

SZABÁLYOZOTT SEJTELHALÁS: APOPTÓZIS ÉS NEKROPTÓZIS U937 SEJTEKBEN

Doktori tézisek

Dunai Zsuzsanna Ágnes

Patológiai Tudományok Doktori Iskola
Semmelweis Egyetem



Témavezető: Dr. Mihalik Rudolf, tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók:

Dr. Vántus Tibor, tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Dr. Koncz Gábor, tudományos munkatárs, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Bánhegyi Gábor, egyetemi tanár, M.D., D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Kiss András, egyetemi docens M.D., Ph.D.

Dr. Réz Gábor, egyetemi docens Ph.D.

Budapest, 2012

1. Bevezetés

Kerr, Wyllie and Currie nevéhez fűződik az apoptózis elnevezése, mely javaslatuk szerint egy aktív, programozott folyamat, amit egyaránt aktiválhatnak fiziológias és patológias stimulusok is. Az apoptózis egy szabályozott sejteliminációs folyamat (sejtelhalás és eltakarítás), mely kiegészítve a sejtsztódással fenntartja a szöveti homeosztázist. Később Horvitz és munkatársai határozták meg az apoptózisban résztvevő géneket, amelyek felelősek a programozott sejteliminációért a modell állat *C. elegans* egyedfejlődése során. Az apoptózis kifejezést azóta széles körben alkalmazzák és gyakran a programozott sejtelhalás szinonímájaként használják. Ezzel szemben a nekrozist egy olyan „mérgezési” folyamatnak tekintették, ahol leáll az ATP termelés és a sejt aktívan fenntartott struktúrája szétesik. Kevesen tulajdonítottak fiziológias szerepet ennek a folyamatnak. Az elmúlt évtizedek során publikált számos megfigyelés azonban arra utal, hogy a nekrotikus sejthalál is lehet genetikailag meghatározott és az apoptózishoz hasonlóan, programozott sejtpusztulási formának nevezhető. Ellentétben a meglehetősen jól karakterizált apoptotikus jelúttal, a nekrozis szignálkaskádjának tagjairól egyelőre keveset tudunk.

Apoptózis, másodlagos nekrozis és nekroptózis

Hagyományosan az apoptózist kaspáz-függő, programozott, nem immunogén folyamatnak tekintjük, melyre a sejt zsugorodása, kromatin kondenzáció és DNS fragmentálódás jellemző. Apoptózis során a pusztuló sejt elveszti a kapcsolatát a szomszédos sejtekkel és végül plazmamembrán határolt apoptotikus testekre esik szét. Fiziológias körülmények között az apoptotikus testeket makrofágok és más immunsejtek kebelezik be, eltávolítják a szövet közötti térből anélkül, hogy immunválasz aktiválódna.

Jellemző, de nem szükségszerű, hogy az apoptózis során kaspázok aktiválódnak, melynek köszönhetően számos szubsztrát fehérje hasítódik, foszfatidilszerin jelenik meg a sejtmembrán külső felszínén, a sejt zsugorodik és korai oligonukleoszómális DNS fragmentálódás következik be.

Abban az esetben, ha az immunsejtek nem fagocitálják az apoptotikus testeket, azok sejtmembránja később felszakad és a sejttartalom a környező sejtek közötti térbe ürül. Ezt a jelenséget Wyllie és munkatársai másodlagos nekrozisnak nevezték el, megkülönböztetve az elsődlegesen nekrozistól, mely előtt apoptózis nem játszódik le.

Eredetileg a nekrozis szó patológias kifejezés volt, amely leírja a pusztult sejtek morfológiáját számos humán betegségben, pl. neurodegeneratív kórképekben, hasnyálmirigy zsírnekrozisban, trauma, szívinfarktus és stroke, bakteriális fertőzések és tumoros megbetegedés esetén.

Megjelenését tekintve a nekrozis során a sejt megduzzad majd a sejtmembránok felszakadnak, a sejt elveszti integritását.

Számos tanulmány igazolta, hogy a nekrotikus sejtelhalás is lehet szabályozott folyamat, így az apoptózishoz hasonlóan nevezhetjük programozott sejthalálynak.

Nekroptózis

A közelmúltban egy új, nekroptózis elnevezésű, nekrotikus morfológiával jellemezhető, kaszpáz-független sejtelhalási formát írtak le. Kimutatták, hogy tumor necrosis factor-alpha (TNF α) vagy Fas ligand (FASL) aktiválta külső apoptotikus jelút során, kaszpázgátolt körülmények között az apoptózis helyett nekrozis-szerű folyamat zajlik le. A folyamat felfüggeszthető a necrostatin (Nec) nevű, kis molekulatömegű inhibitorral, mely gátolja a receptor interacting protein kinase-1 (RIPK1) aktivitását. A necrostatin mellett a folyamat gátlószere a necrosulfonamide (NSA), mely a RIPK3 szubsztrátjának, az úgynevezett mixed lineage kinase domain-like fehérjének (MLKL) inhibitora. Egyes vizsgálatok szerint a RIPK-mediált nekrozis során a poly(ADP-ribose) polimerase (PARP) enzim is aktívan hozzájárul a folyamathoz. További publikációk szerint pedig a nekroptózis mellett autofágia is aktiválódik. A nekroptózist RIPK1 és RIPK3-függő, szabályozott nekrozisnak tekintjük, mely kaszpázgátolt körülmények között valósul meg.

Korábbi eredményeink

A staurosporin (STS) széles spektrumú proteinkináz-gátlószer, általánosan elfogadott belső apoptotikus jelútvonal aktiváló, mely a mitokondrium membrán áteresztőképességének növelésével indukál apoptózist, amely másodlagos nekrozisban folytatódik. Korábban vizsgáltuk a STS-indukálta belső apoptotikus jelútvonalban résztvevő molekulákat, valamint az apoptózis és nekrozis közötti átkapcsolási pontokat U937 sejtvonalon. Azt találtuk, hogy a STS nekrozist indukál kaszpázgátolt körülmények között. Kíváncsiak voltunk, hogy a STS által indukált folyamat átfed-e a nekroptózissal, annak ellenére, hogy a nekroptózis halálreceptorokon keresztül aktiválódó folyamatként ismert.

2. Célkitűzés

Célul tűztük ki a STS-indukálta nekrotikus jelútvonal karakterizálását a humán U937 sejtvonalon. Kíváncsiak voltunk, hogy a folyamatban a RIPK1, MLKL, PARP-1 fehérjék részt vesznek-e, hosszabb távon is (24 óra) felfüggeszthető-e a folyamat CA-074-OMe lizoszómális gátlószerrel, és hogy a STS által kiváltott nekrozis különbözik-e a nekroptózistól. Ehhez létrehoztunk egy halálreceptor-mediálta nekroptózis modellt a TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) citokin alkalmazásával. Majd farmakológiai gátlószereket alkalmazva

összehasonlítottuk a két indukálószer (STS és TRAIL) kiváltotta sejtelhalási mechanizmusokat (kaspázgátló: z-Val-DL-Asp-fluoromethylketone (zVD), PARPgátló: PJ-34, HSP90gátló: geldanamycin (GA), PI3K(III-as típus)gátló: 3-methyladenine (MA), cisztein katepszininhibitor: CA-074-OMe (CA), RIP1Kgátló: necrostatin-1 (Nec) és MLKLinhibitor: necrosulfonamide (NSA)).

3. Módszerek

3. 1. Sejttenyésztés

U937 monocita eredetű sejteket RPMI 1640 médiumban tenyésztettünk, melyet 10% hőinaktivált szérummal, 2 mM L-glutaminnal valamint 100 µg/mL penicillin és 100 egység/ml sztreptomocinnal egészítettünk ki, és 37 °C, 5% CO₂ körülmények között tartottunk fenn. A sejteket 48-as szuszpenziós tálcára szélesztettük 3x10⁵ sejt/mL vagy 5x10⁵ sejt/mL koncentrációban 60 perccel a kezelés előtt. Majd zVD (10 µM) jelenlétében vagy hiányában kezeltük a sejteket a gátlószerekkel 1 órával (Nec, CA, NSA és PJ) vagy 4 órával (GA) megelőzve a sejtelhalást indukáló STS (1 µM) vagy TRAIL (50 ng/mL) alkalmazását.

3. 2. Sejtelhalással összefüggő paraméterek detektálása áramlási citometriai módszerekkel

Az adatgyűjtéshez FACScan vagy FACScalibur típusú áramlási citométereket használtunk, az adatok kiértékelését pedig WINLIST szoftverrel végeztük.

3. 2. 1. Plazmamembrán sérülés detektálása PI festéssel

A kezelt sejteket közvetlenül a tálcán festettük propídium-jodiddal (PI) 10 µg/mL koncentrációban 5 mM glükóz tartalmú PBS-sel. A sejtek fluoreszcencia intenzitását FL2H hisztogrammon logaritmikus skálán detektáltuk.

3. 2. 2. A plazmamembránt alkotó foszfatidilszerin eloszlás megváltozásának mérése Annexin V-FITC és PI kettős jelölt sejteken

A kezelt sejteket PI-dal festettük 10 µg/mL koncentrációban 10 percig 37 °C-os körülmények között. Centrifugálást követően a sejteket Annexin tartalmú pufferben festettük. Majd, közvetlenül a mérést megelőzően 1 µg/mL PI-ot tartalmazó 400 µL pufferrel egészítettük ki a sejteket, melyeket azonnal mértünk.

3. 2. 3. A mitokondrium transzmembrán potenciál változásának mérése DiOC₆(3) festéssel

A kezelt sejteket 10 nM koncentrációjú DiOC₆(3)-mal és 10 µg/mL koncentrációjú PI-dal festettük 5 mM glükóz tartalmú PBS-ben 15 percig 37 °C-on, majd azonnal mértük.

3. 2. 4. A sejtben lévő savas sejtalkotók térfogatának mérése AO festéssel

A kezelt sejteket 5 mM glukóz tartalmú, PBS-ben hígított 5 µg/mL koncentrációjú akridin nanarncsal (AO-val) festettünk 15 percig 37 °C-on, majd azonnal mértük.

3. 2. 5. Az oligonukleoszómális DNS fragmentáció mérése sub-G1 populáció detektálásával

A kezelt sejteket 70%-os etanolban fixáltuk, majd foszfát tartalmú extrakciós pufferben vettük fel, mely a kisméretű DNS fragmentumok kioldódását tette lehetővé. A sejtekben maradt nagyméretű DNS molekulák mennyiségét PI festéssel detektáltuk.

3. 2. 6. Fényszórás változás és DNS fragmentáció mérése

A minta előkészítés fixálási és festési lépései megegyeznek a 3.2.5. alfejezetben leírtakkal. A törmeléktől elválasztott sejt méretű populációt az SSC-FL2H diagrammon analizáltuk.

3. 3. Agaróz gélelektroforézis

A minták DNS-ét fenol-kloroformos módszerrel nyertük ki, majd TE pufferben vettük fel. Az elektroforézist 1,5%-os, etídium-bromid tartalmú agaróz gélben végeztük TBA pufferrel, majd UV alatt detektáltuk.

3. 4. Fénymikroszkópos vizsgálatok

A citospin preparátumokat metanolban fixáltuk, hematoxilin-eozinnal festettük, majd etanollal, acetonnal és xilollal dehidráltuk. A morfológiai változásokat 400x-os nagyítás mellett fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

3. 5. Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok

A kezelt sejteket Hoechst-tel és PI-dal festettünk hogy elkülöníthessük az apoptotikus és nekrotikus sejteket. A festett mintákat 400x-os nagyítás mellett vizsgáltuk.

3. 6. PARP-1 és RIPK1 hasításának detektálása Western blot technikával

Az inkubációs idő lejártá után a sejteket mostuk és Laemmli pufferben vettük fel. Forralás után az elektroforézist 10% poliakrilamid gélen végeztük, majd a fehérjéket nitrocellulózra blottoltuk. A membrán blokkolását követően PARP-1, RIPK1 vagy GAPDH ellenanyagokat, majd HPR jelölt másodlagos ellenanyagokat alkalmaztunk. A fehérjék jelenlétét ECL technikával detektáltuk.

3. 7. Kaszpáz aktivitás mérés

A sejteket PBS-sel mostuk, majd kaszpáz pufferben vettük fel, 96 lukú tálcára pipettáztuk és Triton X-100-zal lizáltuk. A mintákhoz kaszpáz szubsztrátot (z-DEVD) adtunk és a szubsztrát hasítása során felszabaduló amc fluoreszcenciáját 445 nm-en detektáltuk fluoreszcens tálcá leolvasóval, 380 nm-es gerjesztés mellett.

3. 8. Statisztika

Az eredmények statisztikai analízisét kétszélű, két mintás nem egyenlő varianciájú Student t-próbával végeztük.

4. Eredmények

4. 1. A TRAIL nekroptózist indukál U937 sejtvonalon kaspázgátló jelenlétében

Az U937 sejtek érzékenyek bizonyultak 20 órás TRAIL citokin kezelésre. A TRAIL alkalmazása nukleoszómális DNS fragmentációt okozott, valamint a kaspáz-3 aktiváció következtében PARP-1 hasítást detektáltunk. Végül a sejtek PI-dal festődtek, mely a másodlagos nekrosis jele.

Ha a sejteket kaspázgátlóval előkezeltük, akkor a kaspáz aktiváció és a PARP-1 hasítás elmaradt. Oligonukleoszómális DNS fragmentáció helyett, nagy molekulatömegű DNS fragmentumok keletkeztek. Az apoptotikus morfológia helyett a pusztuló sejtek megduzzadtak és elvesztették hematoxilin-eozin festődésüket, mely jelenségek a nekrosisra jellemzőek. A sejtek sejthártyája felszakadt és a PI festés igazolta, hogy kaspázgátolt TRAIL kezelt sejtek nagyobb arányban PI pozitívak, mint a csak TRAIL kezelt sejtek.

A RIPK1gátlószer (Nec) jelenlétében és kaspázgátló hiányában a membránkárosodott populáció megjelenése nem csökkent, míg kaspázgátló jelenlétében a PI pozitív populáció megjelenése teljes mértékben elmaradt.

Tovább vizsgálva a RIPK1 fehérje szerepét a TRAIL indukálta nekroptotikus és másodlagos nekrotikus jelútvonalban HSP90gátlószert, geldanamycint (GA) alkalmaztunk. A GA a HSP90-et gátolva, csökkenti a RIPK1 szintjét a sejtben, így várhatóan gátolja a nekroptózist. Valóban, eredményeink szerint a GA szignifikánsan csökkentette a TRAIL indukálta nekroptózis következtében megjelenő membránkárosodott populáció mértékét.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy kaspázgátló jelenlétében a TRAIL citokin az U937 sejtek esetén nekroptózist és nem pedig apoptózist indukál. Továbbá, a TRAIL okozta nekroptotikus jelútvonal lefutása Nec és GA alkalmazásával felfüggeszthető.

4. 2. A STS nekrozist indukál kaspázgátló jelenlétében

Eredményeink szerint a kaspázgátló zVD jelenlétében a DEVD-áz aktivitás teljes mértékben elmaradt STS kezelt sejtekben. Kaspázgátolt körülmények között a STS membránkárosodást okozott rövid (8-12 órás) kezelés esetén, míg hosszabb kezelés esetén (20 óra) DNS fragmentációt is tudtunk detektálni. A STS+zVD kezelt sejtekben azonban nem apoptotikus,

hanem nekrotikus jellegű, nagy molekula tömegű DNS fragmentumok megjelenését detektáltuk, melyet agaróz gélelektroforézissel igazoltunk. Ezzel szemben a STS kezelt mintákban nukleoszómális DNS fragmentációt tapasztaltunk, melynek megjelenése DNase aktivitásra utal.

Ezek után a RIPK1 fehérje szerepét vizsgáltuk meg kaszpázgátolt körülmények között. A Nec koncentráció-függően gátolta a STS indukálta nekrozist, melyet a csökkent PI pozitív populáció megjelenésével igazoltunk. Mind a Nec, mind a GA felfüggesztette a nekrotikus populáció megjelenését rövid távú (8, 12 órás) kezelés esetén, amit áramlási citometriás méréssel és Hoechst, PI festett mintákon fluoreszcens mikroszkóppal is megerősítettünk.

Hosszabb inkubációs idő mellett (20 óra) a STS+zVD kiváltotta plazmamembrán károsodás gátlása Nec-vel csak részleges volt (~50%). Ezzel szemben a Nec nem befolyásolta a kaszpáz-függő DNS kondenzációt és fragmentációt sem rövidebb, sem hosszabb STS kezelési esetén. Hasonlóképpen a STS indukálta másodlagos nekrozist sem a Nec, sem a GA kezelés nem befolyásolta.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a STS indukálta apoptózist U937 sejtekben másodlagos nekrozis követi. Kaszpázgátolt körülmények között azonban, a STS elsődleges nekrozist indukál, mely részlegesen gátolható a két RIPK1 gátlószerrel: Nec-vel és GA-val.

4. 3. A STS és TRAIL RIPK1- és MLKL-függő nekroptózist indukál

A továbbiakban Western blot technikával is vizsgáltuk a RIPK1 szerepét a STS kiváltotta nekrozisban. A STS indukálta kaszpáz aktiváció következtében a RIPK1 proteolitikusan hasítódott. Míg kaszpázgátló jelenlétében ez a hasítás elmaradt.

Ezt követően tovább vizsgáltuk a STS indukálta nekroptotikus jelútvonal molekuláris elemeit, többek között az MLKL-t. A sejteket az MLKL gátlószerével, NSA-val előkezelve azt találtuk, hogy az NSA koncentráció-függően csökkentette a PI pozitív populáció megjelenését kaszpázgátolt körülmények között mind STS, mind TRAIL indukció esetén. Az NSA gátolta mind a TRAIL, mind a STS okozta nekrozist, melyet PI pozitivitás méréssel és Hoechst/PI festéssel igazoltunk. Ezzel szemben az NSA nem befolyásolta sem a TRAIL, sem a STS indukálta DNS fragmentálódást és a másodlagos nekrozis lefutását.

Ezek az eredmények igazolják a RIPK1 és az MLKL központi szerepét a STS és TRAIL indukálta nekrozisban kaszpázgátolt körülmények között. Tehát a TRAIL és STS kiváltotta kaszpáz-független nekrozist nekroptózisnak tekinthetjük U937 sejtekben.

4. 4. MA csökkenti a STS indukálta nekroptózist

Az autofágia szerepének vizsgálatához 3-methyladenine-t (MA) alkalmaztuk. Az MA ismert autofágiagátlószer, mely a III-as típusú phosphatidylinositol 3-kinázt (PI3K) gátolva, megakadályozza az autofagoszóma megjelenését. Eredményeink szerint az MA csak részlegesen gátolta a STS+zVD okozta nekroptotikus sejtpopuláció megjelenését, míg a STS kiváltotta apoptózist egyáltalán nem befolyásolta. Érdekes, hogy a RIPK1gátló is hasonló mértékű, részleges gátlást okozott STS+zVD kezelés esetén, mint az MA. A Nec és az MA együttes alkalmazása additívnek bizonyult, de nem szinergikusnak, tehát a két jelút vonal független, a nekroptózis mellett autofágia is aktiválódik U937 sejtekben STS+zVD kezelésre.

4. 5. CA gátolja mind a TRAIL, mind a STS indukálta nekroptózist kaszpázgátló jelenlétében

Korábbi vizsgálataink szerint a CA, melyet katepszin B gátlószernek tekintenek, kivédte a kaszpáz-független nekrotikus sejtpopuláció megjelenését promielocitás sejtvonalon STS+zVAD kezelés mellett. Így megvizsgáltuk, hogy a CA kezelés fokozza-e a túlélést U937 sejtvonal esetén is nekroptotikus körülmények között.

Érdekes módon a CA szinte teljesen felfüggesztette a TRAIL indukálta nekroptotikus membránkárosodás megjelenését. Hasonlóképpen, a CA a STS okozta nekroptózist is gátolta.

Tovább vizsgálva a jelenséget, összevetve az eredményeket a Nec és GA hatásával, további sejtelhalással kapcsolatos paramétereket vizsgáltunk. A mitokondrium membrán depolarizációra vonatkozó méréseink szerint folyamatos, idő-függő transzmembrán potenciál csökkenés detektálható DiOC₆(3) festett STS+zVD kezelt U937 sejtekben. A Nec ezt a folyamatot részlegesen, míg a CA teljes mértékben gátolta. Emellett a CA teljes mértékben gátolta a mind a foszfatidilszerin kihelyeződést, mind a sejtmembrán károsodást is TRAIL vagy STS kezelés estén kaszpázgátló körülmények között. Továbbá, a lizoszómális savas térfogatvesztés, mely TRAIL és STS kezelés hatására következett be a nekroptózis során, CA előkezelést alkalmazva teljes mértékben kivédhetőnek bizonyult. A vizsgált paramétereken túl a RIPK1 hasítás elmaradása is igazolta, hogy kaszpáz-független sejtpusztulás zajlik.

Az apoptotikus paramétereket tekintve, sem a sub-G1 populáció megjelenését és mértékét, sem a létra típusú DNS fragmentációt nem befolyásolta a CA. Ezekon túl a másodlagos nekrotikus jelút vonal lefutása sem volt befolyásolható CA kezeléssel TRAIL vagy STS kezelt sejteknél.

Ezek az eredmények igazolják, hogy a CA, hasonlóképpen az NSA-hoz, hatásos gátlószer a STS és TRAIL indukálta kaszpáz-független nekroptózisnak, míg a Nec és a GA csak részlegesen tudja felfüggeszteni a nekroptózist a STS kezelt U937 sejtekben.

4. 6. A PARP-1gátlószer (PJ-34) nem befolyásolja a TRAIL vagy STS indukálta nekroptózist kaszpázgátló jelenlétében

A PARP-1 enzim funkciója bizonyított bizonyos sejtpusztulási formákban. A PARP-1 gátlásával lassítható a NAD és ATP készlet kimerülése, melynek következtében a másodlagos nekrosis megjelenése kitolódik.

Mi a kísérleti modellrendszerünkben a PJ-34gátlószer hatását vizsgáltuk a nekroptotikus jelútvonalra. Jelentős különbség a gátlószer jelenlétében nem volt detektálható. Sem a TRAIL, sem a STS kezelt, kaszpázgátló U937 sejtekben a PJ-34 alkalmazása nem befolyásolta a mitokondrium transzmembrán potenciált, a lizoszómális savas térfogó veszteséget, a foszfatidilszerin kihelyeződést és a sejtmembrán károsodást. Sőt, sem a kaszpáz-függő, sem a kaszpáz-független STS vagy TRAIL indukálta DNS fragmentáció sem változott a PJ-34 alkalmazásával.

Ugyanakkor a másodlagos nekrosis megjelenését a PJ-34 koncentráció-függően gátolta, melyet a sejtmembrán károsodásának vizsgálatával igazoltunk. Továbbá a lizoszómális savas térfogó csökkenést is gátolta a PJ-34 STS kezelés esetén. Hasonló eredményeket kaptunk TRAIL esetén is, bár ott a savas térfogó veszteség TRAIL hatására csupán kismértékű volt.

Ezzel szemben az apoptotikus paraméterek, így a foszfatidilszerin kihelyeződés, a mitokondriális transzmembrán potenciál csökkenése és a DNS fragmentáció megjelenése STS vagy TRAIL kezelés hatására nem változott PJ-34 alkalmazásával.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PJ-34 késlelteti a másodlagos nekrosis megjelenését, de nem védi ki a kaszpáz-függő apoptózist. Eredményeink szerint a PARP1 enzimaktivitása közvetlenül és közvetetten befolyásolja a másodlagos nekrosis megjelenését, de aktivitása szükségtelen a STS vagy TRAIL indukálta nekroptózisban U937 sejtek esetén.

5. Következtetések

1.) Kimutattuk, hogy a TRAIL citokin, mely az apoptózis külső jelútvonalát aktiválja, kaszpázgátló körülmények között nekroptózist indukál U937 sejtekben, melynek lefutása RIPK1 és MLKL gátlásával felfüggeszthető.

2.) Igazoltuk, hogy a kinázgátló staurosporin, mely az apoptózis belső jelútvonalának aktivátora, szintén nekroptózist indukál kaszpázgátló körülmények között, melynek lefutása RIPK1 és MLKL gátlásával részben vagy teljesen felfüggeszthető.

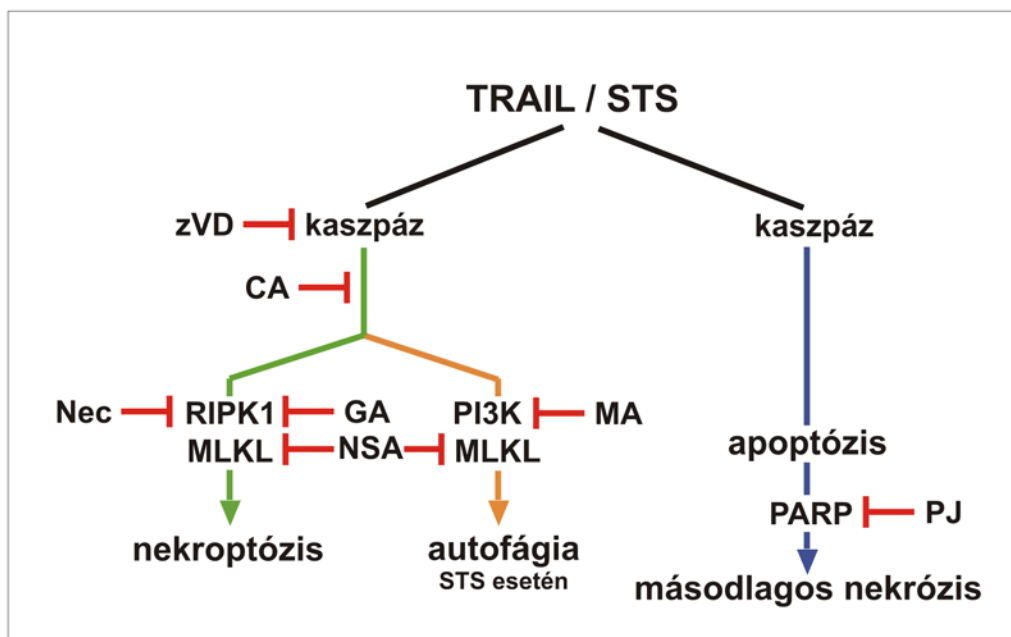
3.) Bizonyítottuk, hogy a staurosporin indukálta RIPK1-mediálta nekroptózis mellett autofágiaszerű folyamat is aktiválódik, mely gátolható a (III-as típusú) PI3K gátlásával. A RIPK1 és a

PI3K együttes gátlása additívan de nem szinergikusan csökkentette a sejtpusztulást, tehát az autofágia és a nekroptózis párhuzamosan zajlik U937 sejtekben.

5.) Kimutattuk, hogy a CA-074-OMe teljes mértékben gátolja a staurosporin és TRAIL indukálta nekroptózist U937 sejtekben, míg a staurosporin esetén a RIPK1 inhibitora csak részlegesen gátolja a folyamatot. *(Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy a CA-074-OMe target molekulája kulcsfontosságú szerepet tölt be a nekroptózis jelútvonalában.)*

6.) Igazoltuk, hogy U937 sejtekben sem az apoptózis, sem a nekroptózis nem befolyásolható PARP-1gátlók alkalmazásával. Ellenben bizonyítottuk, hogy a másodlagos nekrozis megjelenését a PJ-34 késlelteti, míg a necrostatin-1, a geldanamycin, a necrosulfonamide és a CA-074-OMe nem. *(Ezek az eredmények felhívják a figyelmet a PARPgátlók alkalmazásának esetleges lehetőségére pl. tumor lízis szindróma esetén, ha más daganatsejteken is igazolódik az eredményünk.)*

A folyamatábrán összefoglaltuk a gátlók hatásának pozícióját staurosporin és TRAIL indukálta sejtelhalási jelútvonalak esetén U937 sejtvonalon. Reméljük, hogy a bemutatott eredmények hozzájárulnak a nekroptózis molekuláris hátterének mélyebb megértéséhez.



Vázlatos ábra a TRAIL és staurosporin indukálta jelútvonalakról és résztvevőikről U937 sejtvonal esetén.

6. Saját publikációk

6. 1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1. **Dunai ZA**, Imre G, Barna G, Korcsmaros T, Petak I, Bauer PI, Mihalik R Staurosporine induces necroptotic cell death under caspase-compromised conditions in U937 cells. PLoS One 2012;7(7):e41945. Epub 2012 Jul 31. **IF: 4,092**

2. **Dunai ZA**, Bauer PI, Mihalik R Necroptosis: Biochemical, physiological and pathological aspects. Pathol Oncol Res. 2011 Dec;17(4):791-800. **IF: 1,366**

3. Imre G, **Dunai ZA**, Petak I, Mihalik R Cystein cathepsin and Hsp90 activities determine the balance between apoptotic and necrotic cell death pathways in caspase-compromised U937 cells. Biochim Biophys Acta. 2007 Oct;1773(10):1546-57. **IF: 4.374**

6. 2. A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

4. Stemmer U, **Dunai ZA**, Koller D, Purstinger G, Zenzmaier E, Deigner HP, Aflaki E, Kratky D, Hermetter A. Toxicity of oxidized phospholipids in cultured macrophages. Lipids Health Dis. 2012 Sep 7;11(1):110. **IF: 2,17**

5. Barna G, Sebestyén A, **Dunai ZA**, Csernus B, Mihalik R Heparin can liberate high molecular weight DNA from secondary necrotic cells. Cell Biol Int. 2012;36(12):1281-6. **IF: 1,482**

6. Fekete A, Kenesi E, Hunyadi-Gulyas E, Durgo H, Berko B, **Dunai ZA**, Bauer PI. The guanine-quadruplex structure in the human c-myc gene's promoter is converted into B-DNA form by the human poly(ADP-ribose)polymerase-1. PLoS One. 2012;7(8):e42690. **IF: 4,092**

7. Kun E, Mendeleyev J, Kirsten E, Hakam A, Kun AM, Fekete A, Bauer PI, **Dunai ZA**, Mihalik R. Regulation of malignant phenotype and bioenergetics by a π -electron donor-inducible mitochondrial MgATPase. Int J Mol Med. 2011 Feb;27(2):181-6. **IF: 1,573**