jimmunol.1303380 (2014).
- 370 Orozco, S. *et al.* RIPK1 both positively and negatively regulates RIPK3 oligomerization and necroptosis. *Cell death and differentiation* **21**, 1511-1521, doi:10.1038/cdd.2014.76 (2014).
- Wang, Q. *et al.* Receptor-interacting protein kinase 3 contributes to abdominal aortic aneurysms via smooth muscle cell necrosis and inflammation. *Circulation research* 116, 600-611, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304899 (2015).
- 372 Yan, M. *et al.* Aurora-A Kinase: A Potent Oncogene and Target for Cancer Therapy. *Medicinal research reviews* **36**, 1036-1079, doi:10.1002/med.21399 (2016).
- Borisa, A. C. & Bhatt, H. G. A comprehensive review on Aurora kinase: Small molecule inhibitors and clinical trial studies. *European journal of medicinal chemistry* 140, 1-19, doi:10.1016/j.ejmech.2017.08.045 (2017).
- 374 Murao, A., Aziz, M., Wang, H., Brenner, M. & Wang, P. Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **26**, 152-162, doi:10.1007/s10495-021-01663-3 (2021).
- 375 Denning, N. L., Aziz, M., Gurien, S. D. & Wang, P. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol* **10**, 2536, doi:10.3389/fimmu.2019.02536 (2019).
- 376 Krysko, O., Love Aaes, T., Bachert, C., Vandenabeele, P. & Krysko, D. V. Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell death & disease* 4, e631, doi:10.1038/cddis.2013.156 (2013).
- 377 Radic, M., Marion, T. & Monestier, M. Nucleosomes are exposed at the cell surface in apoptosis. *Journal of immunology* **172**, 6692-6700, doi:10.4049/jimmunol.172.11.6692 (2004).
- 378 Linders, J. *et al.* Extracellular cold-inducible RNA-binding protein regulates neutrophil extracellular trap formation and tissue damage in acute pancreatitis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **100**, 1618-1630, doi:10.1038/s41374-020-0469-5 (2020).

- 379 Jahr, S. *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research* **61**, 1659-1665 (2001).
- 380 Yang, H., Wang, H., Chavan, S. S. & Andersson, U. High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1): The Prototypical Endogenous Danger Molecule. *Molecular medicine* 21 Suppl 1, S6-S12, doi:10.2119/molmed.2015.00087 (2015).
- 381 Chen, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**, 7204-7218, doi:10.18632/oncotarget.23208 (2018).
- 382 Dockrell, D. H. The multiple roles of Fas ligand in the pathogenesis of infectious diseases. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **9**, 766-779, doi:10.1046/j.1469-0691.2003.00669.x (2003).
- 383 Rahman, M. M. & McFadden, G. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS pathogens* **2**, e4, doi:10.1371/journal.ppat.0020004 (2006).
- 384 Zhou, X., Jiang, W., Liu, Z., Liu, S. & Liang, X. Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Viruses* 9, doi:10.3390/v9110316 (2017).
- 385 Rauf, A., Khatri, M., Murgia, M. V. & Saif, Y. M. Fas/FasL and perforin-granzyme pathways mediated T cell cytotoxic responses in infectious bursal disease virus infected chickens. *Results in immunology* 2, 112-119, doi:10.1016/j.rinim.2012.05.003 (2012).
- 386 Liu, Z. X., Govindarajan, S., Okamoto, S. & Dennert, G. Fas-mediated apoptosis causes elimination of virus-specific cytotoxic T cells in the virus-infected liver. *Journal of immunology* **166**, 3035-3041, doi:10.4049/jimmunol.166.5.3035 (2001).
- 387 Salamone, G. V. *et al.* Flagellin delays spontaneous human neutrophil apoptosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **90**, 1049-1059, doi:10.1038/labinvest.2010.77 (2010).
- 388 Vijay-Kumar, M. *et al.* Flagellin suppresses epithelial apoptosis and limits disease during enteric infection. *The American journal of pathology* **169**, 1686-1700, doi:10.2353/ajpath.2006.060345 (2006).
- 389 Zeng, H. *et al.* Flagellin/TLR5 responses in epithelia reveal intertwined activation of inflammatory and apoptotic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G96-G108, doi:10.1152/ajpgi.00273.2005 (2006).
- 390 Rolli, J. *et al.* Bacterial flagellin elicits widespread innate immune defense mechanisms, apoptotic signaling, and a sepsis-like systemic inflammatory response in mice. *Critical care* **14**, R160, doi:10.1186/cc9235 (2010).
- 391 Kortmann, J., Brubaker, S. W. & Monack, D. M. Cutting Edge: Inflammasome Activation in Primary Human Macrophages Is Dependent on Flagellin. *Journal of immunology* **195**, 815-819, doi:10.4049/jimmunol.1403100 (2015).

10. Publikációk listája



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: Tárgy:

DEENK/301/2021.PL PhD Publikációs Lista

BRECENI

Jelölt: Molnár Tamás Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

 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

 Varga, Z., Rácz, E., Türk-Mázló, A., Korodi, M., Szabó, A., Molnár, T., Szöőr, 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 TA 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)



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

 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.



11. Az értekezéshez kapcsolódó konferencia előadások és poszterek

- Tamas Molnar, Dora Hancz, Aniko Szabo, Zsofia Varga, Aniko Hancz, Andrea Gregus, Anne-Odile Hueber, Eva Rajnavolgyi, Gabor Koncz. Flagellin increases death receptor-mediated cell death in a RIP1-dependent manner. 5th European Congress of Immunology. 2018. szeptember 2-5.; Amszterdam.
- 2. Tamas Molnar, Dora Hancz, Aniko Szabo, Zsofia Varga, Aniko Hancz, Andrea Gregus, Anne-Odile Hueber, Eva Rajnavolgyi, Gabor Koncz. Flagellin increases death receptor-mediated cell death in a RIP1-dependent manner. 46th Annual Meetingof the Hungarian Society for Immunology. 18.20th October 2017, Velence
- A kaszpáz-9 szerepe nekroptózisban. 2014/15. Tanévi Orvos és Egészségtudományi TDK Konferencia. Debrecen. 2015. február 11-13.
- A kaszpáz-9 szerepe nekroptózisban. 2015/16. Tanévi Orvos és Egészségtudományi TDK Konferencia. Debrecen. 2016. február 23-26.

12. Kulcsszavak

Nekroptózis Apoptózis Sejthalál Kaszpáz-9 Aurora kináz A Pankreatitisz

Gyulladás

13. Keywords

Necroptosis Apoptosis Cell death Caspase-9 Aurora Kinase A Pancreatitis Inflammation
14. 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 segítsége 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.