НЕКРОПТОЗА - МОЛЕКУЛЯРНИ МЕХАНИЗМИ И РОЛЯТА Й ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕНИТЕ ТУМОРИ

Надежда Стефанова¹, Мария Цанева², Калин Калчев¹, Маргарита Богданова³,
Иван Донеv³

¹Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология,
МУ-Варна

²Катедра по предклинични и клинични науки, МУ-Варна

³Катедра по пропедевтика на вътрешните болести, МУ-Варна

NECROPTOSIS – MOLECULAR MECHANISMS AND ITS ROLE IN MALIGNANT TUMORS

Nadezhda Stefanova¹, Maria Tsaneva², Kalin Kalchev¹, Margarita Bogdanova³,
Ivan Donev³

¹Department of General and Clinical Pathology, Forensic and Deontology,
Medical University of Varna

²Department of Preclinical and Clinical sciences, Medical University of Varna

³Department of Propedeutics of Internal Diseases, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Некроптоза е вид алтернативна клетъчна смърт, която се наблюдава при екстрацелуларна апоптоична стимулация в клетки с потисната апоптоза. Тя е важен и специфичен за гръбначните животни механизъм, възникнал, най-вероятно като допълнителна защита срещу имунни клетки и патогени, устойчиви на апоптоза. Двете форми на клетъчна смърт: некроптоза и апоптоза, се контролират от различни сигнални пътища, но имат общи инициатори като реактивни кислородни радикали (ROS), изчерпване на АТФ и ДНК-увреждащи агенти. Индуцирането на некроптоза може да бъде ефикасна терапевтична стратегия при лечението на злокачествени заболявания. По-детайлното проучване на сигналните пътища на некроптозата е от важно значение при определяне на таргетите на некроптозата и за създаването на нови противотуморни средства.

Ключови думи: некроптоза, туморогенеза, клетъчно оцеляване, лечение

ABSTRACT

Necroptosis is a type of alternative cell death which can be triggered by extracellular apoptotic stimulation in cells with suppressed apoptosis. It is an important and vertebrate-specific mechanism that has arisen most likely as an additional defense against immune cells and pathogens resistant to apoptosis. The two types of cell death: apoptosis and necroptosis are regulated by different signal pathways, but they have common inducers like reactive oxygen species (ROS), depletion of ATP and DNA-damaging agents. Induction of necroptosis can be an effective therapeutic strategy in the treatment of malignant tumors. A more detailed study is needed about the signal pathways in necroptosis, this will help determining the targets of necroptosis and creating new antitumor agents.

Keywords: necroptosis, tumorigenesis, cell survival, treatment

УВОД

През 2005 г. д-р Jun-Ying Yuan от Харвардския университет съобщава за нов тип некроза - некроптоза, която се наблюдава в клетки с потисната апоптоза, но с продължаваща екстрацелуларна апоптотична стимулация (Degterev A et al., 2005). Химичният агент Necrostatin-1 (NEC-1) потиска активността на рецептор взаимодействия протеин 1 (RIP1) и блокира некроптозата, което показва, че клетъчната смърт е молекулярно регулиран процес. Ултраструктурни промени като кондензация на хроматина, разрушаване на клетъчната мембрана и разрушаване на цитоплазмените компоненти се наблюдават при двата типа клетъчна смърт: апоптоза и некроза, и затова тази форма на клетъчна смърт е наречена некроптоза (**некроза + апоптоза**). По-късно се установява, че тя показва повече морфологични белези, характерни за некротичния тип клетъчна смърт (1).

Некроптозата и апоптозата се контролират от различни сигнални пътища, но те имат общи инициатори като реактивни кислородни радикали (ROS), изчерпване на АТФ с последваща дезинтеграция на клетката, която включва осмотичен оток, повишен лизозомален и клетъчно мембранен пермеабилитет (2).

Молекулярни механизми на некроптозата

След първото съобщение на д-р Jun-Ying Yuan са проведени много изследвания с цел изясняване причините за възникване на некроптозата и молекулярните ѝ механизми. Данните от литературата показват, че тя може да бъде индуцирана чрез суперфамилията рецептори на туморния некротичен фактор (TNF), Т-клетъчни рецептори, интерферонові рецептори, Toll-like рецептори, клетъчни метаболити, генотоксичен стрес или различни противотуморни съединения (3). Централна роля в инициране на некроптозата играе комплексът, известен като некрозома, която се състои от рецептор взаимодействия протеин киназа 1 (Receptor-interacting protein kinase 1, RIP1), рецептор взаимодействия протеин киназа 3 (Receptor-interacting protein kinase 3, RIP3) и смесената линия на киназия домейн-подобен протеин (Mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL). В некрозомата активният RIP1 е отговорен за фосфорилирането на RIP3, който в последствие фосфорилира и води до тримеризацията на MLKL. Хомотримерът MLKL се прехвърля върху плазмената мембрана, като предизвиква промяна в проницаемостта ѝ, т.нар. пермеабилитация (4), която се явява един от механизмите на протичане на некроптозата. Някои от индукто-

рите на некроптозата заобикалят RIP1 и директно активират RIP3 или MLKL (5).

Механизмите, регулиращи образуването и активиране на некрозомата, не са напълно изяснени. Негативните регулатори на некроптозата са два: Fas асоцииран протеин със смъртоносен домейн (Fas-associated protein with death domain, FADD) и каспаза-8, докато тяхното блокиране повишава чувствителността на клетките, експресиращи RIPK3 към некроптоза.

Некроптозата фармакологично може да бъде инхибирана от химични съединения като: NEC-1 (инхибитор на RIP1), GSK-843 GSK-872 и GSK-840 (RIP3 киназни инхибитори) и некросулфонамид (MLKL инхибитор) (2).

Повечето от съвременните познания за некроптозата се отнасят до тумор-некротизиращ фактор α (TNF- α) – индуцирана некроптоза. TNF- α се свързва с екстрацелуларната част на рецептора на TNF- α (TNFR1), което води до промени в интрацелуларната му част. Неактивните смъртоносни домейни на TNFR1 се освобождават от интрацелуларните му домейни с помощта на различни протеини и ензими. По-късно TNFR1 и TNFR2 иницират образуването на комплекс I с протеини, съдържащи смъртоносен домейн като TNF α рецептор асоцииран смъртоносен домейн (TNF α receptor-associated death domain, TRADD), RIP1, Fas асоцииран смъртоносен домейн (Fas-associated death domain, FADD) и няколко E3 убиквитин лигази, такива като TNF α рецептор асоцииран фактор 2/5 (TNF α receptor associated factor 2/5, TRAF2/5) и инхибитори на апоптозни протеини (inhibitor of apoptosis proteins, IAPs): cIAP1 и cIAP2 (6, 7). TRADD действа като адаптер при свързването на RIP1 към TNFR1. TRAF2/3/5 и cIAP се свързват последователно към некрозомата (8). При активиране на E3 убиквитин лигазата, TRAF2/5 и cIAP могат да убиквитинират RIP1. Последният от своя страна стабилизира RIP1-свързания с плазмената мембрана комплекс, който активира нуклеарния фактор κ B (Nuclear factor κ B, NF- κ B) и митоген-активирана протеин киназа и по този начин се стимулира клетъчното оцеляване. Убиквитинацията, която е ферментна посттранслационна модификация и представлява присъединяване на убиквитин към белтъчен субстрат, е важна за регулиране активността на комплекс I и влияе на по-нататъшния изход на клетката. Следователно комплексът I определя съдбата на клетката, клетъчно оцеляване или клетъчна смърт (9).

Активирането на некроптозата започва с деубиквитинация на RIP1 и други компоненти чрез

ензима cylindromatosis (продукт на ген *CYLD*), който отстранява убиквитиновите вериги от RIP1 и по този начин дестабилизира комплекс I (10). Деубиквитиновеният RIP1 се освобождава от комплекс I и се слива с FADD, TRADD, RIP3 и каспаза-8, формирайки комплекс II (11). Активната каспаза-8 може да разцепи и деактивира RIP1 и RIP3 и по този начин индуцира външния (екзогенен) път на апоптозата (12). При потиснатата каспаза-8 RIP1 и RIP3 остават активни и участват в образуването на некрозомата, която от своя страна поставя началото на поредица от сигнални каскади, които завършват с некроптоза. Независимо че RIP1 и RIP3 са ключови за формирането на комплекс I, при свръхекспресия на RIP3 некроптоза може да бъде предизвикана и без достатъчно количество на RIP1 (13). Установено е, че RIP3 активира поредица от сигнални пътища, по специално фосфорилация и активиране на MLKL сигналния път, който играе централна роля в осъществяването на некроптоза (14). Предполагат се два модела на функционирането на MLKL. Според първия модел локализацията на MLKL на клетъчната мембрана е от

съществено значение за инфлукса на Ca^{2+} , което е ранно събитие на TNF-индуцирана некроптоза (4). Съгласно втория модел фосфорилираният MLKL образува олигомер, който се свързва с фосфатидилинозитоловите липиди и кардиолипина, което позволява на MLKL да се премести от цитозола към плазмата и вътреклетъчните мембрани, където директно нарушава целостта им, което води до некроптоза (15). Има изследвания, които показват, че фосфоглицерат мутаза 5 води до митохондриално фрагментиране и може да е ключова молекула на MLKL при осъществяване на процеса на некроптоза (16). Други проучвания оспорват тази идея (17).

Механизмът на некроптозата е представен на Фигура 1.

Некроптозата, индуцирана освен от външния сигнал тип чрез TNF- α , може да бъде активирана и от вътрешен тип чрез реактивни кислородни радикали. Тя може да бъде предизвикана и от исхемия, за възникването на която се смята, че транслокацията на p53 играе важна роля (18). Механизмите на вътрешния тип на активация на

Фигура. 1 Молекулен механизъм на некроптозата, адаптирано по Z. Su (3)

некроптозата все още не са напълно изяснени и трябва да бъдат по-детайлно проучени.

Некроптоза при злокачествени заболявания

Некроптозата е важен и специфичен за гръбначните животни механизъм, който вероятно е възникнал като допълнителна защита срещу имунни клетки и патогени. Тя се появява по време на ранната фаза на клонална експанзия на Т-клетките, което показва, че този вид клетъчна смърт участва в регулирането на имунния отговор (19). Може да се разглежда като защитен срещу вируси механизъм, който позволява на клетката да претърпи „клетъчно самоубийство“ по начин, независим от каспазите. Устойчиви на апоптоза, вирус-инфектираните клетки претърпяват некроптоза, което показва, че тя е алтернативен механизъм на клетъчна смърт (20).

При острата лимфобластна левкемия (ALL) некроптоза може да бъде индуцирана с цел преодоляване на глюкокортикоидната резистентност на туморните клетки. В началната фаза на химиотерапията слабият отговор към глюкокортикоиди, т.е. резистентността е важен предиктивен фактор за неблагоприятно протичане на ALL при деца. Прилагането на obataclax mesylate, Bcl-2 антагонист и garapucisin върху човешки клетъчни култури от пациенти с ALL повишава активността на RIP1 и възстановява отговора към дексаметазон чрез индуциране на клетъчна смърт от некроптозен тип (21). Модулацията на регулаторите на клетъчната смърт е подходяща стратегия за предотвратяване на лекарствената резистентност. Некроптоза е наблюдавана при злокачествени тумори в отговор на няколко противотуморни модела на терапия (22, 23, 24, 25).

Изследванията през последните няколко години показват, че нарушенията в процеса на некроптоза и промени в гените, асоциирани с нея, са свързани с туморогенезата при злокачествените заболявания. Деубиквитирането на RIP1 от CYLD е важно за образуването на комплекс II, който определя формата на клетъчната смърт: апоптоза или некроптоза. Тумори с мутации в CYLD (C/S) [каталитично неактивна форма на CYLD, която прилича на откритите мутации на CYLD в човешки тумори] растат по-бързо, показват по-ниска диференциация, имат по-добре развита неоангиогенеза и в резултат са по-агресивни в сравнение с тези, при които липсва мутация (26). Инхибиторите на апоптозните протеини cIAP-1 и cIAP-2 подпомагат оцеляването на туморните клетки, функционирайки като E3 убиквитин лигази и по този начин те под-

държат постоянно убиквитиране на RIP1 адапторния протеин (27). cIAP-1 и cIAP-2 в туморните клетки директно убиквитинират RIP1, който в следствие се свързва с TAK1-киназа (киназа, свързана с оцеляването) и апоптозата се потиска (27). Имунохистохимичният анализ на cIAP-1 и cIAP-2 в материали от пикочен мехур показва, че експресията на двата инхибитора cIAP-1 и cIAP-2 е сигнификантно повишена при карцином на пикочния мехур в сравнение с нормалния уротел. Нуклеарната експресия на cIAP-1 силно корелира със стадия, степента на диференциация и възможността за рецидив при карцином на пикочния мехур, което означава, че cIAP-1 се явява прогностичен маркер при уротелния карцином (28). Подобна интензивна ядрена експресия на X-IAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein, известен още като inhibitor of apoptosis protein 3, IAP-3), cIAP-1 и cIAP-2 е установена при хроничната лимфоцитна левкемия (29, 30, 31, 32). От всичко това следва, че IAP молекулите могат да са потенциални кандидати за противотуморна терапия. В допълнение на това, полуубиквитинацията на RIP1 от TRAF2/TRAF5 на позиция K63 потиска TNF- α индуцираната некроптоза (33, 34), което предполага, че и TRAF може да бъде таргет за противотуморна терапия (35).

Некроптозата в туморните клетки може да се индуцира по различни начини. Прилагането на ДНК-увреждащи алкилиращи агенти (36), както и на фотодинамична терапия, при която се образуват фотосензитивни съединения, водят до генериране на свободни кислородни радикали в туморните клетки (37). Предполага се, че предизвикването на некроптоза в туморни клетки може да бъде от полза при лечението на злокачествените заболявания, които са резистентни към индуцираната от противотуморната терапия апоптоза. Според някои проучвания шиконин (shikonin), естествено срещащ се нафтохинон, който индуцира некроптоза, е в състояние да преодолее резистентността към противотуморни лекарства, медирирани от P-glycoprotein, Bcl-2 и Bcl-XL в туморни клетъчни линии (25).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данните от литературата показват, че индуцирането на некроптоза може да бъде ефикасна терапевтична стратегия при лечението на злокачествените заболявания. По-детайлното проучване на сигналните пътища на некроптозата е от важно значение при определяне на таргетите на некроптозата и за създаването на нови противотуморни средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Degterev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* 2008;4:313-21.
2. Jouan-Lanhuet S, Riquet F, Duprez L, Berghe TV, Takahashi N, Vandenabeele P. Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 35: 2-13.
3. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer* 2015; 14: 48.
4. Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang H-C, Choksi S, Liu J et al. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol* 2014; 16: 55-65.
5. Dillon CP, Weinlich R, Rodriguez DA, Cripps JG, Quarato G, Gurung P et al. RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase-8 and RIPK3. *Cell* 2014; 157: 1189-1202.
6. Welz PS, Wullaert A, Vlantis K, Kondylis V, Fernandez-Majada V, Ermolaeva M, Kirsch P, Sterner-Kock A, van Loo G, Pasparakis M. FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation. *Nature* 2011;477:330-4.
7. Han, J, Zhong CQ, Zhang DW. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat Immunol* 2011;12:1143-9.
8. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:700-14.
9. Oberst A, Dillon CP, Weinlich R, McCormick LL, Fitzgerald P, Pop C, Hakem R, Salvesen GS, Green DR. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP (L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* 2011;471:363-7.
10. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 2009;137:1112-23.
11. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhuet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:135-47.
12. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr Mol Med* 2014;8:207-20.
13. Dondelinger Y, Aguilera M, Goossens V, Dubuisson C, Grootjans S, Dejardin E, Vandenabeele P, Bertrand MJ. RIPK3 contributes to TNFR1-mediated RIPK1 kinase-dependent apoptosis in conditions of cIAP1/2 depletion or TAK1 kinase inhibition. *Cell Death Differ* 2013;20:1381-92.
14. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, Wang L, Yan J, Liu W, Lei X, Wang X. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* 2012;148:213-27.
15. Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang LF, Wang FS, and Wang X. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell* 2014;54:133-46.
16. Wang Z, Jiang H, Chen S, Du F, and Wang X. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell* 2012;148:228-43.
17. Feoktistova M, Geserick P, Kellert B, Dimitrova DP, Langlais C, Hupe M, Cain K, MacFarlane M, Hacker G, Leverkus M. cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol Cell* 2011;43:449-63.
18. Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* 2012;149:1536-48.
19. Osborn SL, Diehl G, Han SJ, Xue L, Kurd N, Hsieh K, et al. Fas-associated death domain (FADD) is a negative regulator of T-cell receptor-mediated necroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(29):13034-9.
20. Li M, Beg AA. Induction of necrotic-like cell death by tumor necrosis factor alpha and caspase inhibitors: novel mechanism

- for killing virus-infected cells. *J Virol.* 2000;74(16):7470–7.
21. Bonapace L, Bornhauser BC, Schmitz M, Cario G, Ziegler U, Niggli FK, et al. Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance. *J Clin Invest.* 2010;120(4):1310–23.
22. Horita H, Frankel AE, Thorburn A. Acute myeloid leukemia-targeted toxin activates both apoptotic and necroptotic death mechanisms. *PLoS One.* 2008;3(12):e3909.
23. Mantel F, Frey B, Haslinger S, Schildkopf P, Sieber R, Ott OJ, et al. Combination of ionising irradiation and hyperthermia activates programmed apoptotic and necrotic cell death pathways in human colorectal carcinoma cells. *Strahlenther Onkol Organ Dtsch Rontgengesellschaft.* 2010;186(11):587–99.
24. Zhang H, Zhong C, Shi L, Guo Y, Fan Z. Granulysin induces cathepsin B release from lysosomes of target tumor cells to attack mitochondria through processing of bid leading to Necroptosis. *J Immunol (Baltimore Md 1950).* 2009;182(11):6993–7000.
25. Han W, Li L, Qiu S, Lu Q, Pan Q, Gu Y, et al. Shikonin circumvents cancer drug resistance by induction of a necroptotic death. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(5):1641–9.
26. Alameda JP, Moreno-Maldonado R, Navarro M, Bravo A, Ramirez A, Page A, et al. An inactivating CYLD mutation promotes skin tumor progression by conferring enhanced proliferative, survival and angiogenic properties to epidermal cancer cells. *Oncogene.* 2010;29(50):6522–32.
27. Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreaault A, Durkin J, et al. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell.* 2008;30(6):689–700.
28. Che X, Yang D, Zong H, Wang J, Li X, Chen F, et al. Nuclear cIAP1 overexpression is a tumor stage- and grade-independent predictor of poor prognosis in human bladder cancer patients. *Urol Oncol.* 2012;30(4):450–6.
29. Munzert G, Kirchner D, Stobbe H, Bergmann L, Schmid RM, Döhner H, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of NF- κ B/Rel-regulated inhibitors of apoptosis. *Blood.* 2002;100(10):3749–56.
30. Byrd JC, Kitada S, Flinn IW, Aron JL, Pearson M, Lucas D, et al. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood.* 2002;99(3):1038–43.
31. Schliep S, Decker T, Schneller F, Wagner H, Hacker G. Functional evaluation of the role of inhibitor of apoptosis proteins in chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol.* 2004;32(6):556–62.
32. Loeder S, Zenz T, Schnaiter A, Mertens D, Winkler D, Döhner H, et al. A novel paradigm to trigger apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 2009;69(23):8977–86.
33. Varfolomeev E, Goncharov T, Fedorova AV, Dynek JN, Zobel K, Deshayes K, et al. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNF α)-induced NF- κ B activation. *J Biol Chem.* 2008;283(36):24295–9.
34. Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, Plenchette S, Simard C, Enwere E, et al. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF α -mediated NF- κ B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(33):11778–83.
35. Zheng M, Morgan-Lappe SE, Yang J, Bockbrader KM, Pamarthy D, Thomas D, et al. Growth inhibition and radiosensitization of glioblastoma and lung cancer cells by small interfering RNA silencing of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Cancer Res.* 2008;68(18):7570–8.
36. Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev.* 2004;18(11):1272–82.
37. Agostinis P, Buytaert E, Breyssens H, Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol.* 2004;3(8):721–9.

*Адрес за кореспонденция:
Надежда Стефанова
Катедра обща и клинична патология, съдебна
медицина и деонтология,
Факултет по медицина, МУ-Варна
e-mail: nadezhda_stefanova@yahoo.com*