

РОЛЯТА НА RIPK3 В ПРОЦЕСА НА НЕКРОПТОЗА ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕНИ ТУМОРИ

Невена Янулова

*Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология,
Факултет по медицина, Медицински университет – Варна*

THE ROLE OF RIPK3 IN THE PROCESS OF NECROPTOSIS IN MALIGNANT TUMORS

Nevena Yanulova

*Department of General and Clinical Pathology, Forensic Medicine and Deontology,
Faculty of Medicine, Medical University of Varna*

РЕЗЮМЕ

Некроптозата е алтернативна форма на регулирана клетъчна смърт, съчетаваща черти характерни както за процесите на апоптоза, така и за некроза. Има данни, че тя участва в регулирането на баланса на различни клетъчни линии и формиране на органите по време на ембрионалното развитие и в поддържане на тъканната хомеостаза при възрастни. Некроптозата играе съществена роля при редица болестни процеси като невродегенеративни заболявания, миокардната исхемия, болест на Гоше, както и в прогресията и метастазирането на редица злокачествени новообразувания. Процесът на некроптоза може да бъде активиран от различни стимули като TNF α , интерферон γ , липополизахариди и др. Рецептор-взаимодействащите протеини (RIPK) са серин/треонин кинази, известни като регулатори на клетъчното оцеляване и смърт. Същността на некроптозата се състои в образуването на некрозома, представена от RIPK1, RIPK3 и MLKL. Протуморните и анти-туморните функции на некроптозата са свързани със секреция на различни медиатори и инициране на възпалителна реакция. Изясняване на ролята на некроптоза при различните видове тумори би допринесло за получаване на ценна информация и увеличаване на възможностите за фармакологично повлияване на злокачествените тумори и преодоляване на случаите на терапевтична резистентност.

Ключови думи: некроптоза, RIPK1, RIPK3, злокачествени тумори

ABSTRACT

Necroptosis is an alternative form of regulated cell death, combining features that apply to both apoptosis and necrosis processes. There is evidence that it is involved in regulating the balance of various cell lineages, organ formation during embryonic development, and tissue homeostasis in adults. Necroptosis plays an essential role in a number of disease processes, such as neurodegenerative diseases, myocardial ischemia, Gaucher's disease, and the progression and metastasis of a number of malignant neoplasms. The process of necroptosis can be triggered by various stimuli such as TNF α , interferon γ , lipopolysaccharides, etc. Receptor-interacting proteins (RIPKs) are serine/threonine kinases known as regulators of cell survival and death. The essence of necroptosis is in the formation of a necrosome consisting of RIPK1, RIPK3, and MLKL. The protumor and antitumor functions of necroptosis are associated with the secretion of various mediators and the initiation of an inflammatory response. Clarifying the role of necroptosis in different types of tumors would contribute to obtaining valuable information, increasing the possibilities for pharmacological influence on malignant tumors, and addressing cases of therapeutic resistance.

Keywords: necroptosis, RIPK1, RIPK3, malignant tumors

ВЪВЕДЕНИЕ

Според морфологичните характеристики се различават три основни типа клетъчна смърт: некроза, апоптоза и автофагия (14). Апоптозата и автофагията се разглеждат като „програмирана клетъчна смърт“, докато некрозата се смята за „непрограмирана“ поради нарушена регулаторна активност (10). През последните години се натрупа информация за друг вид клетъчна смърт, която притежава черти характерни за апоптозата и некрозата, известна като некроптоза (8).

Некроптозата е форма на регулирана клетъчна смърт (8), която може да бъде активирана от лиганди за рецептори на смъртта и стимули, които предизвикват експресия на тези лиганди, в условия на дефицит на апоптоза (46). Рецепторите на смъртта (DR) са основни медиатори на клетъчната смърт (3) и представляват част от суперфамилията рецептори на тумор-некротичен фактор (TNFR) (34). Тумор некротичен фактор α (TNF α), интерферон γ , липополизахариди и други могат да активират процеса на некроптоза (5). Образоването на некротомата, която представлява комплекс, състоящ се от рецептор-взаимодействаща протеин киназа 1 и 3 (Receptor-interacting protein kinase - RIPK1; RIPK3) и смесена линия на киназен домейноподобен протеин (Mixed-lineage kinase domain-like; MLKL), стои в основата на този вид клетъчна смърт (33).

Съществуват данни, че некроптозата взема участие в процеси, осъществяващи се по време на ембрионалното развитие на плода. Според Shan et al. (2018) по време на интраутеринното развитие некроптозата може да се разглежда като защитен механизъм с цел елиминиране на непълноценни ембриони с тежки аномалии в развитието. Дефицитът на RIPK3 и на MLKL може да предотврати настъпването на ембрионална смърт, която е блокирана от мутации в множество гени по време на различни етапи от ембрионалното развитие (31).

Според някои данни некроптозата участва в регулиране на антиген-индуцираната пролиферация и оцеляване на Т клетките, необходими за поддържане на хомеостазата на периферните Т лимфоцити (32). При физиологични условия каспаза 8 спомага за оцеляването на активирани Т лимфоцити чрез потискане на некроптолитичния път. Взаимодействието на тези апоптолитични и некроптолитични пътища е критично за имунната толерантност, тъй като мишки с двоен дефицит, както на каспаза 8-RIPK1, така и на FADDdd-RIPK3 развиват лимфопролиферативно заболяване и натрупват автореактивни лимфоцити (32).

Некроптозата изглежда служи като резервен път за елиминиране на излишните Т лимфоцити, когато апоптозата, зависима от каспаза 8, е блокирана. Апоптозата и некроптозата трябва да бъдат строго регулирани, за да се поддържа имунната хомеостаза (32).

Процесът на некроптоза взема участие и при редица патологични състояния като миокардната исхемия (25), алкохолна чернодробна болест (29), болест на Гоше (38), както и при различни злокачествени новообразувания като карцином на гърда, колоректален карцином, остра миелоидна левкемия, плоскоклетъчен карцином на глава и шия, малигнен меланом, карцином стомаха и др. (24).

Механизми за осъществяване на TNF α -зависимата некроптоза

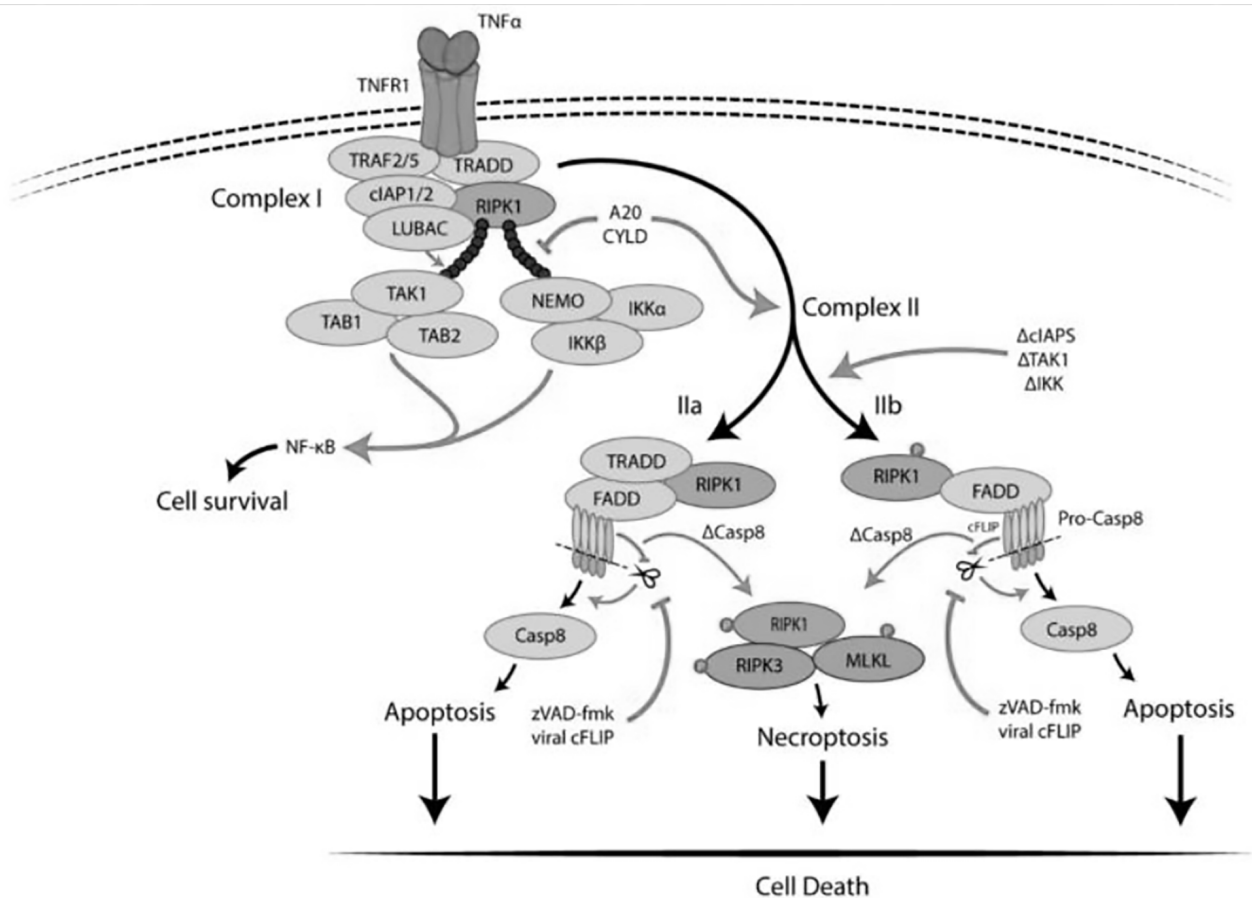
TNF α е важен провъзпалителен цитокин, който е асоцииран както с редица възпалителни заболявания, така и със злокачествени новообразувания (6). Активирането на TNFR1 от TNF α индуцира образуването на преходен комплекс, наречен комплекс I, след което TNFR1 претърпява структурна промяна (27). RIPK1, TNFR-асоцииран смъртен домейн (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein; TRADD), TNFR-асоцииран фактор 2 (TRAF2), TRAF5, E3 убиквитин лигаза клетъчен инхибитор на апоптоза 1 (cIAP1), cIAP2 и линейен убиквитин сглобяващ вериги комплекс (Linear ubiquitin chain assembly complex; LUBAC), представляват протеини, които вземат участие в този процес. Посредством домейни на смъртта TRADD взаимодейства с TNFR1 и предизвиква първоначалното предаване на сигнали (16). С помощта на директното медиращо действие на TRADD, TRAF2/5 взаимодейства с RIPK1. Последва свързване на E3 лигазите с RIPK1, опосредствано от TRAF2 (7). Настъпва убиквитиниране на K63 на RIPK1, което улеснява свързването на комплекса LUBAC. Този комплекс от своя страна извършва убиквитиниране тип M1 на RIPK1 и TNFR1 (9). Тази промяна в комплекс I (Фиг. 1) е важна за присъединяването на тримерния I κ B киназен комплекс (Inhibitor of the NF- κ B kinase; IKK) посредством полиубиквитин-свързваща адапторна субединица IKK γ (NEMO) (9).

Според Li H et al. (2006) съществено значение за образуване на комплекса на трансформиращ растежен фактор β -активирана киназа (Transforming growth factor-activated kinase complex; TAK), състоящ се от TAK1 и TAK1-свързващ протеин (TAK1-binding protein; TAB 1/2), има полиубиквитинирането на RIPK1.

Активирането на нуклеарната транслокация на NF-κB индуцира експресията на гени, предизвикващи имуен отговор и възпаление, но също така участва в няколко аспекта на туморогенезата като насърчаване пролиферацията на туморните клетки, предотвратяване на апоптозата и увеличаване на ангиогенния и метастатичен потенциал (17). Директното фосфорилиране на RIPK1 чрез IKKα/β предотвратява интегрирането на RIPK1 в комплекс IIb (комплекс, предизвикващ смърт) (11). По този начин, образуването на комплекс I съдейства за оцеляване на клетките чрез активиране на пътя NF-κB (6) (Фиг. 1).

функционални характеристики (26,44). Всички изпълняват важна роля в условия на клетъчен стрес, предизвикан от различни фактори като патогенни микроби, възпаление, процеси на клетъчна диференциация и увреда на ДНК. Въпреки че тези стимули са различни, те се конвертират, за да иницират сходни реакции, например активиране на транскрипционни фактори като NF-κB или активиращия фактор 1 (Activator protein 1; AP-1), в допълнение към стимулирането на клетъчната смърт (26).

Двата представителя на семейството, вземащи участие в TNF-зависимата некроптоза,



Фиг. 1. Пътища на TNFR1- медирано оцеляване и клетъчна смърт. Адаптирано от Chen J et al., 2019 (6).

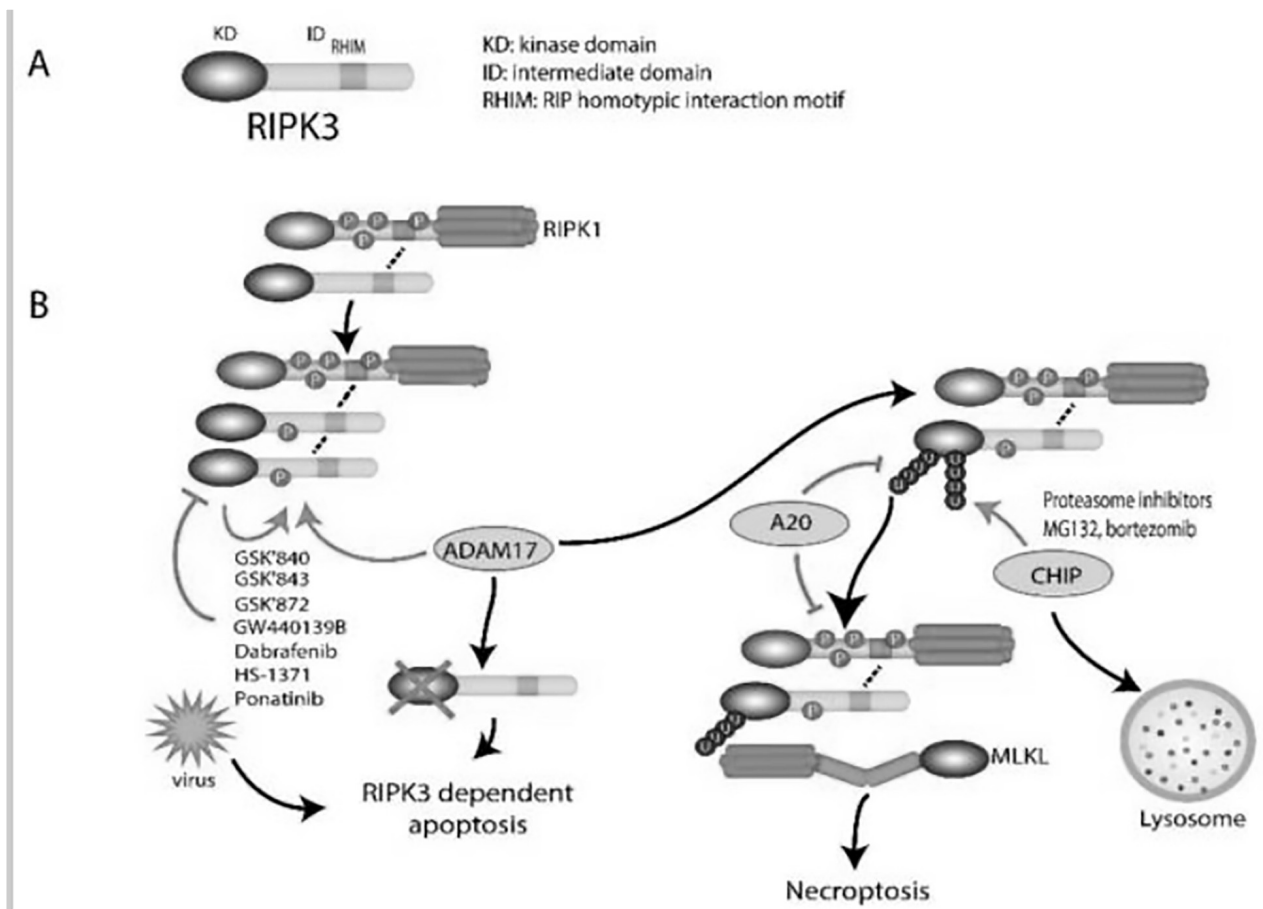
Характеристика на рецептор-взаимодействащите протеини и участието им в некроптозата

Рецептор-взаимодействащите протеини (RIP) са серин/треонин кинази, известни още като рецептор-взаимодействащите протеин кинази (RIPK). Семейството се състои от седем представителя, означавани като RIPK1 до RIPK7 (26). RIPK са регулатори на клетъчното оцеляване и клетъчната смърт. Те споделят не само общи структурни прилики, като присъствие на хо-моложен киназен домейн, но също така и общи

са RIPK1 и RIPK3 (Фиг. 1). Първият идентифициран представител е RIPK1, открит е в дрожди и има размери от 74-kDa (35). RIPK1 съдържа N-терминален киназен домейн, последван от интермедиерен домейн и C-терминален домейн на смъртта (12). Генът, който го кодира, е локализиран в 6p25.2 (26), а RIPK3 е локализиран в хромозома 14q11.2, като съдържа 10 екзона и обхваща около 40 kb от геномната ДНК (18). RIPK3 съдържа N-терминален киназен домейн, последван от интермедиерен домейн, съдържащ мотива RHIM (Receptor-Interacting Protein Homotypic

Interaction Motif), както RIPK1, но за разлика от него, RIPK3 няма C-терминален домейн на смъртта (44) (Фиг. 2).

ция RHIM домейн, за да участват в образуването на некрозомата (15,43) с последваща некроптоза. Некрозомата се състои от RIPK1, RIPK3 и



Фиг. 2. RIPK3-медирана некроптоза. Адаптирано от Chen J et al., 2019 (6)

Преходът на комплекс I към комплекс II се регулира чрез полиубиквитиниране на RIPK1. Ензимите цилиндроматоза (Cylindromatosis; CYLD) и тумор некрозис фактор, алфа-индуциран протеин 3 (A20) имат роля в регулирането и образуването на комплекс II (1). Комплекс II съществува в две различни форми: IIa и IIb в зависимост от протеиновия състав и активността (6). Комплекс IIa се състои от TRADD, RIPK1, FADD и каспаза-8, докато в комплекс IIb TRADD липсва (Фиг. 1). Установено е, че при стимулиране на TNF α комплекс IIa се образува след дисоциация на TRADD и RIPK1 от TNFR1, с участието на ензими като CYLD и A20 (40,1), а това води до набиране на FADD и прокаспаза-8 и последващо активиране на каспаза-8 посредством разцепването ѝ (27,40).

Активната каспаза-8 може да разцепи и инактивира RIPK1 и RIPK3, като по този начин активира екзогенния път на апоптозата (13,15). Ако каспаза-8 е инхибирана, RIPK1 и RIPK3 ще останат активни и ще се комбинират заедно от об-

MLKL (Фиг. 1).

Образуването на началния хетеродимер на RIPK1 и RIPK3 съсредоточава повече RIPK3 и индуцира хомодимеризация на RIPK3, което води до неговото автофосфорилиране и активиране (6). Фосфорилиране на RIPK3 при Ser227 (Thr231/Ser232 за миши RIPK3) играе решаваща роля за натрупването и активирането на неговия субстрат надолу по веригата - MLKL. Активността на RIPK3 се контролира също и от фосфорилирането му (6). Фосфорилираният RIPK3 фосфорилира MLKL, което в крайна сметка води до клетъчна смърт (6). Съществуват данни, че металопротеаза 17 (ADAM17) има съществено значение в процеса на фосфорилиране (Фиг. 2), като тя може да окаже влияние върху RIPK3, а от там и на последващата некроптоза. Seo et al. (2016) изучават влиянието на Hsc70-взаимодействащ протеин (CHIP) върху RIPK3. Установяват, че CHIP-медираната убиквитинация на RIPK3 води до лизозомното му разграждане (Фиг. 2). По техни данни потискането на експресията на CHIP от

генетична делеция или от siRNA медиран нокдаун повишава нивата на RIPK1 и RIPK3, което допринася за засилена некроптоза. Потвърждава се основната роля на CHIP в образуването на некрозомата и чувствителността към TNF-медирана некроптоза (30).

MLKL, намиращ се в комплекс Па (Фиг. 1), е псевдокиназа, която има С-терминален псевдокиназен домейн и N-терминален край с четири спирали (28). От съществено значение за осъществяване на некроптозата са олигомеризацията, фосфорилирането и мембранната транслокация на MLKL (37), след настъпването на които MLKL може да образува пори в плазмената мембрана и да я разруши (6). MLKL може да бъде фосфорилиран от RIPK3 при Thr-357 и Ser-358 при хора (36) и при Ser-345, Ser-347 и Thr-349 при мишки (28).

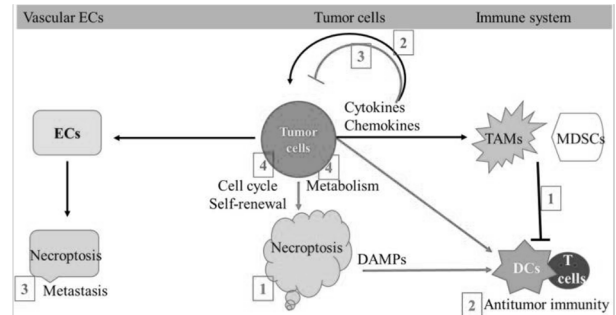
Механизми на действие на RIPK3 при туморния растеж и прогресия

Известно е, че избягването на апоптозата е отличителен белег при редица злокачествени заболявания. През последните години се откри, че туморните клетки освен към апоптозата са резистентни и към друга форма на клетъчна смърт - некроптозата (22).

Установени са няколко механизма, чрез които RIPK3 сигналния път потиска развитието на туморите: 1) смърт на туморните клетки чрез некроптоза; 2) инициране на Т-клетъчно медиран имунен надзор на неоплазмите; 3) секретирание на тумор-инхибиращи цитокини и 4) ограничаване развитието на тумора чрез активиране на митохондриалния метаболизъм и производство на реактивни кислородни съединения (22). Оказва се, че RIPK3 участва също и в процесите на растеж и прогресия на туморите. Досега са установени четири основни механизма, чрез които RIPK3 стимулира неопластичния растеж: 1) чрез индуциране образуването на имунорепресивни миелоидни клетки като миелоидни супресорни клетки (MDSCs) и тумор асоциирани макрофаги (TAMs), които спомагат на туморните клетки да избегнат туморния надзор; 2) чрез секретирание на стимулиращи тумора цитокини и индуциране на стимулираща тумора среда и ангиогенеза; 3) чрез индуциране на ендотелна клетъчна смърт и спомагане за туморното метастазирание и 4) чрез получаване на сигнали за клетъчно самообновяване и активиране на клетъчната пролиферация (22).

Некроптозата и апоптозата играят важна роля в биологията на туморните процеси. За разлика от апоптозата, която не предизвиква имунен от-

говор, некроптотичните клетки индуцират значителен антитуморен имунен отговор чрез активиране на дендритни клетки, които стимулират антитуморните Т лимфоцити (Фиг. 3).



Фиг. 3. Сигнализиране при тумор промотираща и тумор репресивна функция на RIPK3. Адаптирано от Liu S et al., 2021 (22).

В допълнение некроптотичните клетки стимулират също възпалителна реакция в туморната тъкан чрез освобождаване на цитокини (22). Протуморните и антитуморни функции, свързани с RIPK3 сигналния път, зависят главно от баланса между произведените цитокини и хемокини, което е установено при някои модели на злокачествени тумори. Възпалителната реакция може да подобри или да потисне антитуморната среда. RIPK3 сигнализирането стимулира митохондриалното окислително фосфорилиране и други клетъчни дейности (22). Всички тези функции на RIPK3 показват сложната му роля в патогенезата на различни видове неоплазми. Има данни, че RIPK3 сигналният път има роля, както в инхибиране на туморното развитие, така и за неговото стимулиране (22).

Роля на некроптозата за туморния растеж и прогресия

Редица изследователи анализират и определят ролята на RIPK3 при различни злокачествени заболявания при човека. Според данните на Koo et al. (2015) и Yang et al. (2017) поради геномно метилиране експресията на маркера за некроптоза RIP3 е потисната при по-голяма част от злокачествени неоплазми. Няколко години по-късно Zhao et al. (2021) сравняват имунохистохимичната експресия на RIPK3 между нормална дебелочревна лигавица и колоректален карцином. Те установяват значително по-ниски нива на експресия на маркера в туморната тъкан при всички стадии на колоректалния карцином (T1-4) в сравнение с нетуморната тъкан. Експресията на RIPK3 е по-ниска при метастатичните тумори в сравнение с нормалната тъкан. Анализът на общата преживяемост в зависимост от експресия-

та на маркера показва, че тя е значително по-висока при пациенти с висока експресия на RIPK3 отколкото при пациенти с намалена експресия. Получените данни са в подкрепа на супресорната роля на RIPK3 в туморогенезата при колоректален карцином (45).

Стефанова, Н. (2017) анализира имунохистохимично цитоплазмената и нуклеарната експресия на RIPK3 при 81 случая на колоректален карцином. Тя установява висока цитоплазмена експресия при неоплазми, които показват предимно експанзивен туморен растеж и слаба имунна реакция. Данните относно нуклеарната експресия на RIPK3 се различават от тези на цитоплазмената експресия относно имунната реакция. Високата ядрена експресия корелира със силно изразена имунна реакция. Според автора (47), високата цитоплазмена експресия инхибира имунната реакция в туморната тъкан, докато нуклеарната я стимулира.

Комплексната оценка на цитоплазмената експресия върху общата преживяемост във връзка с клинично-морфологичните параметри показва, че високата цитоплазмена RIPK3 експресия се асоциира освен със слабо изразена имунна реакция и с ниска степен на диференциация и води до ниска преживяемост при пациентите с колоректален карцином (48).

При панкреатичен карцином при човек RIPK3 и MLKL, анализирани имунохистохимично и чрез Western blot, показват по-интензивна експресия в туморната в сравнение с нормалната тъкан. Особено интензивна е експресията на MLKL в инвазивния фронт на тумора (2). Чрез TNF- α авторите (2) успяват да индуцират некроптоза върху панкреатичната клетъчна линия AsPS-1. Редица клетки като макрофаги, адипоцити и фибробласти в микросредата на панкреатичен карцином секретират TNF- α , който индуцира некроптоза при висока експресия на MLKL (4). Индукцията на некроптоза на клетъчни панкреатични туморни линии чрез комбинация от човешки рекомбинантен TNF- α , SMAC миметик и zVAD-FMK (TSZ) стимулира миграцията и инвазията на туморните клетки (2).

Медиаторът на некроптоза RIPK3, изследван имунохистохимично при простатен карцином, показва по-интензивна нуклеарна експресия в сравнение с нуклеарната експресия на жлезите с простатна интраепителна неоплазия (PIN), като нуклеарната експресия при нетуморните жлези е най-ниска (47). Нуклеарната експресия намалява с увеличаване на туморния стадий, като най-висока е експресията на RIPK3 в стадий T1,

а най-ниска - в стадий T4. Според автора ниската нуклеарна експресия на маркера на некроптоза е лош прогностичен белег.

Wang et al. (2020) изследват RIPK3 в клетките на простатния карцином чрез прилагане на различни методи: Western blotting, QRT-PCR и имунохистохимичен анализ при човек и модел на *vivo nude mice*. Намалена експресия на RIPK3 се открива както при клетъчните линии от карцином на простатната жлеза, така и в тъканните проби от човешки простатен карцином. Авторите установяват, че свръхекспресията на RIPK3 потиска миграцията и инвазията на туморните клетки на простатния карцином. Ниската експресия на RIPK3 е свързана с ниска преживяемост на пациентите с простатен карцином.

Интерес представлява изследването на Kim et al. (2020), които оценяват прогностичната стойност на експресията на RIPK3 и CHIP при 404-ма пациенти с недребноклетъчен карцином на бял дроб. Нивата на експресия на CHIP и RIPK3 корелират различно с продължителността на живот. Експресията на CHIP е асоциирана с по-добра обща преживяемост, докато експресията на RIPK3 с по-лоша. Анализът на експресията на RIPK3 в зависимост от адювантната терапия показва, че високата експресия на RIPK3 се свързва с по-лоша обща преживяемост и преживяемост без заболяване при пациентите реципиенти на адювантна лъчетерапия в сравнение с не реципиентите. Авторите предполагат, че некроптоза може да доведе до резистентност към лъчетерапията. На база на получените резултати Kim et al. (2020) обобщават, че при пациенти с недребноклетъчен карцином на бял дроб експресията на CHIP е независим благоприятен прогностичен фактор, докато експресията на RIPK3 не е.

Според данни от проучването на Стоева (2022) в туморната тъкан на мамарен карцином експресията на RIPK3 е цитоплазмена и ядрена, като цитоплазмената експресия в туморите е по-ниска в сравнение с контролната група, представена от фиброкистична болест от пролиферативен и непролиферативен тип. Ядрената позитивност е по-висока в туморната тъкан в сравнение с контролната група. Анализирайки зависимостта между експресията на RIPK3 и хистологичния субтип, както и с рецепторния статус, се установява по-висока цитоплазмена експресия при лобуларния карцином в сравнение с инвазивния карцином от неспециален тип, а най-ниска е експресията на маркера при тройно негативните тумори. Според резултатите от изследването (49) цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната

тъкан на мамарния карцином не показва зависимост от възрастта на пациентите, Т-стадия, степента на разпространение на тумора (т.е. от присъствието на метастази), HER2 статуса на тумора и не е асоциирана с преживяемостта на пациентите. Стойностите на експресия на анти тялото при високо диференцираните мамарни карциноми е по-висока спрямо туморите с ниска степен на диференциация. При отчитане на ядрената експресия на RIPK3 е установено, че тя не показва зависимост от възрастта на пациентите, хистологичния тип на карцинома, Т-стадия и степента на диференциация на тумора. При висока ядрена експресия на RIPK3 в туморните клетки съществува голяма вероятност туморът да има метастази в лимфните възли (49).

Won K et al. (2021) изследват тъканни проби от 257 пациенти с карцином на гърдата и установяват високи нива на експресия на RIPK3 при 43,2% и ниски нива при 56,8% от пациентите. Пациентите с ниска експресия на RIPK3 имат големи размери на тумора. Относителният дял на пациентите в стадий Т3–4 е 7,5% в групата с ниски стойности на RIPK3 и 1,8% в групата с високи стойности на RIPK3. В групата с нисък RIPK3 нуклеарният грейд е висок и има тенденция за ангажиране на по-голям брой регионални лимфни възли. Пациентите с ниска експресия на RIPK3 имат по-ниска обща преживяемост и преживяемост без заболяване в сравнение с тези с висока експресия и разликата е статистически значима. Според авторите (41) експресията на RIPK3 е независим прогностичен фактор за преживяемост на пациентите с карцином на гърдата.

Има изследванията върху някои мамарни карциномни клетъчни линии, при които изключването на гени като RIPK1, RIPK3 или MLKL в туморните клетки значително намалява тяхната способност за растеж и адхезия и изглежда повишава чувствителността им към лъчетерапия (23).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Некроптозата е форма на регулирана клетъчна некроза, за която се натрупват все повече данни в литературата, че взема участие при редица възпалителни заболявания и злокачествени новообразувания. Изследването на нейната роля в развитието, прогресията и метастазирането при различни видове неоплазми представлява все по-голям научен интерес. Изучаването на механизмите, чрез които се осъществява, както и възможните пътища за манипулирането им ще предостави нови възможности за терапевтично повлияване при редица тумори.

Благодарности

Статията е резултат на изследванията по проект № 21002, извършени в рамките на научноизследователската дейност към МУ-Варна, финансирана целево от държавния бюджет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Amin P, Florez M, Najafov A, Pan H, Geng J, Ofengeim D et al. Regulation of a distinct activated RIPK1 intermediate bridging complex I and complex II in TNF α -mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2018; 115:E5944–E5953.
2. Ando Y, Ohuchida K, Otsubo Y, Kibe S, Takesue S, Abe T et al. Necroptosis in pancreatic cancer promotes cancer cell migration and invasion by release of CXCL5. *PLoS ONE*. 2020;15:e0228015.
3. Ashkenazi A, Dixit V. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 28;281(5381):1305-8.
4. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 2001; 11: 372–377.
5. Chan F, Luz N, Moriwaki K. Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2015; 33, 79–106.
6. Chen J, Kos R, Garssen J and Redegeld F. Molecular Insights into the Mechanism of Necroptosis: The Necrosome as a Potential Therapeutic Target. *Cells*. 2019; 8, 1486.
7. Csomos R, Brady G, Duckett C. Enhanced cytoprotective effects of the inhibitor of apoptosis protein cellular IAP1 through stabilization with TRAF2. *J Biol Chem*. 2009; 284, 20531–20539.
8. Degtarev A, Huang, Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*. 2005;1:112–119.
9. Degtarev A, Ofengeim D and Yuan J. Targeting RIPK1 for the treatment of human diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019; 116(20):9714-9722.
10. Dhuriya Y, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation*. 2018; 199.
11. Dondelinger Y, Jouan-Lanhouet S, Divert T, Theatre E, Bertin J, Gough P et al. NF-kappaB-Independent Role of IKK α /IKK β in Preventing RIPK1 Kinase-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cell Death during TNF Signaling. *Mol Cell*. 2015; 60, 63–76.
12. Duprez L, Bertrand M, Vanden Berghe T, Dondelinger Y, Festjens N, Vandenabeele P. Intermediate domain of receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) determines

- switch between necroptosis and RIPK1 kinase-dependent apoptosis. *J Biol Chem.* 2012;287:14863–14872.
13. Feng S, Yang Y, Mei Y, Ma L, Zhu D, Hoti N et al. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cell Signal.* 2007; 19, 2056–2067.
 14. Galluzzi L, Maiuri M, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L et al. Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007;14:1237–1243.
 15. He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell.* 2009; 137, 1100–1111.
 16. Hsu H, Huang J, Shu H, Baichwal V, Goeddel D. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity.* 1996;4:387–396.
 17. Karin M, Cao Y, Greten F, Li ZW. NF- κ B in cancer: From innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2, 301–310.
 18. Kasof G, Prosser J, Liu D, Lorenzi M, Gomes B. The RIP-like kinase, RIP3, induces apoptosis and NF- κ B nuclear translocation and localizes to mitochondria. *FEBS Letters.* 2000; 3: 285-291.
 19. Kim J, Chung J-Y, Park Y, Jang S, Kim H, Choi C-M et al. Prognostic Significance of CHIP and RIPK3 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 2020; 12(6): 1496.
 20. Koo G, Morgan M, Lee D, Kim W, Yoon J, Koo J et al. Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. *Cell Res.* 2015; 25(6):707–725.
 21. Li H, Kobayashi M, Blonska M, You Y, Lin X. Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 2006; 281, 13636–13643.
 22. Liu S, Joshi K, Denning M, Zhang J. RIPK3 signaling and its role in the pathogenesis of cancers. *Cell Mol Life Sci.* 2021; 78(23): 7199–7217.
 23. Liu X, Zhou M, Mei L, Ruan J, Hu Q, Peng J et al. Key roles of necroptotic factors in promoting tumor growth. *Oncotarget.* 2016; 7(16):22219–22233.
 24. Liu X, Xie X, Ren Y, Shao Z, Zhang N, Li L et al. The role of necroptosis in disease and treatment. *MedComm.* 2021; 2(4): 730–755.
 25. Luedde M, Lutz M, Carter N, Sosna J, Jacoby C, Vucur M et al. RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2014; 103(2):206-16.
 26. Meylan E, Tschopp J. The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(3):151-9.
 27. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 2003; 114, 181–190.
 28. Murphy J, Czabotar P, Hildebrand J, Lucet I, Zhang J-G, Alvarez-Diaz S et al. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity.* 2013;39:443–53.
 29. Roychowdhury S, McMullen M, Pisano S, Liu X, Nagy L. Absence of receptor interacting protein kinase 3 prevents ethanol-induced liver injury. *Hepatology.* 2013; 57: 1773-1783.
 30. Seo J, Lee E, Sung H, Seong D, Dondelinger Y, Shin J et al. CHIP controls necroptosis through ubiquitylation- and lysosome-dependent degradation of RIPK3. *Nat Cell Biol.* 2016;18:291–302.
 31. Shan B, Pan H, Najafov A and Yuan J. Necroptosis in development and diseases. *Genes & Dev.* 2018; 32: 327-340.
 32. Sikora E. Activation-induced and damage-induced cell death in aging human T cells. *Science Direct.* 2015; 151:85-92.
 33. Silke J, Rickard J, Gerlic M. The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation. *Nat. Immunol.* 2015; 16, 689–697.
 34. Smith C, Farrah T, Goodwin R. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation and death. *Cell.* 1994;76, 959 - 962.
 35. Stanger B, Leder P, Lee T, Kim E, Seed B. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell.* 1995; 81: 513-523.
 36. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell.* 2012; 148: 213–227.
 37. Tanzer M, Tripaydonis A, Webb A, Young S, Varghese L, Hall C et al. Necroptosis signalling is tuned by phosphorylation of MLKL residues outside the pseudokinase domain activation loop. *Biochem. J.* 2015;471:255–265.
 38. Vitner E, Salomon P, Farfel-Becker T, Meshcheriakova A, Ali M, Klein A et al. RIPK3 as a potential therapeutic target for Gaucher's disease. *Nat Med.* 2014; 20: 204-208.
 39. Wang K, Wang K-Y, Zhang H-Z, Meng X-Y, Chen J-F, Wang P. Up-Regulation of RIP3 Alleviates Prostate Cancer Progression by Activation of RIP3/MLKL Signaling Pathway and Induction of Necroptosis. *Front Oncol.* 2020; 10: 1720.
 40. Wang L, Du F, Wang X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell.* 2008; 133: 693–703.

41. Won K, Min S, Song J, Lim S and Han S-A. Clinical Significance of Receptor-Interacting Protein 3 and Parkin, Essential Molecules for Necroptosis, in Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2021; 24(1): 34–48.
42. Yang C, Li J, Yu L, Zhang Z, Xu F, Jiang L et al. Regulation of RIP3 by the transcription factor Sp1 and the epigenetic regulator UHRF1 modulates cancer cell necroptosis. *Cell Death Dis*. 2017; 8(10):e3084.
43. Yang ZH, Wu XN, He P, Wang X, Wu J, Ai T et al. A non-canonical PDK1-RSK signal diminishes pro-caspase-8-mediated necroptosis blockade. *Mol Cell*. 2020;80:296–10.e296.
44. Zhang D, Lin J, Han J. Receptor-interacting protein (RIP) kinase family. *Cell Mol Immunol*. 2010;7:243–249.
45. Zhao Q, Guo J, Cheng X, Liao Y, Bi Y, Gong Y et al. RIPK3 Suppresses the Progression of Spontaneous Intestinal Tumorigenesis. *Front Oncol*. 2021; 11: 664927.
46. Zhou W and Juan J. Necroptosis in health and diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014; (35):14-23.
47. Калчев, К. Експресия на маркер за некроптоза RIP3 в случаи на простатен карцином. Варна; 2020.
48. Стефанова, Н. Експресия на маркери за автофагия и некроптоза при дебелочревен карцином. Варна; 2017.
49. Стоева, М. Имунохистохимична експресия на маркера за некроптоза RIPK3 при карцином на млечната жлеза. Варна; 2022.

Адрес за кореспонденция:

Невена Янулова
Клиника по обща и клинична патология
бул. „Христо Смирненски“ 1
Варна, 9010
e-mail: nevena.yanulova@abv.bg