

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciálně chemicko - biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Markéta Rytířová

Programovaná nekróza: její aktivace, regulace a role v buněčné fyziologii

Programmed necrosis: its activation, regulation and role in cellular physiology

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ladislav Anděra, Csc.

Praha, 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 5. 2014

Abstrakt

Buněčná smrt jako konečné stádium existence buňky, může být indukována jak náhodně, tak i jako důsledek aktivace specifických a regulovatelných signálních drah. Regulovaná nebo-li programovaná buněčná smrt může být vyvolána řadou vně- i vnitrobuněčných podnětů, jak fyziologických, tak nefyziologických. Po dlouhou dobu byla za jedinou formu programované buněčné smrti považována na kaspázách závislá apoptóza. Nicméně v průběhu posledních 10 let se ukázalo, že nekrotická buněčná smrt, se kterou byla původně spojována náhodná a neregulovatelná buněčná smrt, může také probíhat regulovaným způsobem se specifickými signálními dráhami a znaky. Mezi signální dráhy spojované s indukcí regulovatelné nekrózy patří zejména vznik a aktivace RIP1/RIP3 kinázy obsahujícího nekrosomu, dále pak cyklofilinem D regulovaná permeabilizace mitochondrií či reakce na oxidační stres. K nejvíce studovaným signálním dráhám spojených s iniciací programované nekrózy patří TNF α indukovaná aktivace na RIP1/RIP3 závislé nekroptózy. Programovaná nekróza hraje důležitou roli v různých fyziologických a patologických procesech, kupříkladu v ischemicko-reperfúzních onemocněních, chorobách očí, kůže, trávicí soustavy, či se také uplatňuje v protinádorové léčbě.

Klíčová slova

Buněčná smrt, apoptóza, nekroptóza, RIP1/RIP3, kaspázy, reaktivní formy kyslíku

Abstract

Cell death as the final stage of cell existence can be either triggered accidentally or it can result from the activation of specific controllable signalling pathways. Regulated or programmed cell death can be induced by number of extrinsic or intrinsic stimuli under both physiological and pathological conditions. For a long time, caspase-dependent apoptosis has been considered as the only form of programmed cell death. However, in the last 10 years it has been shown and proofed that also necrotic cell death, formally considered as random and uncontrollable cell death, may also proceed in controllable manner with specific signalling pathways and features. Among the signalling pathways associated with the programmed necrosis belong activation of RIP1/RIP3 kinase-containing necrosome, then cyclophilin D assisted mitochondrial permeabilization or response to oxidative stress. To the most studied signal transduction pathways associated with the initiation of programmed necrosis belongs TNF-mediated activation of RIP1/RIP3-dependent necroptosis. Programmed necrosis plays an important role in various physiological and pathological processes, for example in ischemic-reperfusion disorders, diseases of the eye, skin, gastrointestinal system, and also can be triggered in cancer therapy.

Key words

Cell death, apoptosis, necroptosis, RIP1/RIP3, caspases, reactive oxygen species

Poděkování

Mé poděkování patří RNDr. Ladislavu Anděrovi, Csc. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval.

Seznam zkratek

A20	dual E3 ligase and hydrolase cleaves off K63-linked polyubiquitin chains; duální E3 ligáza a hydroláza štěpící na lyzin 63 vázané řetězce polyubiquitinu
AIF	apoptosis inducing factor; apoptózu indukující faktor
ALL	acute lymphoblastic leukemia; akutní lymfoblastická leukémie
ANT	adenine nucleotide translocase; adenin nukleotid translokáza
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor-1; apoptickou proteázu-aktivující faktor-1
Atg	autophagy-related proteins; proteiny související s autofagií
ATP	adenosine triphosphate; adenosin trifosfát
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer; s Bcl-2 homogenní antagonist/killer
Bax	Bcl2-Associated X Protein; s Bcl-2 asociovaný protein X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2; B buněčná lymfoma 2
BID	BH3 interacting-domain death agonist; agonist smrti s BH3 interakční doménou
CAD	caspase-activated DNase; kaspázami aktivovaná DNáza
CARD	caspase activation and recruitment domains; doména aktivující a vázající kaspázu
Casp8 ^{ΔIEC}	conditional deletion of caspase-8 in the intestinal epithelium; podmíněná delece kaspázy-8 ve střevním epitelu
cDCs	conventional dendritic cells; dendritické buňky
cFLIP	FADD-like interleukin-1-converting enzyme-like inhibitory protein
cPLA2	cytosolic phospholipase A2; cytosolická fosfolipáza A2
CRDs	cystein-rich domains; domény bohaté na cystein

CrmA	cytokine response modifier A
CsA	cyclosporin A
CYBA	Cytochrome B-245, Alpha Polypeptide
CYLD	cylindromatosis
CypD	cyclophilin D; cyklofilin D
DAMPs	danger-associated molecular pattern molecules; molekuly se znaky spojené s nebezpečím
dATP	2'-Deoxyadenosine-5'-Triphosphate; 2'-deoxyadenozin-5'-trifosfát
DAXX	death-domain associated protein; protein asociovaný s doménou smrti
DFF40	DNA fragmentation factor, 40-kDa; DNA fragmentační faktor
DFF45	DNA fragmentation factor, 45-kDa; DNA fragmentační faktor
DIABLO	direct IAP-binding protein with low pI; protein s nízkým pI přímo interagující s IAP
DISC	death-inducing signaling complex; smrt-indukující signální komplex
Drp1	dynamamin-related protein; proteiny související s dyaminem
DT-GMCSF	diphtheria toxin fused to GMCSF
EndoG	endonuclease G; endonukleáza G
FADD	FAS-associated death domain protein; s Fas asociovaný protein s doménou smrti
FasL	also known CD95L, tumor necrosis factor ligand; TNF ligand
GLUD1	glutamate dehydrogenase 1; glutamát dehydrogenáza 1
GLUL	glutamine ligase; glutamin ligáza
H2AX	H2A histone family, member X; člen X z histonové rodiny H2A

HIPK1	homeodomain interacting protein kinase 1; s homeodoménou interagující protein kináza 1
HMGBs	high mobility group box proteins
Hsc70	chaperone-70; chaperon-70
Hsp	heat shock protein; protein tepelného šoku
IAPs	inhibitors of apoptosis proteins; inhibitor apoptických proteinů
ICAD	inhibitor of caspase-activated DNase; inhibitor kaspázami aktivované DNázy
IKK	IκB kinase complex; komplex kappa B kináza
IMM	inner mitochondrial membrane; vnitřní mitochondriální membrána
IRF	interferon regulatory factor; interferon regulační faktor
JNK	c-Jun N-terminal kinase 1; c-Jun N-terminální kináza 1
LAMP-A	lysosome-associated membrane protein type A; protein asociovaný s lyzozomální membránou
LMP	lysosomal membrane permeabilization; propustnost lyzozomální membrány
MAPK	mitogen activated protein kinase; mitogen-aktivovaná protein kináza
MCL-1	myeloid cell leukemia 1; myeloidní buněčná leukemie 1
MEF	mouse embryonic fibroblast; myší embryonální fibroblasty
MLKL	mixed lineage kinase like protein; protein připomínající MLK kinázy
MMS	methyl-methansulfonát; metyl-metansulfát
MNNG	1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidinu
MPTP	mitochondrial permeability transition pore; propustnost mitochondriálního tranzičního póru
mTOR	mammalian target of rapamycin; savčí cíl rapamycinu

MyD88	myeloid differentiation primary response 88
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide; nikotinamid adenin dinukleotid
NEMO	NF-κB essentials modulator; NF-κB esenciální modulátor
NF-κB	nuclear factor kappa-B; jaderný faktor NF-κB
NHE1	sodium hydrogen exchanger isoform 1; izoforma sodno vodíkového výměníku
NK	natural killer; přirozené zabíječe
NMDA	N-methyl-D-aspartate; N-metyl-D-aspartát
nNOS	nitric oxide synthase; syntáza oxidu dusnatého
NO	nitric oxide; oxid dusnatý
NOD	nucleotide-binding and oligomerization domain; nukleotid vázající a oligomerizační doména
NOX1	NADPH oxidase 1; NADPH oxidáza 1
OMM	outer mitochondrial membrane; vnější mitochondriální membrána
PAR	poly(ADP-ribose); poly (ADP-ribóza)
PARP	poly ADP-ribose polymerase; poly (ADP-ribóza) polymeráza
PJ34	N-(6-Oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-(N,Ndimethylamino)acetamide hydrochloride
PLAD	pre-ligand assembly domain; doména pro předligansovou asociaci
PRRs	pattern recognition receptors; rozpoznávací receptory
PYGL	glycogen phosphorylase; glykogen fosforyláza
RHIM	RIP homotypic interaction motif; RIP homotypický interagující motiv
RIPK	receptor-interacting protein kinase; receptor interagující protein kináza
ROI	reactive oxygen intermediate; reaktivní kyslíkové intermidiáty

ROS	reactive oxygen species; reaktivní formy kyslíku
SMACs	second mitochondria-derived activator of caspases; druhý z mitochondrií odvozený aktivátor kaspáz
TAB 2/3	TAK1-binding protein 2/3; TAK1 vázající protein 2/3
tAIF	truncated AIF; štěpená AIF
TAK1	transforming growth factor- β -activated kinase 1; transformujícím růstovým faktorem- β -aktivovaná kináza 1
tBID	truncated BID; štěpený BID
TIR	Toll-interleukin 1 receptor
TIRAP	toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein; adapterový protein obsahující TIR doménu
TLR	Toll-like receptore; Toll připomínající receptor
TNFRs	tumor necrosis factor receptors; receptory pro tumor nekrotický faktor
TNF α	tumor necrosis factor alpha; tumor nekrotický faktor α
TRADD	tumor necrosis factor receptor associated death domain; doména smrti asociující s TNF receptorem
TRAF 2/5	TNF α receptor associated factor 2/5; faktor asociující s receptorem pro TNF α
TRAIL	also known Apo-2L, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; apoptózu indukující ligand spojený s TNF
TRAM	TRIF-related adaptor molecule; TRIFu podobná adapterová molekula
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon β ; TIR doménu obsahující adapter indukující interferon β
Type I IFN	type I interferons; interferony typu I
VDAC	voltage-dependent anion channel; napěťově dependentní aniontový kanál

WD-40	wing domain 40; wing doména 40
wt	wild type; divoký typ
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein; inhibitor apoptického proteinu
zVAD	carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]; carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]
$\Delta\Psi_m$	mitochondrial transmembrane potential; mitochondriální membránový potenciál

Obsah

1	Úvod	12
2	Buněčná smrt	12
3	Apoptóza	13
4	Autofagie	17
5	Regulovaná nekróza/nekroptóza	20
5.1	RIP1/RIP3 zprostředkovaná nekroptóza	20
5.1.1	Signalizace vedoucí k aktivaci nekroptózy.....	20
5.1.2	Regulace nekroptózy	27
5.2	Programovaná/regulovaná nekróza nezávislá na RIP kinázách.....	28
5.2.1	Signalizace vedoucí k aktivaci nekroptózy.....	28
5.2.2	Regulace programované nekrózy	33
6	Nekroptóza a apoptóza	34
7	Patologické stavy a nekroptóza.....	35
8	Závěr.....	38
	Seznam literatury.....	40

1 Úvod

Nekroptóza či programovaná nekróza je vedle kanonické apoptotické signalizace závislé na aktivaci kaspáz či autofagické sebedestrukce buňky, další typ buněčné smrti představující řízenou či regulovanou buněčnou sebevraždu. Má práce bude pojednávat zejména o základních mechanismech této atypické buněčné smrti, jejíž existence a s ní spojené signální dráhy jsou v posledních letech předmětem intenzivního výzkumu. Také se zaměřím na porovnání a vzájemný vztah programované nekrózy s apoptózou.

2 Buněčná smrt

Buněčná smrt představuje terminální stádium existence buňky a může být aktivována jak fyziologickými, tak i nefyziologickými podněty. Smrt buněk je nedílnou součástí ontogeneze organismů, kde hraje esenciální roli např. při formování orgánů. Významnou funkcí buněčné smrti je také udržení buněčné homeostáze v multibuněčných organismech. Naopak deregulace buněčné smrti má za následek poškození orgánů, narušení homeostáze organismu a může vést i k závažným a fatálním onemocněním. Fyziologicky relevantní je tzv. programovaná buněčná smrt, která může být aktivována plejádou vně- a vnitro- buněčných podnětů, ke kterým náleží např. poškození DNA či proteinů, různé formy stresu (oxidativní, chemický či tepelný), virové a bakteriální infekce a také aktivace či inaktivace určitých membránových receptorů.

Pojem a základní morfologické principy buněčné smrti poprvé popsal roku 1842 německý přírodovědec Carl Vogt a v roce 1885 upřesnil německý cytogenetik Walther Flemming. Buněčná smrt byla až do poloviny minulého století pokládána za náhodný či stresem vyvolaný, ale nijak neorganizovaný buněčný proces, který byl teprve v roce 1964 Richardem Lockshinem spojen s určitým typem regulace zejména během embryogeneze a pojmenován „programovaná buněčná smrt“ (Lockshin and Williams 1964). Poté v roce 1972, Kerr, Wyllie a Currie asociovali programovanou či regulovanou buněčnou smrt savčích buněk v organismu s jimi zavedeným termínem apoptóza (Kerr, Wyllie, and Currie 1972). První molekulární principy aktivace a regulace apoptózy v buňkách háďátka *Caenorhabditis elegans* byly popsány Robertem Horvitzem a jeho týmem začátkem 90. let minulého století

(Ellis and Horvitz 1986). Za tyto objevy byla R. Horvitzovi v roce 2002 spoluudělena Nobelova cena. Na základě morfologických kritérií Schweichel a Merker posléze v krysích embryích vystavených toxickým látkám, klasifikovaly tři typy buněčné smrti. Typ I, charakterizovaný kondenzací a následným rozpadem buňky na fragmenty procházející fagocytózou a lyzozomální fragmentací sousedních buněk. Typ II buněčné smrti, vyznačující se primární tvorbou lyzozomů v umírajících buňkách, aktivací, následnou destrukcí a fagocytickým vychytáváním fragmentů pomocí sousedních buněk a typ III buněčné smrti určený rozpadem buněk do opticky nedetekovatelných fragmentů a to vše probíhající bez účasti lyzozomálního systému (Schweichel and Merker 1973). V současné době jsou tyto typy buněčné smrti známy jako apoptóza, autofagie a nekróza.

3 Apoptóza

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt typu 1 je dosud nejlépe charakterizovaný způsob buněčné smrti, reagující kontrolovaně na vnější či vnitřní signály (např. aktivace receptorů TNF, poškození DNA atd.). Apoptotické buňky se liší od ostatních buněk mnoha biochemickými a morfologickými znaky. Patří mezi ně aktivace specifických proteáz-kaspáz, expozice fosfatidyl serinu na extracelulární povrch plazmatické membrány (Brouckaert et al. 2004), narušení mitochondriálního membránového potenciálu, smršťování buněk či vytváření apoptotických tělísek. Doprovodným rysem apoptózy je také degradace cytoskeletu, po které dojde ke změně tvaru cytoplazmatické membrány, či degradace jaderné DNA spojená s kondenzací chromatinu a posléze rozpadem jádra (Susin et al. 2000). Zbytky apoptotických buněk jsou odstraněny fagocytózou a na rozdíl od nekrózy tento proces probíhá bez zánětlivé reakce.

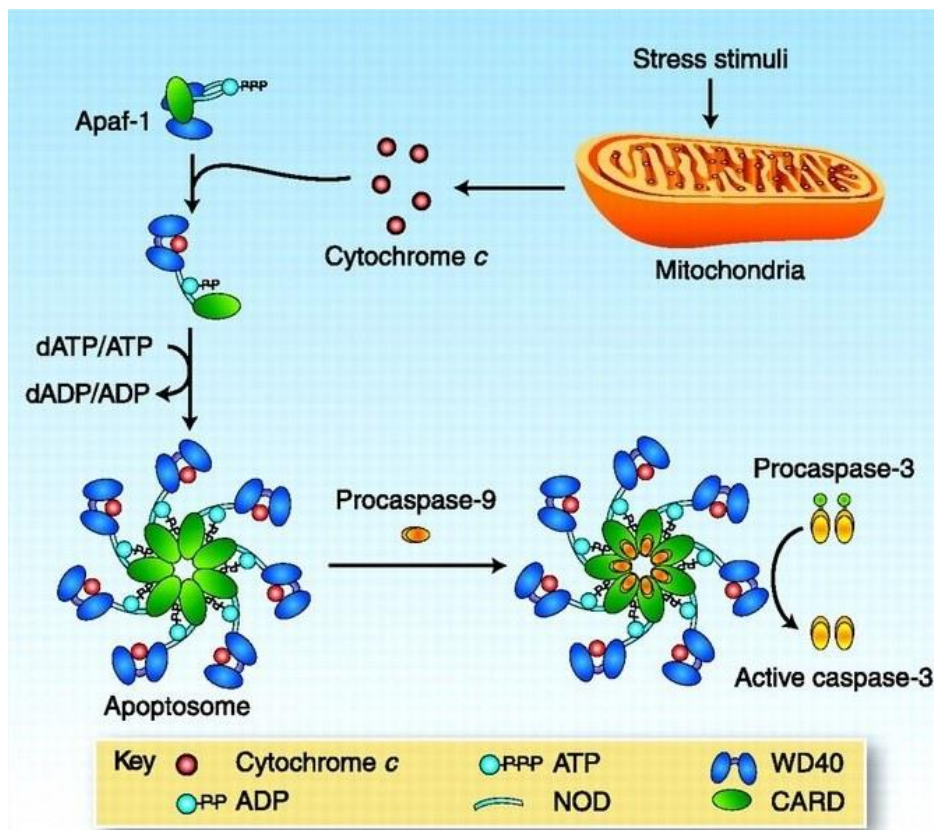
Apoptóza jako fyziologický a vysoce regulovatelný proces buněčné smrti, má esenciální roli jak během embryogeneze, tak i v dospělém organismu. Například je nezbytná pro odstranění nadbytečných neuronů v průběhu vytváření mozku, odstranění meziprstních blan či pro formování očních čoček. Apoptózou umírají také poškozené buňky a to buď její autonomní aktivací (vnitřní cesta), a nebo například za pomoci buněk imunitního systému (vnější cesta) (obr.2) (Tsuda et al. 2012). K významným funkcím apoptózy patří udržení vnitřní homeostáze, která zachovává rovnováhu mezi buněčnou smrtí a buněčným dělením.

Nefunkční či poškozené buňky odstraněné apoptózou jsou nahrazeny novými buňkami. Deregulace apoptózy může vést ale i k mnoha onemocněním. K excesivní apoptické buněčné smrti dochází např. při srdečních či mozkových příhodách/ischemiích (Freude et al. 2000) či neurodegenerativních chorobách a naopak potlačení apoptózy v průběhu karcinogeneze může přispívat k nádorovým onemocněním (Urbanik et al. 2011).

Vnější a vnitřní dráha apoptózy jsou odlišně iniciovány, ale v konečné fázi mají obdobné exekuční mechanismy. Vnější apoptotická dráha je indukována například vazbou ligandů (TNF α , FasL a TRAIL) na odpovídající receptory smrti (TNFR, FasR, atd.) asociované s cytoplazmatickou membránou, což posléze vede k připojení adapterové molekuly FADD a iniciační kaspázy-8 a vzniku komplexu DISC. Na rozdíl od efektorových kaspáz (kaspáza-3, kaspáza-7), které se v buňce vyskytují jako neaktivní dimery a jsou aktivovány štěpením, kaspáza-8, ale i jiné iniciační kaspázy (kaspáza-9) jsou produkovány jako neaktivní monomery. Aby se kaspáza-8 stala aktivní, musí se v rámci DISCu řetězově multimerizovat a v rámci multimerů vzájemným štěpením autoaktivovat a finálně vytvořit aktivní heterotetramer (Dickens et al. 2012).

Vnitřní dráha apoptotické buněčné smrti je aktivována různými stresovými podněty, onkogeny, ultrafialovým a γ -zářením, poškozenou DNA, hypoxií atd. Kritickým momentem této apoptotické dráhy je otevření Bax/Bak kanálů nacházející se na vnější mitochondriální membráně a uvolnění proteinů z mitochondriálního mezimembránového prostoru do cytoplazmy. Bax a Bak ale i ostatní pro-apoptotické proteiny obsahují BH3-doménu, pomocí které interagují s anti-apoptotickými proteiny (např. Bcl-xL, Bcl-2, MCL-1), které otevření Bax/Bak kanálů blokují. Však po stresovém signálu se na anti-apoptotické proteiny naváží pro-apoptotické BH3-only proteiny (např. Bim, Bid, Bad, Noxa, Puma), čímž je inhibují a následně umožňují či některé přímo přispívají (viz níže) k multimerizaci Bax/Bak proteinů a vytváření těchto kanálů (Willis et al. 2007). Nicméně otevření kanálů může být přímo spoluaktivováno interakcí některých BH3-only proteinů např. (Bim či tBid) s proteiny Bax či Bak (Kuwana et al. 2005). Po otevření Bax/Bak kanálů se z mezimembránového prostoru mitochondrií do cytoplazmy uvolní cytochrom-c, který následně interaguje s receptorem Apaf-1 obsahujícím N-terminální CARD doménu. Navázání cytochromu-c na Apaf-1 vyvolá konformační změnu a hydrolýzu dATP/ATP, které jsou na Apaf-1 navázané. V závislosti na výměně dATP/ATP na dADP/ADP heterodimery Apaf-1-cytochrom-c a vytvářejí heptamerický

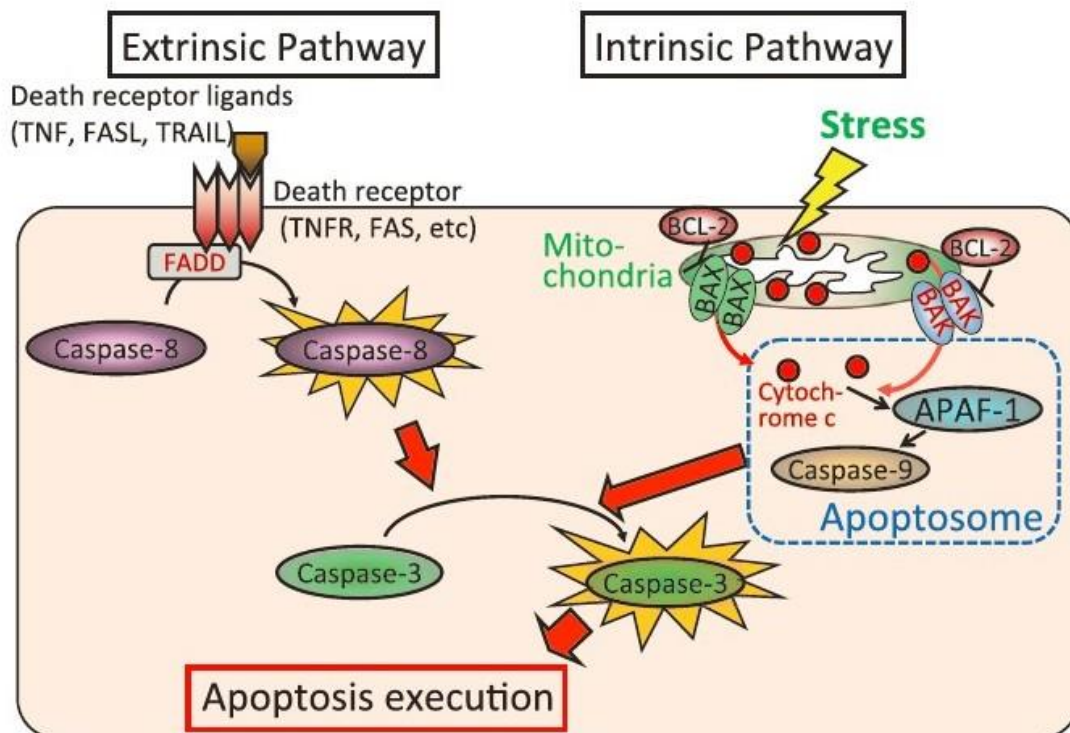
komplex apoptosom (obr.1) (Ledgerwood and Morison 2009) umožňující vazbu a autoaktivaci CARD domény obsahující kaspázy-9 (Kim et al. 2005). Z mitochondrií se ale mohou uvolňovat i jiné molekuly než je cytochrom-c, jako například SMACs či DIABLO, které podporují aktivaci kaspáz vazbou na jejich inhibitory IAPs. Mezi lidské IAPs patří XIAP, cIAP1 a cIAP2. XIAP je přímý inhibitor kaspázy-3 a kaspázy-9 zatímco cIAP1 a cIAP2 regulují receptory zprostředkovanou signální dráhu interakcemi s TNF receptorem asociovanými TRAF (Guicciardi et al. 2011). Další významnými molekulami účastníci se apoptózy jsou AIF a EndoG, které se dostanou z mitochondrií do cytosolu až po uvolnění cytochromu-c a následně translokují do jádra, kde se podílejí na štěpení a kondenzaci jaderné DNA (Arnoult et al. 2003).



Obr. 1 Vznik apoptosomu a jím zprostředkovaná aktivace kaspázy-9. Permeabilizací vnější mitochondriální membrány uvolněný cytochrom-c se váže na cytoplazmatický protein Apaf-1. Následně dochází ke konformační změně a hydrolýze k Apaf-1 vázaného dATP/ATP na dADP/ADP a z heterodimeru Apaf-1-cytochrom-c vznikne apoptosom, jehož centrální kruh tvoří sedm CARD a NOD domén s vyčnívajícími WD-40 repetitivy vážící cytochrom-c. Navázáním prokaspázy-9 na CARD doménu a její následné dimerizaci dochází k její autoaktivaci. Následně aktivovaná kaspáza-9 štěpí a aktivuje kaspázu-3 (Ledgerwood and Morison 2009).

Po vytvoření signalizačního komplexu DISC a apoptosomu u vnější a vnitřní apoptotické dráhy a následné aktivaci iniciačních kaspáz (kaspázy-8, -9 a -10) dochází k sousledné či následné aktivaci efektorových kaspáz (kaspázy-3, -6 a -7). Efektorové kaspázy se v buňce vyskytují jako neaktivní dimery a jsou aktivovány právě štěpením iniciačními kaspázami. Významnou efektorovou kaspázou je kaspáza-3, která v průběhu apoptózy štěpí stovky cytoplazmatických i jaderných proteinů a aktivuje endonukleázu DFF40/CAD. V normálních buňkách je DFF40/CAD v komplexu s jeho inhibitorem DFF45/ICAD, nicméně v apoptotických buňkách aktivní kaspáza-3 DFF45/ICAD štěpí na tři domény, DFF40/CAD se uvolní a po následné dimerizaci štěpí chromozomální DNA až do nukleosomálních fragmentů, což má za důsledek následnou kondenzaci chromatinu (Woo et al. 2004). V posledním stádiu je apoptická buňka fragmentována do apoptotických tělísek.

Odstranění apoptotických buněk je zprostředkováno fagocytózou apoptotických tělísek identifikovatelných exponovaným fosfatidyl serinem a jinými s membránou asociovanými či sekretovanými faktory (Brouckaert et al. 2004). Tento proces včasného a efektivního vychytávání bez úniku buněčných složek proběhne v podstatě bez zánětlivé reakce.



Obr.2 Schématické znázornění dvou hlavních apoptotických signálních drah. Apoptóza může být indukována různými vnějšími a vnitřními podněty. Na vnější dráze se podílí vazba ligandů smrti (TNF, FASL a TRAIL) na receptory smrti (TNFR, FAS, atd.), což vede k připojení nových molekul FADD a kaspázy-8. Kaspáza-8 je poté aktivována, štěpí následně efektorové kaspázy, jako je kaspáza-3, které iniciují apoptózu. Mitochondrie jsou zapojeny do vnitřní dráhy, která může být vyvolána různými stresovými podněty, jako jsou onkogeny, ultrafialové záření, γ -záření, poškození DNA, hypoxie, ztráta faktorů přežití a působení chemoterapie. Stresové signály mohou být dále přenášeny BH3-only proteiny z rodiny Bcl-2, které spolu aktivují pro-apoptické proteiny Bax a Bak. Ty následně vytvářejí kanály ve vnější mitochondriální membráně vedoucí k uvolnění cytochromu-c a dalších proteinů z mezimembránového prostoru mitochondrií do cytoplazmy. Cytochrom-c se váže na Apaf-1 a dojde k vytvoření apoptosomu aktivující kaspázu-9, která následně štěpí kaspázu-3, což vede k apoptóze. Anti-apoptotický Bcl-2 inhibuje Bax a Bak a tím zabraňuje permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (Tsuda et al. 2012).

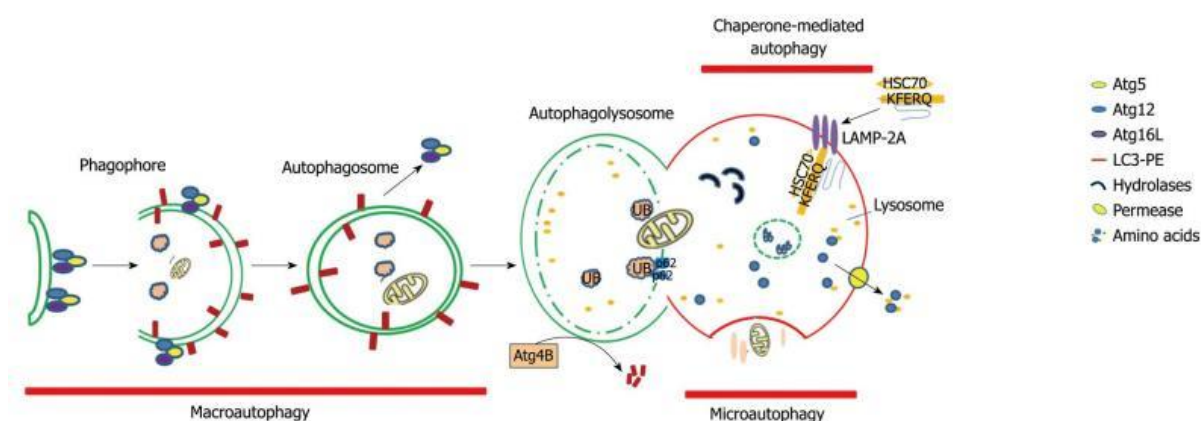
4 Autofagie

Pojem autofagie před více než 40 lety zavedl Christian de Duve na základě pozorování průběhu degradace mitochondrií a dalších intracelulárních struktur v lysozomech krysích jater po přidání pankreatického hormonu glukagonu (Deter and De Duve 1967). V současnosti jsou identifikovány tři hlavní typy autofagie: makroautofagie, mikroautofagie a chaperony zprostředkovaná autofagie z nichž všechny jsou terminovány hydrolytickou

degradací autofagického karga (obr.3) (Ding 2010). Makroautofagie zprvu začíná izolací membrány označované také jako fagofor, která je odvozena z lipidové dvojvrstvy za přispění endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu nebo endosomů (Axe et al. 2008). Prodlužováním membrány fagoforu dochází k tvorbě autofagosomu zprostředkované dvěma ubiquitin-like konjugačními systémy, Atg12 konjugačním systémem (zahrnující Atg12, Atg7, Atg10, Atg5 a Atg16) a Atg8 konjugačním systémem (obsahující Atg8, Atg7, Atg3, a Atg4). V rámci Atg12 konjugačního systému, Atg12 konjuguje s Atg5 a následně tento konjugát interaguje s Atg16 a tvoří oligomer, zatímco v Atg8 konjugačním systému, Atg8 konjuguje s fosfatidylethanolaminem. Následně se tyto ubiquitin-like proteinové konjugáty váží na membránu vznikajícího autofagosomu. Atg8-fosfatidylethanolaminem se váže na obě strany membrány, zatímco Atg12-Atg5-Atg16 je lokalizován pouze na vnějším povrchu membrány a disociuje z membrány až po dokončení autofagosomu. Prostřednictvím autofagosomu se přenáší jeho obsah do lysozomu a to pomocí jeho fúze s lysozomem, kdy se tvoří tzv. autofagolysozom (Sou et al. 2008). Při mikroautofagii jsou naopak cytosolické komponenty přímo přijaty lysozomy prostřednictvím invaginace lysozomální membrány. Během chaperony zprostředkované autofagii dochází k transportu proteinů obsahující KFERQ motiv, který asociuje s chaperonovým proteinem (např. Hsc70), jenž je rozeznán pomocí lysozomálního membránového receptoru LAMP-2A. Pomocí této interakce jsou proteiny přeneseny do lysozomu, kde dochází k jejich degradaci proteázami (Santambrogio and Cuervo 2011). Lysozomy kromě proteáz štěpící proteiny obsahují i jiné hydrolytické enzymy jako lipázy štěpící tuky, či nukleázy, které štěpí DNA.

Autofagie je proces, který je důležitý pro poskytnutí živin pomocí degradace buněčného obsahu během hladovění či pro recyklaci stavebních materiálů. Hraje úlohu při odstraňování špatně složených nebo agregovaných proteinů, poškozených organel jako jsou mitochondrie, endoplazmatické retikulum a peroxisomy, nebo slouží k likvidaci intracelulárních patogenů. Navíc také podporuje prezentaci antigenu na povrchu buněk, chrání proti nestabilitě genomu a zabraňuje nekróze, což je klíčovou rolí v prevenci různých onemocnění, jako je rakovina, neurodegenerace, kardiomyopatie, diabetes, onemocnění jater, autoimunitní onemocnění a infekce. Mimo jiné, její genetická inhibice podporuje buněčný proces stárnutí (Glick, Barth, and Macleod 2010).

Některá experimentální data dokazují, že autofagie není pouze mechanismus důležitý pro přežití buněk, ale naopak může zprostředkovávat programovanou buněčnou smrt typu II, která je závislá na přítomnosti autofagických proteinů a tvorbě autofagosomů. Autofagická buněčná smrt probíhá u Bax/Bak deficientních buněk, které nemohou podstoupit apoptózu. Nicméně tato smrt buněk není indukovaná např. $\text{TNF}\alpha$ jako apoptóza či nedostatkem živin jako autofagie, ale cytotoxickými činidly, jako etoposid, staurosporin či taspigargin. Navíc autofagická buněčná smrt je zřejmě řízena také proteiny Bcl-2 rodiny, Bcl-2 či Bcl-xL, které blokují apoptózu a mimo jiné se také zjistilo, že pro její aktivitu je zásadní aktivace JNK (Shimizu et al. 2010). S autofagickou smrtí se můžeme setkat u některých neurodegenerativních onemocnění např. Parkinsonova choroba (Xiong et al. 2013).



Obr.3 Tři formy autofagie: makroautofagie, mikroautofagie a chaperony zprostředkovaná autofagie. Macroautofagie začíná de novo izolací membrány miskovitého tvaru neboli fagoforu. Prodloužení izolované membrány je podporováno Atg geny, během které dochází k pohlcování cytosolických komponent. Vytvořený dvoumembránový autofagosom se nakonec sloučí s lyzozomem a tvoří autofagolysozom, uvnitř kterého je pohlcený obsah degradován lyzozomálními hydrolázami. Mikroautofagie se vyznačuje pohlcením cytosolických bílkovin, organel, a dokonce i částí jaderného materiálu díky invaginaci lyzozomální membrány. Chaperony zprostředkovaná autofagie je proces přímého transportu skupiny proteinů, které obsahují KFERQ motiv, který asociuje s Hsc70. Tento komplex se pak váže na LAMP-2A na lyzozomální membráně. Všechny formy autofagie následně vedou k degradaci cytosolických komponent lyzozomálními hydrolázami (Ding 2010).

5 Regulovaná nekróza/nekroptóza

Po dlouhou dobu byla apoptóza považována za jedinou formu programované buněčné smrti, zatímco nekróza byla spojována s neregulovatelným a nekontrolovatelným procesem. Nicméně experimentální data a publikované výsledky z posledních deseti let přesvědčivě dokazují, že nekróza může být přirozeně či patologicky aktivovatelná a regulovatelná. Apoptóza a nekróza byly dlouho pokládány za dva odlišné mechanismy buněčné smrti s rozdílnými biochemickými, morfologickými a funkčními charakteristikami. Nicméně tento názor byl vyvrácen po objevu, že různé typy buněk zemřou mechanismem indukovaným stejnou molekulou TNF α , přičemž se projevují znaky charakteristické pro apoptózu nebo nekrozu (Laster, Wood, and Gooding 1988). V roce 1996 experimentální data ukázala další vzájemnou souvislost apoptotické a nekrotické buněčné smrti objevem anti-apoptotických proteinů (Bcl-2, Bcl-xL) inhibujících obě tyto dráhy buněčné smrti (Shimizu et al. 1996). Z těchto objevů vyplývá, že nekróza může sdílet s apoptózou některé signální kroky a roku 2000 tento typ buněčné smrti byl pojmenován aponekróza, nicméně tento název se už dnes nepoužívá (Formigli et al. 2000).

Posun v názoru na existenci fyziologicky relevantní a regulovatelné nekrotické signalizace přinesla v roce 2003 identifikace kinázy RIP1, jakožto kritické komponenty TNF α indukované nekrozy (Chan et al. 2003). Od roku 2005 se začal pro tento proces regulovatelné nekrozy používat pojem nekroptóza a v té době byly také týmem dr. Yuan identifikovány nekrostatiny jako inhibitory nekroptózy (Degterev et al. 2005). Nekrostatin-1 blokáci kinázové aktivity RIP1 efektivně blokuje např. TNF α indukovanou nekroptózu, ale nemá žádný vliv na s aktivací kaspáz spojenou apoptózou. (Degterev et al. 2008).

5.1 RIP1/RIP3 zprostředkovaná nekroptóza

5.1.1 Signalizace vedoucí k aktivaci nekroptózy

Doposud nejvíce prostudovaná forma aktivace nekroptózy je pomocí TNF α , který se váže na jeho receptor TNFR1 (obr.4) (Tsuda et al. 2012). TNF α je homotrimerní protein, který je produkován například aktivovanými makrofágy, jehož každá podjednotka obsahuje 157 aminokyselin (Chen and Goeddel 2002). Dříve byl TNF α pouze spojován s aktivací

prozánětlivé odpovědi či apoptózy, ale experimentální data v publikacích z posledního desetiletí dokazují, že TNF α je i induktorem programované nekrózy.

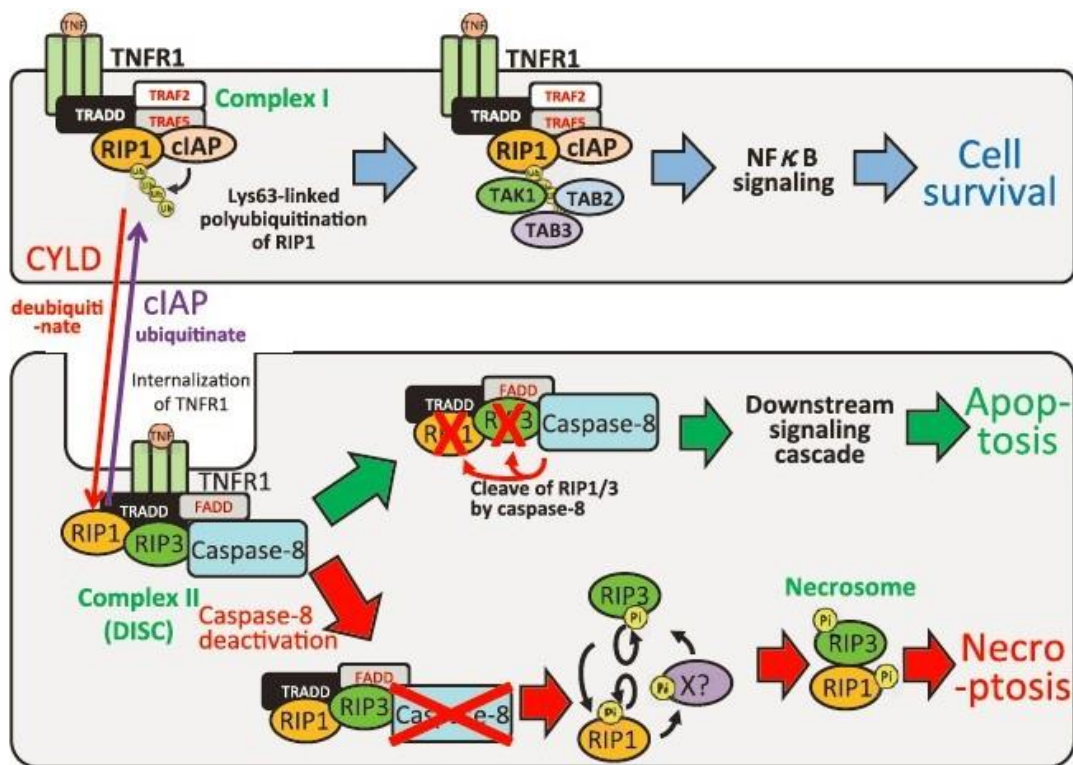
TNF α se váže na extracelulární část TNFR1 a indukuje allosterické změny v intracelulární části receptoru. Extracelulární část TNFR1 obsahuje čtyři na cystein bohaté domény (CRDs) a trimerizační úsek nazvaný PLAD (Andera 2009). Aktivovaný TNFR1 spouští následnou signalizaci vytvořením komplexu I s proteiny, které obsahují doménu smrti, jako je TRADD, RIP1, FADD a několik E3 ubiquitinačních ligáz, jako jsou TRAF2/5 a IAPs (cIAP1/cIAP2), které jsou navázané přes TRAF2/5 (Endres et al. 2003).

RIP1 je členem RIP rodiny obsahující homologní N-terminální kinázovou doménu. Ubiquitinace RIP1 určuje, zda funguje jako molekula pro-přežití nebo jako kináza podporující buněčnou smrt, aktivita RIP1 není důležitá. Z počátku se RIP1 kináza stává členem komplexu I pomocí TNFR1 přes doménu smrti a je polyubiquitinylována pomocí cIAP1, cIAP2 a TRAF2/5 na pozici lysinu 63. Polyubiquitinylovaná RIP1 kináza interaguje s TAK1, který váže TAB2/3 a aktivuje přes NEMO modulátor IKK komplex což je souhrnné označení pro uspořádání IKK α , IKK β , IKK γ . Aktivovaný IKK fosforyluje I κ B proteiny, inhibitory transkripčního faktoru NF- κ B, což vede k jejich proteosomální degradaci a následnému uvolnění transkripčního faktoru NF- κ B a jeho translokaci do buněčného jádra, kde aktivuje genovou expresi (Urbanik et al. 2011), spojenou s přežitím buněk, produkcí růstových faktorů či imunitní zánětlivou odpovědí. NF- κ B má také význam v embryonálním vývoji a ve vývoji a fyziologii tkání (Hou et al. 2008).

Tato dráha může být inhibována deubiquitinací RIP1, který je poté uvolněn do cytoplazmy a dochází k tvorbě komplexu II. Dosud jsou známy dvě ubiquitin hydrolázy (CYLD, A20), které se podílí na této regulaci NF- κ B dráhy. Nádorový supresor CYLD blokuje aktivaci NF- κ B štěpením polyubiquitinylovaných řetězců na RIP1 kináze (Kovalenko et al. 2003). Nádorové buňky nesoucí neaktivní CYLD vykazují zvýšenou proliferační aktivitu a sníženou apoptózu (Urbanik et al. 2011). Deubiquitináza A20 odstraňuje řetězce ubiquitinu z TRAF2 a cIAP1 a inhibuje tím jejich signalační aktivity (Shembade and Harhaj 2010). Aktivace dráhy je též inhibovaná RIP3 kinázou, skrze jím aktivovanou fosforylaci RIP1. RIP1-RIP3 interakce je závislá na jejich intaktních a nemutovaných RHIM doménách (Sun et al. 2002).

Deubiquitinylovaná kináza RIP1 se uvolní z komplexu I do cytoplazmy, kde následně spoluvytváří komplexy II DISC či nekrosom. Komplex IIa-DISC se skládá z TRADD, FADD, RIP1 a kaspázy-8 a slouží jako platforma pro aktivaci kaspázy-8 a následnou aktivaci apoptotické signalizace. Aktivovaná kaspáza-8 vedle jiných cílových proteinů štěpí RIP1 kinázu a tím i blokuje na RIP1 závislé vytváření a aktivaci komplexu IIb-nekrosomu (Wang and Wang 2008). Inhibice či inaktivace kaspázy-8 (např. pomocí CrmA) zablokuje apoptózu a aktivuje signální dráhy vedoucí k nekroptóze (Vercauteren et al. 1998). Potlačení exprese CYLD inhibuje TNF α indukovanou nekroptózu poukazující na deubiquitinaci RIP1 jako důležitý krok v TNF α indukované nekroptóze (Hitomi et al. 2008). Tvorba komplexu II může být také aktivována inhibicí cIAP1/2 (Mahoney et al. 2008).

Multiproteinový komplex zvaný nekrosom obsahuje zejména RIP1 a RIP3 kinázy, které spolu interagují pomocí jejich RHIM domén. Tvorba nekrosomu je významně regulována ubiquitinací a vzájemnou fosforylací RIP1 a RIP3, kdy fosforylace RIP1 pomocí RIP3 je poměrně slabá, odpovídá přibližně autofosforylaci RIP1. Pro tvorbu komplexu a nekrotickou buněčnou smrt je nezbytná kinázová aktivita jak RIP1 tak RIP3 (Li et al. 2012). V buňkách s nadprodukovanou RIP3 kinázou je aktivace nekroptózy zprostředkována ligandem TNF α a překvapivě nezávislá na přítomnosti RIP1 a také proteinů Bax a Bak (Moujalled et al. 2013). Pro aktivaci a průběh nekroptózy je esenciální interakce RIP3 s proteinem MLKL prostřednictvím jeho kináze-podobné domény. MLKL je pomocí RIP3 fosforylována, následně tvoří oligomer, který se váže k fosfolipidům, fosfatidylinositolu a kardiolipinu. MLKL je následně translokován z cytosolu do plazmatické a intracelulárních membrán, kde vytvářením pórů přímo narušuje integritu těchto membrán a podílí se tím na aktivaci nekrotické smrti (Zhao et al. 2012).



Obr. 4 Molekulární signální dráha nekroptózy. Po vazbě ligandu TNF α na TNFR1 dojde k připojení TRADD, RIP1, TRAF2, TRAF5 a cIAP na aktivovaný receptor na buněčném povrchu, dojde k tvorbě komplexu I. V komplexu cIAPs polyubiquitinyluje RIP1, který tvoří komplex s TAK1, TAB2 a TAB3. Dojde k aktivaci NF- κ B, což má za následek indukci transkripce genů a usnadnění přežití buněk. Po vazbě ligandu na TNFR1, komplex je internalizován endocytózou, která vede k přeskupení komplexu I na komplex II (DISC, zahrnující FADD, TRADD, RIP1, RIP3 a kaspázu-8). Deubiquitinace RIP1 je rozhodující pro přechod mezi komplexem I a komplexem II, přičemž se tento stav se mění pomocí cIAP a CYLD (cIAPs polyubiquitinyluje RIP1, který je deubiquitinylován pomocí CYLD). Za normálních okolností je v komplexu II kaspáza-8 aktivována a štěpí RIP1 a RIP3, což vede k apoptóze. Když je kaspáza-8 inhibována, dojde k vzájemné fosforylaci RIP1 a RIP3 a tvorbě tzv. nekrosomu, což vede k nekroptóze (Tsuda et al. 2012).

Další dráha nekroptické buněčné smrti, která je zprostředkována RIP1/RIP3 kinázou je indukována stimulací TLRs, zejména TLR3 a TLR4. TLR3 je aktivován vazbou virové dsRNA nebo syntetizovaným analogem dsRNA poly(I:C), zatímco TLR4 je aktivován vazbou lipopolysacharidu LPS, komponentem buněčné stěny Gram negativních bakterií. Po stimulaci TLR3/TLR4 dochází k interakci s RIP1 prostřednictvím s TLR asociovaného adapterového proteinu TRIF, pomocí homotypické interakce jejich RHIM domén. TRIF se na TLR3/TLR4 váže přes TIR doménu a to přímou interakcí s TLR3 či nepřímou prostřednictvím dalšího adapterového proteinu TRAM. Navíc na TLR4 se prostřednictvím TIRAP váže také MyD88, který rovněž může zprostředkovávat signalizaci jako TRIF. Po vazbě RIP1 na TRIF dochází

k jeho ubiquitinaci a následné aktivaci NF κ -B. Nicméně TLRs ligandy mohou indukovat aktivaci kaspáz, které následně RIP1 štěpí, čímž je aktivovaná apoptóza. Pokud dojde k inhibici či odstranění kaspázy-8, je indukována nekroptóza. V průběhu indukce nekroptózy místo RIP1 může s TRIF interagovat RIP3 a dráha je na RIP1 nezávislá, nicméně je však závislá na MLKL, který se váže na oligomerizované RIP3. Tedy TRIF je schopen interagovat jak s RIP1 tak RIP3, přičemž interakce s RIP1 vede zejména k aktivaci NF- κ B signalizace a s RIP3 pak k aktivaci nekroptózy (Kaiser et al. 2013).

Během nekrozy dochází k velké produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které následně poškozují buněčné struktury a tím podporují buněčnou smrt. Jejich hlavním zdrojem je mitochondriální dýchací řetězec, který se skládá ze čtyř komplexů, kdy komplex I a komplex III jsou hlavními centry této produkce (Q. Chen et al. 2003). Pro tvorbu ROS je důležitý nekrosomální komplex RIP1-RIP3, který podněcuje glykogenolýzu (štěpení glykogenu na glukózu) a glutaminolýzu (konverze glutaminu na laktát). Nekrosomální RIP3 zvyšuje aktivitu glykogen fosforylázy (PYGL), glutamát-amoniak ligázy (GLUL) a glutamát dehydrogenázy 1 (GLUD1), kdy všechny tyto enzymy jsou nezbytné pro produkci ROS. Aktivovaný GLUL katalyzuje v cytosolu tvorbu glutaminu z glutamátu a amoniaku. Po přesunutí glutaminu do mitochondrií, se z něj opět stává amoniak a glutamát, který podléhá deaminaci, což je reakce katalyzovaná aktivním GLUD1. Po této deaminaci z glutamátu vzniká α -ketoglutarát, který je zdrojem Krebsova cyklu. Aktivní PYGL katalyzuje odbourávání glykogenu na glukóza-1-fosfát, který se může změnit na glykolytický substrát glukóza-6-fosfát, z něhož vzniká pyruvát, který vstupuje do mitochondrie, kde je rovněž jako α -ketoglutarát zpracován Krebsovým cyklem. Tedy tento zvýšený katabolismus je zdrojem substrátů Krebsova cyklu, který poté zvyšuje elektronový transport a oxidativní fosforylaci, což má za následek zvýšenou hladinu ATP a produkci ROS (Zhang et al. 2009). Mimo jiné RIP3 také podporuje tvorbu methylglyoxalu, cytotoxické látky, která vzniká ze substrátu glykolýzy, glyceraldehyd-3-fosfátu. Kovalentně se váže na bílkoviny a tvoří pokročilou glykaci konečných produktů AGEs (Van Herreweghe et al. 2002), které také spouští tvorbu ROS (Aronson 2002).

Ke zvýšené produkci ROS také dochází při TNF α indukované nekrotické buněčné smrti a to aktivací NADPH oxidázy NOX1, která je navázána pomocí RIP1 na plazmatické membráně. Aktivace NOX1 závisí na riboflavinové kináze, která propojuje doménu smrti TNFR1 a p22phox (také známý jako CYBA), což je podjednotka NOX1, ale i ostatních NADPH oxidáz (Yazdanpanah et al. 2009).

Klíčovým rysem nekrózy je narušení plazmatické a intracelulárních membrán, což se děje pomocí peroxidace lipidů. Organelami, jejichž membrány jsou během nekroptózy porušeny jsou lysozomy, obsahující plejádu hydrolytických enzymů. Peroxidace lipidů lyzozomálních membrán způsobuje jejich permeabilizaci (LMP) a následné uvolnění hydrolytických enzymů proteáz, nukleáz či lipáz, které se následně podílí na exekuci nekrotické buněčné smrti. Mechanismus a signální dráhy vedoucí k permeabilizaci lyzozomů byly podrobněji analyzovány u TNF α indukované nekroptózy. Při ní dochází k aktivaci cytosolické fosfolipázy A2 (cPLA2), což je esteráza produkující z membránových fosfolipidů kyselinu arachidonovou. Její metabolismus vede k tvorbě ROS a procesu peroxidace lipidů způsobující LMP (Adibhatla, Hatcher and Dempsey 2003). Během nekrózy je také indukován hydrolytický sfingomyelin fosfodiesteráza transformující sfingomyelin na ceramid, z kterého následně může vzniknout sfingosin, který opět způsobuje lipidovou peroxidaci a LMP (Kagedal et al. 2001). Další významné látky jsou i kalpainy, cytoplazmatické cysteinové proteázy, které se aktivují po zvýšení cytosolického vápníku (Bano et al. 2005). Aktivované kalpainy se přemístí na lyzozomální membránu, kde štěpí integrální protein Hsp70 a spoluaktivují tak LMP (Oikawa et al. 2009). Nicméně aktivované kalpainy jsou také schopné štěpit Na⁺/Ca²⁺ výměníky na plazmatické membráně (Bano et al. 2005) a mitochondriích (Kar et al. 2009), což vede k nárůstu koncentrace Ca²⁺ v cytosolu a v mitochondriální matrix.

Nekrotické buňky se svojí morfologií, ale i biochemickými znaky liší od buněk apoptotických (tab. 1) (zdroj vlastní). Jsou zejména charakterizované zvětšením objemu buňky a organel, ztrátou membránové integrity, prasknutím plazmatické membrány a následným vylitím intracelulárního obsahu, se kterým se mohou uvolnit mnohé prozánětlivé faktory tzv. DAMPs. Mezi DAMPs patří proteiny tepelného šoku (např. Hsp70, Hsp90), histonové proteiny, HMGBs a několik dalších faktorů (RNA, DNA), které působí na různé PRRs např. TLRs buněk imunitního systému, čímž aktivují zánětlivou reakci tvorbou a uvolněním prozánětlivých cytokinů (Zhang et al. 2010). Po stimulaci TLRs dochází k vazbě adapterových

molekul prostřednictvím jejich TIR domény např. MyD88, TRIF, TIRAP a TRAM. Přijetí těchto molekul aktivuje různé transkripční faktory, jako například NF- κ B, IRF3/7 a MAP kinázy, které indukují produkci a uvolnění prozánětlivých cytokinů z makrofágů a cDCs a typ I IFN stimuluje aktivitu NK buněk (Kumar, Kawai and Akira 2011).

	Apoptóza	Nekroptóza
MORFOLOGIE		
Buňka	zmenšení objemu	nárůst objemu
Mitochondrie	normální, i když později může dojít k poklesu objemu	výrazné zvětšení objemu
Kondenzace chromatinu	ano, význačný znak	parciální kondenzace
Fragmentace buňky	ano, vznik apoptotických tělísek	prasknutí buňky
Tvorba záhybů na plazmatické membráně	přítomna	není charakterizována
Membránová integrita	in vivo neporušená, často bývá narušena ke konci	narušená v rané fázi
Tkáňový zánět	většinou nedochází k zánětu	výrazně prozánětlivá
FUNKCE		
Buněčná hladina ATP	zachována (v rané fázi)	výrazně potlačena
Produkce ATP	obvykle zachována, ale může být snížena	výrazně snížena
Spotřeba ATP	snížena	pokračuje
Otevření MPTP	může k ní dojít, ale není určujícím znakem	nastává v rané fázi
Ztráta $\Delta\Psi_m$	nastává ve střední fázi	nastává v rané fázi
Uvolnění apoptogenů (uvolnění cytochromu-c)	zejména pomocí permeabilizace OMM prostřednictvím Bax/Bak kanálů	není typické, ale může být přítomné v důsledku prasknutí OMM následované po otevření MPTP
Kaspázová aktivita	kaskáda kaspázové aktivace je velice důležitá	normálně není přítomna, ale může k ní dojít s prasknutím OMM
Aktivita dalších proteáz	není nezbytná, jen sekundární aktivace např. kalpainů	kalpainy, katepsiny a další lysozomální proteázy
Externalizace fosfatidylserinu	přítomna v rané fázi s neporušenou membránovou integritou	přítomna se ztrátou membránové integrity
Extracelulární znaky (například uvolnění HMGB1)	chybí	přítomny

Tab. 1 Rozdílné morfologické a biochemické znaky apoptózy a nekroptózy. (zdroj vlastní)

V konečné fázi jsou nekrotické buňky označeny fosfatidyl serinem a fagocytovány makrofágy stejně jako u apoptózy. Nicméně příjem apoptotických buněk je účinnější jak kvantitativně tak kineticky než fagocytóza buněk nekrotických. Dalším rozdílem je, že apoptotické buňky jsou vychytávány v době, kdy je jejich membrána neporušená. Naopak fagocytóza nekrotických buněk nastává, když buňky ztrácí integritu membrány. Významným rozdílem také je, že apoptotické buňky před tím než jsou fagocytovány, tak se fragmentují do mnoha malých částic, které jsou snadno rozpoznatelné. Naproti tomu nekrotické buňky zvyšují svojí velikost, a do takto zvětšených buněk pronikají makrofágy svými výběžky a fagocytují pouze malé části těchto destruovaných buněk (Brouckaert et al. 2004).

5.1.2 Regulace nekroptózy

Důležitým regulátorem jak TNF α indukované apoptózy i nekroptózy je protein FLIP (Micheau et al. 2001). FLIP je součástí komplexu zvaného ripoptosom (komplex II), který se kromě jiného skládá z RIP1, RIP3, FADD, kaspázy-8 či kaspázy-10. K tvorbě ripoptosomu dochází kromě TNF α indukované signalizace i po stimulaci TLR3 (Feoktistova et al. 2011) či při nedostatku XIAP, cIAP1 a cIAP2, který je zapříčiněn genotoxickým stresem nebo jejich inhibicí pomocí SMACs. Tyto cIAPs za normálních okolností potlačují RIP1 kinázovou aktivitu, která je pro skládání ripoptosomu nezbytná a proto jejich nepřítomnost podporuje tvorbu tohoto komplexu. Když cIAPs chybí, kaspázová aktivita je řízena FLIP, který dále rozhoduje, zda proběhne na RIP3 závislá nekroptóza či na kaspáze závislá apoptóza. Vznik ripoptosomu není ale závislý jen na aktivaci TNFR1 či dalších receptorů smrti, neboť genotoxickým stresem aktivovaná tvorba ripoptosomu probíhá v buňkách bez TNFR1 (Tenev et al. 2011).

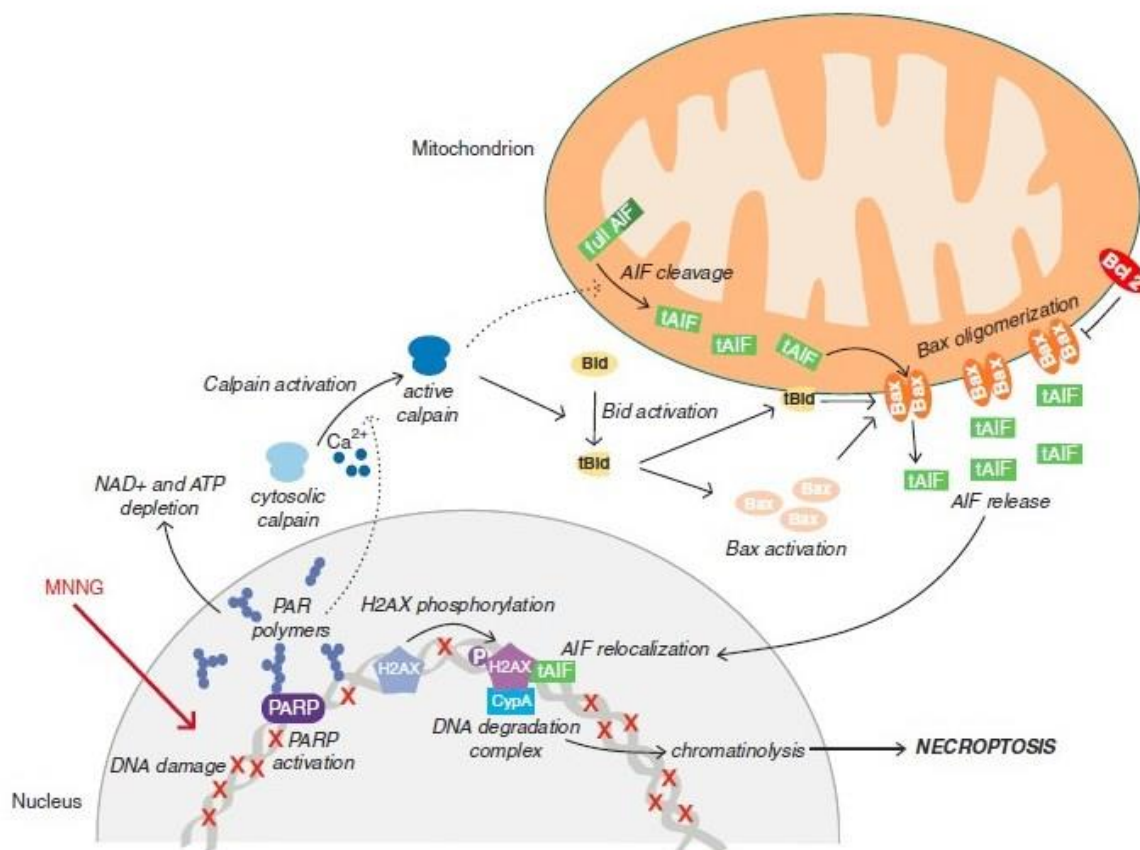
Na regulaci apoptózy a nekroptózy se podílí dvě sestřihové varianty proteinu FLIP a to dlouhá FLIP_L a alternativně sestřižená krátká forma FLIP_S. FLIP_L v nízké koncentraci spoluaktivuje kaspázu-8 a tvoří s ní proteolyticky aktivní heterodimer kaspáza-8-FLIP_L. Tento heterodimer štěpí RIP1, čímž je blokována na RIP1 závislá nekroptóza. Vyšší koncentrace FLIP_L pak může blokovat autoaktivaci kaspázy-8 v DISC_u a inhibovat apoptózu aktivovanou receptory smrti (Olivier Micheau et al. 2002). FLIP_S působí podobně s tou výjimkou, že jeho heterodimer kaspáza-8-FLIP_S neaktivuje kaspázu-8 a tudíž také neinhibuje nekroptózu (Feoktistova et al. 2011). Pokud FLIP není vůbec přítomen, tak aktivace receptorů smrti vede zejména k indukci apoptózy, v případě inhibice kaspáz pak nekroptózy. Naproti tomu virový

inhibitor kaspázy-8 CrmA blokuje jen aktivaci kaspázy-8 v DISCu a tím i receptory smrti indukovanou apoptózu. CrmA ale neblokuje aktivaci kaspázy-8 v jejím intracelulárním komplexu s FLIP_L a tudíž na rozdíl od FLIP_S aktivně nepřispívá k možné indukci nekroptózy (Oberst et al. 2011).

5.2 Programovaná/regulovaná nekróza nezávislá na RIP kinázách

5.2.1 Signalizace vedoucí k aktivaci nekroptózy

Poly (ADP-ribóza) polymeráza-1 (PARP-1) je jaderný enzym aktivovaný DNA zlomy hrající klíčovou roli při opravě poškozené DNA. PARP-1 je aktivován alkylačními činidly jako MNNG nebo MMS (obr.5) (Cabon et al. 2012) a za využití NAD⁺ modifikuje cílové proteiny řetězci poly ADP ribóz (PAR). V důsledku hyperaktivace PARP-1 dochází k rapidnímu vyčerpání intracelulárního NAD⁺ a následně i ATP. Dojde k prudkému nárůstu intracelulární koncentrace Ca²⁺ a aktivaci kalpainů. Ty štěpí Bid na tBid, který se prostřednictvím oligomerizace Bax/Bak podílí na permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (OMM). Kalpains také štěpí mitochondriální AIF na tAIF, které se dostávají Bax/Bak kanály do cytosolu a následně do jádra, kde tvoří aktivní degradační komplex s histonem H2AX a cyklofilinem A, vyvolávající na kaspáze nezávislou rozsáhlou chromatinolýzu a nakonec nekrozu (Cabon et al. 2012). Jak už bylo uvedeno výše, tak AIF se účastní i apoptózy, kde způsobuje kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA. Rozdílem je, že během nekrozy dochází k inhibici tvorby ATP a AIF způsobuje pouze fragmentaci DNA, nikoliv kondenzaci chromatinu jako tomu je u apoptózy (Daugas et al. 2000).



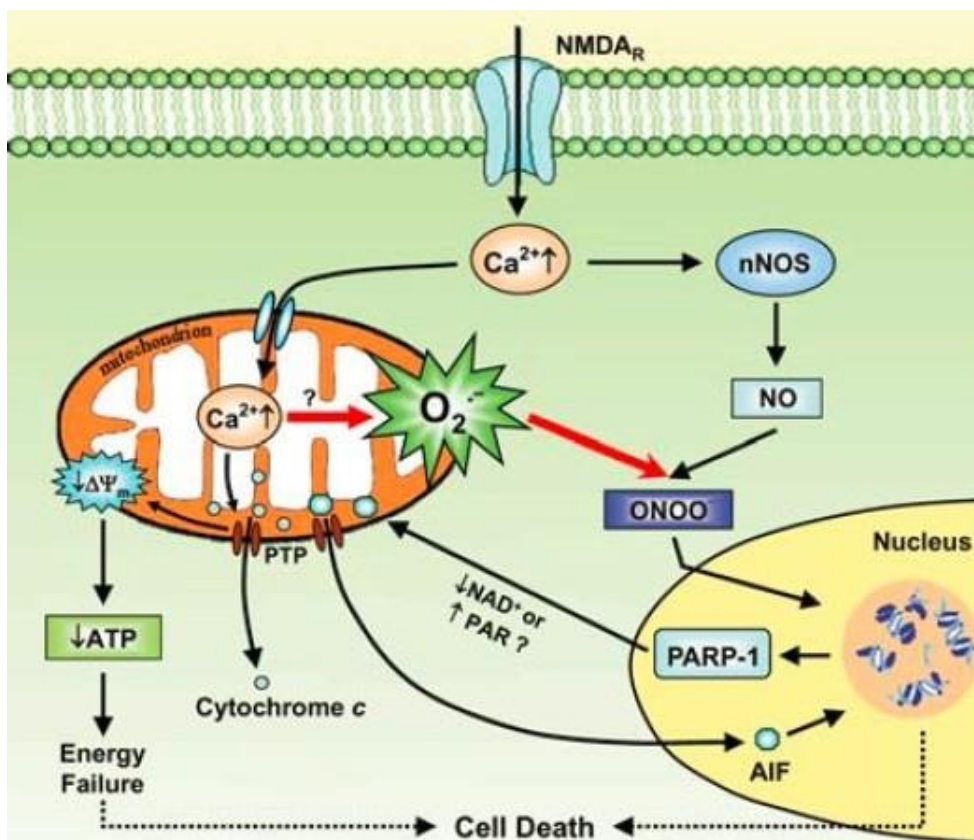
Obr. 5 PARP-1 aktivace pomocí MNNG. MNNG indukované poškození DNA vede přes PARP-1 k depleci NAD⁺ a ATP a také k aktivaci kalpainů. Kalpains štěpí BID na tBID aktivující Bax, který vyvolává mitochondriální permeabilizaci a následné uvolňování tAIF z mitochondrií do cytosolu a jádra. Anti-apoptotický protein Bcl-2 tomuto uvolnění může zabránit. V jádře tAIF asociuje s CypA a H2AX se kterými tvoří DNA degradační komplex, podporující chromatinolýzu a ztrátu životaschopnosti buněk (Caban et al. 2012).

Dříve poly (ADP-ribóza) polymeráza-1 byla považována za nedílnou součást TNF α indukované nekroptózy, nyní ale víme, že PARP-1 dráha a TNF α indukovaná nekroptóza jsou dvě odlišné a nezávislé cesty programované nekrozy. Tento názor potvrzují mnohá experimentální data ukazující například že, inhibice PARP-1 dráhy nechrání proti TNF α indukované nekroptóze či naopak přerušení TNF α indukované nekroptózy nezabrání nekroze zprostředkovanou PARP-1. Konkrétně, i když RIP1 a RIP3 se účastní jak TNF α indukované nekroptózy tak PARP-1 zprostředkované nekrozy, jejich funkce jsou v každé dráze na sobě nezávislé. Například TNF α indukuje nekroptózu v L929Ts a NIH3T3 buňkách exprimující RIP3, ale ne v 293T, MCF-7 a HeLa buňkách, které RIP3 postrádají. Naproti tomu, jak MNNG tak MMS indukují nekrozu ve všech těchto buněčných liniích, z čehož vyplývá, že RIP3 kinázová aktivita není nutná pro jejich funkci v PARP-1 zprostředkované nekroze. Dalším důkazem

nezávislosti obou drah je také účinek nekrostatinů, inhibitorů RIP1, které blokují TNF α indukovanou nekrózu a na nekrózu indukovanou MNNG nemají žádný vliv (Sosna et al. 2014).

PARP-1 může rovněž zprostředkovávat nekroptózu indukovanou oxidačním stresem (obr.6) (Duan, Gross and Sheu 2007), který se významně podílí na neuronální buněčné smrti při ischemii, Alzheimerově chorobě či Parkinsonově chorobě. Dráha je indukována glutamátem, který inhibuje syntézu glutationu, což má za následek snížení jeho hladiny, aktivaci NMDA receptoru a zvýšení transportu Ca²⁺ do buňky. Poté se Ca²⁺ translokuje do mitochondrií, kde dojde ke zvýšení produkce ROS, zejména superoxidů O₂⁻. Aktivace PARP-1 je také závislá na oxidu dusnatém (NO), který je produkován pomocí nNOS aktivované zvýšenou hladinou cytosolického Ca²⁺. NO interaguje s O₂⁻, čímž vzniká ONOO⁻, který se přesune do jádra, kde poškozují DNA, indukuje aktivaci PARP-1 a následnou nekroptózu (Duan, Gross and Sheu 2007).

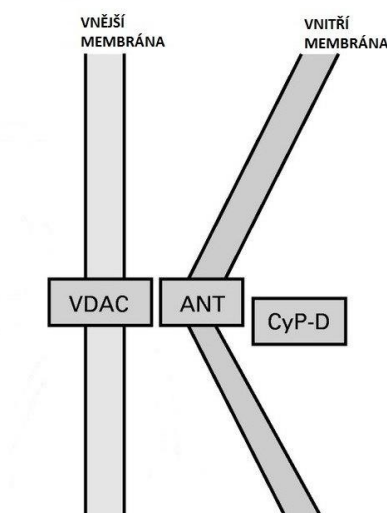
Účast PARP-1 v glutamátem indukované nekroptóze byla potvrzena pomocí PARP-1 inhibitoru PJ34. Ukázalo se, že tento inhibitor v HT-22 buňkách má ochranný účinek před glutamátem indukovanou nekroptózou ještě 8 hodin po expozici glutamátu (X. Xu et al. 2010).



Obr. 6 Iniciale a exekuce PARP-1 zprostředkované nekrózy. Za patologických podmínek masivně aktivované NMDA receptory způsobí silný nárůst cytosolické hladiny Ca^{2+} , které se poté dostanou do mitochondrie. Nadbytek mitochondriálního Ca^{2+} vede ke ztrátě $\Delta\Psi_m$ a tvorbě O_2^- . Zvýšená hladina cytosolického Ca^{2+} také aktivuje nNOS a zvyšuje produkci NO. ONOO^- je tvořen reakcí O_2^- s NO a pak se šíří do jádra kde způsobuje poškození DNA. V reakci na toto poškození DNA se aktivuje PARP-1. Aktivace PARP-1 dále indukuje translokaci AIF z mitochondrie do jádra, což způsobuje fragmentaci DNA. Poškození DNA v kombinaci s nedostatkem energie způsobí mitochondriální dysfunkci a dochází k buněčné smrti (Duan, Gross and Sheu 2007).

V reakci na oxidační stres může také dojít k programované nekróze zprostředkované cyklofilinem D, což je peptidylprolyl cis-trans izomeráza kódovaná jaderným genem ppif (Baines et al. 2005). Cyklofilin D (CypD) je spolu s ANT a VDAC součástí tzv. MPTP nacházejícího se na kontaktních místech mezi vnitřní a vnější mitochondriální membránou (obr.7) (Crompton 1999). Mitochondriální propustnost hraje velice významnou roli jak v apoptotické tak nekrotické buněčné smrti. Klíčovým krokem v apoptóze je permeabilizace vnější mitochondriální membrány. Naopak pro nekrózu je charakteristické otevření MPTP kanálu na vnitřní mitochondriální membráně (IMM). Permeabilizace OMM je indukována oligomerizací Bax a Bak, pro-apoptotických Bcl-2 proteinů a umožňuje uvolnění mitochondriálních apoptogenů do cytoplazmy, jako je cytochrom-c. Tyto apoptogeny aktivují

kaspázy a následnou buněčnou smrt (Schinzel et al. 2005). Když je OMM nepermeabilizovaná, tak apoptogeny nepropouští, umožňuje pouze průchod pro ionty a malé molekuly. Naopak IMM je nepropustná i pro tyto malé molekuly, dokonce i protony, což vede k utvoření elektrického a chemického gradientu mezi matrix a mezimembránovým prostorem. Zejména průchod elektronů v rámci dýchacího řetězce vytváří protonový gradient, který způsobuje, že je matrix negativní a tato změna elektrického potenciálu ($\Delta\Psi_m$) řídí přeměnu ADP na ATP pomocí oxidativní fosforylace. Oxidační stres indukuje uvolňování vápníku z intracelulárních zásob, který je následně přijat do mitochondriální matrix. Tato zvýšená koncentrace vápníku vede k otevření MPTP a následně k narušení gradientů a zvýšené propustnosti membrány podněcující ztrátu $\Delta\Psi_m$ a zastavení syntézy ATP (Schinzel et al. 2005). Na otevření MPTP se také podílí Bax/Bak, a to bez své schopnosti oligomerizace a vytváření kanálů ve vnější mitochondriální membráně. Bax/Bak obnovují mitochondriální fúzi v buňkách bez Bax a Bak, které jinak vykazují fragmentované mitochondrie, kdy právě tato obnova fúze poté potencuje otevření MPTP (Whelan et al. 2012). Přerozdělení rozpustných látek a iontů přes IMM umožňuje vstup velkého množství vody do matrix, což způsobí zvětšení jeho objemu a roztáhnutí IMM. Nicméně OMM zvětšit objem nemůže a tak tedy expanze IMM může vést k prasknutí OMM a následně dojde k uvolnění apoptogenů včetně cytochromu-c do cytoplazmy a nastává apoptóza (Schinzel et al. 2005).



Obr. 7 Struktura MPTP. Základní jednotka MPTP je komplex VDAC-ANT-CypD nacházející se na kontaktních místech mezi vnitřní a vnější mitochondriální membránou (Crompton 1999).

Oxidační stres vede také k akumulaci p53 v mitochondriální matrix, který rovněž pomocí interakce s regulátorem MPTP cyklofilinem D indukuje otevření MPTP a nekrózu. K aktivaci této nekrotické signalizace zprostředkované p53 dochází zejména při ischemických mozkových stavech a indukce nekrózy je zčásti inhibovatelná cyklosporinem A, inhibitorem cyklofilinu D (Vaseva et al. 2012). Interakce p53 s cyklofilinem D může být zprostředkována mitochondriální GTPázou Drp1 (Guo, Sesaki, and Qi 2014).

Některá experimentální data dokazují, že jak CypD zprostředkovaná nekroptóza tak TNF α indukovaná nekróza se účastní ischemicko-reperfuzních (IR) onemocnění. Nicméně není zřejmé, zda se vzájemně doplňují. Pro určení významu obou nekrotických signalizací byly využity myši s geneticky inaktivovanými CypD, RIPK3 či oběma mediátory programované nekrózy. Inaktivace CypD či RIPK3 sice prodloužila přežití myši s IR, ale neposkytla dlouhodobou ochranu a postižené myši nakonec stejně zemřely. Naproti tomu inaktivace obou genů či současná inhibice RIPK1 nekrostatinem-1 a CypD sanglifehrinem vedla k dlouhodobému přežití IR myši (Linkermann et al. 2013). Kombinovaná terapie zaměřená jak na inhibici RIP kináz, tak i MPTP (CypD) může být úspěšná při léčbě například srdečních ischemických onemocnění.

5.2.2 Regulace programované nekrózy

Aktivace a průběh PARP-1 indukované nekrózy může být z části inhibován interakcí Hsp70 s AIF, mitochondriálním flavoproteinem, který se po indukci translokuje přes cytosol do jádra. AIF obsahuje tři různé funkční oblasti. První oblast se vyskytuje mezi aminokyselinami 150 a 268, kam se váže Hsp70. Druhá doména, která se nachází mezi zbytky 367 a 459, obsahuje jadernou lokalizační sekvenci a třetí je C-terminální doména, která je vyžadována pro chromatinovou kondenzační aktivitu. Pokud dojde k delecí domény 150-268, Hsp70 s AIF není schopen interagovat, čímž se AIF může transportovat do jádra, kde se účastní degradace DNA (Gurbuxani et al. 2003). Hsp70 se také může podílet na ochraně buněk před NO a ROI. Nicméně Hsp70 nechrání buňky přímo destrukcí reaktivních radikálů nebo předcházející prevencí buněk, ale spíše se zdá, že upravuje buněčnou odpověď až po toxickém zásahu (Bellmann et al. 1996). Potvrdil to i ve svých studiích Simon, který ukázal, že Hsp70 neinhibuje UV světlem indukované uvolnění O_2^- , ale posléze snižuje O_2 indukovanou produkci IL-6 (Simon et al. 1995).

Další významnou roli ve stresem aktivované nekróze hrají stresové kinázy, zejména pak JNKs. Inhibice JNKs pomocí SP600125 částečně blokovala na aktivaci PARP-1 nekrózu indukovanou pomocí MNNG (Y. Xu et al. 2006).

CypD zprostředkovaná nekrotická buněčná smrt může být inhibována cyklosporinem A (CsA), který interaguje s CypD, inhibuje otevření MPTP a snižuje citlivost na Ca^{2+} . CsA má neuroprotektivní účinky, snižuje rozsah infarktu či brání mitochondriální dysfunkci během ischemického poškození mozku. CsA také brání ischemickému poškození sítnicových gangliových buněk (Kim et al. 2014).

6 Nekroptóza a apoptóza

Ligandem stimulované receptory smrti, zejména TNFR1 mohou po vzniku komplexu II, skládajícího se z FADD, RIP1, RIP3 a kaspázy-8 aktivovat jak apoptózu, tak i nekroptózu. Když je kaspáza-8 inhibována, tak RIP1 a RIP3 jsou fosforylovány, nekrosom je aktivován a v důsledku toho dojde k navození nekroptózy. Naproti tomu aktivní kaspáza-8 štěpením RIPK1 blokuje vznik ripoptosomu a aktivuje apoptózu. Elegantně o vztahu mezi aktivitou kaspázy-8 a regulací nekroptózy vypovídají recentní publikace využívající geneticky modifikovaných myší. Křížením RIPK3 deficientních myší s myšmi haplodeficientními na kaspázu-8 (genetická inaktivace kaspázy-8 je embryonálně letální) dokázali, že je to právě aktivita kaspázy-8, která reguluje nekroptózu v embryogenezi-myši s současně inaktivovanou RIPK3 a kaspázou-8 se rodí živé a přežívají do dospělosti (Kaiser et al. 2011). Naopak recentnější publikace v časopise Science ukazuje, že myši exprimující mutovanou RIPK3 (mutace D161N inaktivující kinázovou aktivitu) hynou v průběhu embryogeneze kvůli zvýšené na kaspáze-8 závislé apoptóze endoteliálních a epiteliálních buněk. V buňkách těchto myší nadměrně vzniká kaspázu-8 aktivující komplex FADD, kaspáza-8, RIPK1 a RIPK3/D161N, který jinak v buňkách obsahujících wt RIPK3 či neobsahujících RIPK3 vůbec nevzniká. Z toho plyne, že obdobně jako kaspáza-8 může štěpením RIPK1 blokovat nekroptózu, tak i enzymaticky aktivní RIPK3 může doposud nevyjasněným mechanismem blokovat apoptózu závislou na aktivaci kaspázy-8 (Newton et al. 2014).

Mezi faktory, které mají vliv na přepínání mezi apoptózou a nekroptózou patří stimuly přírodní povahy, typ buněk a aktivita kaspáz. Například shikonin, který byl dříve považován pouze za induktora apoptózy je schopen indukovat nekroptózu v buňkách MCF-7 a HEK293,

ale apoptózu jen v buňkách HL-60 (Han et al. 2007). Nicméně v HL-60 buňkách je možné kromě apoptózy vyvolat i nekroptózu, ale za pomoci jiného induktoru a to DT-GMCSF (Horita, Frankel and Thorburn 2008). Přesný mechanismus, jaký typ buněk je závislý na jakém stimulu pro aktivaci apoptózy či nekroptózy, je dosud nejasný. Oba typy buněčné smrti navzájem fungují jako záložní mechanismy a pokud je apoptóza inhibována, může být indukována nekróza a naopak (Han et al. 2009). Rozdílné buněčné prostředí a mezibuněčná komunikace mohou vést až k tomu, že v tkáních či orgánech (prsni žlázy, epitel tenkého střeva) může nastat situace, kdy jedna buňka zemře apoptózou a další nekroptózou (Trichonas et al. 2010).

7 Patologické stavy a nekroptóza

Programovaná nekróza doprovází například ischemicko-reperfuzní onemocnění. Během ischemie se spouští řada dějů, které probíhají i po obnovení cirkulace (v reperfuzi) a jež mohou vést k dalšímu poškození dosud životaschopných buněk (ischemicko-reperfuzní poškození). Na IR se kromě nekroptózy podílejí i volné kyslíkové radikály, narušení iontové homeostázy, aktivace proteáz či aktivace zánětlivých mechanismů. Většina těchto procesů není tkáňově specifická a může probíhat v různých orgánech.

Ischemické poškození mozku například při novorozenecké hypoxické ischemii byl první model onemocnění, při kterém role nekroptózy byla zkoumána (Degterev et al. 2005). Po IR poškození dochází k aktivaci RIP1 zprostředkované buněčné smrti iniciované autofosforylací RIP1/3 kináz. Tato dráha je do značné míry závislá na ROS, které jsou produkovány hlavně prostřednictvím mitochondriálního dýchacího řetězce, NADPH oxidázou NOX1 nacházející se v cytoplazmatické membráně nebo prostřednictvím metabolismu sacharidů. (Oerlemans et al. 2012).

Jako prevence nekrotické buněčné smrti slouží inhibitor nekrostatin-1 inhibující na RIP1 závislou nekrózu snížením RIP1/3 fosforylace či omezením zánětlivé odpovědi a tvorby ROS (Oerlemans et al. 2012). Inhibicí RIP1 zprostředkované nekroty dochází k zabránění poškození neuronů (Chavez-Valdez et al. 2012), snížení počáteční ztrátě myocytů, ale také nejspíše vede ke zvýšené odolnosti na oxidační stres a brání dalšímu IR zranění. Snižuje rozsah infarktu či zachovává dlouhodobou srdeční funkci (Oerlemans et al. 2012).

Programovaná nekróza je aktivována i při různých očních chorobách. Jedním ze závažných onemocnění je například odchlípení sítnice spočívající v odloučení senzorické části od pigmentového epitelu, které může vést až k úplné slepotě. Fyzické oddělení fotoreceptorů je vidět v různých sítnicových onemocněních, jako je věkem podmíněná degenerace makuly (oblast uprostřed sítnice), diabetická retinopatie nebo rhematogenní odchlípení sítnice, kde je nekroptóza nejčastěji zprostředkována pomocí RIP kináz. Při experimentálním odchlípení sítnice u potkanů je nekrotická smrt fotoreceptorů z části blokovatelná nekrostatinem (Dong et al. 2012) a může probíhat současně s apoptózou (Trichonas et al. 2010).

Programovaná nekróza se podílí i na očních onemocněních, které mají ischemický charakter, jako je retinální cévní okluze či glaukom. Zjistilo se, že na ischemické buněčné smrti se účastní kromě RIP3, také jeho substrát Daxx, který zprostředkovává RIP3 indukovanou smrt gangliových buněk sítnice. Za normálních okolností se Daxx převážně nachází v jádře, nicméně po určitém stresu je exportován do cytoplazmy, kde zvyšuje aktivitu sodného výměníku NHE1, což vede ke smrti buněk. Na přesunu Daxx z jádra do cytoplazmy se podílí RIP3, který se váže na jeho serine/proline/threonine bohatou doménu, fosforyluje ji na serinu 668, čímž právě spouští jeho jaderný export. Pokud je RIP3 nedostatek, jaderný export Daxx je inhibován a následně do značné míry dojde k potlačení buněčné smrti. Jadernému exportu Daxx se dá také zabránit leptomycinem B, který omezuje navázání exportinu. Fosforylace Daxx může být také způsobena HIPK1, s tím rozdílem, že po stresu je HIPK1 exportován z jádra, zatímco RIP3 je importován do jádra, kde oba fosforylují jejich substrát Daxx, který je poté exportován do cytoplazmy (Lee et al. 2013).

Nekroptóza také může být aktivována při kožních zánětech. Epidermální keratinocyty poskytují základní strukturální a imunologickou bariéru tvořící obranu proti potenciálně patogenním mikroorganismům. Mechanismy regulující integritu bariéry a vrozenou imunitní odpověď v epidermis jsou důležité pro udržení imunitní kožní homeostáze a patogenezí zánětlivých kožních onemocnění. Vývoj zánětu kůže u myši je vyvolána pomocí RIP3 zprostředkované programované nekrózy v FADD deficientních keratinocytech. Tyto myši posléze podléhají těžkým zánětům kůže. Tento mechanismus závisí také na deubiquitinylačním enzymu CYLD. Naopak nekróza keratinocytů je potlačena nedostatkem

RIP3 či nadbytkem FADD. Tato regulace je důležitá pro udržování kožní imunitní homeostázy a prevenci chronického zánětu v kůži (Bonnet et al. 2011).

Na kožní onemocnění má také vliv kaspáza-8 a to zejména na atopickou dermatitidu, zánětlivé kožní onemocnění. Dochází k narušení funkce bariéry kůže a jejímu následnému zvýšení náchylnosti k dehydrataci a infekci. Chronická ztráta epidermální kaspázy-8 způsobuje mnoho aspektů atopické dermatitidy, včetně spongiotického fenotypu, což je morfologický znak, který popisuje oddělení keratinocytů v epidermis štěpením E-cadherinů, které zprostředkovávají keratinocytovou soudržnost. Aby se zabránilo této vadě, stačí potlačit aktivitu matrixové metaloproteinázy-2, která E-cadheriny štěpí (C. Li et al. 2010).

Nekroptóza se může podílet i na onemocnění trávicí soustavy a to zejména střev. Epiteliální buněčná smrt je znakem střevního zánětu a je možným patogenním mechanismem Crohnovy choroby u lidí, což je nevléčitelné onemocnění vyznačující se zánětem tenkého a tlustého střeva. Předpokládá se, že dysfunkce střevního epitelu je následkem nadměrné translokace komenzálních bakterií do střevní stěny. U zdravých jedinců střevní epitel udržuje fyzickou bariéru zřízenou buňkami, které jsou v těsném kontaktu. Navíc, specializované epitelové buňky, jako jsou Panethovy buňky a pohárkové buňky poskytují přirozenou obranyschopnost sekrecí hlenu a antimikrobiálních peptidů. Regulace nekroptózy střevních epitheliálních buněk je velice podobná regulaci nekrózy epidermálních keratinocytů, i zde hrají roli kaspáza-8, FADD a RIP3. U myši s podmíněnou delecí kaspázy-8 ve střevním epitelu (Casp8^{ΔIEC}) dochází ke spontánnímu vyvinutí zánětlivých lézí v terminální části tenkého střeva (ileum) a jsou velmi citlivé na kolitidy (zánět tlustého střeva). Navíc Casp8^{ΔIEC} myši postrádají Panethovy buňky a vykazují snížení počet pohárkových buněk, což způsobuje dysregulovanou antimikrobiální imunitní buněčnou funkci střevního epitelu. Epiteliální buněčná smrt indukovaná pomocí TNFα je taktéž jako u keratinocytů spojena se zvýšenou expresí RIP3, jejichž vysoká hladina u pacientů s Crohnovou chorobou je zejména v Panethových buňkách a v terminálním ileu (Günther et al. 2011). Na epitheliální nekróze a ztrátě Panethových buněk se také podílí nedostatek FADD. Z těchto poznatků vyplývá, že mechanismy, které brání RIP3 zprostředkované epitheliální buněčné smrti jsou rozhodující pro udržování střevní homeostáze, a že programovaná nekróza střevních epitheliálních buněk může být zapojena do patogeneze zánětlivých střevních onemocnění (Welz et al. 2011).

Nekroptóza může být naopak přínosná v protinádorové léčbě. Konkrétním příkladem nám může být akutní lymfoblastická leukémie (ALL) u dětí, kdy glukokortikoidy obsahující chemoterapeutika indukují převážně apoptotickou buněčnou smrt. Avšak ALL buňky se postupem stávají rezistentními na tuto chemoterapii nadprodukcí Mcl-1 z rodiny Bcl-2 a jeho asociací s jedním z induktorů autofagocytózy beclinem-1. Disociace beclinu-1 od Mcl-1 pomocí nízkomolekulárního inhibitoru Bcl-2 proteinů obatoclaxu či aktivace autofagocytózy rapamycinem zprostředkovanou inhibicí mTOR vedla pak namísto apoptózy k chemoterapií indukované nekroptóze, závislé na přítomnosti a aktivitě RIPK1 a tudíž i k možné nekroptóze využívající terapeutické intervenci (Bonapace et al. 2010). Obatoclax aktivuje autofagocytózu a na autofagosomech pak vytváření RIPK1/RIPK3 obsahujícího ripoptosomu (Basit, Cristofanon and Fulda 2013).

8 Závěr

Cílem této bakalářské práce primárně bylo představit programovanou nekrózu či nekroptózu jako další fyziologicky významnou a regulovatelnou signalizaci vedoucí k buněčné smrti. Dalším cílem bylo porovnat vzájemné vztahy a komunikaci nekroptózy s apoptotickou buněčnou smrtí. Nekróza byla zprvu považována za neregulovanou buněčnou smrt, nicméně akumulované a publikované poznatky zejména z posledního desetiletí tento názor vyvrátily a přesvědčivě zařadily regulovanou nekrózu/nekroptózu vedle apoptózy jako další typ fyziologicky indukovatelné a regulovatelné buněčné smrti.

Nekrotická signalizace může být aktivovatelná poškozením DNA či proteinů, TNF α , cyklofilinem D regulovanou permeabilizací mitochondrií či reakcí na oxidační stres a hraje roli při udržení buněčné homeostáze, poškození orgánů či může vést i k závažným a fatálním onemocněním. Programovaná nekróza může apoptotickou signalizaci komplementovat (srdeční ischemie reperfuze a další příklady) či nahrazovat-antivirová či protinádorová odpověď. Biochemicky se programovaná nekróza od apoptózy liší zejména snížením produkce ATP, brzkou ztrátou membránového potenciálu a fyziologicky pak indukcí zánětlivé reakce. Typologicky a způsobem indukce prozatím rozlišujeme několik forem programované nekrózy. Patří mezi ně PARP-1 zprostředkovaná nekróza vyznačující se permeabilizací vnější mitochondriální membrány a uvolněním AIF způsobující rozsáhlou chromatinolýzu DNA či

cyclofilinem D zprostředkovaná nekróza, během které dochází k otevření MPTP, ztrátě membránového potenciálu, zastavení syntézy ATP, transferu vody do mitochondrie a jejímu následnému prasknutí souvisejícím s uvolněním cytochromu-c. Nejlépe popsanou je pak TNF α či jinými signály indukovaná nekroptóza, jejíž indukce a průběh jsou závislé na aktivaci a aktivitě RIP1 a RIP3 kináz a jejich multimerním komplexu, deubiquitinaci RIP1 pomocí cIAPs a inhibici kaspázy-8.

Nekroptóza, ale i jiné formy buněčné smrti, je atraktivním cílem mnoha výzkumů, kde pochopení mechanismu signálních drah a jejich regulace je zásadní pro potencionální léčbu mnoha chorob. Například nekroptóza se významně účastní ischemicko-reperfuzním poranění mozku a srdce, zánětlivých, traumatických či virových onemocnění. Nicméně nejen inhibicí programované nekrozy se dá zabránit patologickým jevům, naopak i její indukce pro nás může mít pozitivní význam, zejména v protinádorové či protivirální léčbě.

Seznam literatury

Adibhatla, Rao Muralikrishna, James F. Hatcher, and Robert J. Dempsey. 2003. Phospholipase A2, hydroxyl radicals, and lipid peroxidation in transient cerebral ischemia. *Antioxidants & Redox Signaling* 5 (5): 647–54.

Andera, Ladislav. 2009. Signaling activated by the death receptors of the TNFR Family. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia* 153 (3): 173–80. Review.

Arnoult, Damien, Brigitte Gaume, Mariusz Karbowski, Juanita C. Sharpe, Francesco Cecconi, and Richard J. Youle. 2003. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *The EMBO Journal* 22 (17): 4385–99.

Aronson, Doron. 2002. Potential role of advanced glycosylation end products in promoting restenosis in diabetes and renal failure. *Medical Hypotheses* 59 (3): 297–301.

Axe, Elizabeth L., Simon A. Walker, Maria Manifava, Priya Chandra, H. Llewelyn Roderick, Anja Habermann, Gareth Griffiths, and Nicholas T. Ktistakis. 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology* 182 (4): 685–701.

Baines, Christopher P., Robert A. Kaiser, Nicole H. Purcell, N. Scott Blair, Hanna Osinska, Michael A. Hambleton, Eric W. Brunskill. 2005. Loss of Cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434 (7033): 658–62.

Bano, Daniele, Kenneth W. Young, Christopher J. Guerin, Ros Lefevre, Nancy J. Rothwell, Luigi Naldini, Rosario Rizzuto, Ernesto Carafoli, and Pierluigi Nicotera. 2005. Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell* 120 (2): 275–85.

Basit, F., S. Cristofanon, and S. Fulda. 2013. Obatoclox (GX15-070) triggers necroptosis by promoting the assembly of the necrosome on autophagosomal membranes. *Cell Death and Differentiation* 20 (9): 1161–73.

Bellmann, K., M. Jäätelä, D. Wissing, V. Burkart, and H. Kolb. 1996. Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Letters* 391 (1-2): 185–88.

Bonapace, Laura, Beat C. Bornhauser, Maike Schmitz, Gunnar Cario, Urs Ziegler, Felix K. Niggli, Beat W. Schäfer, Martin Schrappe, Martin Stanulla, and Jean-Pierre Bourquin. 2010. Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 120 (4): 1310–23.

Bonnet, Marion C., Daniela Preukschat, Patrick-Simon Welz, Geert van Loo, Maria A. Ermolaeva, Wilhelm Bloch, Ingo Haase, and Manolis Pasparakis. 2011. The adaptor protein FADD protects epidermal keratinocytes from necroptosis in vivo and prevents skin inflammation. *Immunity* 35 (4): 572–82.

Brouckaert, Greet, Michael Kalai, Dmitri V. Krysko, Xavier Saelens, Dominique Vercammen, Matladi N. Ndlovu, Matladi Ndlovu, Guy Haegeman, Katharina D’Herde, and Peter Vandenabeele. 2004. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Molecular Biology of the Cell* 15 (3): 1089–1100.

Cabon, L, P Galán-Malo, A. Bouharrou, L. Delavallée, M. Brunelle-Navas, H. K. Lorenzo, A. Gross, and S. A. Susin. 2012. BID regulates AIF-mediated caspase-independent necroptosis by promoting BAX activation. *Cell Death and Differentiation* 19 (2): 245–56.

Crompton, M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *The Biochemical Journal* 341: 233–49. Review.

Daugas, E., S. A. Susin, N. Zamzami, K. F. Ferri, T. Irinopoulou, N. Larochette, M. C. Prévost, et al. 2000. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (5): 729–39.

Degterev, Alexei, Junichi Hitomi, Megan Germscheid, Irene L. Ch’en, Olga Korkina, Xin Teng, Derek Abbott, et al. 2008. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature Chemical Biology* 4 (5): 313–21.

Degterev, Alexei, Zhihong Huang, Michael Boyce, Yaqiao Li, Prakash Jagtap, Noboru Mizushima, Gregory D. Cuny, Timothy J. Mitchison, Michael A. Moskowitz, and Junying Yuan. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology* 1 (2): 112–19.

Deter, R. L., and C. De Duve. 1967. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *The Journal of Cell Biology* 33 (2): 437–49.

Dickens, Laura S., Robert S. Boyd, Rebekah Jukes-Jones, Michelle A. Hughes, Gemma L. Robinson, Louise Fairall, John W R Schwabe, Kelvin Cain, and Marion Macfarlane. 2012. A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Molecular Cell* 47 (2): 291–305.

Ding, Wen-Xing. 2010. Role of autophagy in liver physiology and pathophysiology. *World Journal of Biological Chemistry* 1 (1): 3–12. Review.

Dong, Kai, Hong Zhu, Zhengyu Song, Yuanyuan Gong, Fenghua Wang, Wenqiu Wang, Zhi Zheng, et al. 2012. Necrostatin-1 protects photoreceptors from cell death and improves functional outcome after experimental retinal detachment. *The American Journal of Pathology* 181 (5): 1634–41.

- Duan, Yuntao, Robert A Gross, and Shey-Shing Sheu. 2007. Ca²⁺-dependent generation of mitochondrial reactive oxygen species serves as a signal for poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during glutamate excitotoxicity. *The Journal of Physiology* 585 (Pt 3): 741–58.
- Ellis, H. M., a H. R. Horvitz. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. Elegans*. *Cell* 44 (6): 817–29.
- Endres, Robert, Georg Häcker, Inge Brosch, and Klaus Pfeffer. 2003. Apparently normal tumor necrosis factor receptor 1 signaling in the absence of the silencer of death domains. *Molecular and Cellular Biology* 23 (18): 6609–17.
- Feoktistova, Maria, Peter Geserick, Beate Kellert, Diana Panayotova Dimitrova, Claudia Langlais, Mike Hupe, Kelvin Cain, Marion MacFarlane, Georg Häcker, and Martin Leverkus. 2011. cIAPs block ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Molecular Cell* 43 (3): 449–63.
- Formigli, L., L. Papucci, A. Tani, N. Schiavone, A. Tempestini, G. Orlandini, S. Capaccioli, and S. Zecchi Orlandini. 2000. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal of Cellular Physiology* 182 (1): 41–49.
- Freude, B., T. N. Masters, F. Robicsek, A. Fokin, S. Kostin, R. Zimmermann, C. Ullmann, S. Lorenz-Meyer, and J. Schaper. 2000. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32 (2): 197–208.
- Glick, Danielle, Sandra Barth, and Kay F. Macleod. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology* 221 (1): 3–12. Review.
- Guicciardi, Maria Eugenia, Justin L. Mott, Steven F. Bronk, Satoshi Kurita, Christian D. Fingas, and Gregory J. Gores. 2011. Cellular inhibitor of apoptosis 1 (cIAP-1) degradation by caspase-8 during TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *Experimental Cell Research* 317 (1): 107–16.
- Günther, Claudia, Eva Martini, Nadine Wittkopf, Kerstin Amann, Benno Weigmann, Helmut Neumann, Maximilian J. Waldner, et al. 2011. Caspase-8 regulates TNF-induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature* 477 (7364): 335–39.
- Guo, Xing, Hiromi Sesaki, and Xin Qi. 2014. Drp1 stabilizes p53 on the mitochondria to trigger necrosis under oxidative stress conditions, in vitro and in vivo. *The Biochemical Journal*.
- Gurbuxani, Sandeep, Elise Schmitt, Celine Cande, Arnaud Parcellier, Arlette Hammann, Eric Daugas, Ilektra Kouranti, et al. 2003. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* 22 (43): 6669–78.
- Han, Weidong, Ling Li, Shuang Qiu, Qinghua Lu, Qiangrong Pan, Ying Gu, Jianhong Luo, and Xun Hu. 2007. Shikonin circumvents cancer drug resistance by induction of a necroptotic death. *Molecular Cancer Therapeutics* 6 (5): 1641–49.

- Han, Weidong, Jiansheng Xie, Ling Li, Zhen Liu, and Xun Hu. 2009. Necrostatin-1 reverts shikonin-induced necroptosis to apoptosis. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 14 (5): 674–86.
- Hitomi, Junichi, Dana E. Christofferson, Aylwin Ng, Jianhua Yao, Alexei Degterev, Ramnik J. Xavier, and Junying Yuan. 2008. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 135 (7): 1311–23.
- Horita, Henrick, Arthur E. Frankel, and Andrew Thorburn. 2008. Acute myeloid leukemia-targeted toxin activates both apoptotic and necroptotic death mechanisms. *PLoS One* 3 (12): e3909.
- Hou, Yanjun, Fu Li, Michael Karin, and Michael C Ostrowski. 2008. Analysis of the IKKbeta/NF-kappaB signaling pathway during embryonic angiogenesis. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 237 (10): 2926–35.
- Chan, Francis Ka-Ming, Joanna Shisler, Jacqueline G. Bixby, Martin Felices, Lixin Zheng, Michael Appel, Jan Orenstein, Bernard Moss, and Michael J. Lenardo. 2003. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (51): 51613–21.
- Chavez-Valdez, R., .L J. Martin, D. L. Flock, and F. J. Northington. 2012. Necrostatin-1 Attenuates Mitochondrial Dysfunction in Neurons and Astrocytes Following Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Neuroscience* 219 (září): 192–203.
- Chen, Guoqing, and David V Goeddel. 2002. TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science (New York, N.Y.)* 296 (5573): 1634–35. Review.
- Chen, Qun, Edwin J. Vazquez, Shadi Moghaddas, Charles L. Hoppel, and Edward J. Lesnefsky. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (38): 36027–31.
- Kagedal, K., M. Zhao, I. Svensson, and U. T. Brunk. 2001. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *The Biochemical Journal* 359 (Pt 2): 335–43.
- Kaiser, William J., Haripriya Sridharan, Chunzi Huang, Pratyusha Mandal, Jason W. Upton, Peter J. Gough, Clark A. Sehon, Robert W. Marquis, John Bertin, and Edward S. Mocarski. 2013. Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *The Journal of Biological Chemistry* 288 (43): 31268–79.
- Kaiser, William J., Jason W. Upton, Alyssa B. Long, Devon Livingston-Rosanoff, Lisa P. Daley-Bauer, Razqallah Hakem, Tamara Caspary, and Edward S. Mocarski. 2011. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature* 471 (7338): 368–72.
- Kar, Pulak, Tapati Chakraborti, Krishna Samanta, and Sajal Chakraborti. 2009. Mu-calpain mediated cleavage of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in isolated mitochondria under A23187 induced Ca²⁺ stimulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 482 (1-2): 66–76.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26 (4): 239–57.

Kim, Hyun-Eui, Fenghe Du, Min Fang, and Xiaodong Wang. 2005. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (49): 17545–50.

Kim, S. Y., M. S. Shim, K. Kim, R. N. Weinreb, L. A. Wheeler, and W. Ju. 2014. Inhibition of Cyclophilin D by cyclosporin A promotes retinal ganglion cell survival by preventing mitochondrial alteration in ischemic injury. *Cell Death & Disease* 5: e1105.

Kovalenko, Andrew, Christine Chable-Bessia, Giuseppina Cantarella, David Wallach, and Gilles Courtois. 2003. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF- κ B signalling by deubiquitination. *Nature* 424 (6950): 801.

Kumar, Himanshu, Taro Kawai, and Shizuo Akira. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology* 30 (1): 16–34. Review

Kuwana, Tomomi, Lisa Bouchier-Hayes, Jerry E Chipuk, Christine Bonzon, Barbara A. Sullivan, Douglas R. Green, and Donald D. Newmeyer. 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular Cell* 17 (4): 525–35.

Laster, S. M., J. G. Wood, and L. R. Gooding. 1988. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 141 (8): 2629–34.

Ledgerwood, Elizabeth C., and Ian M. Morison. 2009. Targeting the apoptosome for cancer therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (2): 420–24. Review

Lee, Yun-Suk, Yogesh Dayma, Min-Young Park, Kyung Il Kim, Sung-Eun Yoo, and Eunhee Kim. 2013. Daxx is a key downstream component of receptor interacting protein kinase-3 mediating retinal ischemic cell death. *FEBS Letters* 587 (3): 266–71.

Li, Christopher, Samuel Lasse, Pedro Lee, Manando Nakasaki, Shih-Wei Chen, Kenshi Yamasaki, Richard L Gallo, and Colin Jamora. 2010. Development of atopic dermatitis-like skin disease from the chronic loss of epidermal caspase-8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (51): 22249–54.

Li, Jixi, Thomas McQuade, Ansgar B. Siemer, Johanna Napetschnig, Kenta Moriwaki, Yu-Shan Hsiao, Ermelinda Damko, et al. 2012. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell* 150 (2): 339–50.

Linkermann, Andreas, Jan Hinrich Bräsen, Maurice Darding, Mi Kyung Jin, Ana B. Sanz, Jan-Ole Heller, Federica De Zen, et al. 2013. Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (29): 12024–29.

Lockshin, Ra, a Cm Williams. 1964. Programmed Cell Death-2 Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *Journal of Insect Physiology* 10 (4): 643–49.

Mahoney, D. J., H. H. Cheung, R. Lejmi Mrad, S. Plenchette, C. Simard, E. Enwere, V. Arora, et al. 2008. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF-alpha-mediated NF-kappaB activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (33): 11778–83.

Micheau, O., S. Lens, O. Gaide, K. Alevizopoulos, and J. Tschopp. 2001. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Molecular and Cellular Biology* 21 (16): 5299–5305.

Micheau, Olivier, Margot Thome, Pascal Schneider, Nils Holler, Jürg Tschopp, Donald W. Nicholson, Christophe Briand and Markus G. Grütter. 2002. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (47): 45162–71.

Moujalled, D. M., W. D. Cook, T. Okamoto, J. Murphy, K. E. Lawlor, J. E. Vince, and D. L. Vaux. 2013. TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death & Disease* 4: e465.

Newton, Kim, Debra L. Dugger, Katherine E. Wickliffe, Neeraj Kapoor, M. Cristina de Almagro, Domagoj Vucic, Laszlo Komuves, et al. 2014. Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* 343 (6177): 1357–60.

Oberst, Andrew, Christopher P. Dillon, Ricardo Weinlich, Laura L. McCormick, Patrick Fitzgerald, Cristina Pop, Razq Hakem, Guy S. Salvesen, and Douglas R Green. 2011. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* 471 (7338): 363–67.

Oerlemans, Martinus I. F. J., Jia Liu, Fatih Arslan, Krista den Ouden, Ben J. van Middelaar, Pieter A. Doevendans, and Joost P G Sluijter. 2012. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo. *Basic Research in Cardiology* 107 (4): 270.

Oikawa, Shinji, Tomoko Yamada, Toshikazu Minohata, Hatasu Kobayashi, Ayako Furukawa, Saeko Tada-Oikawa, Yusuke Hiraku, Mariko Murata, Mitsuru Kikuchi, and Tetsumori Yamashima. 2009. Proteomic identification of carbonylated proteins in the monkey hippocampus after ischemia-reperfusion. *Free Radical Biology & Medicine* 46 (11): 1472–77.

Santambrogio, Laura, and Ana M. Cuervo. 2011. Chasing the elusive mammalian microautophagy. *Autophagy* 7 (6): 652–54.

Shembade, Noula, Averil Ma, and Edward W. Harhaj. 2010. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science (New York, N.Y.)* 327 (5969): 1135–39.

- Shimizu, S., Y. Eguchi, W. Kamiike, S. Waguri, Y. Uchiyama, H. Matsuda, and Y. Tsujimoto. 1996. Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions. *Oncogene* 12 (10): 2045–50.
- Shimizu, S., A. Konishi, Y. Nishida, T. Mizuta, H. Nishina, A. Yamamoto, and Y. Tsujimoto. 2010. Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. *Oncogene* 29 (14): 2070–82.
- Schinzel, Anna C., Osamu Takeuchi, Zhihong Huang, Jill K. Fisher, Zhipeng Zhou, Jeffery Rubens, Claudio Hetz, Nika N. Danial, Michael A. Moskowitz, and Stanley J. Korsmeyer. 2005. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (34): 12005–10.
- Schweichel, J. U., and H. J. Merker. 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7 (3): 253–66.
- Simon, M. M., A. Reikerstorfer, A. Schwarz, C. Krone, T. A. Luger, M. Jäättelä, and T. Schwarz. 1995. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *The Journal of Clinical Investigation* 95 (3): 926–33.
- Sosna, Justyna, Susann Voigt, Sabine Mathieu, Arne Lange, Lutz Thon, Parvin Davarnia, Thomas Herdegen, et al. 2014. TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 71 (2): 331–48.
- Sou, Yu-shin, Satoshi Waguri, Jun-ichi Iwata, Takashi Ueno, Tsutomu Fujimura, Taichi Hara, Naoki Sawada, et al. 2008. The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Molecular Biology of the Cell* 19 (11): 4762–75.
- Sun, Xiaoqing, Jianping Yin, Melissa A. Starovasnik, Wayne J. Fairbrother, and Vishva M Dixit. 2002. Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (11): 9505–11.
- Susin, S. A., E. Daugas, L. Ravagnan, K. Samejima, N. Zamzami, M. Loeffler, P. Costantini, et al. 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine* 192 (4): 571–80.
- Tenev, Tencho, Katuscia Bianchi, Maurice Darding, Meike Broemer, Claudia Langlais, Fredrik Wallberg, Anna Zachariou, et al. 2011. The ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Molecular Cell* 43 (3): 432–48.

Trichonas, George, Yusuke Murakami, Aristomenis Thanos, Yuki Morizane, Maki Kayama, Christine M Debouck, Toshio Hisatomi, Joan W. Miller, and Demetrios G. Vavvas. 2010. Receptor interacting protein kinases mediate retinal detachment-induced photoreceptor necrosis and compensate for inhibition of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (50): 21695–700.

Tsuda, Hiromasa, Zhao Ning, Yoko Yamaguchi, and Naoto Suzuki. 2012. Programmed cell death and its possible relationship with periodontal disease. *Journal of Oral Science* 54 (2): 137–49. Review.

Urbanik, Toni, Bruno Christian Kohler, Regina Johanna Boger, Marcus Alexander Worns, Steffen Heeger, Gerd Otto, Nadine Hövelmeyer, et al. 2011a. Down-regulation of CYLD as a trigger for NF- κ B activation and a mechanism of apoptotic resistance in hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Oncology* 38 (1): 121–31.

Urbanik, Toni, Bruno Christian Kohler, Regina Johanna Boger, Marcus Alexander Worns, Steffen Heeger et al. 2011b. Down-regulation of CYLD as a trigger for NF- κ B activation and a mechanism of apoptotic resistance in hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Oncology* 38 (1): 121–31.

Van Herreweghe, Franky, Jianqiang Mao, Frank W. R. Chaplen, Johan Grooten, Kris Gevaert, Joël Vandekerckhove, and Katia Vancompernelle. 2002. Tumor necrosis factor-induced modulation of glyoxalase I activities through phosphorylation by PKA results in cell death and is accompanied by the formation of a specific methylglyoxal-derived AGE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2): 949–54.

Vaseva, Angelina V., Natalie D. Marchenko, Kyungmin Ji, Stella E. Tsirka, Sonja Holzmann, and Ute M. Moll. 2012. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* 149 (7): 1536–48.

Vercammen, D., R. Beyaert, G. Denecker, V. Goossens, G. Van Loo, W. Declercq, J. Grooten, W. Fiers, and P. Vandenabeele. 1998. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *The Journal of Experimental Medicine* 187 (9): 1477–85.

Wang, Lai, Fenghe Du, and Xiaodong Wang. 2008. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133 (4): 693–703.

Welz, Patrick-Simon, Andy Wullaert, Katerina Vlantis, Vangelis Kondylis, Vanesa Fernández-Majada, Maria Ermolaeva, Petra Kirsch, Anja Sterner-Kock, Geert van Loo, and Manolis Pasparakis. 2011. FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation. *Nature* 477 (7364): 330–34.

Whelan, Russell S., Klitos Konstantinidis, An-Chi Wei, Yun Chen, Denis E Reyna, Saurabh Jha, Ying Yang, et al. 2012. Bax regulates primary necrosis through mitochondrial dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (17): 6566–71.

- Willis, Simon N., Jamie I. Fletcher, Thomas Kaufmann, Mark F. van Delft, Lin Chen, Peter E Czabotar, Helen Ierino, et al. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science (New York, N.Y.)* 315 (5813): 856–59.
- Woo, Eui-Jeon, Yeon-Gil Kim, Min-Sung Kim, Won-Deok Han, Sejeong Shin, Howard Robinson, Sam-Yong Park, and Byung-Ha Oh. 2004. Structural mechanism for inactivation and activation of CAD/DFF40 in the apoptotic pathway. *Molecular Cell* 14 (4): 531–39.
- Xiong, Nian, Jing Xiong, Min Jia, Ling Liu, Xiaowei Zhang, Zhenzhen Chen, Jinsha Huang, et al. 2013. The role of autophagy in Parkinson's disease: rotenone-based modeling. *Behavioral and Brain Functions: BBF* 9: 13.
- Xu, Xingshun, Chu C. Chua, Min Zhang, Deqin Geng, Chun-Feng Liu, Ronald C. Hamdy, and Balvin H. L. Chua. 2010. The role of PARP activation in glutamate-induced necroptosis in HT-22 cells. *Brain Research* 1343: 206–12.
- Xu, Yue, Shuang Huang, Zheng-Gang Liu, and Jiahuai Han. 2006. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation. *The Journal of Biological Chemistry* 281 (13): 8788-95.
- Yazdanpanah, Benjamin, Katja Wiegmann, Vladimir Tchikov, Oleg Krut, Carola Pongratz, Michael Schramm, Andre Kleinriders, et al. 2009. Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase. *Nature* 460 (7259): 1159–63.
- Zhang, Duan-Wu, Jing Shao, Juan Lin, Na Zhang, Bao-Ju Lu, Sheng-Cai Lin, Meng-Qiu Dong, and Jiahuai Han. 2009. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science (New York, N.Y.)* 325 (5938): 332–36.
- Zhang, Qin, Mustafa Raoof, Yu Chen, Yuka Sumi, Tolga Sursal, Wolfgang Junger, Karim Brohi, Kiyoshi Itagaki, and Carl J Hauser. 2010. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464 (7285): 104–7.
- Zhao, Jie, Siriporn Jitkaew, Zhenyu Cai, Swati Choksi, Qiuning Li, Ji Luo, and Zheng-Gang Liu. 2012. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (14): 5322–27.