

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

A RIPK1-függő sejthalál szerepe az immunválasz szabályozásában

Varga Zsófia

Témavezető: Dr. Koncz Gábor



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2021

Tartalomjegyzék

I. Rövidítések jegyzéke	5
II. Bevezetés	7
III.1 A dendritikus sejtek funkcionális jellemzése, a keresztprezentáció folyamata	8
III.2 A DS citotoxicitás szerepe az immunválasz során.....	10
III.3 A makrofágok heterogenitása	11
III.3.2 Az M1 és M2 makrofág alpopulációk szerepe az immunválaszban.....	11
III.3.3 Az M1 makrofág populáció sajátosságai	12
III.3.4 Az M2 makrofág populáció sajátosságai	12
III.4 Tumorasszociált makrofágok.....	13
III.5 A makrofág alpopulációk szerepe betegségek patogenezisében	13
III.6 A sejthalál.....	13
III.7 A sejthalál immunrendszerre gyakorolt hatása	14
III.8 Az apoptózis.....	15
III.8.2 Extrinsic apoptózis	15
III.8.3 Intrinsic útvonal.....	16
III.9 Apoptotikus útvonalak RIPK1-függése	18
III.10 A nekroptózis	18
III.10.2 A nekroszóma kialakulása, az MLKL aktiválása	19
III.11 A RIPK1 szerepe a túlélés és a sejthalál szabályozásában.....	19
III.12 A TNF α jelátvitel lehetséges kimenetelei	20
III.13 Az apoptózis gátló fehérjék	23
III.14. SMAC mimetikumok, a Birinapant	24
III.15 TAK1, a sejthalál központi szabályozója.....	25
III.15.2 A TAK1 szerepe a TNFR által kiváltott jelátvitelben	25
III.16 Az immunogén sejthalál	26
III.16.2 Az ICD antigén forrása	29
III.17 A RIPK1-függő sejthalál hatása a tumorok progressziójára	29
III.17.2 A RIPK1-függő sejthalál immunrendszerre kifejtett immunogén hatása	30
IV. Célkitűzések	32
V. Anyagok és módszerek	33
V.1 Monocita szeparálás humán vércsészitményből.....	33
V.2 Humán monociták differenciáltatása dendritikus sejtekké	33

V.3 Humán monociták differenciáltatása IFN dendritikus sejtekké.....	33
V.4 Humán monociták differenciáltatása dexamethasone dendritikus sejtekké.....	34
V.5 A dendritikus sejt felülűszók (moDS, IFN DS, dexamethasone DS) összegyűjtése	34
V.6 Humán monociták differenciáltatása érett dendritikus sejtekké	34
V.7 Humán monociták differenciáltatása makrofágokká.....	34
V.8 Felhasznált sejtvonalak.....	35
V.9 A THP-1 felülűszó előállítás.....	35
V.10 Az M1 és M2 makrofágok ko-kultúrában való tenyésztése	36
V.11 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), „szendvics” ELISA	36
V.12 Kaszpáz-3/7 enzimaktivitás mérése	36
V.13 Immunprecipitáció.....	36
V.14 Áramlási citometria	37
V.14.1 Sejt felszíni molekulák megjelenésének vizsgálata.....	37
V.14.2 Sejthalál mérés.....	38
V.15 Western blot	39
V.16 Statisztika	40
VI. Eredmények.....	41
VI.1 Az M1 makrofágokkal ellentétben, az M2 sejtek érzékenyek a TAK1 gátló által kiváltott nekroptózisra.....	41
VI.2 Az M1 és M2 sejtek ko-kultúrában való tenyésztése nem érzékenyíti az M1 sejteket a TAK1 inhibitor által indukált nekroptózisra	47
VI.3 A TAK1 jelátviteli út downstream komponenseinek gátlása nekroptózist vált ki az M2 sejtekben.....	50
VI.4 A TAM-szerű makrofágok érzékenyek a TAK1 inhibitor által kiváltott nekroptózisra	54
VI.5 A moDS-ek felülűszója sejthalált indukál	57
VI.6 A moDS-ek felülűszója TNF α -függő sejthalált vált ki	60
VI.7 A DS felülűszó RIPK1-függő sejthalált indukál	62
VI.8 A DS felülűszó apoptózist indukál	65
VI.9 A tolerogén mikro környezet csökkenti a DS-ek citotoxikus képességét	66
VII. Megbeszélés.....	69
VIII. Új eredmények	76
IX. Összefoglalás	77
X. Summary.....	79
XI. Irodalomjegyzék.....	81
XII. Kulcsszavak	93

XIII. Keywords	93
XIV. Köszönetnyilvánítás	94
XV. Függelék	95

I. Rövidítések jegyzéke

ACD-	véletlen/esetleges sejthalál (<u>a</u> ccidental <u>c</u> ell <u>d</u> eath)
APAF-1-	apoptotikus proteáz aktiváló faktor-1 (<u>a</u> poptotic <u>p</u> rotease <u>a</u> ctivating <u>f</u> actor- <u>1</u>)
Bid-	BH3 interakciós domén halál antagonista (<u>B</u> H3 <u>i</u> nteracting- <u>d</u> omain death agonist)
CCL-	kemokin (C-C motívum) ligandum (<u>c</u> hemokine <u>C</u> - <u>C</u> motif <u>l</u> igand)
CTL-	citotoxikus T sejt/limfocita (<u>c</u> ytotoxic <u>T</u> cell/ <u>l</u> ymphocyte)
CXCL-	kemokin (C-X-C motívum) ligandum (<u>c</u> hemokine C- <u>X</u> - <u>C</u> motif <u>l</u> igand)
DAMP-	sérülés-asszociált molekuláris mintázat (<u>d</u> amage- <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> attern)
DD-	halál domén (<u>d</u> eath <u>d</u> omen)
DISC-	halált kiváltó jelző komplex (<u>d</u> eath- <u>i</u> nducing <u>s</u> ignaling <u>c</u> omplex)
DS-	<u>d</u> endritikus <u>s</u> ejt (dendritic cell)
FADD-	Fas-asszociált fehérje halál doménnal (<u>F</u> as- <u>a</u> ssociated protein with <u>d</u> eath <u>d</u> omain)
FLIP _L	FLICE-szerű gátló fehérje hosszú izoformája (<u>F</u> LICE- <u>l</u> ike <u>i</u> nhibitory <u>p</u> rotein <u>l</u> ong isoform)
IAP-	apoptózis-gátló fehérje (<u>i</u> nhibitor of <u>a</u> poptosis)
ICD-	immunogén sejthalál (<u>i</u> mmunogenic <u>c</u> ell <u>d</u> eath)
IFN-	interferon (<u>i</u> nter <u>f</u> eron)
IL-	interleukin (<u>i</u> nter <u>l</u> eukin)
LPS-	lipopoliszacharid (<u>l</u> ipopolysaccharide)
MHC-	fő hisztokompatibilitási komplex (<u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex)
MLKL-	kevert eredetű kináz domén-szerű pszeudokináz (<u>m</u> ixed <u>l</u> ineage <u>k</u> inase domain like pseudokinase)
NCCD -	Sejthalál Nomenklatúra Bizottság (Nomenclature Committee on Cell Death)
PAMP-	patogén-asszociált molekuláris mintázat (<u>P</u> athogen- <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> attern)
PRR -	mintázat-felismerő receptor (<u>p</u> attern <u>r</u> ecognition <u>r</u> ecceptor)
RCD-	szabályozott sejthalál (<u>r</u> egulated <u>c</u> ell <u>d</u> eath)
RIPK-	receptor kölcsönható fehérje kináz (<u>r</u> ecceptor <u>i</u> nteracting <u>p</u> rotein <u>k</u> inase)
ROS-	reaktív oxigén gyökök (<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies)

SMAC-	kaspáz második mitokondriális aktivátora (second <u>m</u> itochondrial <u>a</u> ctivator of <u>c</u> aspase)
TAK-	transzformáló növekedési faktor β -aktivált kináz (transforming growth factor β - <u>a</u> ctivated <u>k</u> inase)
TAM-	tumor-asszociált makrofág (tumor- <u>a</u> ssociated <u>m</u> achrophage)
tBid-	hasított Bid (truncated <u>B</u> id)
TGF β -	transzformáló növekedési faktor β (transforming grow <u>f</u> actor <u>\beta</u>)
TLR-	Toll-szerű receptor (Toll- <u>l</u> ike <u>r</u> eceptor)
TNF-	tumor nekrosis faktor (tumor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor)
TRADD-	tumor nekrosis faktor receptor 1-asszociált halál domén (tumor necrosis factor receptor 1- <u>a</u> ssociated <u>d</u> eath <u>d</u> omain)
TRAIL-	tnf kapcsolt apoptózis indukáló ligandum (tnf related apoptosis inducing <u>l</u> igand)

II. Bevezetés

Az utóbbi években több, az apoptózistól független sejthalál útvonalat írtak le. Ismert, hogy a sejthalál folyamatok immunológiai kimenetele eltérő lehet. Az általában tolerogén apoptózis mellett gyulladást indukáló, ugyanakkor az adaptív immunválaszt aktiváló sejthalál útvonalak is ismertek. A dolgozatban a receptor interacting protein kinase-1 (RIPK1) függő sejthalál folyamatokat, a gyulladást kiváltó nekroptózist és apoptózist tanulmányoztuk.

A veleszületett immunitás kezdeti lépéseit elsősorban a makrofágok és dendritikus sejtek koordinálják. A makrofágok differenciációját a szöveti mikro környezetük határozza meg¹, amelynek köszönhetően kialakulhatnak pro-inflammatórikus (M1) és anti-inflammatórikus (M2) altípusok. A sejtpopulációk egyensúlya felborulhat betegségek patogenezisében, például a fertőzések, daganatok, krónikus gyulladásos vagy autoimmun reakciókban. Ezekben a kórképekben több klinikai vizsgálat célja az M1/M2 arány megváltoztatása². A doktori munka során összehasonlítottuk a humán monocita-eredetű M1 és M2 makrofágok nekroptózisra való érzékenységét. A nekroptózis RIPK1, RIPK3 és mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL) jelátviteli útvonalon zajlik, amelyet a RIPK1 ubiquitinációja és foszforilációja egyaránt gátol. A nekroptózis kiváltásához inhibitor of apoptosis (IAP) antagonistát, amely a RIPK1 ubiquitinációját³, vagy transforming growth factor- β -activated kinase (TAK1) inhibitor használtunk, amely a RIPK1 foszforilációját gátolja⁴. Eredményeink szerint a TAK1 inhibitor által indukált nekroptózisra az M2 sejtek lényegesen érzékenyebbek, mint az M1 sejtek, ami lehetővé teszi a két alpopuláció egyensúlyának szabályozását.

A veleszületett immunitás másik jelentős sejtpopulációját a dendritikus sejtek (DS-ek) alkotják. Professzionális antigén prezentálók, melyek folyamatosan pásztázzák a mikro környezetüket, és elhalt, tumoros vagy vírussal fertőzött sejtekből fagocitózissal mintákat gyűjtenek. Az antigéneket a nyirokcsomókba szállítják és naiv T sejteknek prezentálják⁵. Antigén prezentáló és T sejtet aktiváló tulajdonságokon túl ismert, hogy a DS-ek sejtpusztító funkcióval is rendelkeznek⁶. A doktori munka során vizsgáltuk, hogy a humán monocita-eredetű DS-ek (moDS) citotoxikus képessége hogyan változik meg a mintázatfelismerő receptorokon PRR-stimulusok hatására. Kimutattuk, hogy citotoxicitás általában az éretlen, perifériás szövetekben található DS-ekhez köthető. Az aktivált DS felülűszója RIPK1- függő immunogén sejthalált indukál, ami ezáltal lehetőséget biztosít a DS-ek számára a szöveti környezet monitorozására és elősegítheti az intracelluláris kórokozók, valamint a tumor antigének prezentációját.

III. Irodalmi áttekintés

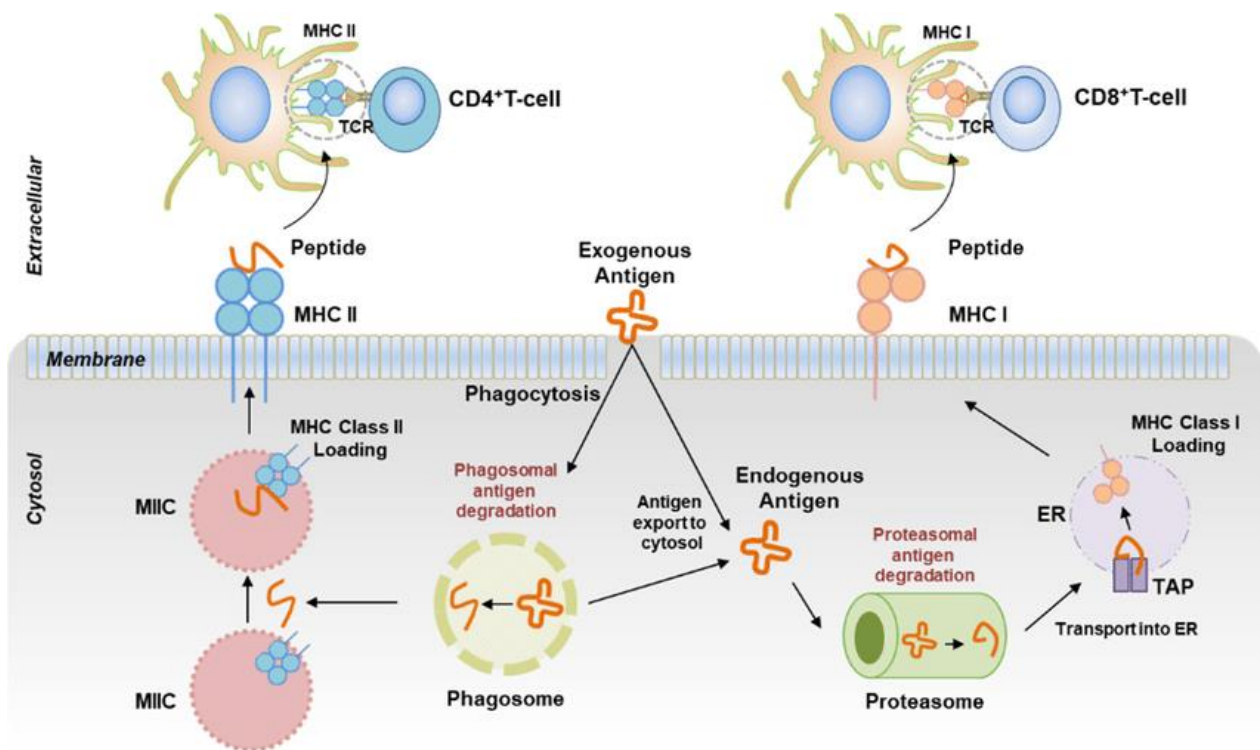
III.1 A dendritikus sejtek funkcionális jellemzése, a keresztprezentáció folyamata

A DS-ek biztosítják az immunrendszer két működési egysége, a természetes és az adaptív immunrendszer közötti kapcsolatot. A szövetek között folyamatosan vándorló éretlen DS-ek professzionális fagocita és antigén prezentáló sejtek, a veleszületett immunrendszer elemeiként elsősorban PRR-okkal képesek felismerni különböző mikrobákat⁵. Az antigén felvételét követően a perifériás szövetekből a nyirokcsomóba vándorolnak, ez alatt érett DS-ekké differenciálódnak és a feldolgozott antigéneket T sejteknek prezentálják. Ennek megfelelően az éretlen DS-ek fő funkciója a fagocitózis, az érett DS-eké pedig az antigének bemutatása⁷. Az érett DS-eken fokozódik a T limfociták aktiválásához szükséges sejtfelszíni kostimulátor és az antigén prezentációban szerepet játszó molekulák kifejeződése az éretlen sejtekhez képest⁸. Az elpusztult sejtek fagocitózisával különféle sejtekből származó antigének is bejuthatnak a DS-ekbe, ezáltal a tumor sejtekből felszabaduló vagy a hivatásos antigén prezentáló sejtek fertőzésére képtelen mikrobák fehérjéi is fontos antigén forrást jelenthetnek mind a major histocompatibility complex II (MHC-II), mind pedig az MHC-I molekulákon zajló prezentációhoz.

Az MHC-I fehérjék a normál prezentáció során nem férnek hozzá az exogén antigénekhez. Ezeket a fagocitált antigéneket a sejt membránnal határolt kompartmentekben internalizálja és általános esetben az MHC-II molekulákon jeleníti meg, stimulálva ezzel a CD4⁺ T-sejt választ. Ennek a jelenségnek egy érdekes kivételét képezi a keresztprezentációs útvonal, amely során a DS-ek exogén antigéneket prezentálnak MHC-I molekulákon, aktiválva a naiv CD8⁺ T-sejteket, ezáltal hozzájárulhatnak a daganatok eliminációjához is. A fagocitálásra képes professzionális antigén prezentáló sejtekben -makrofágokban és DS-ekben⁹- bizonyos mikrokörnyezeti feltételek mellett zajlik a keresztprezentáció. Ezt a folyamatot olyan tényezők szabályozzák, mint a prezentáló sejtek érési állapota, kostimuláló molekulák expressziós szintje vagy adjuvánsok jelenléte¹⁰.

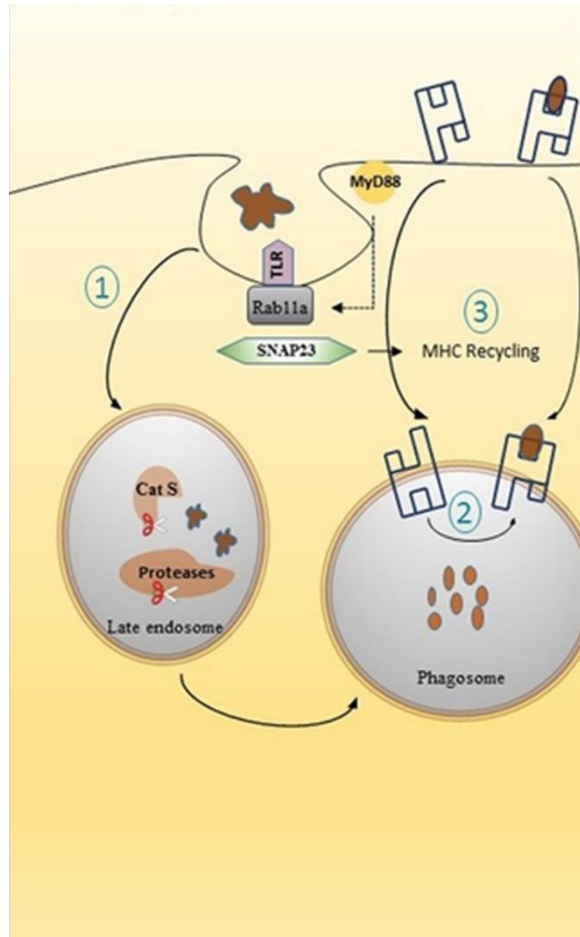
Az extracelluláris antigénekből származó peptidek az MHC-I molekulákon különféle mechanizmusokkal jelenhetnek meg. Az egyik lehetséges molekuláris mechanizmus a vakuoláris útvonal. Ennek során a fagoszómákban lévő proteázok elősegítik a fehérjék hasítását. A MHC-I fehérje a sejt felszínéről jut vissza a fagoszómákba különböző chaperonok (Rab11 és a SNAP23 fehérjék) közreműködésével, a hasított peptidek így az MHC-I-hez is kapcsolódhatnak. A

mechanizmus *in vivo* lépéssora még nem teljesen ismert, azonban a katepszin S lizoszomális proteáz, amelyet elsősorban az antigén prezentáló sejtek expresszálnak, nélkülözhetetlen a keresztprezentáció vakuoláris útvonalához. Másik lehetséges módszer az exogén antigének MHC-I-en való bemutatásához a fagoszóma-citoszol útvonal. Ennek során a fagoszómákban lévő antigének átjutnak a citoszolba, ahol lezajlik az antigének proteaszómákban való hidrolízise. Ezt követően a peptideket a TAP transzporter továbbítja az endoplazmatikus retikulumba (ER) ahol az MHC-I molekulákhoz kapcsolódik az exogén-eredetű peptid¹⁰. Az azonban még kérdéses, hogy a DS-ek azonos intenzitással fagocitálják és prezentálják-e az elpusztult sejtekből származó antigéneket. Kevésbé ismert, hogy ezeket a lépéseket a sejthalál módja hogyan befolyásolhatja. Ezáltal felmerül a kérdés, vajon a különböző programozott sejthalálformák módosíthatják-e a CD8⁺ T-sejtek választását a DS-eken keresztül¹¹.



1. Ábra: Keresztprezentációs útvonalak a DS-ekben. Fagoszóma-citoszol útvonal.

A DS-ek az extracelluláris térből antigéneket fagocitálnak, amelyeket nemcsak az MHC-II molekulán keresztül mutathatnak be a CD4⁺ T sejteknek (balra), hanem az MHC-I-en keresztül is prezentálják (jobbra, fagoszóma-citoszol útvonal). Az antigének a proteaszómákban degradálódnak. A proteaszómában keletkezett peptideket a TAP transzporterek az ER-ba szállítják, ahol hasítást követően az MHC-I-hez kapcsolódnak. (TAP, transporters associated with antigen processing protein; ER, endoplazmatikus retikulum)¹² Az ábra forrása: ¹².



2. **Ábra: Vakuoláris útvonal:** (1) A fagocitózis vagy receptor-mediált endocitózis által internalizált antigének a fago-lizoszómákban degradálódnak. (2) Az exogén antigén eredetű-peptidek MHC-I molekulákra kapcsolódnak. (3) Az MHC-I fehérje a sejt felszínétől visszajut a fagoszómákba chaperon (Rab11 és a SNAP23) fehérjék közreműködésével. (SNAP, soluble NSF attachment protein, Cat S, Cathepsin S)¹⁰ Az ábra forrása: ¹⁰.

III.2 A DS citotoxicitás szerepe az immunválasz során

A DS-ekről a szakirodalomban ismert az antigén prezentáló és T sejtet aktiváló funkciójukon túl a citotoxikus hatásuk is⁶. Ellentmondásos adatok jelentek meg azzal kapcsolatban, hogyan érhetik el ezt a hatást. A DS citotoxikus képessége főként a szövetekben lokalizált éretlen fenotípushoz kapcsolható, ezzel szemben a nyirokcsomóba vándorolt érett sejtek kevésbé citotoxikusak, amelyet mind vérből izolált, mind pedig *in vitro* differenciáltatott DS-ek vizsgálatával megerősítettek¹³. Azonban nem tisztázott még a DS-citotoxicitás alapjául szolgáló molekuláris háttér, illetve, hogy mi lehet a sejtölő képességük pontos fiziológiás

funkciója. Különösen váratlan ez a citotoxikus hatás, ha figyelembe vesszük, hogy a kórokozó felismerését követően aktiválódó, érett DS-ek a nyirokcsomóba vándorolnak⁷, így a periférián nagy mennyiségű fertőzött sejt elpusztítására nem lehetnek képesek. A sejtölő hatást a DS-ek kiválthatják szolubilis faktorokkal, mint a tumor necrosis factor α (TNF), Limphotoxin $\alpha 1\beta 2$, FasL vagy TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL) közvetítésével^{6,14,15,16}. A DS-ek ezen funkcióját a szolubilis ligandumok kollektív hatásaként^{6,15}, továbbá közvetlen sejt-sejt kapcsolat révén¹⁷ is leírták.

A DS-ek citotoxikus tulajdonsága lehetővé teszi, hogy az immunválasz szabályozóiként működjenek. Egyrészt képesek gátolni bizonyos limfociták expanszióját előregedett vagy autoreaktív limfociták esetében¹⁸. A DS-ek tekinthetők a természetes immunitás effektor sejtjeinek¹⁹, sejtölő funkciójukat kimutatták tumoros célsejtekkel szemben is. Továbbá az *in vitro* generált vagy a vérben keringő éretlen DS-ek számára a célsejtek elpusztítása lehetővé teszi az apoptotikus sejtekből származó antigének gyors fagocitózist és keresztprezentálását a citotoxikus T sejteknek^{20,13}.

III.3 A makrofágok heterogenitása

A makrofágok kulcsszerepet játszanak a fertőzések elleni védekezésben, a sérült vagy apoptotikus sejtek eltávolításában, illetve a szöveti sérüléseket követő regenerációban. Jól ismert fagocita funkciójukon túl részt vesznek a homeosztázis fenntartásában és az immunválasz szabályozásában; az antigének bemutatásával, citokinek és más biológiailag aktív molekulák előállításával, valamint a T sejtek szabályozásán keresztül is. A makrofágok térben és időben is eltérő szereppel bírhatnak, azáltal, hogy funkcionális tulajdonságaik nem csak az eredetüktől, hanem a szöveti környezetből származó molekuláris jelektől is függenek. Eltérő szöveti környezetben reverzibilis változásokon mehetnek keresztül, amelyet a lokális citokin és PRR-stimulusok vezérelnek. A makrofágok megfelelő ingerek által irányított plaszticitása biztosítja a gyulladásos folyamatok kialakításában és megszüntetésében betöltött dinamikus szerepüket^{1,21,22}.

III.3.2 Az M1 és M2 makrofág alpopulációk szerepe az immunválaszban

A makrofágok két jól meghatározható polarizációs állapota ismert, a klasszikusan aktivált M1 és alternatív módon aktivált M2 fenotípussal rendelkező makrofágok csoportja, amelyek

különböző faktorokat termelnek, eltérő biológiai funkciókkal és sejtfelszíni markerekkel rendelkeznek. Az M1 sejtek biztosítják az immunrendszer első védelmi vonalát, aktiválják mind a veleszületett, mind az adaptív immunitást. Az M2 makrofágok felelősek a szöveti regeneráció szabályozásáért, részt vesznek az apoptotikus testek eltakarításában és hozzájárulnak az immunszuppresszió kialakításához is²³. A legújabb kutatások szerint azonban a különféle mikrokörnyezeti feltételek integrációja képes a polarizációs állapotok teljes spektrumát létrehozni az M1 és M2 között^{24,25}.

III.3.3 Az M1 makrofág populáció sajátosságai

A klasszikus, M1 makrofág polarizációt Th1 típusú citokinek (Interferon γ (IFN) vagy TNF α), intracelluláris patogének és baktérium sejtfal komponensek (például lipopoliszacharid, (LPS)) indukálhatják²⁶. Ezek a makrofágok gyulladást elősegítő, TNF α , Interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 citokinek termelnek, valamint alacsony koncentrációban IL-10 anti-inflammatórikus hatású citokint is szekretálnak²⁷. A gyulladást elősegítő citokinek kifejezésével az adaptív immunrendszert is aktiválják, növelik a sejtfelszíni MHC-II és a CD40, CD80, CD86 kostimulációs molekulák kifejezését²⁷. A kemotaktikus aktivitású CXCL8 fő forrásai, amely termelésével már nanomoláris koncentrációban kiváltják a neutrofil granulociták és limfociták szelektív toborzását²⁸. Az M1 makrofágok által termelt további kemokinek, például a CXCL9 és a CXCL10, a Th1 sejtek toborzását segítik²⁷.

III.3.4 Az M2 makrofág populáció sajátosságai

Az alternatív, M2 makrofág fenotípus főként a Th2 sejtek, bazofil és az eozinofil granulociták által termelt citokinek (IL-4, IL-13, IL-10, IL-33) jelenlétében alakul ki²⁶. Az M2 makrofágok gyulladásgátló hatással jellemezhetőek, nagy mennyiségben szekretálnak IL-10 és transforming growth factor β (TGF), valamint alacsony koncentrációban IL-12 citokint^{2,29}. Biológiai aktivitásukat tekintve az M2 makrofágoknak fontos szerepük van a parazitaellenes immunválaszban, nagymértékű fagocitáló képességgel rendelkeznek, így eltávolítják a törmeléket és az apoptotikus sejteket is. Pro-angiogén és pro-fibrotikus faktorokat bocsátanak ki, ezáltal elősegítik a szövetek regenerálódását és a sebgyógyulást^{2,29}. Az M2 sejtek által termelt kemokinek, például CCL17, CCL18, CCL22 és CCL24 segítik a regulátor T sejteket (Treg),

eozinofil és bazofil granulociták toborzását²⁷. Attól függően, hogy mi volt a polarizációt kiváltó stimulus, az M2 makrofágok további alpopulációkra (M2a, M2b, M2c és M2d) bonthatóak, amelyek citokin termelése és sejtfelszíni receptor kifejezése is eltérő².

III.4 Tumorasszociált makrofágok

A tumor mikrokörnyezetbe infiltrálódó immunsejtek egyik legnagyobb populációját a monociták/makrofágok képezik. A szolid tumorokra jellemző a monociták vagy makrofágok toborzása és átprogramozása, amelynek következtében tumorasszociált makrofágok (TAM) jönnek létre. A TAM-ok segítik a daganatok növekedését és progresszióját, azáltal, hogy fokozzák az angiogenezist, valamint a növekedési faktorok termelését és immunszuppressziót indukálnak³⁰. Az immunszuppresszív környezet kialakításához hozzájárul a TAM-ok gyenge antigén prezentáló képessége, az IL-10 és TGF β szekréciója, továbbá képesek aktiválni a Treg-eket is. A TAM-ok olyan enzimeket és proteázokat termelnek, mint például mátrix metalloproteázokat (MMP), plazmint, osteonektint és katepszineket, amelyek elősegítik az extracelluláris mátrix (ECM) lebomlását, ezzel elősegítve a metasztázisok képződését². Ennek megfelelően a TAM-ok infiltrációja rossz prognózissal jár bizonyos daganatokban, mint például a petefészek- és emlőrák, a B sejt limfóma, szarkóma és a klasszikus Hodgkin limfóma esetében^{31,32}.

III.5 A makrofág alpopulációk szerepe betegségek patogenezisében

A pro-inflammatórikus és az anti-inflammatórikus makrofágok egyensúlyának felborulása figyelhető meg bizonyos betegségek patogenezisében. A daganatok^{30,33} esetében az M1 túlsúly, míg a szív- és érrendszeri betegségek³⁴, fertőzések³⁵, krónikus gyulladás³⁶ cukorbetegség³⁷, autoimmun reakciók³⁸ kezelésében pedig az M2 populáció dominanciájának kiváltása lenne megfelelő terápiás módszer. A tumorelles terápia hatékonyságának növelése érdekében számos projekt dolgozik olyan stratégiák kidolgozásán, amelyek a TAM-ok M1 fenotípusá történő repolarizációját célozzák meg a tumor sejtek mikrokörnyezetében².

III.6 A sejthalál

A sejthalál elengedhetetlen a homeosztázis során feleslegessé vált, elöregedett vagy a sérült sejtek eltávolításában. A Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) 2018. évi

meghatározása szerint a következő sejthalál csoportok különíthetők el: a szabályozott sejthalál (regulated cell death, RCD), az esetleges/véletlen sejthalál (accidental cell death, ACD) és a programozott sejthalál (programmed cell death, PCD). Ezekben a kategóriákban morfológiai, genetikai, biokémiai, farmakológiai és funkcionális tulajdonságaik alapján rendszerezik a különféle sejthalál típusokat. Molekuláris mechanizmusaik alapján RCD-nak tekinthető az intrinsic apoptózis, extrinsic apoptózis, mitokondriális permeabilitás tranzíció (MPT), nekroptózis, ferroptózis, piroptózis, parthanatos, entózis, netózis, lizoszóma-függő sejthalál, autofágia-függő sejthalál és az immunogén sejthalál³⁹.

III.7 A sejthalál immunrendszerre gyakorolt hatása

A humán szervezetben sejtek milliárdjai pusztulnak el naponta különféle sejthalál útvonalakon, amelyre az immunrendszer számos módon reagálhat. Az immunrendszerre gyakorolt hatásuk alapján tolerogén, gyulladásos és immunogén típusokat különböztethetünk meg. Ezen sejthalál folyamatok lezajlását különböző molekuláris útvonalak irányítják, amelyek eltérően befolyásolják a természetes és az adaptív immunrendszer működését.

Az elhaló sejtek felszabadíthatnak olyan molekulákat, amelyek a szervezet számára figyelmeztető jelként szolgálnak. Ilyen veszély jelek általában a gyulladásos szignálok, például a sérülés-asszociált molekuláris mintázatok (DAMP-ok) csoportjai. A DAMP-ok, a patogén-asszociált molekuláris mintázatokhoz (PAMP) hasonlóan aktiválják a természetes immunrendszert, ezáltal hozzájárulnak a T sejtek aktiválásához is, szabályozva ezzel az adaptív immunitást^{39,40}. A sejthalál által kiváltott specifikus immunitás előfeltétele, hogy az elpusztuló sejt antigéneket tárjon fel, illetve az immunrendszernek olyan mechanizmusokat kell működtetnie, amelyek megkülönböztetik a sejthalál különféle típusait. Az ACD sejthalálokkal ellentétben, ahol a súlyos fizikai vagy kémiai behatás (például mechanikai nyíróerők, magas nyomás, hőmérséklet, ozmotikus erők, szélsőséges pH-ingadozások) eredményeként a sejtek azonnali pusztulása következik be, a RCD meghatározott molekuláris lépések eredménye. Ez azt jelenti, hogy farmakológiai vagy genetikai beavatkozások útján szabályozható, azaz késleltethető vagy felgyorsítható.

III.8 Az apoptózis

Az apoptózis számos útját leírták, amelyek mindegyike az iniciátor és a végrehajtó kaszpázok aktivációjának függvénye. Morfológiai szempontból az apoptotikus sejtek jellegzetes folyamatsort hajtanak végre: az elpusztuló sejt eltávolodik a környező sejtektől, megszünteti kapcsolatát az extracelluláris mátrixszal, majd lekerekedik. A sejtmembránon kitüremkedések képződnek, a kromatin kondenzálódik, ezt követően pedig a DNS fragmentálódik és 200-250 bázispárnyi szakaszokra esik szét. Végül létrejönnek az apoptotikus testek, amelyek membránnal határolva tartalmazzák a sejt komponenseit. A sejt tartalom nem ürül ki az extracelluláris térbe, ennek megfelelően az apoptózis olyan RCD, amelynek általában tolerogén a kimenetele³⁹. Azonban az apoptózis korábbi ismereteinkkel ellentétben bizonyos körülmények között immunogén is lehet, indukálhatja az adaptív immunrendszert⁴⁰. Egyes publikációk szerint az apoptotikus sejthalál aktív mechanizmusai hozzájárulhatnak az elpusztuló sejtek immunogenitásához³⁹. Ilyen mechanizmus lehet például a kaszpázok aktív működése által feltárt neoepitópok kialakulása, amelyekről ismert, hogy „előnyben részesülnek” a keresztprezentálás során⁴¹.

III.8.2 Extrinsic apoptózis

Az apoptózis két útvonalon aktiválódhat, ennek egyik formája az extrinsic apoptózis, mely egy, az extracelluláris mikrokörnyezeti zavarokra aktiválódó RCD³⁹. Három típusú receptor aktiválhatja: (1) halálreceptorok (death receptor, DR) a sejthalál ligandumok kötését követően, (2) PRR-ek, illetve (3) dependence/függőség receptorok^{42,43,44,45}.

A DR-ok intracelluláris fehérje-fehérje kölcsönhatásra képes doménnel rendelkeznek, úgynevezett haláldoménnel (death domain, DD), amely elengedhetetlen az apoptózis elindulásához⁴⁶. A DR ligandumai közé tartozik a TNFR1-TNF α , Fas-FasL, TRAILR1(másnéven: DR4) -TRAIL és a TRAILR2 (másnéven: DR5) -TRAIL. A DR-ok bizonyos esetekben dimerként vannak jelen⁴⁷, vagy a megfelelő ligandum általi stimulálást követően oligomerizálódnak és konformáció változáson mennek keresztül. Ezáltal hozzáférhetővé válik a citoplazmatikus DD-jük, ami elősegíti a többi DD-tartalmú fehérjével való kölcsönhatást⁴⁸. A ligandum általi aktiváció következménye a death-inducing signaling complex (DISC) komplex létrejötte, amely Fas-associated protein with death domain (FADD)/Tumor

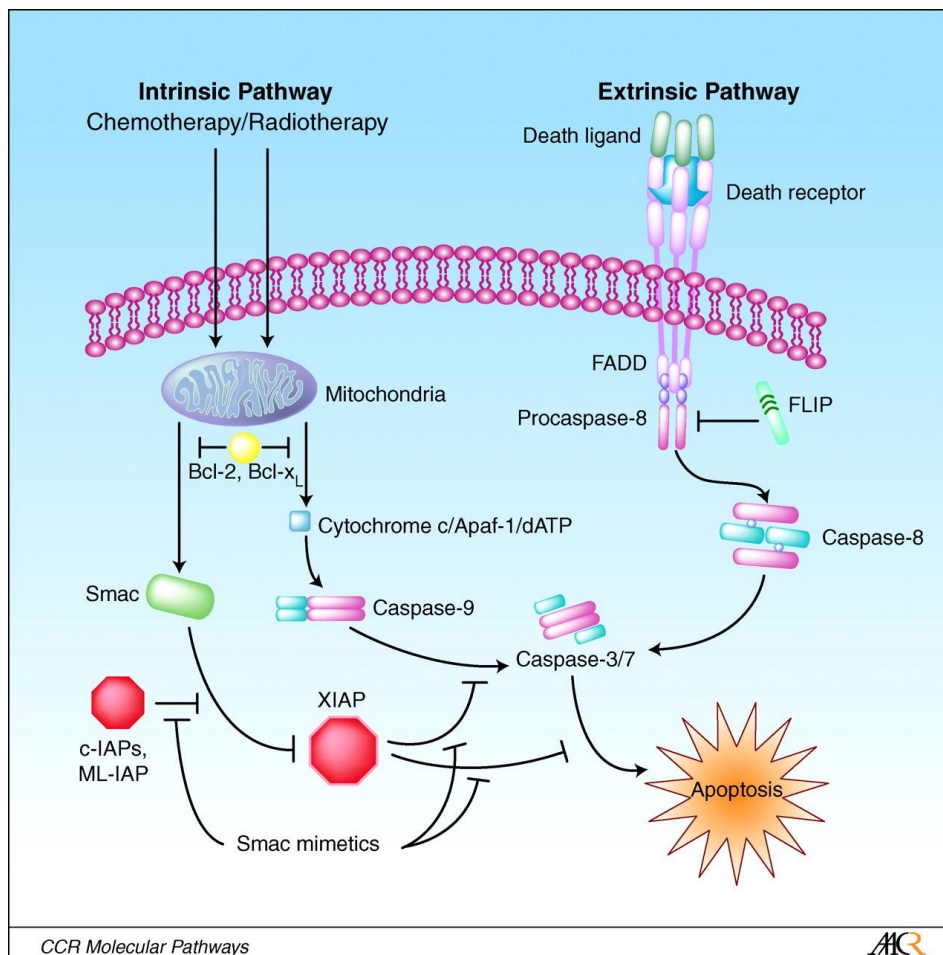
necrosis factor receptor 1-associated death domain (TRADD) adapter fehérjék segítségével koncentrálna az iniciátor pro-kaspázokat (pro-kaspáz 8 és/vagy pro-kaspáz-10) a komplexben. A zimogén formában lévő kaspázok aktiválása proteolitikus hasítással történik. A prodomén hasításának helyén lévő konszenzus szekvencia kaspáz-specifikus, ezért a kaspázokra jellemző az autokatalízis. A DISC komplexben történő oligomerizálódás tehát kedvezően hat az auto-proteolitikus aktiválódásukra⁴⁹.

Az iniciátor kaspázok aktiválása az effektor kaspázok (kaspázok-3, -6 és -7) aktiválódását eredményezi, amelyek ezt követően a sejtek életképességéhez nélkülözhetetlen szubsztrátokat hasítják. Ennek következményeként a citoplazma és a sejtmag vázrendszere sérül, az intracelluláris transzportfolyamatok súlyosan károsodnak, a DNS fragmentálódik, így az alapvető sejtéletlen folyamatok leállnak⁵⁰.

III.8.3 Intrinsic útvonal

Az apoptózis intrinsic útvonala olyan receptor-független RCD forma, melyet intracelluláris szignálok közvetítenek. Az útvonal különböző mikrokörnyezeti változásokra aktiválódik, mint például az ER-stressz, UV-sugárzás, radioaktív sugárzás, mitózisban bekövetkező hibák, ROS túlzott mennyisége, a növekedési faktorok, tápanyagok hiánya vagy különböző citosztikumok³⁹. A stimulusok megváltoztatják a mitokondrium belső membránpotenciálját, ami a mitokondrium membrán pórusainak megnyitását eredményezi. Ennek következtében membránok közötti térből a pro-apoptotikus fehérjék jutnak a sejt citoplazmájába³⁹. Ilyen pro-apoptotikus fehérje a citokróm c, melynek kibocsátása lehetővé teszi az apoptozóma kialakulását. A citokróm c, az apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1), a kaspáz-9 és az ATP kölcsönhatásával megalakul az apoptozóma. Ebben a komplexben aktiválódik a kaspáz-9, amely hasítja az effektor kaspázokat (kaspáz-3 és a kaspáz-7)^{51,52}.

Amennyiben a kaspázokhoz IAP-ék kapcsolódnak, megakadályozzák azok pro-apoptotikus proteáz funkcióját. Ekkor az apoptózis csak az IAP-ék gátlása révén mehet végbe, amelyet a SMAC közvetít. A SMAC, mint pro-apoptotikus fehérje, képes gátolni az IAP-éket, csökkenheti vagy megszüntetheti az IAP kaspázokkal való kölcsönhatását, így lehetővé teszi a kaspáz enzimek aktivitását a programozott sejthalál során. Az IAP-ék szabályozó hatása kaspázok közvetlen gátlásával és/vagy a proteaszómális degradációjukkal történhet⁵³.



3. **Ábra: A SMAC mimetikumok gátló szerepe az apoptózis extrinsic és intrinsic útvonalában.** Az *intrinsic* jelátviteli útvonalat a különböző stressz stimulusok válthatják ki, például sugárzás, kemoterápiás szerek vagy a növekedési faktorok hiánya. A Bcl2 család pro-apoptotikus BH3-only tagjai gátolják az anti-apoptotikus (Bcl-xL és Mcl-1) fehérjéket, ezáltal citokróm c és SMAC szabadul fel a mitokondriumból a citoplazmába. Ezek az események a kaszpázok (3, -7 és -9) aktiválódásához, végeredményben pedig a sejt halálához vezetnek. Az extrinsic útvonalat a Fas, DR5 vagy például a TNFR megfelelő ligandummal való asszociációja indíthatja el. A receptoron keresztül zajló jelátvitel következménye a FADD és pro-kaspáz-8 fehérjék toborzása, illetve a kaszpáz-8 és az effektor kaszpázok (kaspáz-3, -7) aktiválódása. A sejthalállal szembeni utolsó védelmi vonalat az IAP-ék jelentik, melyek képesek blokkolni a kaszpáz-3, -7 és -9 fehérjéket. A mitokondriumból felszabaduló SMAC, illetve a szintetikus SMAC mimetikumok a sejthalál lezajlását segítik elő azáltal, hogy megzavarják az IAP-kaspáz kölcsönhatásokat és lehetővé válik az apoptózis végbemenetele. (Bcl-2, B-cell lymphoma 2; Bcl-xL, B-cell lymphoma extra large; FLIP, FLICE-like inhibitory protein, FADD, Fas-associated protein with death domain; SMAC, second mitochondrial activator of caspase)³ Az ábra forrása: ³.

III.9 Apoptotikus útvonalak RIPK1-függése

A TNF α két különálló útvonalon keresztül válthat ki apoptózist, melyek egyaránt kaszpáz-8 függőek. Az egyik lehetséges útvonal a second mitochondria derived activator of caspase (SMAC) mimetikumok által indukált (RIPK1-függő) sejthalál. Ez folyamat eltér attól, amely a cikloheximid (proteinszintézis-inhibitor) jelenlétében alakul ki. A két útvonal fő különbsége a RIPK1 molekula használata. A RIPK1 nélkülözhetetlen az SMAC-mimetikumok által stimulált-, de nem szükséges a cikloheximid-mediált apoptózis kialakulásához, míg a FADD mindkét útvonalban fontos résztvevő^{54,3}.

III.10 A nekroptózis

A nekroptózis a RCD egyik típusa, mely bekövetkezhet számos receptor (DR, PRR, DNS-kötő és adhéziós receptorok) aktivációjának, valamint immunreakciók, kórokozók és különféle gyógyszerek hatására is^{39,55}. Az RCD ezen típusa fontos az embrionális fejlődés bizonyos szakaszaiban, a T sejt homeosztázis fenntartásában⁵⁶, a vírusos fertőzések leküzdésében^{57,58,59}. Szerepe több betegség patogenezisében is bizonyított, így például degeneratív és gyulladásos kórképekben⁵⁶. Hasonló morfológiai tulajdonságokkal rendelkezik, mint a passzív nekrozis. Ezek a tulajdonságok a következők: a sejtek lekerekedése, amelyet duzzanat (onkózis) és a plazmamembrán ruptúrája követ, a membrán integritásának elvesztése pedig gyulladásos reakciót vált ki⁵⁶.

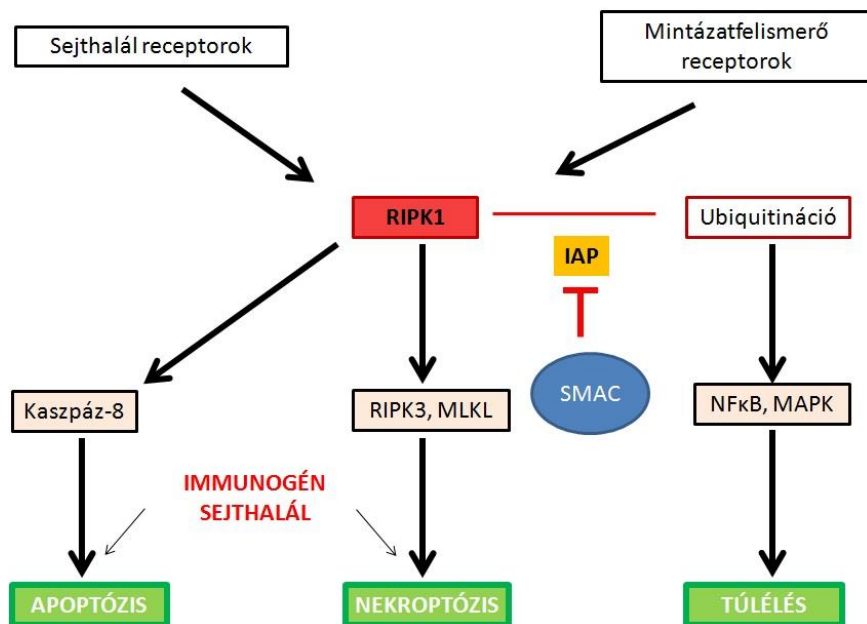
Jelátvitelét tekintve a nekroptózis folyamatához elengedhetetlen a RIPK1, RIPK3 és az MLKL aktivációja. A RIPK1 és a RIPK3 összekapcsolódik, majd az így kialakult nekroszóma idézi elő a pro-nekroptotikus molekula, az MLKL foszforilációját. A kaszpáz-8 gátlása elengedhetetlen a nekroptózis létrejöttéhez, mivel aktív formában hasítják a RIPK1⁶⁰, RIPK3⁵⁵ és a RIPK1 deubiquitinálásáért felelős cylindromatosis (CYLD) fehérjét, ezáltal gátolva a nekroptózis jelátvitelét⁶¹. A kaszpázok gátlása történhet például mutációk vagy bizonyos patogének (Herpes simplex vírus-1, egér citomegalovírus, Shigella flexneri)^{62,63}, illetve farmakológiai szerek által (Z-VAD, Z-Dev)⁶⁴.

III.10.2 A nekroszóma kialakulása, az MLKL aktiválása

A nekroptotikus stimulus hatására kialakul az MLKL fehérjét foszforiláló nekroszóma. A komplex létrejöttéhez elsőként a RIPK1 és RIPK3 a RHIM doménjükön keresztül összekapcsolódnak, ennek következtében a RIPK3 oligomerizálódik. A kialakult komplexben mind a RIPK1, mind a RIPK3 foszforilálódik. A foszforiláció humán szervezetben a RIPK1 a 161-es, a RIPK3 esetében pedig a 277-es szerinen történik. A RIPK3 oligomerizáció és az azt követő foszforiláció lehetővé teszi a RIPK3-MLKL kölcsönhatásának kialakulását. A kapcsolódást követően a RIPK3 foszforilálja az MLKL molekulát (a 357-es treoninon és a 358-as szerinen)⁶⁵. Ennek hatására az MLKL térszerkezete megváltozik, oligomerizálódik, majd a plazmamembránba transzlokálódik. A sejtmembránban pórust formál, vagy kation csatornák aktiválásával növeli a Ca^{2+} és Na^{+} ionok beáramlását. Ezáltal megnövekszik az intracelluláris ozmotikus nyomás, ami a homeosztázis felborulásához, a sejt duzzadásához és a nekrozisra jellemző morfológia kialakulásához vezet. Amikor a plazmamembrán megreped, a citoszolban levő DAMP-ok felszabadulnak, amely folyamat szöveti gyulladást és szervkárosodást válthat ki⁶⁶. A nekroptózis tanulmányozása kísérletes rendszerekben elsősorban kaszpáz gátlók jelenlétében történik, míg *in vivo* főként vírusok által kiváltott kaszpáz gátlást követően fordul elő⁶⁷.

III.11 A RIPK1 szerepe a túlélés és a sejthalál szabályozásában

A RIPK1 fehérje egy szerin-treonin kináz, mely számos ponton vesz részt a sejtek működésében és jelátvitelében. Szerkezetét tekintve az N-terminálisán tartalmaz egy kináz domént, RHIM (RIP homotypic interaction motif) domént, C-terminálisán pedig egy halál domént (Death domain, DD), amelyen keresztül a sejthalál receptorokkal (Fas, TNFR1, TRAILR1, TRAILR2), valamint a TRADD és a FADD molekulákkal léphet interakcióba. A sejthalál receptorok aktiválása többféle jelátviteli eseményhez vezethet. Stimulálásuk a sejtípustól, a mikrokörnyezettől, az aktivációs állapottól függően alternatív kimeneteket tesz lehetővé. Egyrészt indukálhatóak túlélő szignálok az NF- κ B és MAPK kaszkád aktivációjával, amelyek együttesen vezérlik a különféle gyulladáshoz és túlélést elősegítő gének kifejeződését. Másrészt a DR-ok aktiválása közvetíthet a RIPK1-függő és RIPK1-független apoptózist, valamint nekroptózist is⁶⁸.



4. **Ábra: A RIPK1 szerepe a túlélés és a sejthalál szabályozásában.** A RIPK1 fehérje a sejthalál receptorokkal, a FADD molekulával, továbbá mintázat felismerő receptorokkal (TLR3 és TLR4) léphet interakcióba. A RIPK1-függő sejthalál folyamatok szükségesek az immunogén sejthalál kialakulásához. Ha a sejthalál során a RIPK1 ubiquitinált állapotban van, akkor sejt aktiváció következik be. Ha azonban a RIPK1 deubiquitinált állapotban van, akkor a RIPK1-függő sejthalál útvonalak aktiválódnak. Alapesetben a RIPK1 ubiquitinált, az apoptózis pedig FADD és kaspáz-8 mediált útvonalon zajlik. Ekkor az apoptózis RIPK-független módon történik. Azonban a sejthalál receptorok jelátvittele eredményezhet RIPK- függő sejthalált is. A RIPK1 fontos szerepet tölt be mind az apoptotikus, mind a nekroptotikus folyamatok jelátvitelében, attól függően, hogy milyen komplexben helyezkedik el. Apoptózis lesz a folyamat végkimenetele, ha a RIPK1 és a FADD komplexéhez kapcsolódik a kaspáz-8. A komplex valamelyik molekulájának hiányában vagy kaspáz gátlók jelenlétében azonban nekroptózis következik be. Ilyenkor a RIPK1 a RIPK3 kinázhoz kapcsolódik, és kialakul az nekroszóma, amely előidézi a pro-nekroptotikus molekula, az MLKL foszforilációját. (MLKL, mixed lineage kinase domain like pseudokinase; RIPK, receptor interacting protein kinase; IAP, inhibitor of apoptosis; SMAC, second mitochondrial activator of caspase)^{54,69}

III.12 A TNF α jelátvitel lehetséges kimenetelei

A TNF α , TRAIL, Fas ligand mind a tumor nekrosis szupercsalád tagjai, receptoraik egy extracelluláris ligandkötő, egy transzmembrán és egy intracellulárisan elhelyezkedő DD-ből állnak. A DR-ok aktivációját a specifikus ligandum bekötődése után létrejövő receptor oligomerizáció váltja ki, ami elindítja a jelátviteli kaszkádot. A szakirodalomban TNF receptor (TNFR) szignalizációja ismert a leg részletesebben.

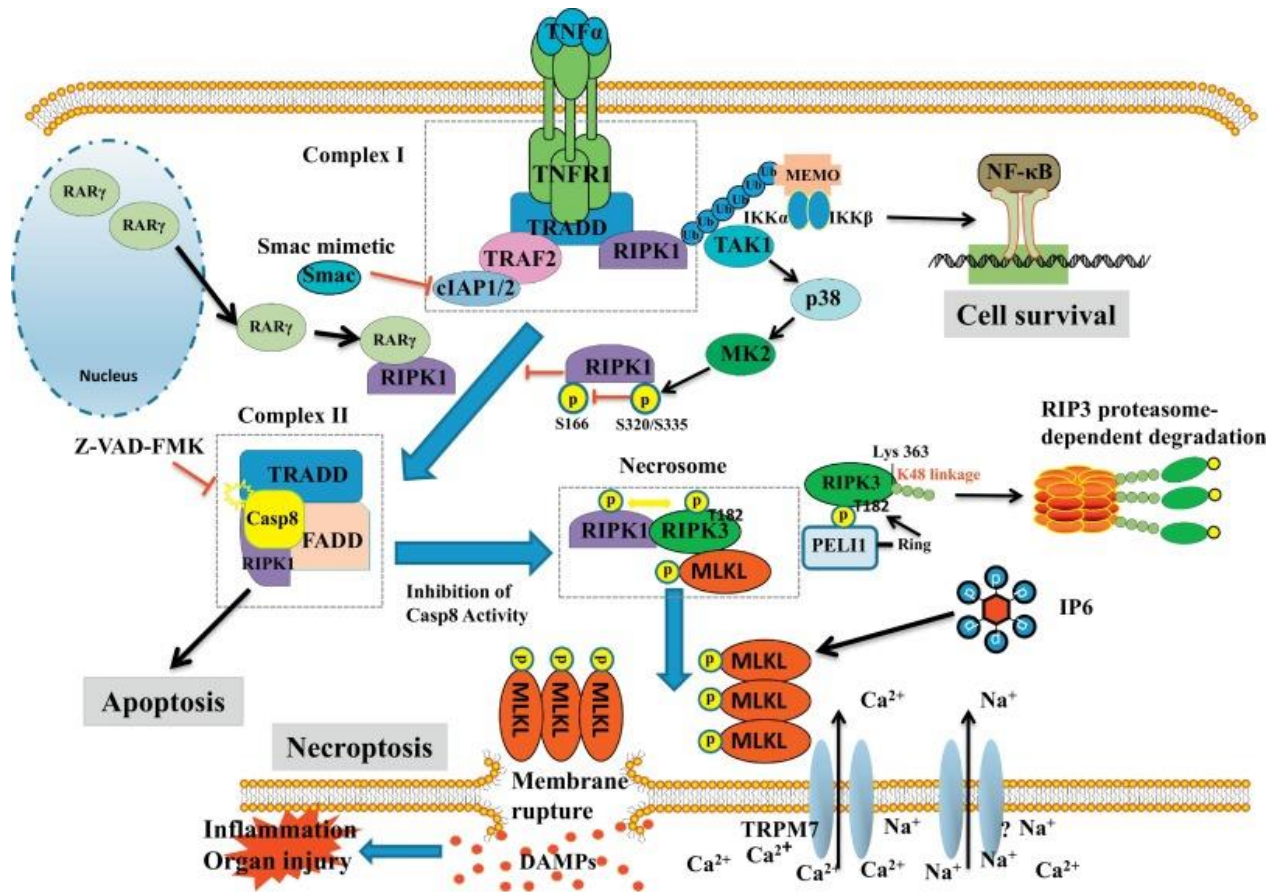
A TNF α receptorhoz kötődésének hatására a TNFR trimerizálódik és konformációja megváltozik, melynek következtében leválik a DD-ről annak gátló fehérjéje, a silencer of death domain (SODD). A gátlás alól felszabadult receptorhoz kötődik a TRADD, ami magához toborozza a RIPK1, a TNF receptor associated factor 2 (TRAF2) és TRAF5 fehérjét. A TRAF2 a komplexhez kapcsolja az IAP1 és IAP2 ubiquitin ligázokat és a LUBAC fehérje komplexet (HOIL-1, HOIP, and Sharpin) is. Az IAP1 és IAP2 ubiquitinálják (fehérje-fehérje interakciókat segítő K63-as poliubiquitin láncot alkotva) a RIPK1-et annak 377-es lizinjén. Ezen felül a LUBAC további lineáris ubiquitin láncokat kapcsol a K63-as poliubiquitinhez, amely láncokhoz kapcsolódhat a NEMO adapter fehérje. A poliubiquitin láncok és a NEMO pedig az IKK komplexnek (IKK α/β , TBK1/IKK ϵ), valamint a TAK1, TAB2 és TAB3 molekuláknak a toborzását teszik lehetővé, amelyek aktiválják a downstream jelátviteli útvonalak (NF- κ B és MAPK) foszforilációs lépéseit. Az így kialakult fehérje komplex (I.-es típusú komplex) a sejt aktiváció mellett többféle túlélési szignált is közvetít. Egyrészt a transzkripciós faktorok (NF- κ B és MAPK) aktiválásával anti-apoptotikus fehérjék (FLIP, IAP) kifejezését eredményezi, másrészt a TAK1 kináz - és downstream szubsztrátjai - a RIPK1 foszforilálásán keresztül gátolják a RIPK1 közvetített sejthalál szignálokat. A RIPK1 tehát a komplex enzimatikusan inaktív tagjaként, állvány fehérjeként járul hozzá a TNF α -indukált sejtaktivációhoz^{70,69}.

A TNFR aktiválódásának másik lehetséges következménye a sejthalál folyamatok végbemenetele. Amennyiben a TNF α indukált túlélő szignálok nem gátoltak, az I.-es komplex disszociálódik a TNFR1-ről⁷¹ és a citoszólban elhelyezkedő TRADD, a FADD, a FLICE-like inhibitory protein hosszú izoformájával (FLIP_L) és a pro-kaspáz-8 fehérjékkel az úgynevezett II.a komplex (TRADD, FADD, RIPK1, kaspáz-8, FLIP_L) alakul ki. Ebben a komplexben a pro-kaspáz-8 oligomerizálódik, hasítódik és aktiválódik, amely apoptotikus sejthalálhoz vezet⁷⁰. Továbbá a komplex összeszerelődésekor kialakuló FLIP_L és pro-kaspáz-8 heterodimerek, vagy az aktív kaspáz-8 homodimerek hasítják a RIPK1-et és a RIPK3-at. Ezáltal a nekroptózis elindulását gátolják és biztosítják a tolerogén apoptózis dominanciáját a nekroptotikus sejthalállal szemben^{69,60,56}.

Ha a RIPK1 deubiquitinált állapotba kerül, megváltozik a II.-es komplex összetétele, ennek elnevezése a komplex IIb⁷². A RIPK1 deubiquitinációja megtörténhet egyrészt a CYLD vagy A20 deubiquitináz aktivációjával, vagy pedig a RIPK1 ubiquitinációját végző IAP fehérjék gátlásával, vagy azok hiányában. A IIb komplexben a TRADD helyett a RIPK1 kapcsolja össze a

FADD és pro-kaspáz-8 fehérjét, ekkor a RIPK1-függő apoptózis zajlik le^{73,69}. A TNF jelátvitel további lehetséges kimenetele a nekroptózis kialakulása, melynek előfeltétele a kaspáz-8 inaktív, gátolt állapota⁶⁹. A TNF által indukált nekroptózisban⁶⁸ az előző fejezetekben már ismertetett módon a RIPK1 a RIPK3-mal alkot komplexet (komplex IIc).

Az ubiquitináció mellett a RIPK1 aktivitását a foszforilációs/poszt-transzlációs változásai is módosítják. A nekroptózist elősegítő foszforilációs események mellett, több, a RIPK1-függő sejthalált gátló foszforilációs lépés is ismert, ilyen például a TAK1, a TBK1 és az IKKε általi RIPK1-foszforiláció^{74,75}.



5. **Ábra: A TNF α receptor jelátviteli útvonala és szabályozása.** A TNF α TNFR1-hez való kötődése kiváltja az I-es komplex képződését (TRADD, RIPK1, TRAF, IAP1/2). Az I-es komplexen keresztül aktiválódik az NF κ B jelátviteli út, amely folyamathoz elengedhetetlen a RIPK1 IAP fehérjék (IAP1, IAP2) által kiváltott poliubiquitinációja. Az aktivált NF κ B a sejtek túlélését és a pro-inflammatorikus citokinek termelődését eredményezi. Ha az IAP fehérjék aktivitása gátolt- például a SMAC vagy SMAC mimetikumok által-, a RIPK1 deubiquitált állapotba kerül. Ekkor az I-es komplex a citoplazmába jut, ahol a FADD megkötésével létrejön a II-es komplex. A FADD szükséges a pro-kaspáz-8 dimerizációjához és aktiválásához, ezáltal az apoptózis lezajlását segíti elő. A RAR γ - TNF α és SMAC

mimetikum jelenlétében - kijut a sejtmagból a citoplazmába. Kölcsönhatásba lép a RIPK1-gyel, amellyel elősegíti a RIPK1 disszociációját az I-es komplexből. A TAK1 közvetlenül vagy a p38/MAPK útvonalon, a MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) fehérjén keresztül foszforilálhatja a RIPK1-et. Ezzel a poszttranszlációs módosítással a RIPK1 auto-foszforilációja (S166) gátolt, ami megakadályozza a II.-es komplex képződését. A Z-VAD-FMK kaszpáz inhibitor általi gátlás teszi lehetővé, hogy a RIPK3 a II.-es komplexhez csatlakozzon, létrehozva ezzel a nekroszómát és aktiválva a nekroptózist. A nekroptózis gátolható ebben a lépésben is például a PELI1 ligáz enzim által, amely a RIPK3-at a K48 ubiquitinációval a proteaszómális lebontásra itéli. PELI1hiányában az MLKL csatlakozik a nekroszómához, ahol a RIPK3 foszforilálja, kiváltva ezzel az oligomerizációját és a plazmamembránba való transzlokációját. Az MLKL transzlokációját az inozitol-foszfátok például az IP6 molekula is elősegítheti. Az MLKL sejtmembránba való átjutása elengedhetetlen a pórusképződéshez. Egyrészt az MLKL közvetlenül károsíthatja a membránt. Másrészt a kation csatornák megnyitásával, Na^+ és Ca^{2+} ionok beáramlásával növelheti a sejt ozmotikus nyomását, amely folyamattal kiváltja a membránruptúrát. A sejtmembrán sérülésekor a citoplazmában lévő DAMP-ok felszabadulnak, ami gyulladáshoz és szövethárosodás kialakulásához vezet. (FADD, Fas-associated protein with death domain; TRADD, tumor necrosis factor receptor 1-associated death domain; MK2, MAPK-activated protein kinase 2; RAR, retinoic acid receptor; PELI1, Pellino E3 Ubiquitin Protein Ligase 1; TAK1, transforming growth factor- β -activated kinase1; MLKL, mixed lineage kinase domain like pseudokinase; RIPK, receptor interacting protein kinase; IP6, inositol phosphate-6) ^{68,76,77}. Az ábra forrása: ⁶⁸.

III.13 Az apoptózis gátló fehérjék

Az IAP fehérjék családja részt vesz a sejtek különféle folyamatainak szabályozásában, beleértve a sejthalált, az immun- és gyulladáshoz kapcsolódó reakciókat, a sejtek proliferációját, differenciálódását és a motilitását. Ezen folyamatok végrehajtásához az IAP-ék kapcsolatba lépnek kaszpázokkal, az NF κ B útvonal szabályozóival, az aktin citoszkeleton elemeivel, továbbá transzkripció regulátorokkal is⁵¹.

A humán genom nyolc IAP-kódoló gént tartalmaz. A fehérje család tagjai a NAIP, IAP1, IAP2, XIAP, Survivin, Apollon, ML-IAP és az ILP2. Az IAP család valamennyi tagja rendelkezik legalább egy, úgynevezett BIR (baculovirus IAP-repeat) régióval és a többségük egy RING (really interesting new gene/C-terminal Ring zinc-finger) vagy egy UBA (ubiquitin association) doménnel^{78,79}.

Az evolúciósan konzervált domének közül az egyik legfontosabb a BIR, mely egy fehérje-fehérje interakciós domén. Ezek ismétlődése növeli a kötőpartner iránti affinitást, valamint a lehetséges kötő partnerek számát. A BIR2 és a BIR3 részt vesz az apoptotikus

fehérjék működésének szabályozásában, míg a BIR1 szignalizációs útvonalak szereplőivel teremt kapcsolatot. A BIR2 és a BIR3 domének kapcsolódhatnak egy evolúciósan konzervatív, úgynevezett IAP-kötő, IBM (IAP binding motif) szekvenciához. Az IBM motívum előfordul többek között a kaszpáz, (kaspáz-9, -3 és -7) illetve SMAC fehérjéken is. A BIR- IBM kötődés létrejöttével egyes IAP-ék képesek gátolni a kaszpázok (kaspáz-9, -3 és -7) aktivitását^{78,79}.

Az IAP1, a IAP2 és az XIAP fehérjék szerkezetében a BIR és a RING domén közötti kapocs régióban evolúciósan konzerválódott UBA domén található. Azok a fehérjék, amelyek rendelkeznek az UBA doménnel részt vehetnek az ubiquitin-függő jelátviteli utak szabályozásában. A domén konzervált, hidrofób régiója közvetlenül érintkezhet az ubiquitinnel. Az IAP család tagjainak (IAP1, IAP2, XIAP) UBA doménje a K63, illetve egyes esetekben a K48 pozícióban (IAP1) kapcsolt poliubiquitin láncait köthetik meg/ismerhetik fel. Amennyiben az ubiquitinek a K48 pozíción keresztül kapcsolódnak egymáshoz, a célfehérje degradációja következik be. Ha azonban K63 pozícióban található ubiquitinek kapcsolódnak, akkor proteaszómás lebontás helyett különféle folyamatok, fehérje-fehérje interakciók, citoplazmatikus transzport, transzláció vagy a DNS hibajavítás aktiválódhatnak^{79,80}.

Az IAP-ék C-terminálisán található RING domén E3 ubiquitin ligázként funkcionál (E3, az ubiquitin konjugáló enzimsor utolsó tagja). A RING domén teszi lehetővé az -előzetesen E1 által aktivált- ubiquitint hordozó E2 és a célfehérje kapcsolatát és elősegíti az ubiquitin átkerülését a célfehérjére. A IAP-ék ubiquitin ligáz tulajdonságuknak köszönhetően képesek a fehérjéket (például: SMAC, TRAF, kaszpáz enzimek) K63-as pozícióban, illetve más IAP fehérjéket és saját magukat K48-as pozícióban poli-ubiquitinálni. Az auto-ubiquitináció így a proteaszómális lebontásukat idézni elő, ami biztosítja az IAP-ék viszonylag állandó szintjét a sejtekben^{79,80}.

Az IAP-ék túlzott expressziója a hibás citokinezis által rendellenes sejtosztódáshoz és a poliploid sejtek felhalmozódásához vezet. Ezen tulajdonságoknak megfelelően az IAP overexpresszió rossz prognózist jelent különféle tumoros megbetegedések esetében, egyrészt a sejtciklusban bekövetkező változások, másrészt az apoptózis-rezisztencia befolyásolása miatt^{51,81}.

III.14. SMAC mimetikumok, a Birinapant

A mitokondriális SMAC fehérjék mesterségesen előállított változatai a SMAC mimetikumok vagy másnéven IAP antagonisták. A szintetikus SMAC mimetikumok

szerkezetüket tekintve lehetnek monovalensek vagy bivalensek. A bivalens mimetikumok dimerek, vagyis két BIR domént is képesek megkötni. Ezáltal intenzívebben gátolják az IAP fehérjéket^{78,79,80}.

A Birinapant bivalens SMAC mimetikum, amely azon felül, hogy a XIAP-BIR doménjéhez kötődik, képes az aktivált kaszpázokat kiszorítani a XIAP-vel való kölcsönhatásból. Az IAP fehérjecsald tagjai közül az IAP1 és az IAP2 lebomlását indukálja a sejtekben. A Birinapant kezelés hatására a RIPK1 deubiquitinálódik, kialakul a RIPK1-kaspáz-8 fehérje komplex, ami lehetővé teszi a kaszpáz-8 aktivációját. Tumorellenes hatását kimutatták szolid tumorok és limfómák esetében is^{78,79,80}.

III.15 TAK1, a sejthalál központi szabályozója

A TGF- β aktivált kináz 1 (TAK1), a MAPKKK család tagja, részt vesz a természetes és az adaptív immunrendszer szabályozásában és a gyulladásos folyamatok irányításában. Aktiválja az NF-kB és a MAPK kaszkádot, amelyeknek számos célgénje ismert. A célgének között szerepelnek többek között apoptózist gátló, illetve a sejtek proliferációját elősegítő és a gyulladásos válaszokat serkentő gének egyaránt⁸². A TAK1 a sejthalál központi szabályozója, változatos intra- és extracelluláris stimulusok például sejthalál ligandumok⁸³, környezeti változások, ozmotikus stressz⁸⁴, tápanyagok hiánya⁸⁵, UV sugárzás, citokinek vagy bakteriális ligandumok következményeként aktiválódhat⁴.

III.15.2 A TAK1 szerepe a TNFR által kiváltott jelátvitelben

A TAK1 gátló hatást fejt ki a kaszpázokra és az apoptózis elindítására. Ismert, hogy TNF stimulációt követően a TAK1 csökkenti a II.-es komplex kialakulását és/vagy aktiválását⁸⁶. A legújabb tanulmányok több mechanizmust írtak le, amelyen keresztül a TAK1 megvédheti a sejteket a TNF α által indukált apoptózistól. A TAK1 az NF-kB upstream kináza, ezen a transzkripciós úton kiváltja az anti-apoptotikus fehérjék, például a FLIP és az IAP-ék átírását. Ezen kívül a TAK1 közvetlenül is, illetve közvetve, az TAK1-aktivált kinázokon keresztül is foszforilálja a RIPK1-et. Ez a foszforiláció a RIPK1 gátlásához vezet. A TAK1-aktivált jelátviteli utak megakadályozzák a TNF α hatására termelődő ROS felhalmozódását is. A ROS potenciálisan

az IAP-ék kimerülését okozhatja, ezáltal a RIPK1 deubiquitinációját eredményezheti és így elindíthatja az apoptotikus sejthalált^{86,87,88}.

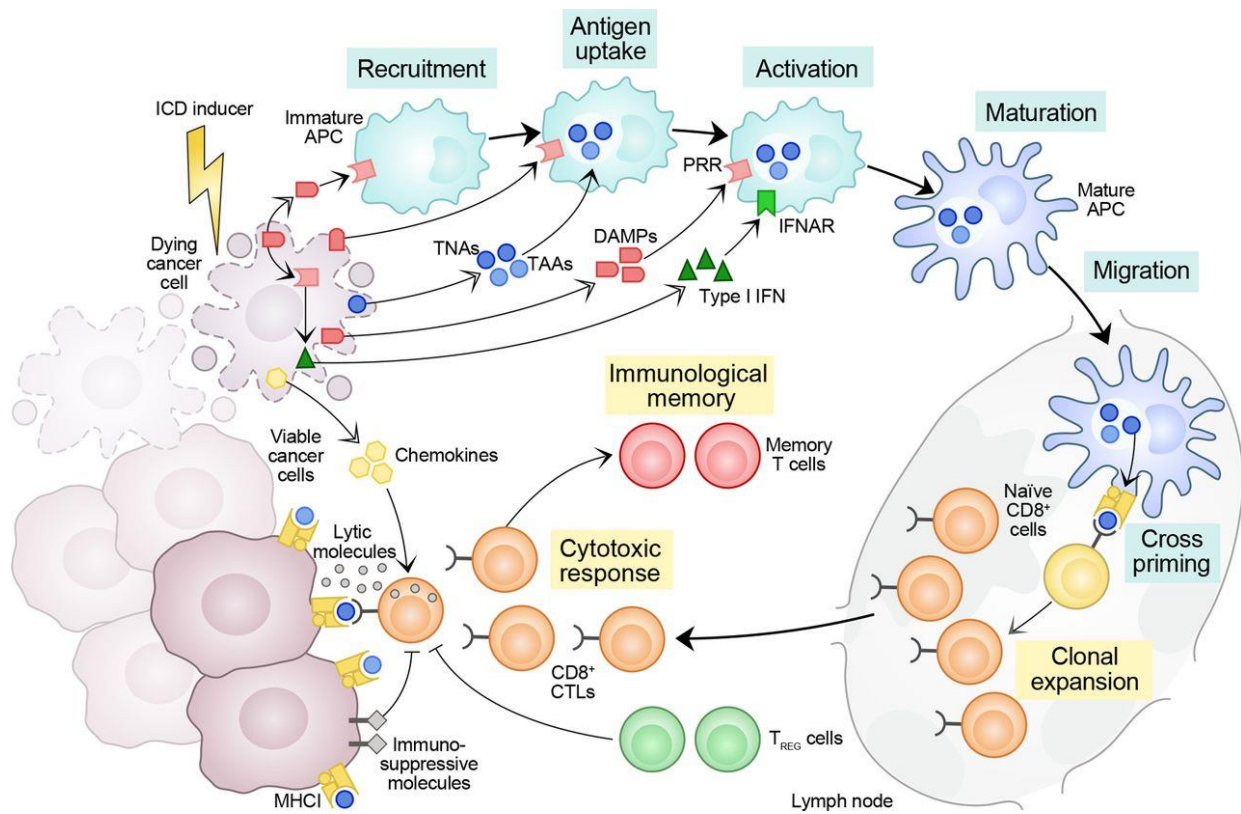
III.16 Az immunogén sejthalál

Az NCCD 2018. évi meghatározása szerint az immunogén sejthalál (ICD) „az RCD olyan formája, amely elegendő az adaptív immunválasz aktiválásához immunológiailag kompatibilis gazdaszervezetekben”³⁹. Más megfogalmazás szerint az ICD stressz hatására képes gyulladásoos reakciót kiváltani, amely az adaptív immunitás aktiválását és a hosszú távú immunológiai memória kialakulását eredményezi⁸⁹.

Az RCD az adaptív immunitást szabályozó képessége két meghatározó tényezőtől függ, amelyek nem szükségszerű kísérői a sejthalálnak: az adjuváns hatás és az antigenitás. Az adjuváns hatást az antigén prezentáló sejtek (APC) toborzásához és éréséhez elengedhetetlen veszélyjelek, DAMP-ok termelése biztosítja. Bizonyos DAMP-ok képesek az RCD-t ICD folyamattá alakítani, azonban ez nem minden molekuláris mintázatra jellemző.

Az elpusztult sejtek DS-ek általi fagocitózisa és a bekebelezett antigének keresztprezentációval történő bemutatása is szükséges a citotoxikus T sejt aktivációhoz. A sejtpusztulás típusa nagymértékben befolyásolja a DS-ek keresztprezentációs képességét. Ez a megállapítás magyarázatul szolgál arra, hogy miért nem képes a tumor terápiák során alkalmazott citotoxikus szerek mindegyike ICD-t indukálni. Az adjuváns és antigenitás hatását azonban még tovább módosíthatják a mikrokörnyezeti feltételek, például a tumorokra jellemző tolerogén „alaptermészet” jelentősen korlátozhatja az ICD-irányított immunitást.

Összefoglalva, míg az elpusztuló sejtek adjuvánsként ható képessége és antigenitása függ a sejthalált és a stresszt előidéző inger tulajdonságaitól, addig az RCD immunogenitása végső soron a haldokló sejtek mikrokörnyezetének is a függvénye. Ezáltal a mikrokörnyezet elemei elősegíthetik vagy gátolhatják az adaptív immunválaszt⁸⁹.



6. **Ábra: A sejthalál immunogenitását meghatározó legfontosabb tényezők.** A klinikumban alkalmazott kemoterápiás szerek egy része vagy a megfelelő sugárterápia képes immunogén sejthalált indukálni a daganatos sejteken, ezzel a kezelések lehetővé teszik a tumor-eredetű neoantigének (TNA) és a tumor-asszociált antigének (TAA) bemutatását. Azonban a tumor mikrokörnyezet (TME) általában immunszuppresszív tulajdonságú, ami az immunogén sejthalál elindulása/végbemenetele ellen hat. Tehát a RCD azon képessége, mely által az adaptív immunrendszert aktiválhatja a sejthalált kiváltó ingertől és a haldokló sejttől függ, ezen felül pedig a gazdaszervezetre jellemző tulajdonságok is meghatározóak lehetnek az ICD beindításában. A RCD-on áteső sejtek képesek aktiválni az adaptív immunrendszert, oly módon, hogy a (1) felszabaduló antigénnel szembeni tolerancia mechanizmusok kevésbé aktívak. (2) DAMP-ok és citokinek szabadulnak fel, melyek elősegítik az APC-ek toborzását, fagocitózisát és érését. (3) Az elpusztult sejtek a DS-ekben keresztprezentációs folyamatokat indítanak el. (IFNAR, interferon-alfa / beta receptor; PRR, mintázatfelismerő receptor; T_{REG}, szabályozó T sejt; TME, tumor mikrokörnyezet)⁸⁹ Az ábra forrása: ⁸⁹.

Az ICD a következő celluláris stresszt okozó tényezők hatására következhet be:

- (1) intracelluláris kórokozók megjelenése, baktérium vagy vírus-fertőzés^{90,91},
- (2) terápiásan alkalmazott onkolitikus vírusok, amelyek szelektíven, a tumoros sejtek szétesését váltják ki⁹²,

- (3) különböző onkolitikus hatással rendelkező molekulák (LTX-315, LTX-401) jelenléte^{93,94},
- (4) kemoterápiás szerek, például antraciklinek (doxorubicin, epirubicin, idarubicin és mitoxantrone), egyes DNS-károsító szerek (ciklofoszfamid és oxaliplatin), poli-A-ribóz-polimeráz (PARP) gátlók, mitózis gátlók (docetaxel és patupilone) és proteaszómális inhibitorok (bortezomib és karfilzomib)^{95,96,97,98,99,100},
- (5) epigenetikus módosítások, DNS-metil-transzferáz, a hiszton-deacetiláz (HDAC) és a brómdomén inhibitorok használata^{101,102,103,104,105},
- (6) tumor-ellenes szerek, például tirozin-kináz-gátló (krizotinib)¹⁰⁶, epidermális növekedési faktor receptor (EGFR)-specifikus monoklonális antitest (cetuximab)¹⁰⁷, ciklin-függő kináz (CDK) inhibitor (dinaciclub) és Bruton tirozin-kináz (BTK) inhibitor (ibrutinib)¹⁰⁸,
- (7) különböző vegyi anyagok jelenléte, például az ubiquitin-specifikus peptidáz inhibitor (spautin-1)¹⁰⁹, egyes antibiotikumok (bleomicin)¹¹⁰, a foszfatáz-2A protein inhibitor (LB-100)¹¹¹, a kínai gyógyászatban alkalmazott összetevők, mint a shikonin¹¹²,
- (8) számos fizikai beavatkozás, beleértve az ionizáló sugárzás különféle formáit^{113,114,115} az extrakorporális fotokemoterápia, a hipericin alapú fotodinamikai terápia (PDT)¹¹⁶, magas hidrosztatikus nyomás¹¹⁷, súlyos citotoxikus hősokek¹¹⁸, nanopulzus stimuláció¹¹⁹ és elektrohipertermia¹²⁰ alkalmazása.

A kiváltó stimulustól függetlenül az ICD sejthalál forma egyedülálló tulajdonsága, hogy képes aktiválni az adaptív immunválaszt. A folyamat során az antigének lehetnek elhalt sejtek által felszabadított exogén vagy az elpusztuló sejtéből származó endogén antigének³⁹. Az ICD-ra jellemző a különböző típusú DAMP-ok felszabadulása, illetve az adott antigénre specifikus immunológiai memória kialakulása³⁹. Jelenleg hat DAMP megjelenése köthető az ICD-RCD sejthalál típusához:

- (1) kalretikulin (CALR)
- (2) ATP
- (3) high-mobility group box 1 (HMGB1)
- (4) I. típusú IFN
- (5) tumor sejt-eredetű nukleinsav
- (6) Annexin A1 (ANXA1)⁸⁹

Az ICD ezeken a DAMP-okon keresztül megszünteti az immunszuppresszív hatású tumor mikrokozonyt, azáltal, hogy a daganatos sejtek elpusztulását követően fokozza az antigén

prezentálást és a fagocitózist, a kostimulátorok kifejezését és citokinek termelését, mind a tumor, mind pedig az antigén prezentáló sejtekben. Ezek eredményeként képes kiváltani a tumor antigénre-specifikus T sejtek aktiválódását⁸⁹.

III.16.2 Az ICD antigén forrása

Az ICD legnagyobb antigén forrását a mikrobák általi fertőzések adják, mivel a mikrobiális fehérjékre kevésbé hat az immunológiai tolerancia. A PAMP-ok közös tulajdonsága, hogy evolúciósan konzerváltak és erőteljes immunstimulációs jeleket közvetíthetnek. Ennek megfelelően az intracelluláris kórokozók által kiváltott RCD általában immunogén hatású. Azonban nem csak a fertőzött, hanem az egészséges sejtek is átmehetnek ICD folyamaton. Ennek az oka, hogy a fehérjék szerkezetét módosító antigén determinánsok létrejöhetnek enzimatis és nem enzimatis poszttranszlációs módosítások (oxidatív környezet) révén is. Ilyen enzimatis poszttranszlációs módosítások például a foszforiláció, acetiláció, glikoziláció, citrullinálás, nitrálás/nitroziláció, glikálás, oxidáció és az ubiquitináció. Továbbá a fehérje antigén repertoár a retikuláris aminopeptidázok, mint az endoplazmatikus retikulum aminopeptidáz 1 (ERAP1) és ERAP2 aktivációjával bővíthető⁸⁹.

III.17 A RIPK1-függő sejthalál hatása a tumorok progressziójára

A szakirodalmi adatok alapján a nekroptózis a daganatok progressziója során, mind anti-tumorális, mind pedig pro-tumorális tulajdonságokkal is rendelkezhet. Feltehetően az adott tumor típusa és stádiuma határozza meg, hogy melyik hatás érvényesül.

A nekroptózis gyulladást kiváltó sejthalálnak tekintjük, amely során intracelluláris DAMP-ok szabadulnak fel¹²¹ és kiváltják a DS-ek érését^{122,11}. A RIPK1-függő sejthalál fokozza a DS-ek keresztprezentáló képességét is, így immunogénnek tekintjük¹¹. Ezek a tulajdonságok elősegítik a CD8⁺ T-sejtek aktiválódását a tumor mikroköznyezetben és tumor ellenes immunitást indukálnak.

A sejthalál immunológiai kimenetelét módosíthatja az apoptózis/nekroptózis közötti átmenet hibás szabályozása. Ez számos betegség patogeneziséhez, mint például a degeneratív rendellenességek, autoimmun folyamatok, gyulladáshos betegségek kialakulásához vagy a daganatok immunológiai kontrolljának megszűnéséhez járulhat hozzá^{122,11}.

Az apoptózis-rezisztens tumorok esetében nagy terápiás potenciállal rendelkeznek a nekroptózist indukáló szerek, amelyek a sejthalál kiváltását kaspáz-független útvonalon teszik lehetővé. Számos kemoterápiás szerről (többek között az etopozidot, az 5-Fluorouracilt és a ciszplatin)^{59,123,124} és természetes vegyületről (shikonin)¹²⁵ mutatták ki, hogy elpusztíthatják a daganatos sejteket nekroptózis kiváltásával.

Egyes élettani folyamatok, például az oxigénhiány fokozza a RIPK3 kifejeződését, ezzel elősegíti a nekroptózis *in vivo* kialakulását. A hiperglikémia egyaránt megnöveli a RIPK3 expressziót¹²⁶. Hipoxiás körülmények között a RIPK1, RIPK3 és MLKL kifejeződés és a RIPK1/3 komplex képződése is fokozott. Továbbá a lecsökkent oxigén és glükóz szint hatására a nekroptózis negatív szabályozójaként működő kaspáz-8 messenger RNS kisebb mértékben fejeződik ki¹²⁷.

A tumorokban különféle mechanizmusok működnek a RIPK1-függő sejthalál elkerülésére. A nekroptózis kulcsmolekuláinak (RIPK1, RIPK3, MLKL) fokozott kifejeződése többnyire a betegség jó prognózisával társul, azonban ezzel a hatással ellentétes eseteket is leírtak⁷⁷.

A daganatos sejtekben gyakori a RIPK3 expresszió csökkenése, ami hozzájárul a nekroptózis rezisztencia kialakulásához. A RIPK3 alacsony szintje rossz prognózist jelent például akut mieloid leukémia-, krónikus limfoid leukémia-, emlő- és vastagbél daganat esetében, illetve a petefészek-, emlőrákban⁷⁷. Az MLKL downregulációja mutatható ki gyomor-, petefészek- és vastagbélrákban^{128,129,130}.

Bizonyos daganatos megbetegedésekben a RIPK3 fokozott expressziója mutatható ki. A RIPK3 kifejeződése megnövekszik a petefészekrákban¹³¹, a hasnyálmirigy adenokarcinóma pedig a RIPK1, RIPK3 és MLKL fokozott expressziójával társul¹³². Az MLKL foszforilált formájának megjelenése (pMLKL) magas halálozási arányt mutat a vastagbél-és nyelőcső daganatos megbetegedésekben^{133,134}.

III.17.2 A RIPK1-függő sejthalál immunrendszerre kifejtett immunogén hatása

A keresztprezentáció folyamata lehetővé teszi, hogy a DS-ek az exogén, fagocitált antigéneket, például tumor-eredetű vagy virális fehérjéket jelenítsenek meg az MHC-I-en keresztül. A tumor ellenes immunválasz elindításában az immunogén sejthalál a leghatékonyabb antigéneket generáló sejthalál forma. Bár az immunogén sejthalál fogalma napjainkban még

képlékeny, jelenlegi ismereteink szerint az adaptív immunitás aktiválását és a hosszú távú immunológiai memória kialakulását eredményezi⁸⁹.

A RIPK1-függő jelátvitel mind sejthalál, mind pedig az NF- κ B útvonalakat is beindítja. Ezáltal a haldokló sejtekben zajló gyulladásos folyamatokkal együtt mozgósítja az immunrendszert a tumoros sejtek ellen. Az elhalt sejtekből DAMP-ok, kemokinek és citokinek is felszabadulnak, amelyek az elpusztuló sejt mikro környezetébe toborzott immunsejteket aktiválják¹¹. A DS-ek ezen citokin stimulusok hatására keresztprezentációs útvonalon mutatják be az elpusztult sejtekből származó peptideket. Azonban még kevésbé ismert, az immunogén sejthalál pontosan hogyan befolyásolja a DS-ek keresztprezentáló képességét, mellyel beindítják a CD8⁺ T-sejt válaszokat^{11,40}.

Jelenleg nem alkalmaznak olyan terápiát, amely hasznosítaná a RIPK1-függő sejthalál immunogén potenciálját. Az első *in vivo* RIPK1-függő sejthalál indukció végtagi lágyrész szarkóma-egér modellekben történt¹³⁵. A tanulmány során sikeresen alkalmazták a TNF α és az IAP antagonistá/SMAC mimetikum kombinációját a tumorellenes immunválaszok elősegítésére. A TNF α és az IAP antagonistá kezelés kemoterápiás szerrel kombinálva fokozta a CD8⁺ T-sejtek, valamint az NK-sejtek aktiválását, és megnövelte a túlélés időtartamát. Annak ellenére, hogy az SMAC mimetikumok jól toleráltak klinikai vizsgálatok során, tumorterápiákban való alkalmazásuk korlátozott. Ennek az az oka, hogy önmagukban, alacsony TNF α -tartalmú mikro környezetben a sejthalál kiváltásában nem hatásosak¹³⁶. Bár a TNF α képes a RIPK1-függő sejthalál kiváltására, daganatellenes terápiaként való használatát korlátozza a szisztémás alkalmazásakor bekövetkező súlyos toxicitás^{137,138}. Ez a negatív hatás elkerülhető a TNF α lokális beadásával¹³⁵.

IV. Célkitűzések

Az eltérő immunológiai szereppel rendelkező sejthalál típusok közötti átmenetek pontosabb ismerete, illetve szabályozása hozzájárulhat a tumorok eliminációját vagy a gyulladásos betegségek kezelését segítő új terápiák kidolgozásához.

Célkitűzéseink között szerepelt vizsgálni, hogy vajon:

- az eltérő stimulusok alkalmazásakor azonos módon megy-e végbe a sejthalál az M1 és M2 sejtpopulációkban?
- milyen típusú a TAK1 inhibitor és SMAC mimetikum által kiváltott sejthalál az M1 és M2 makrofágokon?
- milyen típusú a TAK1 inhibitor és SMAC mimetikum által kiváltott sejthalál a TAM-szerű sejteken?

Ismert, hogy a DS-ek bizonyos körülmények között citotoxikus hatással rendelkeznek⁶. Célkitűzéseink között szerepelt vizsgálni, hogy vajon:

- a DS-ek felülűszója képes-e különböző sejtvonalakon citotoxikus hatást kiváltani?
- eltérő-e az érett és az éretlen DS-ek felülűszójának sejttölő hatása?
- a citotoxikus hatást milyen sejthalál receptorok közvetítik?
- milyen mértékben befolyásolja a RIPK1 fehérje jelenléte vagy hiánya a felülűszó által kiváltott sejthalált?

V. Anyagok és módszerek

V.1 Monocita szeparálás humán vércézáítményből

Kísérleteink során humán monocita-eredetű dendritikus sejtekkel (moDS) illetve monocita-eredetű makrofágokkal dolgoztunk. A fiziológiás sóoldattal hígított humán vércézáítményt (buffy-coat) Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences) oldatra rétegeztük 1:2 arányban, majd grádiens alapú centrifugálásnak vetettük alá, amellyel a perifériás, vérben keringő mononukleáris sejtek elválaszthatóak. A mosási lépések után a CD14⁺ monocitákat pozitív szeparáláson alapuló módszerrel választottuk el. Ehhez paramágneses gyönggyel konjugált CD14-ellenes antitestet (Miltenyi Biotec) használtunk. A jelölt sejtek kitapadtak az erős mágneses térben lévő speciális szeparáló oszlopra, ahonnan fecskendővel steril centrifugacsőbe eluáltuk a monocitákat (tisztaság > 95%).

V.2 Humán monociták differenciálata dendritikus sejtekké

Az izolált monociták 80 ng/ml ml Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF, Gentaur Molecular Products) és 100 ng/ml IL-4 (PeproTech) jelenlétében 5 nap alatt (37 °C, 5%, CO₂) nyugvó DS-ekké differenciálódtak szérummentes AIM-V médiumban (Thermo Fischer Scientific) 2.0 x 10⁶ sejt/ml sejtsűrűségben 6 lyukú szövettenyésztő lemezen. A differenciálataához szükséges GM-CSF-et és IL-4-et a 3. napon pótoltuk a sejtek etetésével¹³⁹.

V.3 Humán monociták differenciálata IFN dendritikus sejtekké

Az IFN DS-eket az következő publikáció alapján hoztuk létre:¹⁴⁰. Az izolált monociták 40 ng/ml GM-CSF (Gentaur Molecular Products) és 100 U/ml rhIFN- α (Roferon-A) jelenlétében 5 nap alatt (37 °C, 5%, CO₂) nyugvó DS-ekké differenciálódtak szérummentes AIM-V médiumban (Thermo Fischer Scientific) 2.0 x 10⁶ sejt/ml sejtsűrűségben 6 lyukú szövettenyésztő lemezen. A differenciálataához szükséges GM-CSF-et és rhIFN- α -át a 3. napon pótoltuk a sejtek etetésével.

V.4 Humán monociták differenciálata dexamethasone dendritikus sejtekké

A dexamethasone DS-eket a következő publikáció alapján hoztuk létre:¹⁴¹. Az izolált monociták 100 ng/ml GM-CSF (Gentaur Molecular Products), 20 ng/ml IL-4 (PeproTech) és 0.25 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich) jelenlétében 5 nap alatt (37 °C, 5%, CO₂) nyugvó dendritikus sejtekké differenciálódtak szérummentes AIM-V médiumban (Thermo Fischer Scientific) 2.0×10^6 sejt/ml sejtsűrűségben 6 lyukú szövettenyésztő lemezen. A differenciálathoz szükséges GM-CSF-et, IL-4-et és dexamethasone-t a 3. napon az etetésekkel pótoltuk.

V.5 A dendritikus sejt felülúszók (moDS, IFN DS, dexamethasone DS) összegyűjtése

A differenciálata 5. napján a DS-eket CL075-tel (1 μ g/ml, Sigma) vagy LPS-dal (0.5 μ g/ml, InvivoGen) kezeltük 30 percen keresztül. A TLR ligandumok eltávolítása érdekében háromszor mostuk a sejteket (RPMI 1640), majd 4.0×10^6 sejt/ml DS-et 2, 8 vagy 24 óráig inkubáltunk szérum-mentes RPMI 1640 médiumban (Sigma-Aldrich). A DS-ek által termelt felülúszókat (moDS, IFN DS, dexamethasone DS) 9500 relatív centrifugálási erő (rcf)/perc sebességgel 10 percig 4 °C-on centrifugálva gyűjtöttük össze.

V.6 Humán monociták differenciálata érett dendritikus sejtekké

A differenciálata 5. napján a DS-eket 100 ng/ml LPS-dal kezeltük. 24 óra múlva az LPS-előkezelt DS-eket (LPS-DS) TLR-ligandumokkal kondicionáltuk 30 percen keresztül, majd három mosási lépést követően 4.0×10^6 sejt/ml DS-et 2 óráig inkubáltunk szérum-mentes RPMI 1640 médiumban (Sigma-Aldrich). A DS-ek által termelt felülúszót 9500 rcf/perc sebességgel 10 percig 4 °C -on centrifugálva gyűjtöttük össze.

V.7 Humán monociták differenciálata makrofágokká

Az izolált monociták 50 ng/ml Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF, PeproTech) jelenlétében 5 nap alatt (37 °C, 5%, CO₂) nyugvó, M0 típusú makrofágokká differenciálódtak szérummentes AIM-V médiumban (Thermo Fischer Scientific) 2.0×10^6 sejt/ml

sejtsűrűségben 6 lyukú szövettenyésztő lemezen. A differenciáltatáshoz szükséges M-CSF-et a 2. és az 5. napon az etetésekkel pótoltuk.

Az M1 és M2 altípusok létrehozásához a sejteket a differenciáltatás 5. napján 24 órán keresztül stimuláltuk (50 ng/ml LPS-dal (InvivoGen), IFN γ -val (20 ng/ml, PeproTech) az M1 fenotípus, illetve IL-4-gyel (20 ng/ml, PeproTech), IL-10-zel (20 ng/ml, PeproTech) és TGF β -val (20 ng/ml, PeproTech) az M2 fenotípus kialakításához. A sejteket a 6. napon tekintettük M1 és M2 típusú makrofágoknak¹⁴². A TAM-szerű sejtek differenciáltatásához az izolált monocitákat 5 napig 6 lyukú szövettenyésztő lemezen tartottuk 2.0×10^6 sejt/ml sejtsűrűségben, THP-1 sejtvonal felülúszójában, melyet IL-4-gyel (20 ng/ml), IL-10-zel (20 ng/ml) és TGF β -val (20 ng/ml) egészítettünk ki. Az 5. napon a TAM-szerű sejteket ismét THP-1 felülúszóval kezeltük 24 órán át. A makrofágokat a 6. napon tekintettük TAM-szerű sejteknek.

V.8 Felhasznált sejtvonalak

Az SVT35 Jurkat és HT-29 sejtvonalakat RPMI 1640 médiumban (Sigma-Aldrich), 10% FCS (Gibco), 2 mM L-glutamine (Biosera) és 40 mg/l Gentamicin (Sigma-Aldrich) jelenlétében tenyésztettük (37 °C, 5%, CO₂).

A THP-1 sejtvonalat szérumentes AIM-V médiumban (Thermo Fischer Scientific) tenyésztettük (37 °C, 5%, CO₂).

A HUVECs sejteket 20% FCS (Gibco), 2 mM L-glutamin (Biosera), 1% penicillin/streptomycin (Gibco), EGMTM-2 Endothelial Single QuotsTM Kit (Lonza)-tartalmú M199 (Gibco) médiumban tenyésztettük (37 °C, 5%, CO₂).

V.9 A THP-1 felülúszó előállítása

A THP-1 felülúszó előállításához a sejteket 2 napig, 2.0×10^5 sejt/ml sűrűséggel tenyésztettük szérumentes AIM-V tápközegben (Thermo Fischer Scientific), majd a felülúszót 2000 rcf/perc sebességgel 5 percig tartó centrifugálást követően gyűjtöttük össze.

V.10 Az M1 és M2 makrofágok ko-kultúrában való tenyésztése

Az M1 és M2 makrofágok eltérő sejthalál érzékenységét ko-kultúrában teszteltük. A következő ko-kultúrákat hoztuk létre:

- Mosási lépéseket követően az egyenlő számú M1 és M2 makrofágot (4.0×10^5 sejt/0.5 ml) együtt tenyésztettünk 4 órán át 24-lyukú sejttenyésztő lemezen. Az M1 és M2 ko-kultúrákat nekroptotikus stimulusokkal kezeltük. A sejthalál indukciót követően 24 órával a túlélő makrofágokat anti-CD209-Phycoerythrin (CD209-PE) és anti-CD80-Fluorescein isothiocyanate (CD80-FITC) antitestekkel jelöltük.
- Az M1 és az M2 sejthalál megkülönböztetése érdekében az M2 makrofágokat CellTracker™ Green CMFDA festékkel (10 ng/ml, Thermo Fischer Scientific) töltöttük fel 37 °C-on 30 percig. Három intenzív mosási lépést követően 4.0×10^5 sejt/0.5 ml M2 sejtet tenyésztettünk, azonos koncentrációjú, nem jelölt M1 makrofággal, 24-lyukú sejttenyésztő lemezeken. Az M1 és M2 ko-kultúrákat nekroptotikus ingerekkel kezeltük, az eltérő populációk sejthalálát 24 óra elteltével PI festéssel határoztuk meg.

V.11 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), „szendvics” ELISA

Az M1 és M2 makrofágok felülúszóit a differenciáltatás 6. napján gyűjtöttük össze és mértük ELISA módszerrel. A DS-eket a differenciáltatás 5. napján gyűjtöttük össze és mértük ELISA módszerrel. A citokin koncentrációk meghatározásához TNF α , IL-6, IL-10, IL-12p70 OptEIA kitéket használtunk a gyártó utasításai szerint (BD Biosciences).

V.12 Kaszpáz-3/7 enzimaktivitás mérése

Az SVT35 Jurkat sejteket a moDS-ek felülúszóival vagy 20 ng/ml TNF α jelenlétében inkubáltuk 24 órán keresztül, 37 °C-on. A kaszpáz 3/7 aktivitást az Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 assay kit (Promega) használatával mértük, követve a gyártó utasításait.

V.13 Immunprecipitáció

Az SVT35 Jurkat sejteket a moDS-ek felülúszóival vagy TNF α és SMAC mimetikum (Birinapant) jelenlétében inkubáltuk 1 órán keresztül (37 °C), majd a sejteket 1 % Triton-X 100

(Sigma-Aldrich) és 1 % proteáz-gátló koktél (Sigma-Aldrich) tartalmú lízis pufferben szuszpendáltuk és 30 percen keresztül inkubáltuk (4 °C). A sejtlizátumot centrifugálást követően gyűjtöttük össze (12350 rcf, 10 perc, 4 °C), majd anti-kaspáz-8 antitesttel fedett Protein G gyöngyökkel kevertettük (GE Healthcare) (*overnight*, 4 °C). A következő napon négyszer (lízis puffer) mostuk a gyöngyöket, majd 2X Laemli pufferben szuszpendáltuk fel. A fehérje mintákat linearizáltuk (5 perc, 95 °C), majd SDS-PAGE gélen futattuk a mintákat. A RIPK-1-kaspáz-8 interakciót anti-RIPK1 western blottal mutattuk ki. Az interakció kialakulását anti-RIPK1 antitesttel fedett Protein G gyöngyökkel történt immunprecipitációt követő anti-kaspáz-8 western blottal is megerősítettük.

V.14 Áramlási citometria

V.14.1 Sejtfelszíni molekulák megjelenésének vizsgálata

Az M1, M2 és TAM sejteket sejtfelszíni molekuláik alapján karakterizáltuk, melyek kimutatásához specifikus, fluorokrómmal konjugált egér anti-humán ellenanyagot használtunk fel, jelöletlen kontroll sejtek mellett.

A különböző specificitású ellenanyagokkal történő jelölés minden esetben a következő módon történt: a sejt pallethez hozzáadtuk a direkt jelölt ellenanyagot, majd 20 percig, 4 °C-on, sötétben inkubáltuk. Ezt követően FACS pufferrel mostuk a sejteket (5 perc, 2000 rcf, 4 °C). A sejtfelszíni fehérje expressziót 10000 darab sejten mértük le.

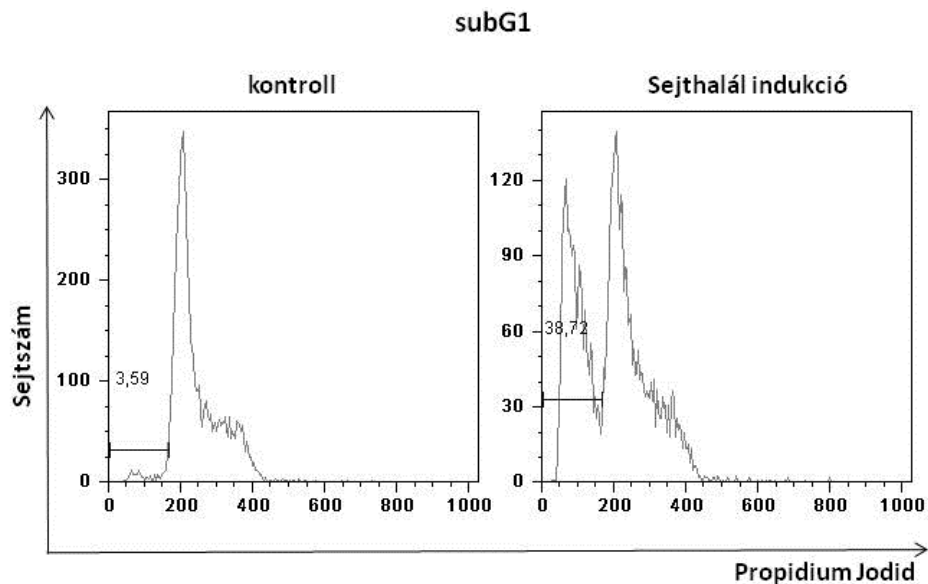
A következő sejtfelszíni jelöléseket mértük: CD209-PE (DC-SIGN, BioLegend), CD206-phycoerythrin cyanine TM5 (Pe-CyTM5, BD Pharmingen), CD80-FITC (SONY Biotechnology), CD14-PE (BioLegend), HLA-DR-peridinin-chlorophyll-protein (PercP, BD Pharmingen), PD-1/CD279-PercP (BioLegend), CD163-PE (Biosciences).

A fluoreszcencia intenzitásokat FACS Calibur (BD Biosciences) áramlási citométerrel mértük, az adatok kiértékelését pedig FlowJo szoftverrel (Tree Star) végeztük.

V.14.2 Sejthalál mérés

V.14.2.1 Sub-G1 mérés

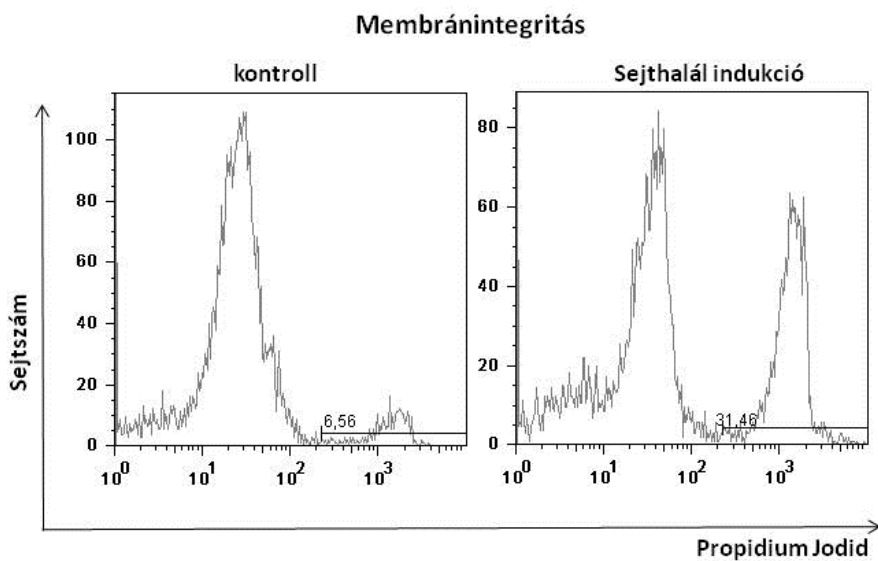
A DNS fragmentációt sub-G1 mérés alapján határoztuk meg. A sejteket az aktivációt követően 70 %-os alkoholban fixáltuk 4 °C-on, 1 órán keresztül, majd citrát pufferrel (38 mM, pH 7.4) mostuk. A sejteket 50 µg/ml propidium-jodidot (PI, Sigma-Aldrich) tartalmazó citrát pufferben jelöltük 15 percen keresztül 37 °C-on. A subG1 csúcsok arányát FACS Calibur (BD Biosciences) áramlási citométerrel határoztuk meg, az adatok kiértékelését pedig FlowJo szoftverrel (Tree Star) végeztünk.



7. Ábra: A subG1 csúcsok reprezentatív ábrázolása.

V.14.2.2 Membrán integritás mérés

A sejthalált a membránintegritás elvesztése és a PI felvétele alapján is számszerűsítettük. A sejteket PI oldattal (10 µg/ml PI foszfát pufferben) festettük, majd a sejtpusztulást a fluoreszcencia intenzitás alapján FACS Calibur (BD Biosciences) áramlási citométerrel határoztuk meg, az adatok kiértékelését pedig FlowJo szoftverrel (Tree Star) végeztük.



8. *Ábra: A membránintegritás mérésének reprezentatív ábrázolása.*

V.15 Western blot

A fehérjék kiszabadítását a sejtekből 2X Laemli pufferben való lizálással értük el. A fehérjéket 10% poliakril-amid gélen, SDS gélelektroforézissel választottuk el, a fehérje mintákat a méret szerinti szeparálást követően nitrocellulóz membránra vittük át (Bio-Rad Laboratories). Az antitestek nem specifikus kötődését 5%-os tejpor oldattal (TBS-Tween-ben oldva) gátoltuk meg. A blokkolást követően a membránokat elsődleges antitestekkel inkubáltuk *overnight* 4 °C-on 1000x hígításban alkalmazva: RIPK1 (BD Biosciences), RIPK3 (Cell Signaling), MLKL (Sigma-Aldrich), pMLKL (Cell Signaling), TAK1 (Cell Signaling), p38 (Thermo Fischer Scientific), pErk (Thermo Fischer Scientific), pJNK (Thermo Fischer Scientific), pIκβ (R&D Systems) és β-aktin (Sigma-Aldrich). Másodlagos ellenanyagként tormaperoxidázzal konjugált anti-nyúl (GE Healthcare), anti-egér (GE Healthcare) vagy patkányellenes (Sigma-Aldrich) antitesteket alkalmaztunk. A kialakult immunkomplexeket a SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific™) vagy SuperSignal™ West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific™) felhasználásával tettük láthatóvá.

V.16 Statisztika

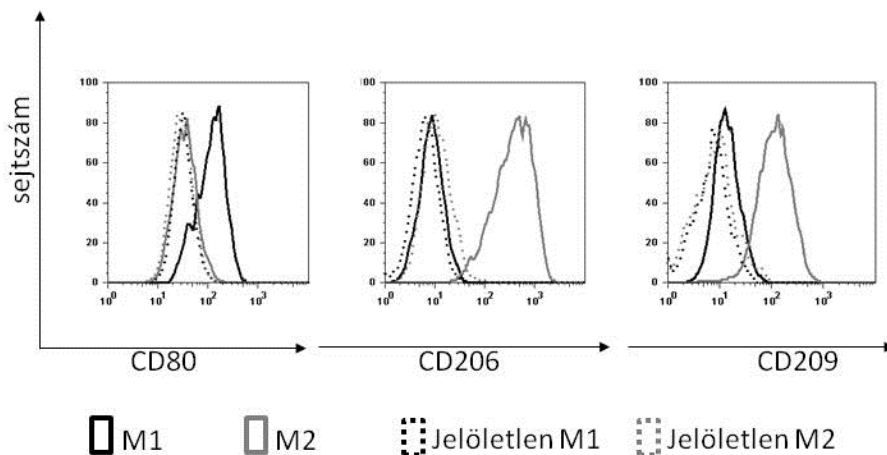
Valamennyi ábra legalább három, egymástól független donorból származó eredmény átlagait mutatja \pm standard szórással (SD). Az eredmények statisztikai elemzése során adott esetben egyutas vagy kétutas varianciaanalízist alkalmaztunk Sidak teszttel, Graphpad Prism 6.00 program segítségével (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

VI. Eredmények

A doktori munka első fázisában összehasonlítottuk a humán monocita-eredetű M1 és M2 makrofágok nekroptózisra való érzékenységét.

VI.1 Az M1 makrofágokkal ellentétben, az M2 sejtek érzékenyek a TAK1 gátló által kiváltott nekroptózisra

A pro-inflammatórikus és anti-inflammatórikus makrofágok egyensúlyának szabályozása számos betegségben jelenthet terápiás lehetőséget. A terápiás beavatkozás új alternatívájaként összehasonlítottuk a humán M1 és M2 makrofágok érzékenységét a különféle sejthalál stimulusokkal szemben. Az M1 és M2 altípusok létrehozásához a differenciáltatás 5. napján az M0 makrofágokat stimuláltuk LPS-dal és $IFN\gamma$ -val (M1 alpopuláció), illetve IL-4, IL-10 és $TGF\beta$ adásával (M2 alpopuláció) 24 órán keresztül¹⁴². Annak igazolására, hogy a sejtpopulációk elérték a megfelelő M1 és M2 fenotípusokat^{143,157}, vizsgáltuk a polarizált makrofágok sejtfelszíni markereinek megjelenését. Az M1 sejteken megfigyeltük a CD80 (M1 marker) indukcióját, valamint az M2 sejteken a CD206 és CD209 (M2 markerek) magasabb expressziós szintjét (9. Ábra).

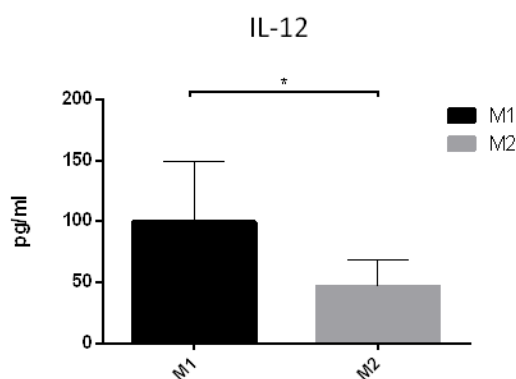


9. **Ábra: Az M1 és M2 makrofágok *in vitro* differenciáltatása.** A humán monocita-eredetű makrofágokat LPS (50 ng/ml) és $IFN\gamma$ (20 ng/ml) vagy IL-4 (20 ng/ml), IL-10 (20 ng/ml) és $TGF\beta$ (20 ng/ml) jelenlétében differenciáltattuk. A makrofág alpopulációkon a CD80, CD206 és CD209 markerek

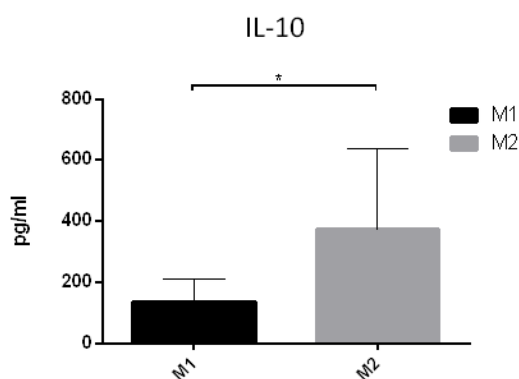
sejtfelszíni expresszióját áramlási citométerrel mértük. Az eredmény öt egymástól függetlenül elvégzett kísérlet adatainak reprezentatív bemutatása.

A két makrofág alpopuláció funkcionális jellemzéseként mértük az IL-10 és IL-12 citokinek termelését. A szakirodalmi adatoknak megfelelően^{2,29,27} az M1 sejtek szignifikánsan nagyobb mennyiségben termeltek IL-12 citokint, mint az M2 sejtek (8. Ábra A), miközben az M2 sejtekben jelentősebb mennyiségű IL-10 volt kimutatható (10. Ábra B).

A



B



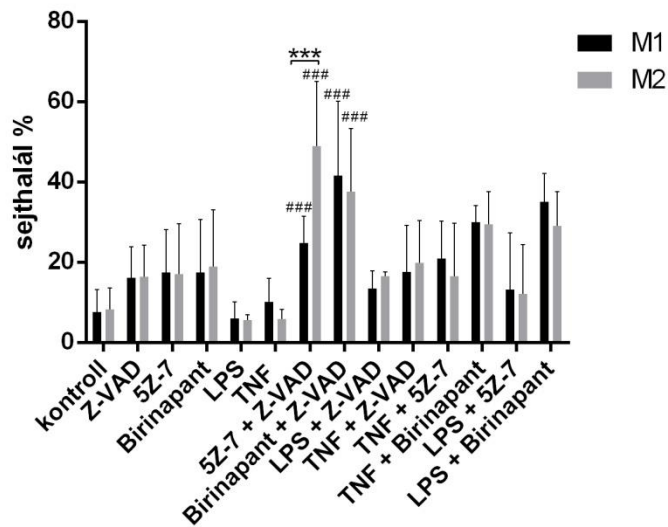
10. Ábra: Az M1 és M2 makrofágok *in vitro* citokin szekréciója. (A) A sejtek IL-12 és (B) IL-10 termelését ELISA módszerrel mértük. Az ábrák három függetlenül elvégzett kísérlet átlagait mutatják.

Miután igazoltuk, hogy a két sejtpopuláció sejtfelszíni markerei és citokin termelése is megfelel az M1, illetve M2 fenotípusnak, összehasonlítottuk a makrofág alpopulációk érzékenységét apoptotikus, illetve nekroptotikus sejthalál indukcióra. Apoptózist kiváltó ágensként LPS-dot, TNF α -át, SMAC mimetikumot (Birinapant), TAK1 inhibitor (5Z-7-oxozeaenol; 5Z-7) és ezek kombinációit alkalmaztuk. Ezen stimulusokról ismert, hogy kaszpáz gátló jelenlétében a makrofágokban nekroptózist váltanak ki^{144,82}, ezért Z-VAD jelenlétében is vizsgáltuk a sejthalál intenzitását.

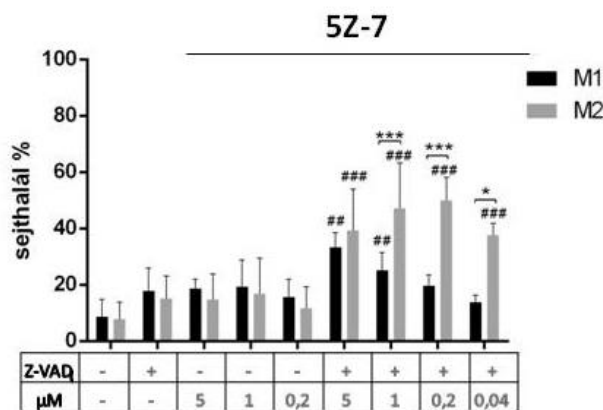
A két sejt típus ugyanolyan érzékeny volt az általunk vizsgált ingerek többségére, a TAK1 inhibitor azonban Z-VAD jelenlétében intenzívebb sejthalált indukált az M2 sejtekben (11. Ábra

A). Ennek az eredménynek a megerősítéseként megvizsgáltuk a Birinapant és az 5Z-7-mediált sejthalál dóziszfüggését. Kaszpáz gátló jelenlétében, az általunk vizsgált koncentrációkban az 5Z-7 által kiváltott sejthalál intenzívebb volt az M2 sejtekben, mint az M1 makrofágokban (11. Ábra B). A Birinapant kezelés azonban Z-VAD kezelés mellett sem eredményezett magasabb sejthalál-intenzitást az M2 makrofágokban. A Birinapant által kiváltott sejthalál nem szignifikáns mértékben, de enyhén intenzívebb volt az M1 sejtekben (11. Ábra C).

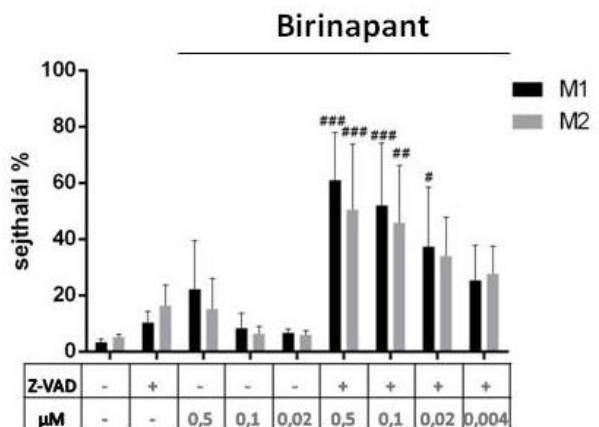
A



B



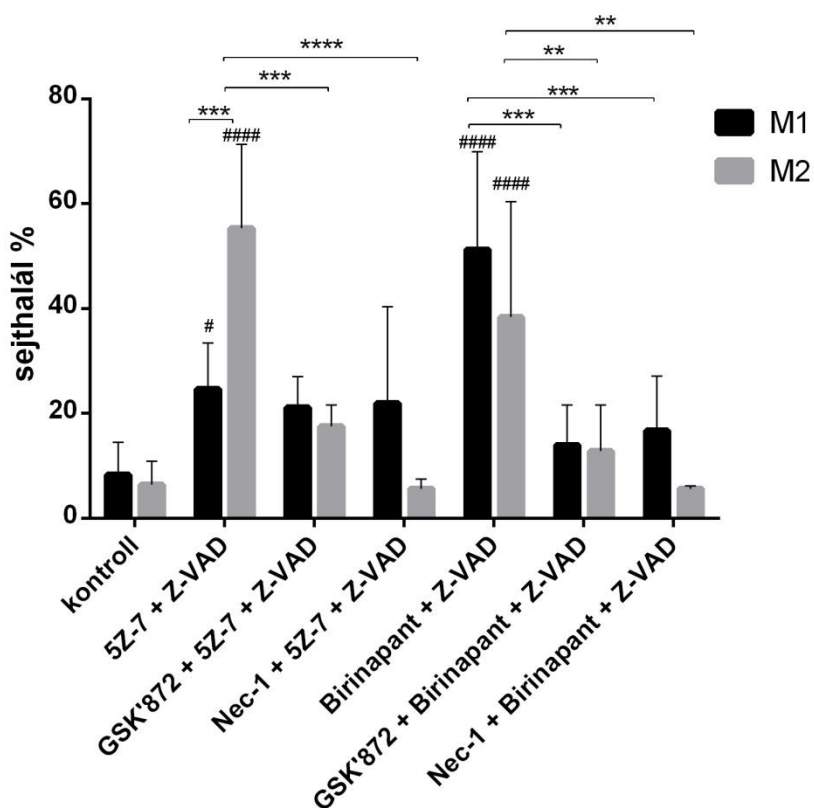
C



11. Ábra: TAK1 inhibitor Z-VAD jelenlétében intenzívebb nekroptózist indukál az M2 sejteken, mint az M1 makrofágokon. (A) Az *in vitro* differenciáltatott M1 és M2 sejteket 100 ng/ml LPS, 60 ng/ml

TNF α , 0.5 μ M Birinapant és 1 μ M 5Z-7-oxozeaenol kezeléssel stimuláltuk 50 μ M Z-VAD jelenlétében vagy hiányában 24 óráig. (B-C) A makrofágokat 5Z-7-oxozeaenollal vagy Birinapant-tal kezeltük különböző dózisokban 50 μ M Z-VAD jelenlétében vagy hiányában. 24 óra elteltével a sejtpusztulást PI festéssel határoztuk meg. (A-C) Az ábrák legalább három független kísérlet átlagát és szórását mutatják. A kontrollhoz viszonyított szignifikancia értékeket a # szimbólum jelöli.

Azért, hogy bizonyítsuk, hogy a kaszpáz gátló jelenlétében, a Birinapant/Z-VAD (BZ), illetve 5Z-7/Z-VAD (OZ)-, indukált sejthalál valóban nekroptózis, specifikus inhibitorok jelenlétében is elvégeztük a kísérleteket. Ehhez előzetesen RIPK3 inhibitorral (GSK'872), illetve RIPK1 inhibitorral (Necrostatin-1, Nec-1) kezeltük a polarizált makrofágokat. Mindkét gátlószer blokkolta a BZ által indukált sejthalált (10. Ábra A), illetve M2 sejtekben a GSK'872 és a Nec-1 is egyaránt gátolta az OZ által indukált citotoxicitást (12. Ábra A), igazolva, hogy a megfigyelt sejthalál nekroptózis.

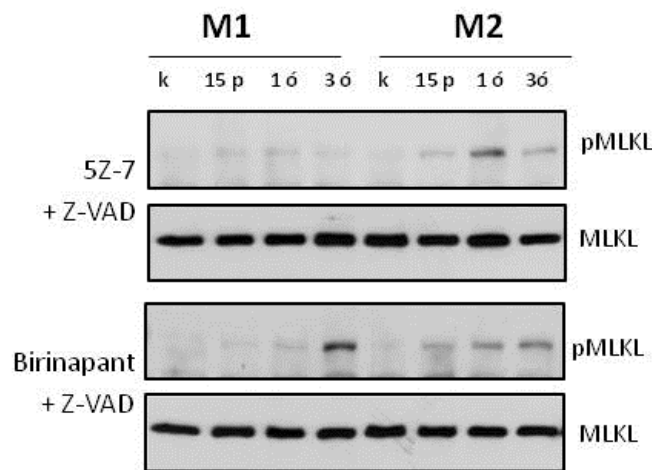


12. Ábra: A nekroptózis inhibitorok, a GSK'872 és a Necrostatin-1 gátolták a kaszpáz gátlók jelenlétében kialakuló sejthalált az M1 és M2 makrofágokban. Az M1 és M2 sejteket előkezeltük 30 percig 7.5 μ M GSK'872 RIPK3 inhibitorral és 50 μ M Z-VAD-dal, vagy 50 μ M Necrostatin-1 RIPK1 inhibitorral és 50 μ M Z-VAD-dal, majd 0.5 μ M Birinapant vagy 1 μ M 5Z-7-oxozeaenol adásával

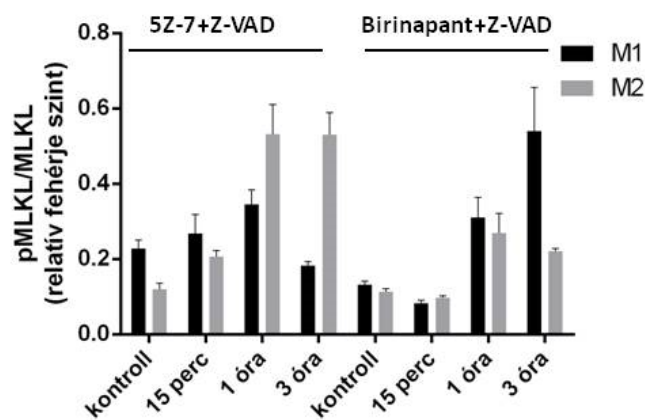
nekroptózist indukáltunk. 24 óra elteltével a sejtpusztulást PI festéssel határoztuk meg. Az ábra három független kísérlet átlagát és szórását mutatja. A kontrollhoz viszonyított szignifikancia értékeket a # szimbólum jelöli.

A nekroptózis jellegzetes markereként megvizsgáltuk az MLKL (S358) foszforiláció (p-MLKL) kialakulását a makrofág típusokban a BZ és az OZ reagensekkel való aktiválás után. A BZ kezelés hatására kimutattuk az MLKL foszforilációját mind az M1, mind az M2 sejtekben (13. Ábra A B). Az OZ stimulációt követően intenzívebben jelenik meg a p-MLKL sáv az M2 makrofágokban, mint az M1 sejtekben (13. Ábra A B).

A



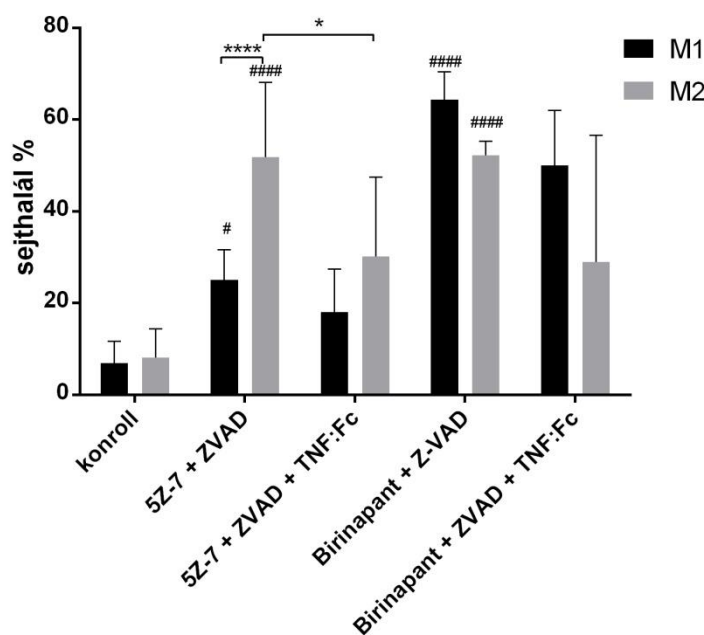
B



13. Ábra: TAK1 inhibitor vagy IAP antagonista által indukált MLKL foszforiláció az M1 és M2 sejtekben kaspáz gátló jelenlétében. (A) A sejteket egy órát előkezeltük 50 μ M Z-VAD inhibitorral,

majd az MLKL foszforilációt (S358) 0.5 μ M Birinapant vagy 1 μ M 5Z-7-oxozeaenol kezelés után western blot-tal mutattuk ki 15 perc, 1 óra, illetve 3 óra kezelést követően. Az ábra három egymástól függetlenül elvégzett kísérlet eredményeinek reprezentatív bemutatása, melyek denzitometrált eredményét a (B) panel ábrázolja.

Felmerült a kérdés, hogy a funkcionálisan is eltérő M1 és M2 makrofágok autokrin TNF α termelése állhat-e a két populáció eltérő sejthalál érzékenységének hátterében. Ennek a vizsgálatához szolubilis TNFR-ral (TNF:Fc fehérjével) kezeltük elő a polarizált makrofágokat, majd ezt követően váltottuk ki a sejthalált az OZ vagy BZ kezelésekkel. Eredményeink azt mutatják, hogy a TNF:Fc csak részlegesen gátolta az OZ által indukált nekroptózist. Ez alapján azt feltételezzük, hogy az autokrin TNF α termelés mellett más mechanizmusok is szerepet játszhatnak az OZ/BZ mediált sejthalálban (14. ábra).



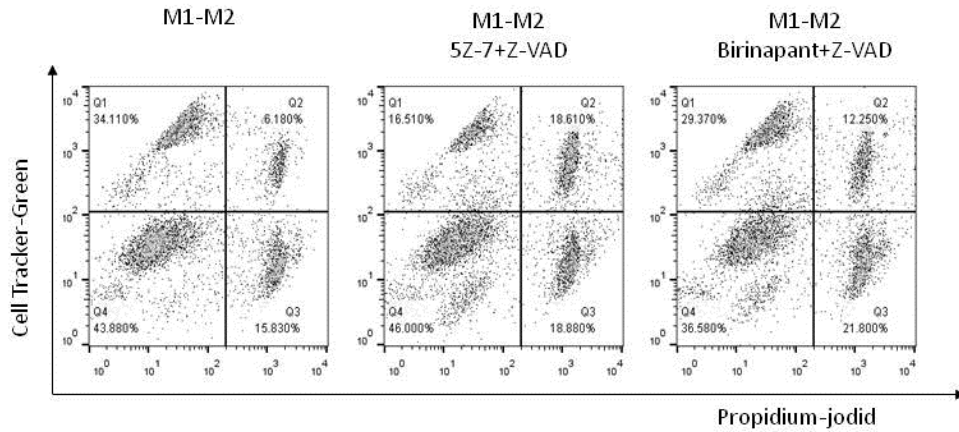
14. Ábra: TAK1 inhibitor nekroptózist indukál az M2 sejteken, amely sejthalált a TNF:Fc részben gátolja. A makrofágokat 10 ng/ml TNF:Fc-vel kezeltük elő 1 órán keresztül, majd 0.5 μ M Birinapant vagy 1 μ M 5Z-7-oxozeaenol hozzáadásával sejthalált indukáltunk 50 μ M Z-VAD jelenlétében. 24 óra elteltével a sejtpusztulást PI festéssel határoztuk meg. Az ábra három független kísérlet átlagát és szórását mutatja. A kontrollhoz viszonyított szignifikancia értékeket a # szimbólum jelöli.

Megállapítottuk, hogy az M2 makrofágok érzékenyek, de az M1 sejtek rezisztensek az OZ által indukált nekroptózisra, míg az általunk vizsgált további ingerek ugyanolyan intenzív sejthalált okoztak mindkét makrofág alpopulációban.

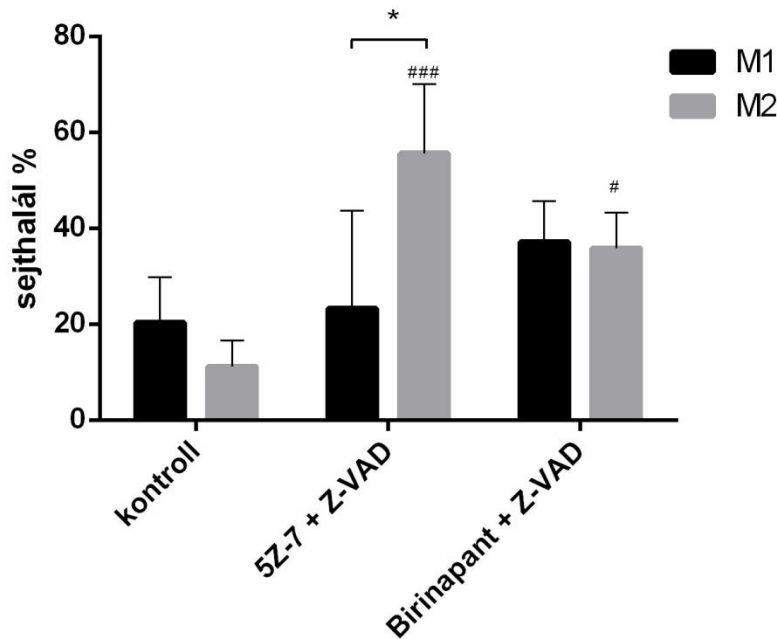
VI.2 Az M1 és M2 sejtek ko-kultúrában való tenyésztése nem érzékenyíti az M1 sejteket a TAK1 inhibitor által indukált nekroptózisra

Az M1 és M2 makrofág alpopulációk a krónikus gyulladás helyén vagy a daganatok mikro környezetében egyszerre vannak jelen. Vizsgáltuk a makrofágok azon képességét, hogy az M1 és M2 sejtek együttes jelenléte módosítja-e az egyes altípusok érzékenységét nekroptotikus stimulusokra. Ennek megállapítására, az M2 makrofágokat CellTracker™ Green CMFDA festékkel töltöttük fel, majd M1 makrofágokkal helyeztük ko-kultúrába. Az együtt tenyésztett sejteket BZ vagy OZ reagensekkel kezeltük 24 órán keresztül. A sejthalál intenzitását mind a CellTracker pozitív, mind negatív populációkban meghatároztuk PI festéssel. A külön kezelt makrofágok esetében megfigyelt eredményekkel összhangban, az M2 sejtek érzékenyek voltak az OZ által kiváltott nekroptózisra, míg az M1 sejtek rezisztensek maradtak ezzel szemben. Továbbá az eddigi eredményeknek megfelelően a BZ kezelés mindkét makrofág populációt elpusztította a ko-kultúrában (15. Ábra A-B).

A



B

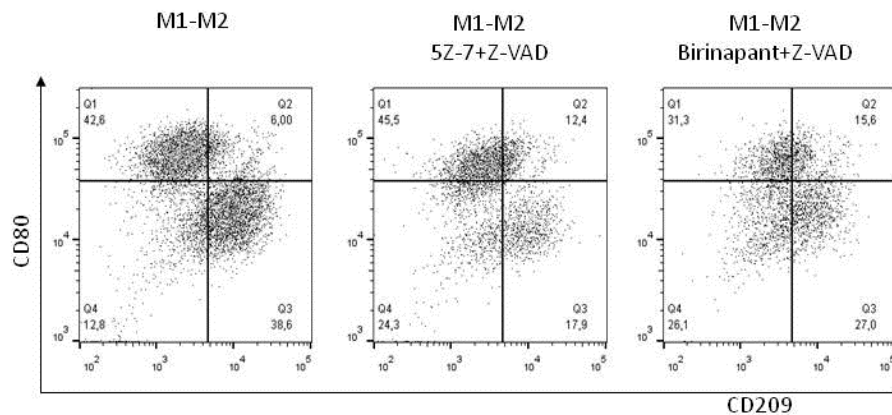


15. **Ábra:** Az M1/M2 ko-kultúrában a TAK1-inhibitor nekroptózist indukál az M2 sejteken. (A-B) Az M2 sejteket 10 ng/ml CellTracker™ Green CMFDA festékkel töltöttünk fel 37 C°-on, 30 percen keresztül. A CellTracker jelöléssel ellátott M2 és a jelöletlen M1 sejteket együtt tenyésztettük, ezt követően a ko-kultúrában tartott makrofágokat 0.5 µM Birinapanttal és 50 µM Z-VAD-dal vagy 1 µM 5Z-7-oxozeaenollal és 50 µM Z-VAD-dal kezeltük 24 órán keresztül. A makrofágokon kiváltott sejthalál mértékét a PI felvétele alapján számszerűsítettük. (A) Az eredmény három egymástól függetlenül elvégzett kísérlet adatainak reprezentatív bemutatása. (B) A CellTracker pozitív és a CellTracker negatív

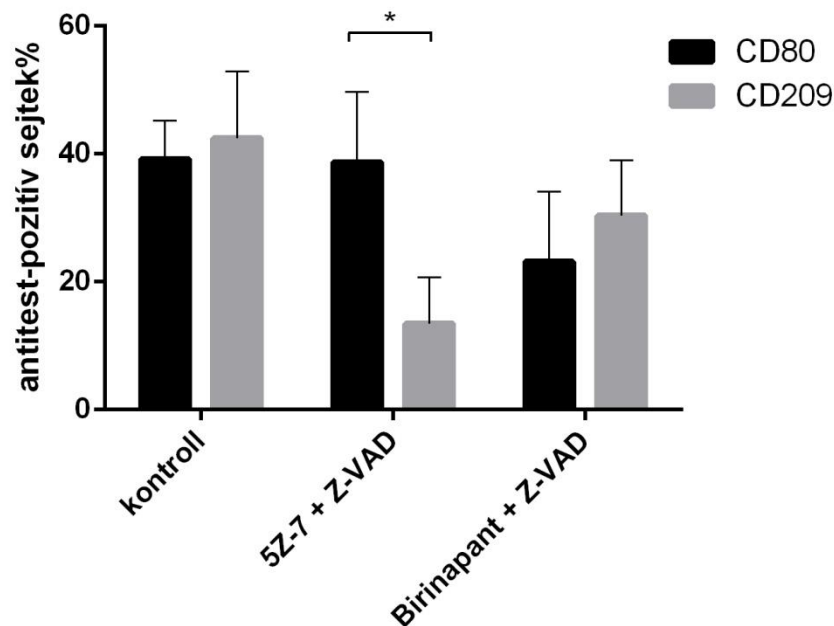
poupopulációkra vetítve meghatároztuk a sejthalál százalékos arányát. Az ábra három független kísérlet átlagát és szórását mutatja. A kontrollhoz viszonyított szignifikancia értékeket a # szimbólum jelöli.

Ezt az eredményt a túlélő sejtpopulációk sejtfelszíni markereinek mérésével erősítettük meg, melyet a sejthalál indukciója előtt és után is elvégeztünk. Az OZ kezelés csökkentette a CD209⁺ sejtek mennyiségét, tehát az M1/M2 ko-kultúra összetételét az M1 túlsúly felé tolta el, miközben a BZ kezelés nem gyakorolt szignifikáns hatást az M1/M2 arányra (16. Ábra A-B).

A



B



16. Ábra: Az M1/M2 ko-kultúrában a TAK1-inhibitor nekroptózist indukál az M2 sejteken. (A-B) M1 és M2 sejteket együtt tenyésztettünk és a ko-kultúrát 0.5 μ M Birinapant-tal vagy 1 μ M 5Z-7-oxozeaenollal

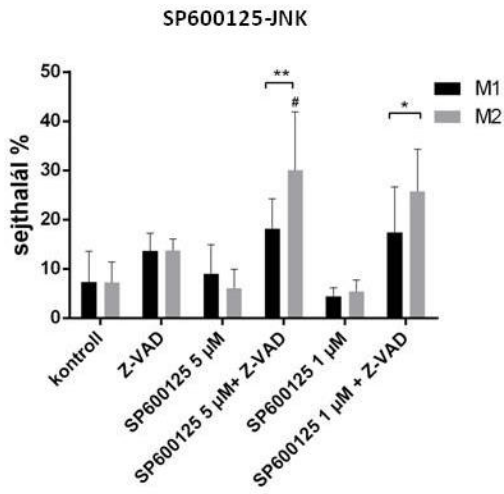
kezeltük 50 μ M Z-VAD jelenlétében 24 órán át. A CD80 és CD209 sejtfelszíni expresszióját áramlási citometriával mértük a kezelések előtt, illetve 24 órával a sejthalál indukciót követően. (A) A CD80 és CD209 sejtfelszíni expresszióját áramlási citometriával mértük a kezelések előtt, illetve 24 órával a sejthalál indukciót követően. Az eredmény öt egymástól függetlenül elvégzett kísérlet adatainak reprezentatív bemutatása. (B) Az élő sejtek populációján belül meghatároztuk a CD80 pozitív CD209 negatív (CD80) és a CD209 pozitív CD80 negatív (CD209) sejtek százalékos arányát. Az ábra öt független kísérlet átlagát és szórását mutatja.

Eredményeink szerint az együtt tenyésztett M1 és M2 makrofágok TAK1 inhibitorral történő kezelése a túlélő sejtek egyensúlyát az M1 dominancia felé tolta el. Ezen eredmények alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a makrofág altípusok nekroptózis-érzékenysége nem függ szolubilis mediátoroktól, sem az M2-eredetű citotoxikus sem az M1-eredetű túlélési faktoroktól, hanem a két sejtpopuláció önálló tulajdonságai által szabályozott.

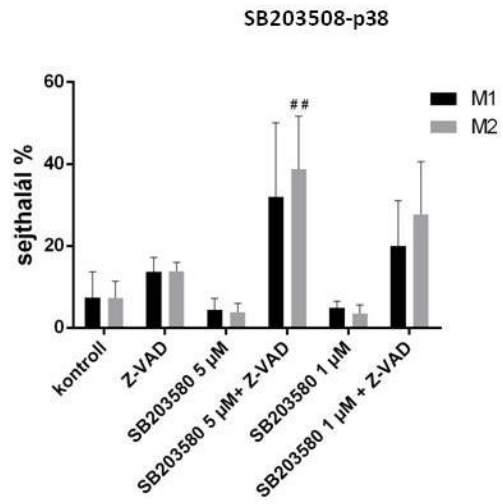
VI.3 A TAK1 jelátviteli út downstream komponenseinek gátlása nekroptózist vált ki az M2 sejtekben

A TAK1 ismert, mint a MAPK és az NF κ B jelátviteli útvonalak szabályozója⁸². Vizsgáltuk, hogy a TAK1 jelátvitel melyik downstream komponense lehet felelős a TAK1 inhibitor által kiváltott nekroptózisért. Kísérleteink során a TAK1 által szabályozott útvonalakat a következő inhibitorokkal gátoltuk: SP600125 (JNK inhibitor), SB203508 (p38MAPK inhibitor), U0126 (ERK inhibitor) és TPCA1 (IKK inhibitor). Kaszpáz gátló jelenlétében az általunk használt inhibitorok sejthalált indukáltak az M2 makrofágokban. A vizsgált dózisokban a kiváltott sejthalál az M2 sejtekben intenzívebbnek bizonyult, mint az M1 sejtekben. A p38 kináz inhibitor kivételével, minden vizsgált esetben szignifikánsnak bizonyultak (JNK inhibitor, ERK inhibitor, I κ B inhibitor) a sejthalál intenzitásában megfigyelhető különbségek. A MAPK és NF κ B inhibitorainak különbözően kombinált alkalmazása szintén intenzívebb sejthalált indukált az M2, mint az M1 makrofágokban (17. Ábra E). Azonban a kaszpáz aktivitás (Z-VAD hiányában) mindkét makrofág alpopulációt megvédte akár a MAPK, akár az IKK gátlás hatására kiváltott nekroptózistól (17. Ábra A-D).

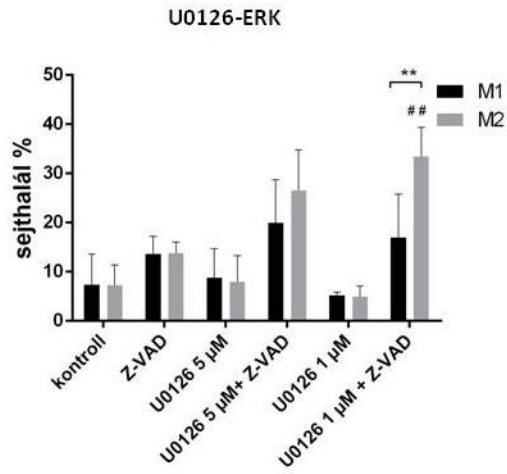
A



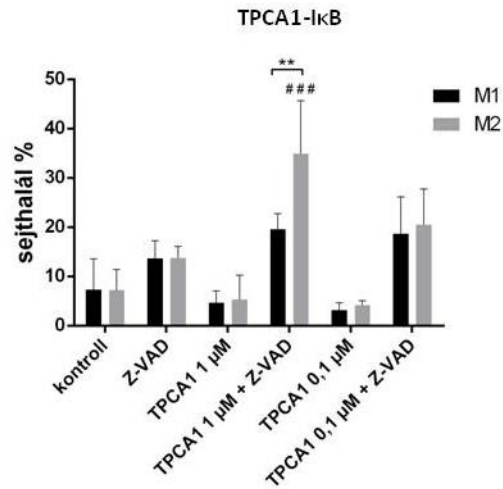
B



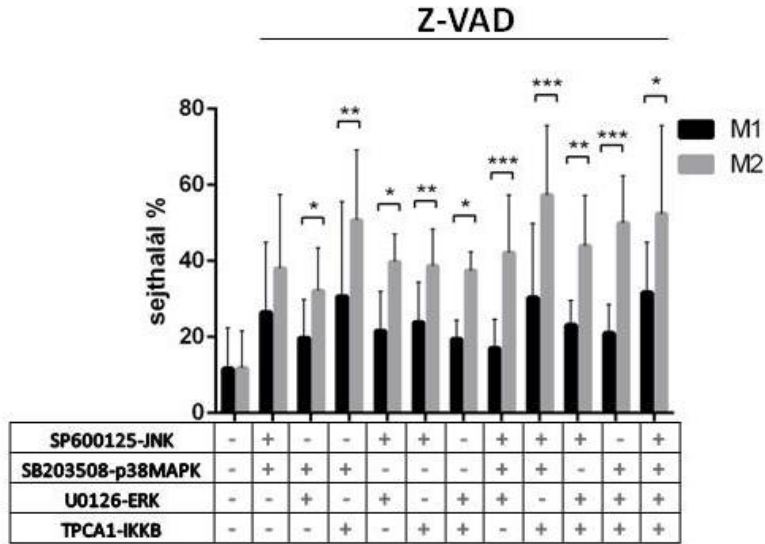
C



D



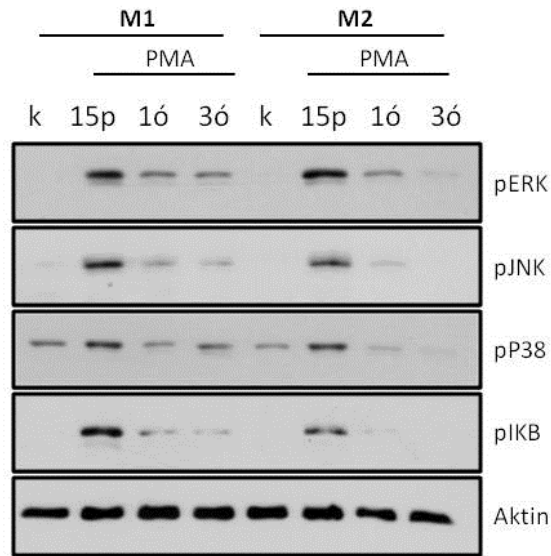
E



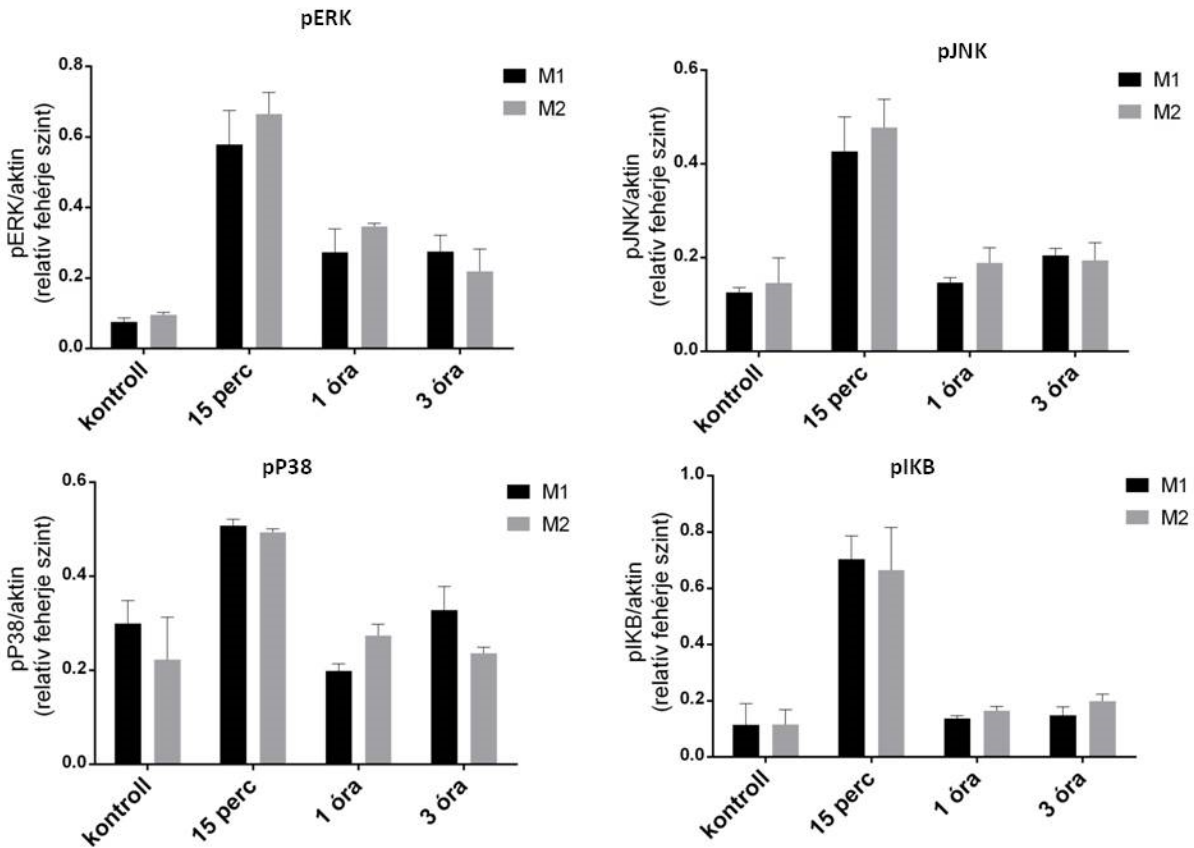
17. Ábra: Kaszpáz gátló jelenlétében a p38MAPK, JNK, ERK és IKK inhibitorok sejthalált indukálnak az M2 makrofágokban. Az *in vitro* differenciáltotott humán M1 és M2 sejteket 50 μ M Z-VAD jelenlétében vagy hiányában stimuláltuk 24 órán keresztül az (A) 1-5 μ M SP600125 (JNK inhibitor), (B) 1-5 μ M SB203508 (p38MAPK inhibitor), (C) 1-5 μ M U0126 (ERK inhibitor) és (D) 0.1-1 μ M TPCA1 (IKK inhibitor) vagy (E) 50 μ M Z-VAD jelenlétében ezen inhibitorok kombinációival (1 μ M SP600125, 1 μ M SB203508, 1 μ M U0126, 0.1 μ M TPCA1). A sejthalál mértékét a PI felvétel alapján határoztuk meg. (A-E) Az ábrák legalább öt független kísérlet átlagát és szórását mutatják. # a szignifikáns különbségeket jelzi a Z-VAD-dal kezelt mintákhoz képest.

Vizsgáltuk az M1 és M2 sejtekben az ERK, JNK, p38 és I κ B foszforilációs szintjét phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) kezelés hatására. A PMA-aktivált makrofágokban hasonló intenzitású MAPK és I κ B foszforiláció mutatható ki. Ebből az eredményből arra következtethetünk, hogy a két sejtípus között megfigyelt sejthalálban mérhető különbséget nem a TAK1 által szabályozott jelátvitel downstream komponenseinek (MAPK és NF κ B) alapvetően eltérő működése okozza (18. Ábra A B). A sejthalálban kimutatható különbség hátterében feltehetőleg a nekroptózist érintő jelátvitel változása állhat.

A



B

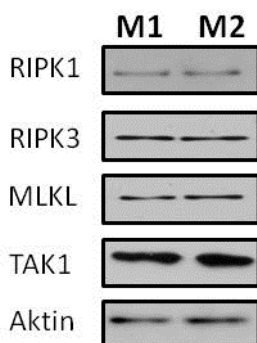


18. **Ábra: A p38MAPK, JNK, ERK és IK β foszforilációs állapota az M1 és M2 makrofágokban.**

(A) Az M1 és M2 sejteket 100 nM PMA-tal aktiváltuk. A p38MAPK, JNK, ERK és IK β foszforilációját western blot-tal mutattuk ki foszfo-specifikus antitestek alkalmazásával. Az ábra három egymástól

függetlenül elvégzett kísérlet adatainak reprezentatív bemutatása, amely kísérletek denzitometrált eredményét a (B) panel ábrázolja.

Ezt követően megvizsgáltuk az M1 és M2 makrofágokban a nekroszóma komponensek fehérje expresszióját. A nekroptózis szabályozásában szerepet játszó legfontosabb fehérjék expressziós szintjében sem találtunk jelentős különbséget az M1 és M2 sejtek között (19. Ábra).



19. Ábra: A nekroptózis szabályozásában részt vevő fehérjék az M1 és M2 makrofágokban.

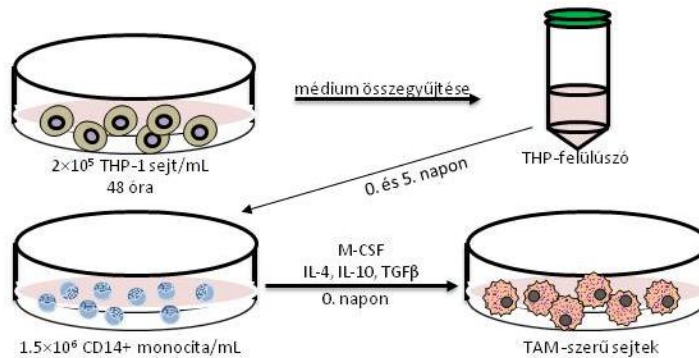
A nekroptózis szabályozásában szerepet játszó fehérjék expressziós szintjét western blot segítségével vizsgáltuk az M1 és M2 makrofágok teljes sejt lizátumaiból. Az eredmény három egymástól függetlenül elvégzett kísérlet adatainak reprezentatív bemutatása.

VI.4 A TAM-szerű makrofágok érzékenyek a TAK1 inhibitor által kiváltott nekroptózisra

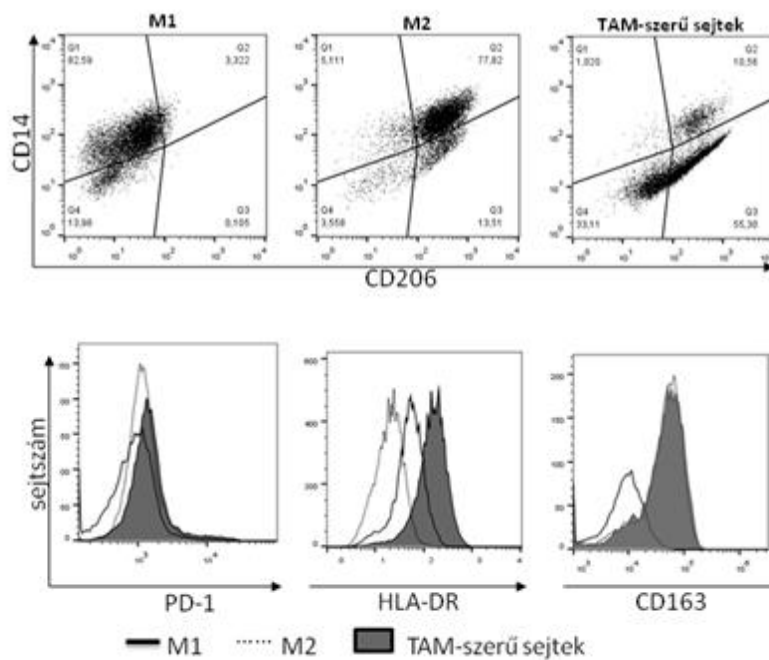
Megfigyeléseink alapján a monocita-eredetű M2 sejtek érzékenyebbek a TAK1 inhibitor által kiváltott nekroptózisra, mint az M1 makrofágok. Az M2-szerű funkcionális tulajdonságokkal jellemezhető tumor asszociált makrofágok sejthalál érzékenysége meghatározó lehet azon terápiákban, ahol a tumorok mikrokörnyezetében nekroptózis indukáló szereket alkalmaznak. A TAM-ok nekroptózis érzékenységének vizsgálatához *in vitro* monocita-eredetű TAM-szerű sejteket differenciáltattunk és az életképességüket összevetettük az M1 és M2 makrofágokkal. Az izolált monocitákat M-CSF, IL-10, IL-4, TGF β és THP-1 sejtvonal felülűszojának jelenlétében differenciáltattuk TAM-szerű sejtekké (20. Ábra A), a karakterizálásukat pedig áramlási citometriával (20. Ábra B) végeztük. Az általunk

differenciált TAM-ok a szakirodalmi adatoknak megfelelően^{145,146,147} magas CD206, CD163, HLA-DR és alacsony CD14 és PD-1 expressziót mutattak.

A



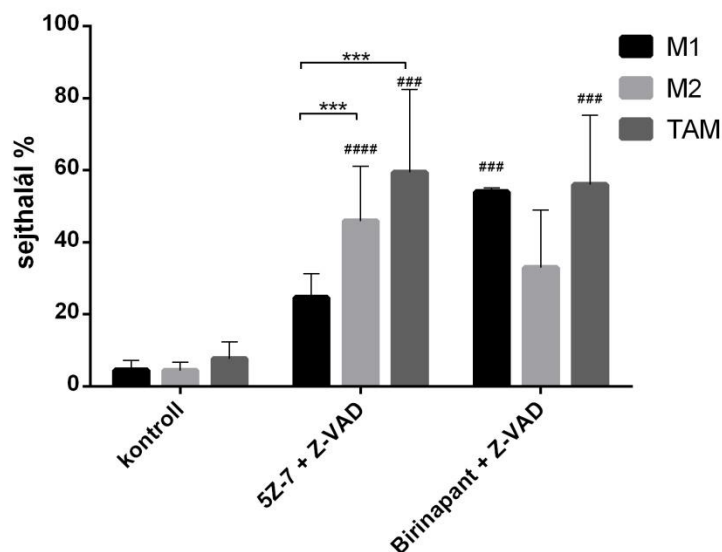
B



20. **Ábra: A TAM-szerű sejtek in vitro differenciáltatása.** (A) A TAM-szerű sejtek létrehozásának sematikus ábrázolása: A THP-1 sejteken 48 órán át kondicionáltuk a médiumot, majd a THP-1 sejtek eltávolítása céljából centrifugáltuk (THP-felüliszó). Egészséges donorokból CD14 pozitív monocitákat szeparáltunk, amelyeket 1.5×10^6 sejt/ml koncentrációban tenyésztettünk. A humán monociták TAM-szerű sejtekké való differenciáltatásához M-CSF, IL-4, IL-10 és TGF β citokineket adtunk a tenyészetbe 5 napig, THP-1 sejtek felüliszójában. Az 5. napon a tápközeget friss THP-1 felüliszóra cseréltük. A 6. napon összegyűjtöttük a TAM-szerű sejteket.

(B) A TAM-szerű sejteket 6. napon áramlási citometriával jellemeztük. Meghatároztuk a CD14 és CD206, illetve a CD163, PD-1 és HLA-DR sejt felszíni expresszióját. Az eredmény három egymástól függetlenül elvégzett kísérlet adatainak reprezentatív bemutatása.

Miután kimutattuk, hogy a differenciált makrofágok sejt felszíni markereik expressziója alapján TAM-nak feleltethetőek meg, Birinapant/Z-VAD vagy 5Z-7/Z-VAD hozzáadásával indukáltunk nekroptózist a TAM-szerű sejteken. Megállapítottuk, hogy a TAM-szerű sejtek ugyanolyan érzékenyek a BZ-indukált nekroptózisra, mint az M1 sejtek. Azonban az M2 sejtekhez hasonlóan szignifikánsan nagyobb sejthalált mutatnak az 5Z-7/Z-VAD kezelés hatására, mint az M1 makrofágok (21. Ábra).



21. Ábra: Kaszpáz inhibitor jelenlétében a TAK1 inhibitor nekroptózist indukál a TAM-szerű makrofágokon. Az *in vitro* generált TAM-szerű sejtek érzékenységét összehasonlítottuk az M1 és M2 makrofágokkal. A sejteket 0.5 μ M Birinapanttal vagy 1 μ M 5Z-7-oxozeaenollal kezeltük 50 μ M Z-VAD jelenlétében. A sejthalál mértékét a PI felvétel alapján határoztuk meg 24 órával a kezelést követően. Az ábra legalább öt független kísérlet átlagát és szórását mutatja. A kontrollhoz viszonyított szignifikancia értékeket a # szimbólum jelöli.

Megfigyeléseinket összefoglalva, az M2 sejtek bármelyik túlélési jel hiányában nekroptózissal elpusztulnak kaszpáz gátló jelenlétében, míg az M1 makrofágok további túlélési jeleket használhatnak, mely megakadályozhatja a TAK1 inhibitor által kiváltott nekroptózist.

A TAM-szerű makrofágok, hasonlóan az M2 sejtekhez szignifikánsan nagyobb érzékenységet mutatnak az OZ nekroptózis indukció hatására, mint az M1 makrofágok. Ez a

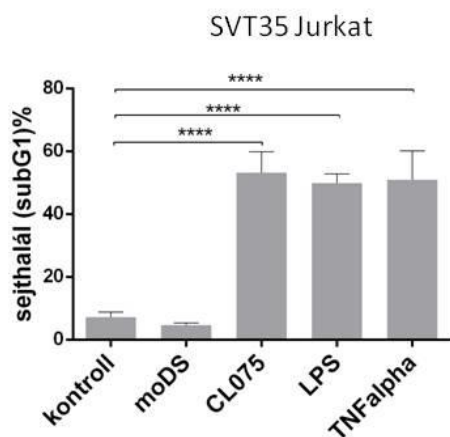
tulajdonságuk terápiás lehetőséget nyújthat a tumorok környezetében megjelenő tolerogén hatású sejtek eliminációjára.

A doktori munka második fázisa során azt vizsgáltuk, hogy a humán monocita-eredetű DS-ek (moDS) citotoxikus képessége hogyan változik meg PRR-stimulusok hatására.

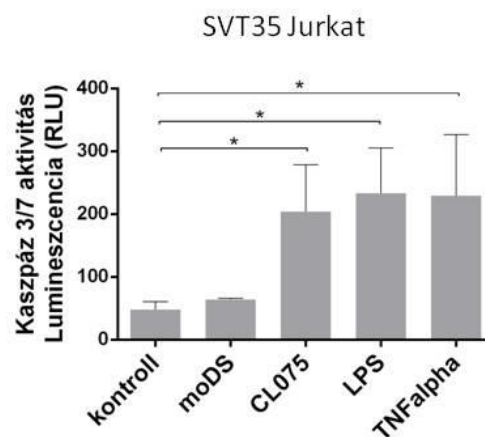
VI.5 A moDS-ek felülűszója sejthalált indukál

A DS-ek citotoxikus képességének vizsgálatához humán moDS-eket használtunk. A moDS-eket LPS (TLR4) és CL075 (TLR7-8) TLR-ligandumokkal kezeltük 30 percen keresztül, majd intenzív mosási lépéseket követően további 2 órán át inkubáltuk. Ezt követően a DS-ek felülűszóival kezeltük az SVT35 Jurkat célsejteket 24 órán keresztül. Az LPS-dal vagy CL075-tel aktivált DS-ek felülűszója jelentős mértékű sejthalált eredményezett a Jurkat sejteken. Ezzel szemben azon DS-ek felülűszója -amelyet nem stimuláltunk TLR-ligandummal- sejtölő hatást nem mutatott. Ezeket az eredményeket a subG1 csúcs (22. Ábra A) és kaszpáz 3/7 aktivitás mérésekkel támasztottuk alá (22. Ábra B).

A



B



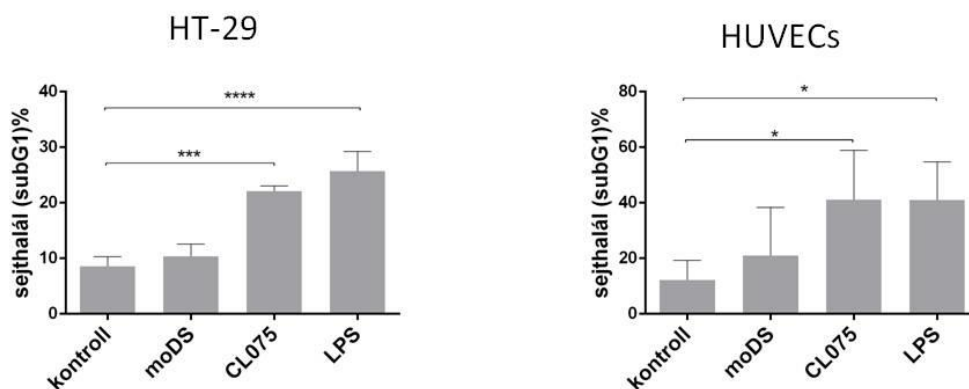
22. **Ábra: A moDS-ek felülűszója sejthalált indukál Jurkat sejteken.** (A) A Jurkat sejteket kezeletlen, CL075-tel (1 µg/ml) vagy LPS-dal (0.5 µg/ml) stimulált DS-ek felülűszóival vagy pozitív kontrollként TNFα-val (20 ng/ml) kezeltük. 24 óra elteltével a sejthalál mértékét a subG1 csúcs méréssel és (B) kaszpáz 3/7 aktivitás méréssel meghatároztuk. Az ábrák öt független kísérlet átlagát mutatják.

A szakirodalmi adatok alapján a DS-ek a citotoxikus hatása nem sejt specifikus, ezen képességük különféle sejtvonalakon kimutatható¹⁷. Annak vizsgálatára, hogy az általunk létrehozott felülűszók sejtpusztító hatása érvényesül-e más sejtek esetében is, a citotoxikus hatást

a HT-29 vastagbél-eredetű adenokarcinóma sejtvonalon és primer HUVECs sejteken is teszteltük. A HT-29 és HUVECs sejtekhez DS felülűszót adtuk, majd 24 óra múlva mértük a sejthalál intenzitást. Eredményeink alapján elmondható, hogy a DS citotoxikus funkciója nem T sejt/Jurkat szelektív, mivel a HT-29 és HUVECs sejtek is szignifikáns mértékben elpusztultak az LPS vagy CL075-kezelt DS felülűszó hatására (23. Ábra A-B).

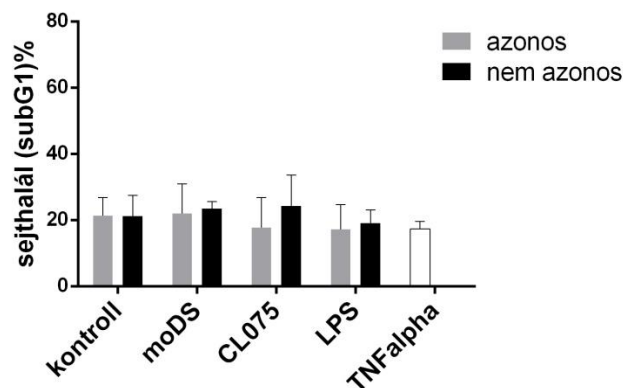
A

B



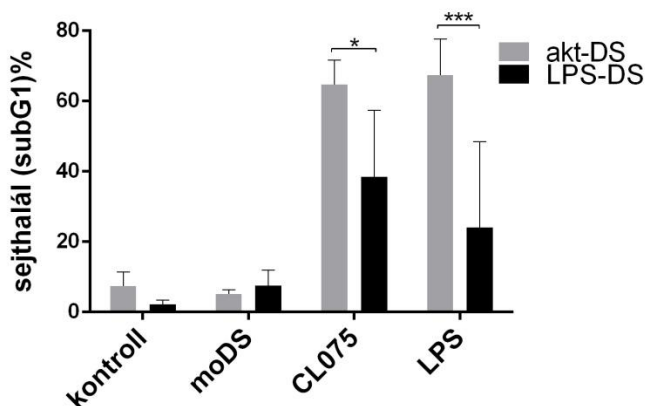
23. **Ábra: A moDS felülűszója sejthalált indukál HT-29 és HUVECs sejteken egyaránt.** (A) A HT-29 vagy (B) HUVECs sejteket kezeletlen, CL075-tel (1 $\mu\text{g/ml}$) vagy LPS-dal (0.5 $\mu\text{g/ml}$) stimulált moDS-ek felülűszóival kezeltük. 24 óra elteltével a sejthalál mértékét a subG1 csúcs mérésével meghatározzuk. Az ábrák három független kísérlet átlagát mutatják.

Vizsgáltuk, hogy a DS-ek hogyan reagálnak a citotoxikus hatású felülűszóra, mind saját, mind pedig eltérő donorokból származó moDS felülűszó esetében. Az eredményeink szerint maguk a DS-ek rezisztensnek bizonyultak a citotoxikus képességgel szemben (24. ábra).



24. **Ábra: A moDS nem érzékeny a DS felülűsző-indukált sejthalálra.** A DS-eket azonos, illetve eltérő donorból származó DS-ek által termelt felülűszővel kezeltük. Pozitív kontrollként TNF α (50 ng/ml) kezelést alkalmaztunk. 24 óra elteltével a subG1 csúcs mérésével határoztuk meg a sejtpusztulást. Az ábrák öt független kísérlet átlagát mutatják.

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy a DS felülűsző citotoxikus képessége a szövetekben lokalizált, éretlen DS fenotípushoz köthető-e, vagy inkább a nyirokcsomókba vándorolt, érett DS-ek jellemzője. Ennek megállapításához LPS-dal 24 óráig aktiváltuk a DS-eket (LPS-DS), majd az LPS előkezelt és kezeletlen moDS-eket egyaránt 30 percig aktiváltuk LPS-dal vagy CL075-tel. Összehasonlítottuk az így nyert felülűszők citotoxikus hatását. Eredményeink szerint a Jurkat sejtek szignifikánsan kisebb mértékben pusztultak el az LPS-DS felülűsző adásakor, mind az LPS, mind pedig a CL075-aktivációt követően (25. Ábra).

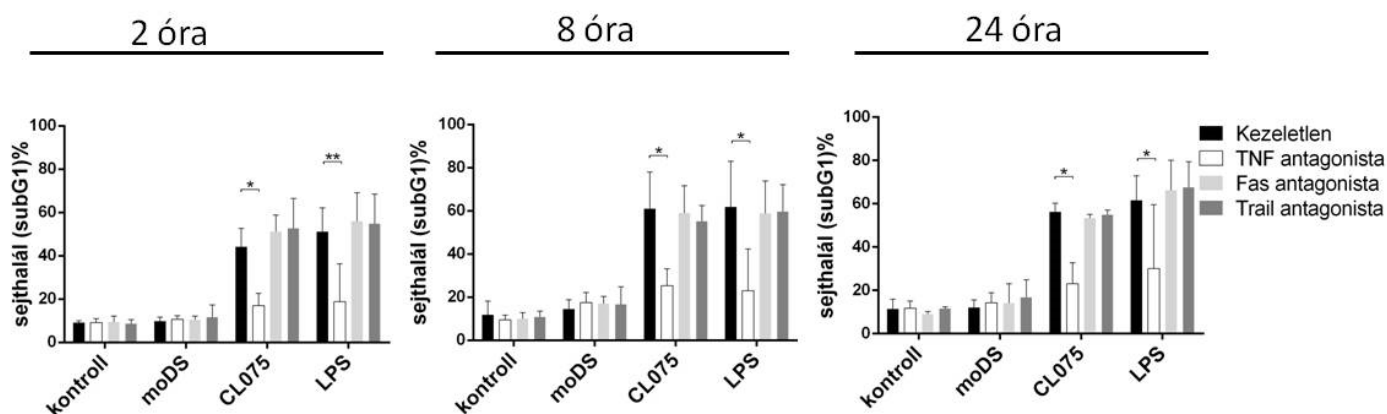


25. **Ábra: A LPS-DS felülűszője kisebb mértékben indukál sejthalált.** A moDS-eket (akt-DS) vagy az LPS-előaktivált (24 óra) DS-eket (LPS-DS) 30 percig CL075-tel (1 μ g/ml) vagy LPS-dal (0.5 μ g/ml) aktiváltuk. Az SVT35 Jurkat sejteket az így előállított felülűszőkkel kezeltük. 24 óra elteltével a sejtpusztulást a subG1 csúcs mérésével határoztuk meg. Az ábrák öt független kísérlet átlagát mutatják.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy szemben az érett fenotípusú DS-ekkel a szöveti rezidens DS-ek rövid, PRR stimulust követően citotoxikus tulajdonsággal is rendelkezhetnek.

VI.6 A moDS-ek felülűszója TNF α -függő sejthalált vált ki

Szakirodalmi adatok alapján a DS-ek citotoxikus képességéért a sejthalál receptorok aktivációja a felelős¹⁴⁸. Ellentétes adatok jelentek meg azonban arról, hogy melyik receptor ligandumai váltják ki a sejtölő hatást. Ennek tisztázására sejthalál ligandum antagonisták adása mellett vizsgáltuk a DS citotoxikus képességét. A moDS-eket LPS és CL075 TLR-ligandumokkal kezeltük 30 percen keresztül, majd intenzív mosási lépéseket követően 2, 8 vagy 24 óráig inkubáltuk. A moDS felülűszókat szolubilis TNF, Fas vagy TRAIL receptorokkal kezeltük elő, hogy semlegesítsék az esetleges sejthalál ligandumokat a felülűszóban. Az SVT35 Jurkat sejtekhez TNF:Fc, Fas:Fc és TRAIL:Fc fehérjével előkezelt DS felülűszókat adtuk és 24 óra múlva mértük a sejthalált. A TNF:Fc megakadályozta a célsejtek halálát, megerősítve ezzel a TNF α DS citotoxicitásában betöltött nélkülözhetetlen szerepét. Azonban a FasL vagy a TRAIL elleni specifikus inhibitorok nem gátolták meg a moDS által kiváltott sejtpusztulást, függetlenül attól, hogy 2, 8 vagy pedig 24 órás felülűszót adtunk a sejtekhez (26. Ábra).

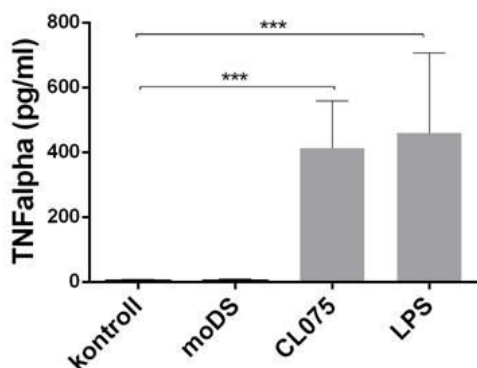


26. Ábra: A moDS felülűszó TNF-függő sejthalált vált ki. A nem stimulált, CL075 (1 μ g/ml) vagy LPS (0.5 μ g/ml) stimulált moDS felülűszókat szolubilis receptorokkal (TNF:Fc, Fas Fc, TRAIL:Fc) kezeltük elő 1 óráig keresztül. Az SVT35 Jurkat sejteket a 2, 8 vagy 24 óráig termeltetett DS felülűszókkal inkubáltuk együtt 24

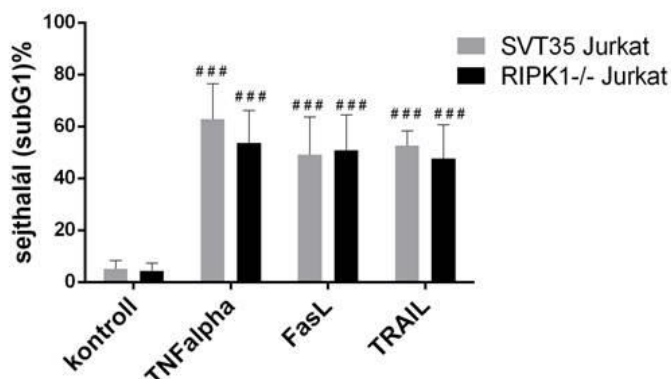
óráig, majd mértük a sejtpusztulás mértékét a subG1 csúcs meghatározásával. Az ábrák három független kísérlet átlagát mutatják.

Az eredményeink megerősítéséhez mértük a TLR aktivált DS felülűszókban a TNF α mennyiségét. Az LPS és CL075-kezelt DS felülűszó 200-400 pg/ml TNF α -t tartalmaz (27. Ábra A).

A



B



27. **Ábra: A moDS felülűszó TNF α -t tartalmaz.** (A) A TNF α termelést ELISA módszerrel detektáltuk a nem stimulált, CL075-tel (1 μ g/ml) vagy LPS-dal (0.5 μ g/ml) stimulált moDS felülűszókban. Az ábrák öt független kísérlet átlagát mutatják.

(B) Az SVT35 Jurkat sejteket és a RIPK1-/- változatát 20 ng/ml TNF α -val (PeproTech), 20 ng/ml FasL-dal (Sigma) vagy 0.2 ng/ml TRAIL-lel (AdipoGen) kezeltük 24 órán keresztül, majd mértük a sejtpusztulás mértékét a subG1 csúcs meghatározásával. A kontrollhoz viszonyított szignifikancia értékeket a # szimbólum jelöli.

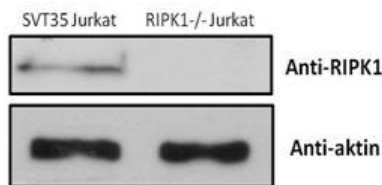
Ezek a megfigyelések összességében arra utalnak, hogy a PRR stimulációval kiváltott TNF termelés felelős az moDS-közvetített citotoxicitásért.

V.7 A DS felülúszó RIPK1-függő sejthalált indukál

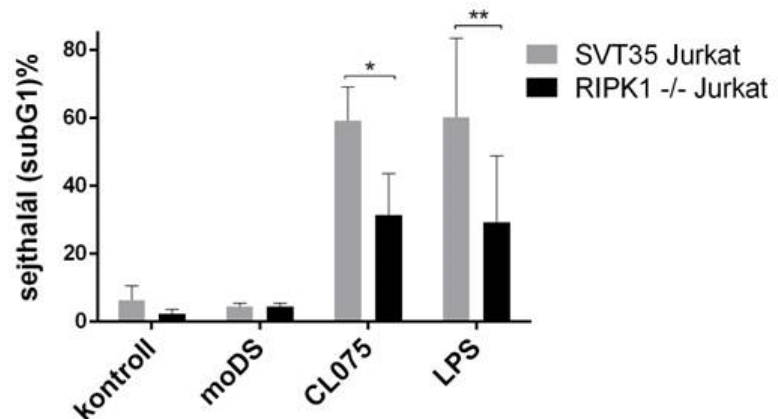
A DS felülúszó által kiváltott sejthalál RIPK1-függő és -független útvonalon is végbe mehet⁵⁴. Kísérleteink során vizsgáltuk, hogy a RIPK1 részt vesz-e a DS felülúszó által mediált sejthalálban. Ennek megállapításához az SVT35 vad típusú Jurkat sejtekkel és RIPK1^{-/-} klónjának DS felülúszóra való érzékenységét teszteltünk. Ennek első lépéseként western blot módszerrel megerősítettük a fehérje hiányát a RIPK1^{-/-} sejtvonalon (28. Ábra A). A sejthalál mérés alapján elmondható, hogy a TLR-kezelt DS felülúszó adása szignifikánsan nagyobb mértékű sejtpusztulást váltott ki a RIPK1^{+/+} vad típusú sejteken, mint a RIPK1 negatív sejtvonalon (28. Ábra B).

Mivel előző kísérleteinkben a DS-indukált sejthalál TNF-függőnek bizonyult, megvizsgáltuk, hogyan reagál rekombináns sejthalál ligandumokra az SVT35 vad típusú Jurkat sejt vonal és ennek RIPK1^{-/-} változata. Eredményeink szerint vad típusú Jurkat sejtek és RIPK1^{-/-} klónja a TNF α , FasL és TRAIL sejthalál ligandumokra egyaránt érzékenyek, ebből következően nem a vad típusú, illetve RIPK1 deficiens sejt vonalak eltérő TNF érzékenysége okozta a sejtpusztulásban megfigyelt különbségeket (27. Ábra B).

A



B



28. **Ábra: A moDS felülúszó RIPK1-függő sejthalált vált ki.** (A) Az SVT35 Jurkat sejt vonalon és annak RIPK1^{-/-} változatában western blot módszerrel mutattuk ki a RIPK1 fehérje szintjét. Az eredmény három egymástól függetlenül elvégzett kísérlet adatainak reprezentatív bemutatása. (B) A Jurkat sejteket és azok RIPK1^{-/-} változatát nem stimulált, CL075-tel (1 μ g/ml) vagy LPS-dal (0.5 μ g/ml) 30 percig stimulált DS felülúszókkal inkubáltuk együtt 24 óráig, majd mértük a sejtpusztulás mértékét a subG1 csúcs meghatározásával. Az ábra öt független kísérlet átlagát mutatja.

A RIPK1-függő sejthalál útvonalakat elsősorban SMAC mimetikumok jelenlétében mutatták ki, amikor a RIPK1 deubiquitinált állapotba kerül. Ebben az állapotban a RIPK1 prokaspáz-8 molekulákat toboroz és végső soron serkenti a sejthalál bekövetkezését¹⁴⁹. Vizsgáltuk, hogy a DS felülűszó hatására kialakul-e a kísérleti rendszerünkben a RIPK1 és kaszpáz-8 kapcsolat. Ehhez RIPK1 (29. Ábra A) és kaszpáz-8 (29. Ábra B) immunprecipitációkat végeztünk. Pozitív kontrollként TNF α -t és SMAC mimetikum kombinációját adtuk⁵⁴. Eredményeink alapján elmondható, hogy a kaszpáz-8 a RIPK1 kinázhoz kapcsolódik a TLR-ligandumokkal kezelt DS felülűszó hatására, ami a kezeletlen moDS felülűszónál nem mutatható ki (29. Ábra A-B).

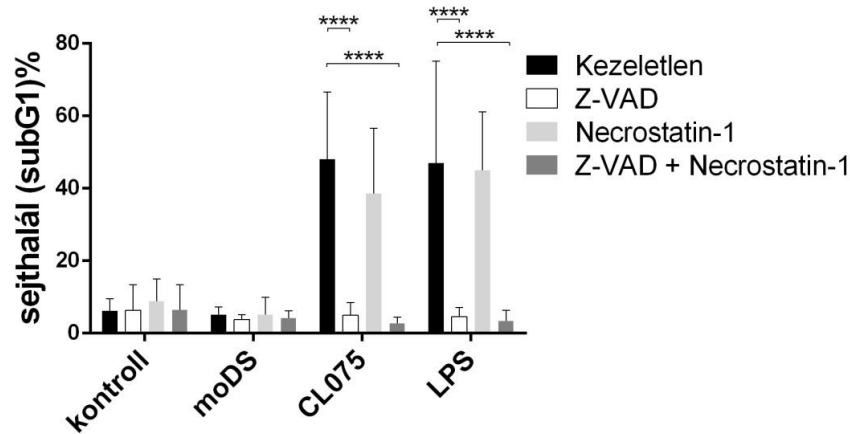
Szakirodalomban elfogadott, hogy a RIPK1 a RIPK1-függő sejthalál folyamatokban foszforilálódik⁷⁴. Az eredményeink megerősítéseként vizsgáltunk a RIPK1 foszforilációs állapotát a DS felülűszó kezelést követően a Jurkat sejtekben. Az LPS-dal és CL075-tel kezelt DS-ek felülűszója kiváltotta a RIPK1 foszforilációját, ami az moDS kezelt Jurkat sejtekben nem mutatható ki (29. Ábra C). Ezek az eredményeink arra utalnak, hogy a RIPK1 által közvetített szignálok legalább részben felelősek a DS felülűszó által indukált sejthalálért.

RIPK1 foszforilációját western blottal mutattuk ki a sejtizátumokból. Az eredmény három egymástól függetlenül elvégzett kísérlet adatainak reprezentatív bemutatása.

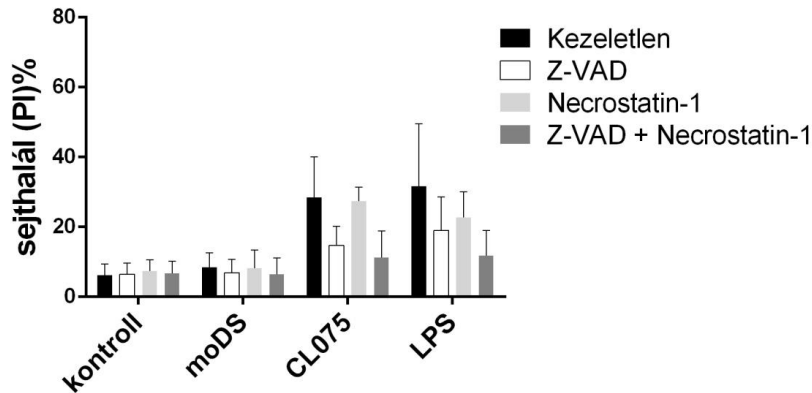
VI.8 A DS felülűszó apoptózist indukál

A RIPK1 a nekroptózis jelátvitelének is fontos szereplője, abban az esetben, ha a kaszpáz-8 hiányzik vagy aktivitása gátolt a sejthalált mediáló komplexben. Az elpusztuló sejtekből felszabaduló DAMP-ok aktiválják a természetes immunrendszert, ezáltal a sejthalál apoptózisból nekroptózis jelátvitelre való módosulása gyulladáshoz vezet eredményez⁵⁴. Annak megállapítására, hogy a DS felülűszó által indukált sejtpusztulás apoptózisnak vagy nekroptózisnak tekinthető, különböző inhibitorokat alkalmaztunk. A Jurkat sejteket előkezeltük Z-VAD kaszpáz inhibitorral, amely az apoptotikus jelátvitel gátlószere, illetve Necrostatin-1-gyel, ami a nekroptózist gátolja. A Jurkat célsejtek 10 μ M Z-VAD-dal történő előkezélése meggátolta a DS felülűszó-indukált sejthalált a subG1 mérés alapján (30. Ábra A). Továbbá a Z-VAD előkezelés megszüntette a Jurkat sejt pusztulást a PI-felvétel szerint meghatározott sejthalál esetében is (30. Ábra B). A Necrostatin-1 azonban nem akadályozta meg a DS citotoxicitást sem a subG1, sem pedig a PI mérések alapján (30. Ábra A-B). Ebből az eredményből arra következtethetünk, hogy a DS felülűszó kiválthatja a célsejtek kaszpáz-függő apoptotikus sejtpusztulását, nekroptózis azonban nem alakul ki, még kaszpáz gátolt feltételek között sem.

A



B



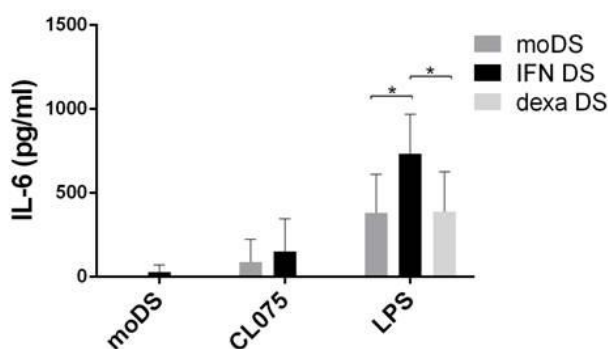
30. *Ábra: A DS felülcszó kiváltja a célsejtek apoptotikus sejtpusztulását. (A) A Jurkat sejteket 40 μ M Necrostatin-1-gyel vagy 10 μ M Z-VAD-dal, illetve a reagensek kombinációjával előkezeltük 1 órán át, majd a nem stimulált, CL075-tel (1 μ g/ml) vagy LPS-dal (0.5 μ g/ml) kezelt DS felülcszóival inkubáltuk együtt 24 órán át. A Jurkat sejthalál mértékét a subG1 csúcs (A) mérésével és a PI felvétel (B) alapján határoztuk meg. Az ábrák öt független kísérlet átlagát mutatják.*

VI.9 A tolerogén mikrokörnyezet csökkenti a DS-ek citotoxikus képességét

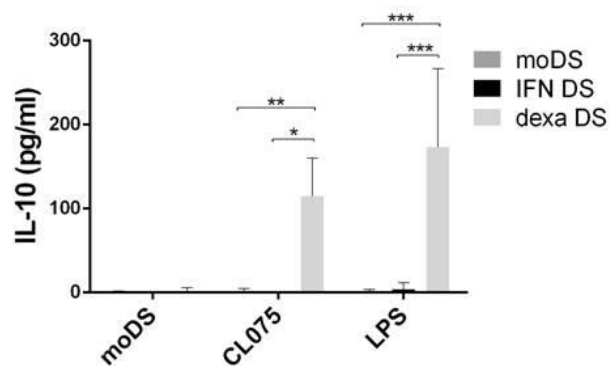
Hipotézisünk szerint a DS-ek citotoxikus funkciója lehetővé teszi olyan sejtekből származó antigének felszabadulását, melyek intracellulárisan fertőzöttek vagy malignus transzformáción estek át. Annak megállapítására, hogy az elpusztuló sejtekből származó antigének hozzáférhetőségét módosítja-e szöveti környezet, megvizsgáltuk a tolerogén és immunogén körülmények között differenciált DS-ek funkcióit. A tolerogén mikrokörnyezeti feltételeket a DS-ek dexamethasone (dexa DS), míg az intracelluláris fertőzést az I-es típusú

interferon (IFN DS) jelenlétében történő differenciáltatással modelleztük^{141,150}. A megfelelő polarizációs állapot igazolásához vizsgáltuk az egyes DS populációkban LPS vagy CL075 aktiválást követően a gyulladásos, illetve tolerogén citokinek termelését (31. Ábra A-B). Az IFN-nal kezelt DS szignifikánsan nagyobb mennyiségű IL-6 citokint (31. Ábra A) bocsátott ki, mint a tolerogén populáció, míg az IL-10 termelés (31. Ábra B) a dexamethasonnal kezelt DS-ekben volt jelentősebb.

A



B



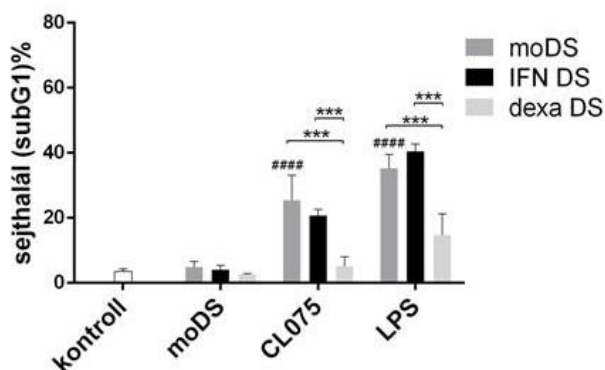
31. A kontroll moDS-ek, IFN-nal kezelt DS-ek és a tolerogén (dexe) DS-ek citokin szekréciója. (A-B) Az IL-6 és az IL-10 citokinek szekrécióját ELISA módszerrel detektáltuk nem stimulált, 30 percig CL075-tel (1 µg/ml) vagy LPS-dal (0.5 µg/ml) stimulált, a moDS, az immunogén (IFN DS) és tolerogén (dexe DS) DS felülűszókban. Az ábra öt független kísérlet átlagát mutatja.

Vizsgáltuk, hogy az IFN vagy dexamethasone jelenlétében differenciáltatott DS-ek felülűszóinak citotoxikus hatása módosul-e az moDS populációkhoz viszonyítva. Ennek megállapítására az eltérő körülmények között differenciáltatott DS populációkat LPS-dal vagy CL075-tel stimuláltuk, majd a Jurkat sejteket LPS vagy CL075-stimulált IFN DS, dexe DS és moDS felülűszókkal kezeltük. A felülűszók által kiváltott sejthalál nem változott szignifikáns mértékben az IFN DS esetében, azonban a tolerogén dexe DS felülűszó szignifikánsan kisebb sejtpusztulást váltott ki a célsejteken (32. Ábra A).

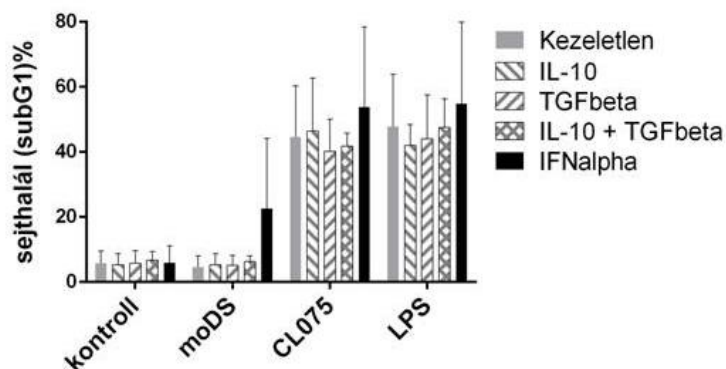
Annak meghatározására, hogy az immunmoduláló környezet befolyásolhatja-e a célsejtek érzékenységét, a Jurkat sejteket előkezeltük I. típusú interferonnal vagy tolerogén hatású IL-10 és/vagy TGFβ citokinekkal. Az előkezeléstől függetlenül a DS felülűszók hasonló sejthalált váltottak ki a Jurkat sejtekben. Az IFN előkezelés kis mértékben, de nem szignifikánsan nagyobb sejthalált okozott a célsejteken (32. Ábra B).

Az eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a tolerogén mikrokörnyezet csökkenti a DS-indukált citotoxicitás mértékét. Ez a hatás a DS-mediált sejtlésen keresztül valósul meg, a target sejtek érzékenységét nem módosítja.

A



B



32. A tolerogén mikrokörnyezet csökkenti a DS-ek citotoxikus képességét. (A) A Jurkat sejteket kezeletlen, CL075-tel (1 $\mu\text{g/ml}$) vagy LPS-dal (0.5 $\mu\text{g/ml}$) stimulált moDS, IFN DS vagy dexe DS felülírszóival kezeltük. 24 óra elteltével a sejthalál mértékét subG1 csúcs mérésével határozzuk meg. (B) A Jurkat sejteket 1 órán át előkezeltük 100 ng/ml IL-10 és/vagy 100 ng/ml TGF β citokinekkal, vagy 0.6 millió U/ml IFN α -val. Az előkezelést követően a Jurkat sejteket mostuk, majd kezeletlen, CL075-tel (1 $\mu\text{g/ml}$) vagy LPS-dal (0.5 $\mu\text{g/ml}$) stimulált moDS felülírszóival kezeltük. 24 óra elteltével a sejthalál mértékét subG1 csúcs mérésével meghatározzuk. (A-B) Az ábrák három független kísérlet átlagát mutatják. Az moDS-hez viszonyított szignifikancia értékeket a # szimbólum jelöli.

VII. Megbeszélés

A veleszületett immunrendszer szervezetünk első védelmi vonala. A legfőbb sejt alkotói a makrofágok és a DS-ek, melyek elsőként érzékelik a bejutó kórokozókat és azonnali reakciójukkal biztosítják a korai védelmi mechanizmusok lezajlását. Működésük során a konzervált, molekuláris mintázatokat ismerik fel, amelyek számos kórokozóban megtalálhatóak. A PAMP-ok felismerését követően a védekező sejtekben intracelluláris jelátviteli kaszkád indul el. Ennek célja egy azonnali, általános, pro-inflammatórikus válasz generálása, végső soron pedig a kórokozók eliminálása¹⁵¹. A veleszületett immunsejtek a PRR-okon keresztül a környezeti és endogén veszély jelek széles skáláját képesek felismerni. Ezáltal nem csak a patogénekből származó PAMP-okat, de a saját sejtek károsodására utaló, endogén szignálokat, DAMP-okat is érzékelhetnek. A PRR-ok mind a PAMP, mind pedig a DAMP stimulust követően jelentős fenotípusos és funkcionális változást indítanak el a természetes immunrendszer sejtjeiben, amelyek ez által aktivált állapotba kerülnek¹⁵².

Az immunrendszer aktivációja és a sejthalál folyamatok több ponton összekapcsolódnak. A sejthalál típusok immunrendszerre gyakorolt hatása attól függ, hogy milyen eredményesen tárnak fel veszély jeleket, illetve antigéneket az elpusztuló sejtekből. Az antigének mellett felszabaduló DAMP-ok a PRR-okhoz kötődve olyan génexpressziós változásokat indítanak el, amelyek a veleszületett immunsejtek fagocitáló képességét és a sejt felszíni MHC és kostimulátor molekulák kifejezését fokozzák¹¹. Ezáltal a veleszületett immunsejtek olyan módon aktiválódnak, hogy gyulladást, illetve az elpusztuló sejtekből származó antigénekre specifikus T sejtek aktivációját indítják el. A sejthalál és az immunrendszer aktivációjának kapcsolata kedvező és előnytelen következményekkel is járhat. A gyulladási reakció generálásával egyrészt a sérülés helyére jutnak a veleszületett immunrendszer védekező sejtjei és az adaptív immunrendszer számára jelzik azt a lehetséges problémát, amely a sejthalálhoz vezetett. Másrészt az immunválasz beindítása olyan gyulladási mediátorok felszabadításával jár együtt, amelyek szöveti sérüléseket okoznak¹⁵³.

Különösen érdekes terület az immunrendszer effektor sejtjei (CTL, NK sejtek, DS-ek) által generált citotoxikus reakciók, amelyek a sejthalál immunológiai kimenetét is szabályozzák. Az immunválasz és a sejthalál kapcsolatának egy speciális formája a tumorok ellen zajló immunitás. Az immunrendszer citotoxikus reakciói szükségesek lennének az alapvetően apoptózis rezisztens tumorok elpusztításához, a tumor antigének feltárásához. Ugyanakkor a

tumor környezetbe infiltrálódó immunsejtek életképessége és differenciációja is létfontosságú. A daganatokban expresszáldó aktiváló és gátló szignálok közötti egyensúly kritikus az effektor immunsejtek működésének és a tumorelles immunválasz hatékonyságának szabályozása során. A tumor sejtek különböző mechanizmusokkal kerülnek el a gazdaszervezet védekező reakcióját. Egrésztt rezisztenciát mutatnak az apoptózissal szemben, másrészt képesek az infiltrálódó tumor antigén specifikus effektor sejtek „semlegesítésére”. Utóbbi olyan sejthalál ligandumok kifejezésével érik el, mint például a FasL vagy TNF α , amely az immunsejtek apoptózist indítja be, míg a tumor sejteit sértetlenek maradnak. A klinikumban a daganatok védekező mechanizmusait különböző terápiák alkalmazásával igyekeznek kiküszöbölni, mint például a tumor antigén-specifikus CD8⁺ T sejtek adoptív transzfere vagy a természetes immunrendszer antigénpresentáló sejtjeinek aktiválása. Az egyik első klinikai vakcinák, mint például a GVAX, olyan módosított tumor sejteket tartalmaznak, amelyek GM-CSF-et is expresszálnak. Ezeket a tumor sejteket besugárzással előlik és vakcinaként alkalmazzák. Ezáltal az APC-ek toborzását és aktiválását szolgálják, elősegítve az antigének felvételét és T sejteknek való prezentálását^{154,155}.

Az eltérő funkcionális tulajdonságokkal rendelkező, heterogén makrofág alpopulációk szabályozott működése jellemző a humán szervezetben. A makrofágok két polarizációs állapota ismert, a klasszikusan aktivált M1 és alternatív módon aktivált M2 makrofágok csoportja. A két alpopulációra jellemző, hogy különböző faktorokat termelnek, eltérő biológiai funkciókkal és sejtfelszíni markerekkel rendelkeznek²³. Az M1/M2 átmenet célzott szabályozása ígéretes stratégiát jelent a különböző betegségek gyógyításában. A jelenleg folyamatban lévő klinikai vizsgálatok célja az M1 és M2 makrofágok arányának módosítása például daganatos megbetegedések³³, atherosclerosis¹⁵⁶, sclerosis multiplex¹⁵⁷ és endometriózis esetében¹⁵⁸. Az alkalmazott terápiák egyrészt a sejtek differenciálódásának szabályozását, másrészt a már polarizálódott sejtek funkciójának megváltoztatását célozzák meg³³. A különböző makrofág populációk szelektív elpusztítása kézenfekvő terápiás lehetőséget nyújthat az M1-M2 arány módosítására. A sejthalál terápiás indukciójánál azonban figyelembe kell venni, hogy a makrofágok rezisztensek a legtöbb apoptotikus stimulusra, de kifejezetten érzékenyek a szabályozott sejthalál újonnan megismert gyulladási formáival, mint például a nekroptózissal szemben¹⁵⁹.

Közvetlenül a nekroptózis szabályozására még nincs elfogadott kezelés. Azonban több, mint húsz, elsősorban tumorterápiában, autoimmun és neurodegeneratív rendellenességekben¹⁶⁰

használt gyógyszerről leírták, hogy szabályozzák (fokozzák, illetve gátolják) a nekroptózist¹⁶⁰. Az még nem ismert, hogy milyen hatással lehetnek a nekroptózist szabályozó kezelések az M1 és M2 sejtek életképességére, amely meghatározó tényező lehet a jövőbeli terápiák tervezésekor.

A tumorok elleni sejthalál-indukációs terápiáknál figyelembe kell venni azt is, hogy a stimulusok milyen hatást fejtenek ki a szöveti mikrokörnyezetre. A sejthalált kiváltó reagensek hátrányos következményeiről is beszámoltak már - például anti-tumor terápiák alkalmazásakor - akár az immunsejtekre gyakorolt citotoxikus hatás, akár a metasztázis képzés elősegítése miatt¹⁶⁰. Ez alapján további vizsgálatok elvégzése szükséges a nekroptózist indukáló szerek *in vivo* hatásának ellenőrzésére.

Kutatómunkánk során összehasonlítottuk az M1 és M2 sejtek érzékenységét különböző sejthalál stimulusokkal szemben. A kísérletek során humán monocita-eredetű M1 és M2 makrofágokat használtunk, amely alpopulációk hasonló érzékenységet mutattak a vizsgált apoptotikus vagy nekroptotikus indukciók többségére. Az utóbbi kiváltására két, szakirodalomban elfogadott nekroptózist indukáló kezelést alkalmaztunk. Az apoptózisgátló fehérjék antagonistái (SMAC mimetikumok) blokkolják a RIPK1 ubiquitinációt¹⁴⁴, míg a TAK1 gátlók megakadályozzák a RIPK1 foszforilációját⁸². Kaszpáz gátló jelenlétében alkalmazva mindkét szer kiválthatja a nekroptózist makrofágokban is. Abban az esetben, amikor TAK1 inhibitor kezeléssel indukáltunk sejthalált, azt figyeltük meg, hogy az M2 sejtek érzékenyebbek a nekroptózisra, mint az M1 sejtek. A klasszikus nekroptózisnak megfelelően a RIPK3 és a RIPK1 inhibitor adása megakadályozta a kiváltott sejthalált.

Mivel a TAM-ok általában hasonló funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek, mint az M2 makrofágok, felmerült a kérdés, hogy ezekben a sejtpopulációkban hasonló sejthalál útvonalak mennek-e végbe, mint az alternatívan aktivált makrofágok esetében. *In vitro* TAM-szerű sejteket differenciáltattunk THP1-felülűző és M2-polarizáló citokinek (IL-4, IL-10, TGFβ) jelenlétében és vizsgáltuk a sejtek nekroptózisra való érzékenységét. Kimutattuk, hogy a TAM-szerű sejtek, mint az M2 makrofágok, egyaránt érzékenyek a TAK1 gátló jelenlétében indukált nekroptózisra. Az M1 és M2 makrofág alpopulációk a krónikus gyulladás helyén vagy a daganatok mikrokörnyezetében egyszerre fordulnak elő^{161,2}. Ezáltal felmerült a kérdés, hogy az M1 és M2 sejtek együttes tenyésztése módosítja-e sejthalálra való érzékenységüket. Ennek vizsgálatára a TAK1 inhibitorral kezelt M1 és M2 sejteket ko-kultúrában tenyésztettük. Eredményeink szerint TAK1 gátló jelenlétében indukált sejthalálra az M2 sejtek érzékenyebbek

voltak az együtt tenyésztett makrofág populációk kezelése során is. Az inhibitor a két sejtpopuláció egyensúlyát az M1 dominancia irányába tolta el. Ez kizárja annak a lehetőséget is, hogy a sejthalálban mutatott különbséget az M2 által termelt autokrin citotoxikus, vagy az M1 által termelt túlélő faktor okozza. Ez az eredmény a TAK1 gátló tumor terápiában való használatát indokolja - szemben a SMAC mimetikumok alkalmazásával – azáltal, hogy kiváltja mind az M1-M2, mind a TAM-szerű sejtek nekroptózisát. Azonban a nekroptózis indukáló szerek terápia alkalmazásához további vizsgálatok elvégzése szükséges annak ellenőrzésére, hogy milyen hatással van a kiváltott sejthalál a szöveti mikro környezet egyéb sejt típusaira. Feltételezésünk szerint a sejthalállal szemben mutatott nagyobb rezisztencia arra utalhat, hogy az M1 makrofágokban működhet egy speciális túlélő jel, amely felülírja a TAK1 inhibitor által kiváltott nekroptózist.

Eredményeink a nekroptózist kiváltó stimulusok heterogén működésére utalnak. Megállapításaink szerint legalább két, különféle nekroptikus útvonal működik a makrofágokban. Ez a megfigyelés hangsúlyozza annak a fontosságát, hogy a nekroptotikus útvonalak további vizsgálata és specifikusabb megismerése szükséges. A doktori munka során olyan körülményeket azonosítottunk, amikor az M1 vagy M2 makrofágok sejthalálra való hajlamuk eltérő, ezáltal alkalmas a makrofág arányok szabályozására. Eredményeink új megközelítést jelentenek olyan kórképekben, ahol az M1 és M2 makrofágok aránya befolyásolhatja a betegség alakulását, így tumorok, krónikus gyulladásos megbetegedések, illetve krónikus fertőzések kezelésében.

A doktori munka során vizsgáltuk, hogy a humán monocita-eredetű DS-ek (moDS) citotoxikus képessége hogyan változik meg a PRR-stimulusok hatására.

A DS-ek biztosítják az immunrendszer két működési egysége, az öröklött és az adaptív immunrendszer közötti kapcsolatot. A szövetek között folyamatosan vándorló DS-ek a környezetükben elhalt, fertőzött vagy tumoros sejtekből származó antigéneket fagocitálják, majd alternatív módon keresztprezentálhatják. Ezáltal lehetővé teszik az intracelluláris kórokozókra vagy tumoros sejtekből származó antigénekre specifikus CD8⁺ naiv T sejtek aktiválását⁸⁹. Az intracelluláris antigének keresztprezentálása az nélkülözhetetlen a naiv citotoxikus T sejt aktivációhoz, amely folyamat a leghatékonyabban az antigéneket tartalmazó sejtek immunogén sejthalálát követően valósul meg.

A sejthalál immunológiai kimenetele az alábbiak szerint osztályozható: (1) tolerogén, elsősorban apoptózist követően, (2) gyulladást kiváltó (nekrozis vagy nekroptózis) és (3) a

RIPK1-függő immunogén sejthalál kimenetek^{39,11}, amelyek előnyösek lehetnek, azáltal, hogy növeli a keresztprezentáció kialakulásának valószínűségét⁸⁹.

A fagocitózis és az antigén prezentáció mellett a DS-ek újonnan megismert funkciója a citotoxicitás, amelynek immunológiai szerepe még nem teljesen tisztázott^{148,19}. Mivel DS-ek aktivációt követően a fertőzés helyéről rövid időn belül a nyirokcsomókba vándorolnak, így nagy mennyiségű fertőzött vagy tumoros sejt elpusztítására nem képesek. Ezek alapján azt feltételeztük, hogy a DS-ek sejtlő tulajdonsága nem a klasszikus értelemben vett - T és NK sejtekre jellemző - citotoxikus, a patogének eliminálását célzó effektor funkció. Hipotézisünk szerint a DS-ek sejtpusztító képessége arra szolgál, hogy környező sejtek fagocitózisát lehetővé tegye, hozzáférhetővé váljanak az intracelluláris antigének, olyan céllal, hogy azok keresztprezentációs útvonalon keresztül specifikus CD8⁺ T sejteket aktiváljanak. Ezt az elgondolást alátámasztja, hogy a szövetek között járőröző DS-ek citotoxikus és fagocita funkciója intenzívebb, mint az érett DS-eké¹³.

A kísérletek elvégzése során humán moDS-eket használtunk, amelyekről feltételeztük, hogy a sejtpusztító képességüket patogének jelenléte/érzékelése váltja ki. Megfigyeltük, hogy a rövid ideig tartó, PRR ligandumokkal (LPS vagy CL075) kondicionált DS-ek felülűszója különböző célsejtekben (SVT35 Jurkat, HT-29, HUVECs) sejthalált indukál. Tehát a kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a DS citotoxicitás indukálásához rövid ideig tartó PRR aktiválásra van szükség. Ebből arra következtethetünk, hogy a DS citotoxicitás nem tekinthető konstitutív folyamatnak, fertőzés hiányában a DS-ek ilyen módon nem ellenőrzik a szöveti környezetet. Az LPS-dal hosszú ideig előaktivált DS-ekről összegyűjtött kondicionált felülűszó azonban kevésbé citotoxikus. Az aktiváció után 24 órával, mialatt a DS érése is lezajlik, a differenciálódott sejtek már kevésbé citotoxikusak. In vivo ezek a DS-ek már jellemzően elhagyják a perifériás szöveteket és a másodlagos nyirokszervekbe vándorolnak, mint antigén prezentáló sejtek, így a fertőzések detektálása már nem feladatuk.

Feltételeztük, hogy a szöveti környezet is szabályozza a DS-ek citotoxikus tulajdonságát. A DS-ek keresztprezentáló képessége különösen az intracelluláris kórokozókól és a tumorokból származó antigénekre specifikus adaptív immunválasz beindításához nélkülözhetetlen. Ekkor a legkritikusabb a szöveti környezet citotoxicitást módosító szerepe. A DS-eket szabályozhatja a tumorok többségére jellemző⁸⁹ immunszuppresszív hatás, illetve a fertőzött sejtek által termelt I. típusú interferonok érzékelése. Összehasonlítottuk a tolerogén stimulus, dexamethasone¹⁶² vagy

az I. típusú interferon jelenlétében differenciálódott DS-ek citotoxikus képességét. A dexamethasone-t is tartalmazó tápfolyadékban fejlődött DS-ek kisebb mértékű sejthalált váltottak ki PRR stimulust követően, mint a tolerogén stimulus hiányában tenyésztett DS-ek. Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a tolerogén mikrokörnyezet csökkentheti a DS sejtpusztító képességét. Meglepő módon az immunmoduláló hatással rendelkező, I. típusú interferon jelenléte bár némileg fokozta, szignifikánsan nem változtatta meg a DS felülúszó-indukált citotoxicitást az IFN- α hiányában tenyésztett DS-ekhez viszonyítva.

A RIPK1 által közvetített sejthalál folyamatról ismert, hogy a hatékony keresztprezentáció egyik előfeltétele¹¹. Elméletünk alátámasztásához, miszerint a DS-ek sejtölő képessége antigének feltárására szolgál a keresztprezentálás céljából, megvizsgáltuk a DS felülúszó által kiváltott sejthalál RIPK1 függését. Összehasonlítottuk a DS felülúszók hatását a vad típusú, SVT35 és a RIPK1 deficiens Jurkat célsejteken. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a DS citotoxicitás legalább részben RIPK1-függő folyamat, mivel a RIPK1 $+/+$ célsejteken nagyobb mértékű sejthalált váltott ki a felülúszók adása, mint a RIPK1 $-/-$ sejtvonalon. Ezen kívül a célsejteken a RIPK1 fokozott foszforilációja és a RIPK1-kaspáz-8 kölcsönhatás növekedése szintén arra utal, hogy a RIPK1-függő jelátviteli utak is részt vesznek a DS felülúszó által kiváltott sejthalálban. Ez a megfigyelés megerősíti a hipotézisünket, a DS-ek immunogén/RIPK1-függő sejthalált indukálnak, hogy ezzel elősegítsék a környező sejtekből származó intracelluláris antigén fragmensekhez való hozzáférést.

A DS-ek sejtölő képességét a szakirodalomban többnyire szolubilis ligandumokhoz kapcsolják⁶. Kísérleti rendszerünkben vizsgáltuk a DS által kiváltott sejthalál jelátviteli folyamatait. Megfigyeltük, hogy a TNF:Fc gátolta a DS citotoxikus aktivitását, ellentétben a Fas és a TRAIL antagonistákkal. Ez alapján elmondható, hogy a DS-ek citotoxikus képességét a TNF α szekréció közvetíti, melyben a FasL vagy a TRAIL sejthalál ligandumoknak nincs kimutatható szerepe. A TNF receptor jelátvitel a sejthalált kiváltó komplex összetételétől függően RIPK1-függő apoptózist vagy RIPK1-függő nekroptózist is előidézhethet. Az apoptotikus és nekroptotikus folyamatokra specifikus inhibitorokat alkalmazva vizsgáltuk, hogy a DS felülúszó milyen típusú sejthalált vált ki a célsejteken. Megállapítottuk, hogy a felülúszók által indukált sejthalál apoptózis, mivel kaspáz inhibitorral gátolható volt. Ezzel szemben a necrostatin-1 nekroptózis gátlószer adása nem módosította a felülúszó toxikus hatását.

Kutatómunkánk során kimutattuk, hogy rövid ideig tartó PRR ligandumokkal kondicionált DS-ek felülűszója RIPK1-függő módon indukálja a célsejtek apoptózisát. Ezen eredmények lehetőséget nyújtanak a tumorokkal szemben alkalmazott citotoxikus hatású terápiás mechanizmusok bővítésére.

A dolgozatban két RIPK1-függő sejthalál folyamatot, a gyulladást kiváltó nekroptózist és a RIPK1-függő immunogén sejthalált tanulmányoztuk a természetes immunrendszer két, a perifériás szövetekben elhelyezkedő, sejtípusán. Az immunrendszer aktivációja és a sejthalál között kimutatható kapcsolatokra irányuló vizsgálataink a tumor- ellenes terápiák tervezésekor, illetve a gyulladáshoz kórképek szabályozásában is irányadóak lehetnek.

VIII. Új eredmények

1. Humán monocita-eredetű makrofágokon bemutattunk, hogy az M1 sejtek rezisztensek, azonban az M2 és TAM-szerű sejtek érzékenyek a TAK1 inhibitor által kiváltott nekroptotikus sejthalálra.
2. Kaszpáz gátló jelenlétében a p38MAPK, JNK, ERK és IKK inhibitorok intenzívebb sejthalált indukálnak az M2 makrofágokban, mint az M1 sejtekben, amely sejthalál intenzitásában megfigyelhető különbség a p38MAPK kivétel szignifikánsnak bizonyult.
3. A humán monocita-eredetű makrofág alpopulációk nekroptózis-érzékenysége nem függ az M2-eredetű citotoxikus, sem pedig az M1-eredetű túlélési faktoroktól, hanem a két sejtpopuláció önálló tulajdonságai által szabályozott.
4. A humán monocita-eredetű makrofágokban legalább két különböző nekroptotikus jelátviteli út működik.
5. Rövid ideig tartó PRR stimulációt követően (LPS és CL075) a humán monocita-eredetű éretlen DS-ek felülűszója TNF α -függő apoptózist vált ki a Jurkat sejtvonalon.
6. A humán monocita-eredetű DS-ek felülűszója mind a RIPK1-függő, mind a RIPK1-független apoptózis jelátviteli folyamatait elindítja a Jurkat sejtvonalon.
7. A dexamethasone jelenlétében differenciáltatott tolerogén hatású moDS-ek citotoxikus képessége kisebb mértékű, mint az IFN vagy dexamethasone nélkül tenyésztett sejtek esetében.

IX. Összefoglalás

Napjainkra nyilvánvalóvá vált, hogy az immunrendszer aktivációja és bizonyos sejthalál folyamatok összekapcsolódnak. A veleszületett immunrendszer legfőbb sejt alkotói a makrofágok és a DS-ek, amelyek a kórokozók jelenlétére válaszul pro-inflammtórikus reakciót generálnak a működésük során. Az immunsejtek túlzott aktivációja azonban szövethárosodást okozhat, és olyan kórképekhez vezethet, mint az autoimmun vagy tumoros megbetegedések. Munkánk során tanulmányoztuk a gyulladást kiváltó nekroptózist és az apoptózis RIPK1-függő formáját. Kísérleteinkkel részletesebben megismertük ezen RIPK1-függő sejthalál folyamatok molekuláris mechanizmusát és az immunválaszra kifejtett hatását.

Az M1 és M2 célzott elpusztítása kiemelkedő terápiás előnyt jelenthet kardiovaszkuláris és krónikus gyulladással járó betegségek, fertőzések vagy tumorok esetében. Szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy a makrofágok rezisztensek a legtöbb apoptotikus stimulussal szemben, de érzékenyek a szabályozott sejthalál újonnan megismert gyulladással járó formáival szemben. Munkánk során összehasonlítottuk a humán monocita-eredetű M1 és M2 sejtek érzékenységét különféle sejthalál szignálok hatására. Jelen tanulmányban megfigyeltük, hogy a makrofág sejt típusok eltérő érzékenységet mutatnak a TAK1 inhibitor kezelésre, amely intenzívebb nekroptózist indukált az M2 és TAM-szerű sejtekben. Eredményeink alapján megállapítható, hogy az eltérő nekroptózis-érzékenység nem az M2 által termelt autokrin citotoxikus, vagy az M1 által termelt túlélő faktor hatása. Valószínű magyarázat lehet erre a jelenségre, hogy az eddig ismeretlen jelátviteli mechanizmusok túlélő jelet biztosíthatnak az M1 makrofágokban. Eredményeink azt mutatják, hogy legalább két, eltérő nekroptikus útvonal működik a makrofágokban. Továbbá a makrofág funkciók szabályozására alkalmas körülményeket azonosítottuk, amikor a TAK1-gátló használatával az M1 és M2 sejthalálra való hajlamuk eltérő.

A RIPK1-függő sejthalál folyamatok molekuláris mechanizmusát moDS-ekben tanulmányoztuk. Előzetes tanulmányokból kiderült, hogy a DS-ek citotoxikus képességgel is rendelkeznek, ezáltal képesek a környező sejtek apoptózisát indukálni. Ez a funkció a hivatásos antigén prezentáló számára lehetőséget biztosít a környező sejtek antigénjeinek felszabadítására és a mikrokörnyezetük monitorozására. Munkánk során azt feltételeztünk, hogy a sejt károsító hatást a patogének érzékelése váltja ki. Kísérleti eredményeink szerint a DS-ek rövid ideig tartó, PRR agonistákkal kondicionált felülűszója különböző sejt vonalakban képes sejthalált indukálni. A humán moDS-ek szerte a szervezetben előfordulnak, jelentősen hozzájárulnak az

immunrendszer és a szöveti mikrokörnyezet közötti információk átadásához, ezáltal az immunválaszok finomhangolását látják el mind normál, mind pedig patológias körülmények között. Megfigyeltük, hogy az általunk vizsgált, tolerogén mikrokörnyezet (dexamethasone) csökkentheti a DS sejtpusztító képességét, míg az IFN- α jelenlétében differenciált immunogén DS-ek felülűszója nem befolyásolta a sejthalál mértékét. Munkánk során kimutattuk, hogy a rövid ideig tartó PRR stimulus hatására a DS-ek felülűszója RIPK1-függő módon a célsejtek apoptózisát váltja ki.

Összegzésként elmondható, hogy sikerült olyan mechanizmusokat feltárnunk a makrofág és a DS funkciók szabályozásában, amelyek reményeink szerint a jövőben felhasználhatóak lesznek különböző gyulladásos folyamatok vagy tumoros megbetegedések immunterápiás célpontjaiként is.

X. Summary

Nowadays, it has become apparent that the activation of immune system and certain cell death processes are connected. The major cellular components of the innate immune system are macrophages and dendritic cells (DCs). These cells are able to generate a pro-inflammatory reaction in response to the presence of pathogens. However, excessive activation of immune cells can result in tissue damage and lead to conditions such as autoimmune or tumor diseases. In our work, we studied the inflammatory-inducing necroptosis and the RIPK1-dependent form of apoptosis. Our experiments helped us to have a more detailed view on the molecular mechanism of these RIPK1-dependent cell death processes and their effect on the immune response.

Targeted elimination of M1 and M2 may provide outstanding therapeutic benefits in cardiovascular and chronic inflammatory diseases, infections, or tumors. Based on literature data, macrophages are known to resist to most apoptotic stimuli but sensitive to newly discovered inflammatory forms of regulated cell death. In our work, we compared the sensitivity of human monocyte-derived M1 and M2 cells to different cell death signals. In the present study, we observed that macrophage cell types show different sensitivity to TAK1 inhibitor treatment, which induced more intense necroptosis in M2 and TAM-like cells. Based on our results, it can be concluded that the different necroptosis susceptibility is not the effect of the autocrine cytotoxic produced by M2 or the survival factor produced by M1. A possible explanation for this phenomenon might be that hitherto unknown signaling mechanisms may provide a surviving signal in M1 cells. Our results show that there are at least two different necroptotic pathways in macrophages. Furthermore, conditions suitable for the regulation of macrophage functions have been identified when M1 and M2 have different tendencies to cell death using the TAK1 inhibitor.

We studied the molecular mechanism of RIPK1-dependent cell death processes in moDCs. Preliminary studies have shown that DCs also have cytotoxic function, thus being able to induce apoptosis of surrounding cells. This function provides the professional antigen presenters with the ability to release antigens from surrounding cells and to monitor their microenvironment. In our work, we hypothesized that the cell-damaging effect is induced by the detection of pathogens. The results of our experiments show that short-term, PRR agonist-conditioned supernatants of DCs can induce cell death in different cell lines. Human moDCs occur throughout the body, significantly contributing to the communication between the immune

system and the tissue microenvironment, thereby fine-tuning immune responses under both normal and pathological conditions. We observed that the dexamethasone-induced tolerogenic microenvironment may reduce the cell killing ability of DC, whereas the supernatant of immunogenic DCs differentiated in the presence of IFN- α did not affect the rate of cell death. In our work, we showed that the supernatant of short-term PRR stimulated DCs induces apoptosis of the target cells in a RIPK1-dependent manner.

In summary, we have successfully described new mechanisms in the regulation of macrophage and DC functions those we hope to be useful as immunotherapeutic targets for various inflammatory processes or tumor diseases in the future.

XI. Irodalomjegyzék

- 1 Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* **11**, 723-737, doi:10.1038/nri3073 (2011).
- 2 Shapouri-Moghaddam, A. *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* **233**, 6425-6440, doi:10.1002/jcp.26429 (2018).
- 3 Vucic, D. & Fairbrother, W. J. The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 5995-6000, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0729 (2007).
- 4 Mihaly, S. R., Ninomiya-Tsuji, J. & Morioka, S. TAK1 control of cell death. *Cell Death Differ* **21**, 1667-1676, doi:10.1038/cdd.2014.123 (2014).
- 5 Bousso, P. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nat Rev Immunol* **8**, 675-684, doi:10.1038/nri2379 (2008).
- 6 Vidalain, P. O., Azocar, O., Yagita, H., Roubourdin-Combe, C. & Servet-Delprat, C. Cytotoxic activity of human dendritic cells is differentially regulated by double-stranded RNA and CD40 ligand. *J Immunol* **167**, 3765-3772, doi:10.4049/jimmunol.167.7.3765 (2001).
- 7 Clatworthy, M. R. *et al.* Immune complexes stimulate CCR7-dependent dendritic cell migration to lymph nodes. *Nat Med* **20**, 1458-1463, doi:10.1038/nm.3709 (2014).
- 8 Legitimo, A., Consolini, R., Failli, A., Orsini, G. & Spisni, R. Dendritic cell defects in the colorectal cancer. *Hum Vaccin Immunother* **10**, 3224-3235, doi:10.4161/hv.29857 (2014).
- 9 Tang-Huau, T. L. *et al.* Human in vivo-generated monocyte-derived dendritic cells and macrophages cross-present antigens through a vacuolar pathway. *Nat Commun* **9**, 2570, doi:10.1038/s41467-018-04985-0 (2018).
- 10 Warriar, V. U. *et al.* Engineering anti-cancer nanovaccine based on antigen cross-presentation. *Biosci Rep* **39**, doi:10.1042/BSR20193220 (2019).
- 11 Yatim, N. *et al.* RIPK1 and NF-kappaB signaling in dying cells determines cross-priming of CD8(+) T cells. *Science* **350**, 328-334, doi:10.1126/science.aad0395 (2015).
- 12 Kumar, S., Jeong, Y., Ashraf, M. U. & Bae, Y. S. Dendritic Cell-Mediated Th2 Immunity and Immune Disorders. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20092159 (2019).
- 13 Janjic, B. M. *et al.* Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway. *J Immunol* **168**, 1823-1830, doi:10.4049/jimmunol.168.4.1823 (2002).
- 14 Joo, H. G. *et al.* Human dendritic cells induce tumor-specific apoptosis by soluble factors. *Int J Cancer* **102**, 20-28, doi:10.1002/ijc.10656 (2002).
- 15 Lu, G. *et al.* Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin-alpha(1)beta(2), Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J Immunol* **168**, 1831-1839, doi:10.4049/jimmunol.168.4.1831 (2002).

- 16 Vidalain, P. O., Azocar, O., Rabourdin-Combe, C. & Servet-Delprat, C. Measle virus-infected dendritic cells develop immunosuppressive and cytotoxic activities. *Immunobiology* **204**, 629-638, doi:10.1078/0171-2985-00102 (2001).
- 17 Lakomy, D. *et al.* Cytotoxic dendritic cells generated from cancer patients. *J Immunol* **187**, 2775-2782, doi:10.4049/jimmunol.1004146 (2011).
- 18 Citro, A., Barnaba, V. & Martini, H. From T cell apoptosis to chronic immune activation in inflammatory diseases. *Int Arch Allergy Immunol* **164**, 140-146, doi:10.1159/000363385 (2014).
- 19 Chauvin, C. & Josien, R. Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles. *J Immunol* **181**, 11-16, doi:10.4049/jimmunol.181.1.11 (2008).
- 20 Vanderheyde, N. *et al.* Tumoricidal activity of monocyte-derived dendritic cells: evidence for a caspase-8-dependent, Fas-associated death domain-independent mechanism. *J Immunol* **167**, 3565-3569, doi:10.4049/jimmunol.167.7.3565 (2001).
- 21 Gordon, S. & Martinez, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* **32**, 593-604, doi:10.1016/j.immuni.2010.05.007 (2010).
- 22 Atri, C., Guerfali, F. Z. & Laouini, D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci* **19**, doi:10.3390/ijms19061801 (2018).
- 23 Mills, C. D. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Front Immunol* **6**, 212, doi:10.3389/fimmu.2015.00212 (2015).
- 24 Gordon, S. & Pluddemann, A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol* **15**, 53, doi:10.1186/s12915-017-0392-4 (2017).
- 25 Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958-969, doi:10.1038/nri2448 (2008).
- 26 Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *FI000Prime Rep* **6**, 13, doi:10.12703/P6-13 (2014).
- 27 Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**, 677-686, doi:10.1016/j.it.2004.09.015 (2004).
- 28 Koch, A. E. *et al.* Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258**, 1798-1801, doi:10.1126/science.1281554 (1992).
- 29 Braga, T. T., Agudelo, J. S. & Camara, N. O. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. *Front Immunol* **6**, 602, doi:10.3389/fimmu.2015.00602 (2015).
- 30 Quatromoni, J. G. & Eruslanov, E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res* **4**, 376-389 (2012).

- 31 Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L. & Allavena, P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 399-416, doi:10.1038/nrclinonc.2016.217 (2017).
- 32 Sica, A. *et al.* Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* **18**, 349-355, doi:10.1016/j.semcancer.2008.03.004 (2008).
- 33 DeNardo, D. G. & Ruffell, B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **19**, 369-382, doi:10.1038/s41577-019-0127-6 (2019).
- 34 Liu, W. *et al.* Activation in M1 but not M2 Macrophages Contributes to Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction in Rats: a Critical Role of the Calcium Sensing Receptor/NLRP3 Inflammasome. *Cell Physiol Biochem* **35**, 2483-2500, doi:10.1159/000374048 (2015).
- 35 Yu, T. *et al.* Enhanced Activity of the Macrophage M1/M2 Phenotypes and Phenotypic Switch to M1 in Periodontal Infection. *J Periodontol* **87**, 1092-1102, doi:10.1902/jop.2016.160081 (2016).
- 36 Eapen, M. S. *et al.* Abnormal M1/M2 macrophage phenotype profiles in the small airway wall and lumen in smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Sci Rep* **7**, 13392, doi:10.1038/s41598-017-13888-x (2017).
- 37 Verdeguer, F. & Aouadi, M. Macrophage heterogeneity and energy metabolism. *Exp Cell Res* **360**, 35-40, doi:10.1016/j.yexcr.2017.03.043 (2017).
- 38 Tardito, S. *et al.* Macrophage M1/M2 polarization and rheumatoid arthritis: A systematic review. *Autoimmun Rev* **18**, 102397, doi:10.1016/j.autrev.2019.102397 (2019).
- 39 Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* **25**, 486-541, doi:10.1038/s41418-017-0012-4 (2018).
- 40 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).
- 41 Rawson, P. M. *et al.* Cross-presentation of caspase-cleaved apoptotic self antigens in HIV infection. *Nat Med* **13**, 1431-1439, doi:10.1038/nm1679 (2007).
- 42 Gibert, B. & Mehlen, P. Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands. *Cancer Res* **75**, 5171-5175, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3652 (2015).
- 43 Wajant, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* **296**, 1635-1636, doi:10.1126/science.1071553 (2002).
- 44 Fleten, K. G. *et al.* hvTRA, a novel TRAIL receptor agonist, induces apoptosis and sustained growth retardation in melanoma. *Cell Death Discov* **2**, 16081, doi:10.1038/cddiscovery.2016.81 (2016).

- 45 Zhao, X. *et al.* Poly I:C-induced tumor cell apoptosis mediated by pattern-recognition receptors. *Cancer Biother Radiopharm* **27**, 530-534, doi:10.1089/cbr.2012.1226 (2012).
- 46 Fulda, S. & Debatin, K. M. Death receptor signaling in cancer therapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **3**, 253-262, doi:10.2174/1568011033482404 (2003).
- 47 Chan, F. K. Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine* **37**, 101-107, doi:10.1016/j.cyto.2007.03.005 (2007).
- 48 Guicciardi, M. E. & Gores, G. J. Life and death by death receptors. *FASEB J* **23**, 1625-1637, doi:10.1096/fj.08-111005 (2009).
- 49 Boatright, K. M. & Salvesen, G. S. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 725-731, doi:10.1016/j.ceb.2003.10.009 (2003).
- 50 Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* **256**, 12-18, doi:10.1006/excr.2000.4834 (2000).
- 51 Dubrez, L., Berthelet, J. & Glorian, V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. *OncoTargets and therapy* **9**, 1285-1304, doi:10.2147/OTT.S33375 (2013).
- 52 Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. & D'Orazi, G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* **8**, 603-619, doi:10.18632/aging.100934 (2016).
- 53 Chai, J. *et al.* Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**, 855-862, doi:10.1038/35022514 (2000).
- 54 Wang, L., Du, F. & Wang, X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* **133**, 693-703, doi:10.1016/j.cell.2008.03.036 (2008).
- 55 Vanden Berghe, T., Kaiser, W. J., Bertrand, M. J. & Vandenabeele, P. Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling. *Mol Cell Oncol* **2**, e975093, doi:10.4161/23723556.2014.975093 (2015).
- 56 Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. & Vandenabeele, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 135-147, doi:10.1038/nrm3737 (2014).
- 57 Artal-Sanz, M. & Tavernarakis, N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Lett* **579**, 3287-3296, doi:10.1016/j.febslet.2005.03.052 (2005).
- 58 Mack, C., Sickmann, A., Lembo, D. & Brune, W. Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3094-3099, doi:10.1073/pnas.0800168105 (2008).
- 59 Tenev, T. *et al.* The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol Cell* **43**, 432-448, doi:10.1016/j.molcel.2011.06.006 (2011).

- 60 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).
- 61 O'Donnell, M. A. *et al.* Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nat Cell Biol* **13**, 1437-1442, doi:10.1038/ncb2362 (2011).
- 62 Richard, A. & Tulasne, D. Caspase cleavage of viral proteins, another way for viruses to make the best of apoptosis. *Cell Death Dis* **3**, e277, doi:10.1038/cddis.2012.18 (2012).
- 63 Faherty, C. S. & Maurelli, A. T. Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection. *Trends Microbiol* **16**, 173-180, doi:10.1016/j.tim.2008.02.001 (2008).
- 64 Ekert, P. G., Silke, J. & Vaux, D. L. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* **6**, 1081-1086, doi:10.1038/sj.cdd.4400594 (1999).
- 65 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).
- 66 Chen, X. *et al.* Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res* **24**, 105-121, doi:10.1038/cr.2013.171 (2014).
- 67 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).
- 68 Xie, T. *et al.* Structural basis of RIP1 inhibition by necrostatins. *Structure* **21**, 493-499, doi:10.1016/j.str.2013.01.016 (2013).
- 69 Delanghe, T., Dondelinger, Y. & Bertrand, M. J. M. RIPK1 Kinase-Dependent Death: A Symphony of Phosphorylation Events. *Trends Cell Biol* **30**, 189-200, doi:10.1016/j.tcb.2019.12.009 (2020).
- 70 Vandenabeele, P., Declercq, W., Van Herreweghe, F. & Vanden Berghe, T. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal* **3**, re4, doi:10.1126/scisignal.3115re4 (2010).
- 71 Micheau, O. & Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**, 181-190, doi:10.1016/s0092-8674(03)00521-x (2003).
- 72 Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. & Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 700-714, doi:10.1038/nrm2970 (2010).
- 73 Wilson, N. S., Dixit, V. & Ashkenazi, A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol* **10**, 348-355, doi:10.1038/ni.1714 (2009).

- 74 Geng, J. *et al.* Regulation of RIPK1 activation by TAK1-mediated phosphorylation dictates apoptosis and necroptosis. *Nat Commun* **8**, 359, doi:10.1038/s41467-017-00406-w (2017).
- 75 Lafont, E. *et al.* TBK1 and IKKepsilon prevent TNF-induced cell death by RIPK1 phosphorylation. *Nat Cell Biol* **20**, 1389-1399, doi:10.1038/s41556-018-0229-6 (2018).
- 76 Xu, Q. *et al.* The cytoplasmic nuclear receptor RARGamma controls RIP1 initiated cell death when cIAP activity is inhibited. *Nat Commun* **8**, 425, doi:10.1038/s41467-017-00496-6 (2017).
- 77 Qin, X., Ma, D., Tan, Y. X., Wang, H. Y. & Cai, Z. The role of necroptosis in cancer: A double-edged sword? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1871**, 259-266, doi:10.1016/j.bbcan.2019.01.006 (2019).
- 78 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).
- 79 Dubrez-Daloz, L., Dupoux, A. & Cartier, J. IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell cycle* **7**, 1036-1046, doi:10.4161/cc.7.8.5783 (2008).
- 80 Gyrd-Hansen, M. *et al.* IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nature cell biology* **10**, 1309-1317, doi:10.1038/ncb1789 (2008).
- 81 Samuel, T. *et al.* cIAP1 Localizes to the nuclear compartment and modulates the cell cycle. *Cancer research* **65**, 210-218 (2005).
- 82 Sanjo, H. *et al.* Cutting Edge: TAK1 Safeguards Macrophages against Proinflammatory Cell Death. *J Immunol* **203**, 783-788, doi:10.4049/jimmunol.1900202 (2019).
- 83 Herrero-Martin, G. *et al.* TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. *EMBO J* **28**, 677-685, doi:10.1038/emboj.2009.8 (2009).
- 84 Inagaki, M. *et al.* TAK1-binding protein 1, TAB1, mediates osmotic stress-induced TAK1 activation but is dispensable for TAK1-mediated cytokine signaling. *J Biol Chem* **283**, 33080-33086, doi:10.1074/jbc.M807574200 (2008).
- 85 Xie, M. *et al.* A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17378-17383, doi:10.1073/pnas.0604708103 (2006).
- 86 Morioka, S. *et al.* TAK1 kinase switches cell fate from apoptosis to necrosis following TNF stimulation. *J Cell Biol* **204**, 607-623, doi:10.1083/jcb.201305070 (2014).
- 87 Kajino-Sakamoto, R. *et al.* TGF-beta-activated kinase 1 signaling maintains intestinal integrity by preventing accumulation of reactive oxygen species in the intestinal epithelium. *J Immunol* **185**, 4729-4737, doi:10.4049/jimmunol.0903587 (2010).

- 88 Omori, E., Morioka, S., Matsumoto, K. & Ninomiya-Tsuji, J. TAK1 regulates reactive oxygen species and cell death in keratinocytes, which is essential for skin integrity. *J Biol Chem* **283**, 26161-26168, doi:10.1074/jbc.M804513200 (2008).
- 89 Galluzzi, L. *et al.* Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. *J Immunother Cancer* **8**, doi:10.1136/jitc-2019-000337 (2020).
- 90 Torchinsky, M. B., Garaude, J., Martin, A. P. & Blander, J. M. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature* **458**, 78-82, doi:10.1038/nature07781 (2009).
- 91 Campisi, L. *et al.* Apoptosis in response to microbial infection induces autoreactive TH17 cells. *Nat Immunol* **17**, 1084-1092, doi:10.1038/ni.3512 (2016).
- 92 Fend, L. *et al.* Immune Checkpoint Blockade, Immunogenic Chemotherapy or IFN-alpha Blockade Boost the Local and Abscopal Effects of Oncolytic Virotherapy. *Cancer Res* **77**, 4146-4157, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2165 (2017).
- 93 Zhou, H. *et al.* The oncolytic peptide LTX-315 triggers immunogenic cell death. *Cell Death Dis* **7**, e2134, doi:10.1038/cddis.2016.47 (2016).
- 94 Zhou, H. *et al.* The oncolytic compound LTX-401 targets the Golgi apparatus. *Cell Death Differ* **25**, 227-228, doi:10.1038/cdd.2017.148 (2018).
- 95 Casares, N. *et al.* Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* **202**, 1691-1701, doi:10.1084/jem.20050915 (2005).
- 96 Fucikova, J. *et al.* Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res* **71**, 4821-4833, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0950 (2011).
- 97 Obeid, M. *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* **13**, 54-61, doi:10.1038/nm1523 (2007).
- 98 Tesniere, A. *et al.* Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* **29**, 482-491, doi:10.1038/onc.2009.356 (2010).
- 99 Kopecka, J. *et al.* Loss of C/EBP-beta LIP drives cisplatin resistance in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* **120**, 34-45, doi:10.1016/j.lungcan.2018.03.022 (2018).
- 100 Spisek, R. *et al.* Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood* **109**, 4839-4845, doi:10.1182/blood-2006-10-054221 (2007).
- 101 Christiansen, A. J. *et al.* Eradication of solid tumors using histone deacetylase inhibitors combined with immune-stimulating antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4141-4146, doi:10.1073/pnas.1011037108 (2011).

- 102 Fragale, A. *et al.* Antitumor Effects of Epidrug/IFNalpha Combination Driven by Modulated Gene Signatures in Both Colorectal Cancer and Dendritic Cells. *Cancer Immunol Res* **5**, 604-616, doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0080 (2017).
- 103 Riganti, C. *et al.* Bromodomain inhibition exerts its therapeutic potential in malignant pleural mesothelioma by promoting immunogenic cell death and changing the tumor immune-environment. *Oncoimmunology* **7**, e1398874, doi:10.1080/2162402X.2017.1398874 (2018).
- 104 West, A. C. *et al.* An intact immune system is required for the anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res* **73**, 7265-7276, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0890 (2013).
- 105 Sonnemann, J. *et al.* The histone deacetylase inhibitor vorinostat induces calreticulin exposure in childhood brain tumour cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* **66**, 611-616, doi:10.1007/s00280-010-1302-4 (2010).
- 106 Liu, P. *et al.* Author Correction: Crizotinib-induced immunogenic cell death in non-small cell lung cancer. *Nat Commun* **10**, 1883, doi:10.1038/s41467-019-09838-y (2019).
- 107 Pozzi, C. *et al.* The EGFR-specific antibody cetuximab combined with chemotherapy triggers immunogenic cell death. *Nat Med* **22**, 624-631, doi:10.1038/nm.4078 (2016).
- 108 Sagiv-Barfi, I., Kohrt, H. E., Burckhardt, L., Czerwinski, D. K. & Levy, R. Ibrutinib enhances the antitumor immune response induced by intratumoral injection of a TLR9 ligand in mouse lymphoma. *Blood* **125**, 2079-2086, doi:10.1182/blood-2014-08-593137 (2015).
- 109 Yang, M. *et al.* TFAM is a novel mediator of immunogenic cancer cell death. *Oncoimmunology* **7**, e1431086, doi:10.1080/2162402X.2018.1431086 (2018).
- 110 Bugaut, H. *et al.* Bleomycin exerts ambivalent antitumor immune effect by triggering both immunogenic cell death and proliferation of regulatory T cells. *PLoS One* **8**, e65181, doi:10.1371/journal.pone.0065181 (2013).
- 111 Ho, W. S. *et al.* Pharmacologic inhibition of protein phosphatase-2A achieves durable immune-mediated antitumor activity when combined with PD-1 blockade. *Nat Commun* **9**, 2126, doi:10.1038/s41467-018-04425-z (2018).
- 112 Chen, H. M. *et al.* Shikonin induces immunogenic cell death in tumor cells and enhances dendritic cell-based cancer vaccine. *Cancer Immunol Immunother* **61**, 1989-2002, doi:10.1007/s00262-012-1258-9 (2012).
- 113 Garg, A. D. *et al.* Dendritic cell vaccines based on immunogenic cell death elicit danger signals and T cell-driven rejection of high-grade glioma. *Sci Transl Med* **8**, 328ra327, doi:10.1126/scitranslmed.aae0105 (2016).
- 114 Golden, E. B. *et al.* Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death. *Oncoimmunology* **3**, e28518, doi:10.4161/onci.28518 (2014).

- 115 Gameiro, S. R. *et al.* Radiation-induced immunogenic modulation of tumor enhances antigen processing and calreticulin exposure, resulting in enhanced T-cell killing. *Oncotarget* **5**, 403-416, doi:10.18632/oncotarget.1719 (2014).
- 116 Ogawa, M. *et al.* Immunogenic cancer cell death selectively induced by near infrared photoimmunotherapy initiates host tumor immunity. *Oncotarget* **8**, 10425-10436, doi:10.18632/oncotarget.14425 (2017).
- 117 Fucikova, J. *et al.* High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *Int J Cancer* **135**, 1165-1177, doi:10.1002/ijc.28766 (2014).
- 118 Adkins, I. *et al.* Severe, but not mild heat-shock treatment induces immunogenic cell death in cancer cells. *Oncoimmunology* **6**, e1311433, doi:10.1080/2162402X.2017.1311433 (2017).
- 119 Guo, S. *et al.* Nano-pulse stimulation induces potent immune responses, eradicating local breast cancer while reducing distant metastases. *Int J Cancer* **142**, 629-640, doi:10.1002/ijc.31071 (2018).
- 120 Vancsik, T. *et al.* Modulated electro-hyperthermia induced loco-regional and systemic tumor destruction in colorectal cancer allografts. *J Cancer* **9**, 41-53, doi:10.7150/jca.21520 (2018).
- 121 Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-899, doi:10.1016/j.cell.2010.01.025 (2010).
- 122 Aaes, T. L. *et al.* Vaccination with Necroptotic Cancer Cells Induces Efficient Anti-tumor Immunity. *Cell Rep* **15**, 274-287, doi:10.1016/j.celrep.2016.03.037 (2016).
- 123 Brown, M. F. *et al.* Loss of caspase-3 sensitizes colon cancer cells to genotoxic stress via RIP1-dependent necrosis. *Cell Death Dis* **6**, e1729, doi:10.1038/cddis.2015.104 (2015).
- 124 Xu, Y. *et al.* Cisplatin-induced necroptosis in TNFalpha dependent and independent pathways. *Cell Signal* **31**, 112-123, doi:10.1016/j.cellsig.2017.01.004 (2017).
- 125 Huang, C. *et al.* Shikonin kills glioma cells through necroptosis mediated by RIP-1. *PLoS One* **8**, e66326, doi:10.1371/journal.pone.0066326 (2013).
- 126 Lin, J. *et al.* Exogenous hydrogen sulfide protects human umbilical vein endothelial cells against high glucose-induced injury by inhibiting the necroptosis pathway. *Int J Mol Med* **41**, 1477-1486, doi:10.3892/ijmm.2017.3330 (2018).
- 127 Vieira, M. *et al.* Ischemic insults induce necroptotic cell death in hippocampal neurons through the up-regulation of endogenous RIP3. *Neurobiol Dis* **68**, 26-36, doi:10.1016/j.nbd.2014.04.002 (2014).
- 128 Ertao, Z. *et al.* Prognostic value of mixed lineage kinase domain-like protein expression in the survival of patients with gastric cancer. *Tumour Biol* **37**, 13679-13685, doi:10.1007/s13277-016-5229-1 (2016).

- 129 He, L., Peng, K., Liu, Y., Xiong, J. & Zhu, F. F. Low expression of mixed lineage kinase domain-like protein is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. *Onco Targets Ther* **6**, 1539-1543, doi:10.2147/OTT.S52805 (2013).
- 130 Li, X. *et al.* Association of Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein Expression With Prognosis in Patients With Colon Cancer. *Technol Cancer Res Treat* **16**, 428-434, doi:10.1177/1533034616655909 (2017).
- 131 McCabe, K. E. *et al.* Triggering necroptosis in cisplatin and IAP antagonist-resistant ovarian carcinoma. *Cell Death Dis* **5**, e1496, doi:10.1038/cddis.2014.448 (2014).
- 132 Seifert, L. *et al.* The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression. *Nature* **532**, 245-249, doi:10.1038/nature17403 (2016).
- 133 Bozec, D., Iuga, A. C., Roda, G., Dahan, S. & Yeretssian, G. Critical function of the necroptosis adaptor RIPK3 in protecting from intestinal tumorigenesis. *Oncotarget* **7**, 46384-46400, doi:10.18632/oncotarget.10135 (2016).
- 134 Liu, X. *et al.* Key roles of necroptotic factors in promoting tumor growth. *Oncotarget* **7**, 22219-22233, doi:10.18632/oncotarget.7924 (2016).
- 135 Smith, H. G. *et al.* RIPK1-mediated immunogenic cell death promotes anti-tumour immunity against soft-tissue sarcoma. *EMBO Mol Med* **12**, e10979, doi:10.15252/emmm.201910979 (2020).
- 136 Fulda, S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Semin Cancer Biol* **31**, 84-88, doi:10.1016/j.semcancer.2014.05.002 (2015).
- 137 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).
- 138 Zelic, M. *et al.* RIP kinase 1-dependent endothelial necroptosis underlies systemic inflammatory response syndrome. *J Clin Invest* **128**, 2064-2075, doi:10.1172/JCI96147 (2018).
- 139 Bene, K. P. *et al.* Lactobacillus reuteri Surface Mucus Adhesins Upregulate Inflammatory Responses Through Interactions With Innate C-Type Lectin Receptors. *Frontiers in microbiology* **8**, 321, doi:10.3389/fmicb.2017.00321 (2017).
- 140 Proskurina, A. S. *et al.* Features of monocyte-derived dendritic cells encompassing a rare subpopulation of cells that are capable of natural internalization of extracellular dsDNA. *European cytokine network* **30**, 43-58, doi:10.1684/ecn.2019.0427 (2019).
- 141 Sauter, A., Yi, D. H., Li, Y., Roersma, S. & Appel, S. The Culture Dish Surface Influences the Phenotype and Cytokine Production of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Front Immunol* **10**, 2352, doi:10.3389/fimmu.2019.02352 (2019).
- 142 Mia, S., Warnecke, A., Zhang, X. M., Malmstrom, V. & Harris, R. A. An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF-beta yields a dominant immunosuppressive phenotype. *Scand J Immunol* **79**, 305-314, doi:10.1111/sji.12162 (2014).

- 143 Schulz, D., Severin, Y., Zanotelli, V. R. T. & Bodenmiller, B. In-Depth Characterization of Monocyte-Derived Macrophages using a Mass Cytometry-Based Phagocytosis Assay. *Sci Rep* **9**, 1925, doi:10.1038/s41598-018-38127-9 (2019).
- 144 Siegmund, D., Kums, J., Ehrenschwender, M. & Wajant, H. Activation of TNFR2 sensitizes macrophages for TNFR1-mediated necroptosis. *Cell Death Dis* **7**, e2375, doi:10.1038/cddis.2016.285 (2016).
- 145 Benner, B. *et al.* Generation of monocyte-derived tumor-associated macrophages using tumor-conditioned media provides a novel method to study tumor-associated macrophages in vitro. *J Immunother Cancer* **7**, 140, doi:10.1186/s40425-019-0622-0 (2019).
- 146 Lin, Y., Xu, J. & Lan, H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *J Hematol Oncol* **12**, 76, doi:10.1186/s13045-019-0760-3 (2019).
- 147 Sawa-Wejksza, K. & Kandefer-Szerszen, M. Tumor-Associated Macrophages as Target for Antitumor Therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **66**, 97-111, doi:10.1007/s00005-017-0480-8 (2018).
- 148 Chan, C. W. & Housseau, F. The 'kiss of death' by dendritic cells to cancer cells. *Cell Death Differ* **15**, 58-69, doi:10.1038/sj.cdd.4402235 (2008).
- 149 Obexer, P. & Ausserlechner, M. J. X-linked inhibitor of apoptosis protein - a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy. *Front Oncol* **4**, 197, doi:10.3389/fonc.2014.00197 (2014).
- 150 Carbonneil, C., Saidi, H., Donkova-Petrini, V. & Weiss, L. Dendritic cells generated in the presence of interferon-alpha stimulate allogeneic CD4+ T-cell proliferation: modulation by autocrine IL-10, enhanced T-cell apoptosis and T regulatory type 1 cells. *Int Immunol* **16**, 1037-1052, doi:10.1093/intimm/dxh106 (2004).
- 151 Kelly, B. & O'Neill, L. A. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res* **25**, 771-784, doi:10.1038/cr.2015.68 (2015).
- 152 Schaefer, L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem* **289**, 35237-35245, doi:10.1074/jbc.R114.619304 (2014).
- 153 Rock, K. L., Lai, J. J. & Kono, H. Innate and adaptive immune responses to cell death. *Immunol Rev* **243**, 191-205, doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01040.x (2011).
- 154 Gardner, A. & Ruffell, B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol* **37**, 855-865, doi:10.1016/j.it.2016.09.006 (2016).
- 155 Rivoltini, L. *et al.* Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev* **188**, 97-113, doi:10.1034/j.1600-065x.2002.18809.x (2002).

- 156 Zotes, T. M. *et al.* PI3K p110gamma deletion attenuates murine atherosclerosis by reducing macrophage proliferation but not polarization or apoptosis in lesions. *PLoS One* **8**, e72674, doi:10.1371/journal.pone.0072674 (2013).
- 157 Nally, F. K., De Santi, C. & McCoy, C. E. Nanomodulation of Macrophages in Multiple Sclerosis. *Cells* **8**, doi:10.3390/cells8060543 (2019).
- 158 Lagana, A. S. *et al.* Evaluation of M1 and M2 macrophages in ovarian endometriomas from women affected by endometriosis at different stages of the disease. *Gynecol Endocrinol* **36**, 441-444, doi:10.1080/09513590.2019.1683821 (2020).
- 159 Park, J. *et al.* Ascochlorin induces caspase-independent necroptosis in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* **239**, 111898, doi:10.1016/j.jep.2019.111898 (2019).
- 160 Molnar, T. *et al.* Current translational potential and underlying molecular mechanisms of necroptosis. *Cell Death Dis* **10**, 860, doi:10.1038/s41419-019-2094-z (2019).
- 161 Chylikova, J., Dvorackova, J., Tauber, Z. & Kamarad, V. M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **162**, 79-82, doi:10.5507/bp.2018.015 (2018).
- 162 Im, S. A., Gerelchuluun, T. & Lee, C. K. Evidence for Direct Inhibition of MHC-Restricted Antigen Processing by Dexamethasone. *Immune Netw* **14**, 328-332, doi:10.4110/in.2014.14.6.328 (2014).

XII. Kulcsszavak

nekroptózis; makrofág; tumor; gyulladás

dendritikus sejt; citotoxicitás; immunogén sejthalál; RIPK1; immuntolerancia

XIII. Keywords

necroptosis, macrophage, cancer, inflammation

dendritic cells; cytotoxicity; immunogenic cell death; RIPK1; immune tolerance

XIV. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik hozzájárultak a dolgozatom elkészítéséhez.

Elsőként témavezetőmnek, Dr. Koncz Gábornak szeretnék köszönetet mondani segítőkészségéért, gyakorlati és elméleti tanácsaiért. Hálás vagyok a Tőle kapott gondolkodásmódot, a munkámmal szemben való kritikus hozzáállásért.

Köszönöm az Immunológiai Intézet jelenlegi és korábbi igazgatójának, Prof. Dr. Bácsi Attilának és Prof. Dr. Bíró Tamásnak, hogy lehetőséget biztosítottak munkám sikeres elvégzéséhez és dolgozatom megírásához.

Külön köszönet illeti Molnár Tamást, Türk-Mázló Anettet, Korodi Mónikát és Jakob-Rácz Evelint, akik nagyon sokat segítettek a doktori értekezésben bemutatott kísérletek tervezésében és kivitelezésében egyaránt. Köszönöm a PhD éveim alatt nyújtott támogatásukat és a tartalmas beszélgetéseket.

Valamint köszönöm Bíró-Debreceni Zsuzsannának, hogy segítette és támogatta a laboratóriumi munkám szakszerű és pontos elvégzését, Jó tanácsaiból és gyakorlatias meglátásaiból sokat tanulhattam az évek folyamán.

Szeretnék köszönetet mondani az Immunológiai Intézet összes jelenlegi és volt munkatársának, akik az évek során nem csak kollégaként, de barátként is támogattak. Nekik köszönhetően nem csak a munka marad emlékezetes PhD éveimből.

Köszönettel tartozom a családomnak, akik egy percig sem kételkedtek benne, hogy képes leszek elérni a kitűzött célokat. Hálás vagyok a páromnak és barátaimnak is, hogy mindig türelmesen és megértően végig hallgattak.

A doktori munka a következő pénzügyi támogatásokkal valósult meg:

NKFIH-K-125224, GINOP-2.3.2-15-2016-00050, Romanian Ministry of Education, Executive Agency For Higher Education, Research, Development and Innovation Funding, PNCDI II, project no. 119/2014.

XV. Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/11/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Varga Zsófia
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Varga, Z.**, Rácz, E., Türk-Mázló, A., Korodi, M., Szabó, A., Molnár, T., Szőőr, 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)
2. **Varga, Z.**, Molnár, T., Türk-Mázló, A., Kovács, R., Jenei, V., Kerekes, K., Bácsi, A., Koncz, G.: Differences in the sensitivity of classically and alternatively activated macrophages to TAK1 inhibitor-induced necroptosis.
Cancer Immunol. Immunother. 8, 1-15, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-020-02623-7>
IF: 5.442 (2019)





További közlemények

3. 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
4. Bene, K., **Varga, Z.**, Petrov, V. O., Boyko, N. V., Rajnavölgyi, É.: Gut Microbiota Species Can Provoke both Inflammatory and Tolerogenic Immune Responses in Human Dendritic Cells Mediated by Retinoic Acid Receptor Alpha Ligation.
Front. Immunol. 8 (427), 1-17, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.00427>
IF: 5.511

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,293

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,23**

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

Debrecen, 2021.01.11.

