

Received: 2014.12.29  
Accepted: 2015.08.25  
Published: 2015.12.16

## Zaprogramowana martwica i nekroptoza – mechanizmy molekularne

### Programmed necrosis and necroptosis – molecular mechanisms

Agata Giżycka<sup>1</sup>, Piotr Kopiński<sup>2</sup>, Joanna Chorostowska-Wynimko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Genoterapii, Collegium Medicum Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Bydgoszcz

#### Streszczenie

Badania nad zaprogramowaną martwicą dowiodły jej roli w rozwoju i homeostazie organizmu. Fizjologiczna funkcja martwicy warunkuje prawidłowe działanie układu immunologicznego, jest też mechanizmem śmierci komórek o obniżonej gotowości apoptotycznej, w tym komórek nowotworowych. Coraz częściej wskazuje się na jej znaczącą rolę w patogenezie wielu chorób. Podważono pogląd, że martwica jest procesem biernym, patologicznym i niezależnym od genów, jednak wiedza o jej mechanizmach molekularnych jest wciąż niepełna. Przyczyną jest mnogość i złożoność szlaków wyzwalających, brak swoistych markerów identyfikujących komórki umierające w mechanizmie martwicy i nieprecyzyjna nomenklatura.

W pracy omówiono stan wiedzy o mechanizmach molekularnych powodujących zaprogramowaną martwicę, a zwłaszcza jej swoistą i częstą odmianę - nekroptozę. Podsumowano rolę kinaz RIP1 i RIP3 w nekroptozie. Zwrócono uwagę na odmienne skutki ligacji czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$  do jego receptora, TNFR1, tj. przeżycie, apoptozę lub nekroptozę.

Słowa kluczowe:

zaprogramowana nekroza • nekroptoza • śmierć komórki • szlaki molekularne

#### Summary

Programmed necrosis has been proven vital for organism development and homeostasis maintenance. Its regulatory effects on functional activity of the immune system, as well as on pathways regulating the death mechanisms in cells with diminished apoptotic activity, including malignant cells, have been confirmed. There is also increasing evidence indicating necrosis involvement in many human pathologies. Contrary to previous beliefs, necrosis is not only a passive, pathological, gene-independent process. However, the current knowledge regarding molecular regulation of programmed necrosis is scarce. In part this is due to the multiplicity and complexity of signaling pathways involved in programmed necrosis, as well as the absence of specific cellular markers identifying this process, but also the ambiguous and imprecise international terminology. This review presents the current state of the art on molecular mechanisms of programmed necrosis. In particular, its specific and frequent form, necroptosis, is discussed. The role of RIP1 and RIP3 kinases in this process is presented, as well as the diverse pathways induced by ligation of tumor necrosis factor  $\alpha$ , to its receptor, TNFR1, i.e. cell survival, apoptosis or necroptosis.

Key words:

programmed necrosis • necroptosis • cell death • molecular pathways

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1186337>

**Word count:** 3610

**Tables:** –

**Figures:** 3

**References:** 71

**Adres autorki:** mgr Agata Giżycka, Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa; e-mail: [agatagiżycka@o2.pl](mailto:agatagiżycka@o2.pl)

**Wykaz skrótów:** **AIF** - czynnik indukujący apoptozę (apoptosis inducing factor), **BAD** - białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-only (BCL-2 associated antagonist of cell death), **BAK** - białko proapoptotyczne z podrodziny BAX (BCL-2 antagonist killer 1), **BAX** - białko proapoptotyczne z podrodziny BAX (BCL-2 associated X protein), **BCL-2** - białko antyapoptotyczne podrodziny BCL-2 (B-cell lymphoma protein 2), **BID** - białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-only (BH3 interacting domain death antagonist), **BIM** - białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-only (BCL-2 interacting mediator of cell death), **BH3-only** - rodzina białek proapoptotycznych, **CARD** - domena rekrutująca kaspazy (caspase recruitment domain), **CYLD** - deubikwitynaza (cylindromatosis (turban tumor syndrome)), **DD** - domena śmierci (death domain), **DED** - domena efektorowa śmierci (death effector domain), **DISC** - kompleks sygnałowy indukujący śmierć komórki (death inducing signaling complex), **DR** - receptor śmierci (death receptor), **FADD** - białko adaptorowe FADD (Fas-associated death domain protein), **FAK** - kinaza ogniskowo-adhezyjna (focal adhesion kinase), **Fas** - receptor śmierci Fas (Fas cell surface death receptor), **FasL** - ligand receptora Fas (Fas ligand (TNF superfamily, member 6)), **FSC** - parametr FSC (forward scatter) - w badaniu cytometrycznym informuje o wielkości komórki, **IKK** - kinaza inhibitora  $\kappa$ B (I kappa B kinase), **NCCD** - Komitet do spraw Nazewnictwa Śmierci Komórkowej (Nomenclature Committee on Cell Death), **Nec1** - nekrostatyna 1 (necrostatin 1), **NF- $\kappa$ B** - jądrowy czynnik transkrypcyjny  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), **MOMP** - permeabilizacja zewnętrznej błony mitochondrium (mitochondrial outer membrane permeabilization), **PARP-1** - polimeraza poli-ADP-rybozy (poly(ADP-ribose) polymerase 1), **PUMA** - białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-only (p53 up-regulated modulator of apoptosis), **RIP1** - kinaza RIP1 (receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1), **RIP3** - kinaza RIP3 (receptor-interacting serine-threonine kinase 3), **RNS** - reaktywne formy azotu (reactive nitrogen species), **ROS** - reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species), **SSC** - parametr SSC (side scatter) - w badaniu cytometrycznym informuje o ziarnistości komórek, **tBID** - skrótowa postać BID (truncated BID), **TNF- $\alpha$**  - czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), **TNFR1** - receptor typu 1 dla TNF (tumor necrosis factor receptor 1), **TRADD** - białko adaptorowe TRADD (TNFR1-associated death domain protein), **TRAIL** - ligand związany z czynnikiem martwicy nowotworu indukujący apoptozę (TNF-related apoptosis-inducing ligand), **TRAF2** - białko adaptorowe TRAF2, czynnik 2 związany z receptorem TNF (TNF receptor associated factor 2), **TUNEL** - metoda detekcji degradacji DNA (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay).

## WPROWADZENIE

Opublikowane niedawno prace nad mechanizmami śmierci komórkowej doprowadziły do zachwiania uznanego paradygmatu, w myśl którego komórka ludzka umiera w procesie apoptozy albo martwicy (nekrozy). Typową apoptozę, nazwaną w piśmiennictwie „kanoniczną”, określano na podstawie kryteriów morfologicznych, zwłaszcza charakterystycznej fragmentacji materiału genetycznego jądra, czyli kariopyknozy. Z czasem definicję poszerzono o obligatoryjne działanie enzymów grupy kaspaz i czynników rodziny BCL [25,27]. Uznano, że apoptoza jest zawsze zależna od precyzyjnej kontroli mechanizmów genetycznych i obecności energii swobodnej (ATP), podczas gdy martwica (nekroza) jest wyłącznie bierną odmia-

ną śmierci komórkowej, niezależną od działania genów, dostawy energii i czynności kaspaz [2,27]. Ten czytelny dydaktycznie obraz, celnie opisujący odmiany śmierci komórek nicieni i owadów, uległ jednak zakłóceniu, gdy badania prowadzone u gryzoni wykazały, że nawet brak podstawowych genów odpowiedzialnych za apoptozę, nie zaburza procesów śmierci komórkowej [59].

Obecnie wiadomo, że istnieje wiele rodzajów śmierci komórki, odrębnych od apoptozy, nad którymi przejmują kontrolę swoiste mechanizmy genetyczne, a które morfologicznie przypominają martwicę [36]. Nie umniejszając roli tradycyjnie pojmowanej nekrozy - nagłego niezależnego od genów działania mechanicznego, termicznego lub chemicznego uszkodzenia komórki - trzeba podkre-

ślić, że częste przypadki śmierci komórkowej o cechach nekrozy również bywają zaprogramowane genetycznie. Jak przedstawiono niżej, uczestniczą one w procesach rozwojowych oraz w patogenezie licznych chorób [10,19,61].

Wśród tych procesów szczególną uwagę zwraca tzw. zaprogramowana martwica, czyli nekroza oraz jej szczególna odmiana - nekroptoza. Mechanizmy nekroptozy, zajmującej pośrednie miejsce między apoptozą i martwicą, są przedmiotem rozważań tej pracy. Podsumowano aktualną wiedzę dotyczącą szlaków molekularnych wyzwalających zaprogramowaną martwicę, omówiono mechanizmy decydujące o aktywacji alternatywnych szlaków śmierci, nekroptozy lub apoptozy bądź o przeżyciu komórki.

### **APOPTOZA KANONICZNA**

Warto skrótowo omówić podstawowe wiadomości o klasycznej apoptozie, tzw. apoptozie kanonicznej. Dokładniej opisano dwa najlepiej poznane szlaki apoptozy, zewnętrzny i wewnętrzny, zwłaszcza że - jak się obecnie uważa - różne ich elementy mogą paradoksalnie uczestniczyć w inicjacji i propagacji nekroptozy.

### **Definicja apoptozy**

Apoptoza, zależna od energii odmiana śmierci komórkowej, wywołuje charakterystyczne zmiany w morfologii komórki. Utrata wody zmniejsza jej objętość i powoduje pofałdowanie powierzchni [44]. Cytoplazma i chromatyna ulegają kondensacji, a DNA - międzynukleosomowej fragmentacji [11,29]. Inną typową cechą procesu jest przemieszczenie się fosfatydyloseryny na zewnętrzną stronę błony komórkowej, przez co traci wyjściową asymetrię. Dochodzi do powstania ciałek apoptotycznych - obłonionych fragmentów komórek zawierających organelle i fragmenty chromatyny [35,45]. Apoptoza nie wyzwala stanu zapalnego, gdyż zawartość umierających komórek nie wydostaje się poza obręb ciałek apoptotycznych, pochłanianych następnie przez makrofagi, fibroblasty i inne sąsiadujące komórki [30,36].

### **Mechanizmy inicjujące apoptozę**

Zgodnie z klasyczną interpretacją apoptozy, zachodzi ona za pośrednictwem jednego z pięciu szlaków sygnalizacyjnych:

- a) zewnątrzpochodnego (zależnego od receptorów śmierci),
- b) wewnątrzpochodnego (mitochondrialnego),
- c) pseudoreceptorowego,
- d) sfingomielinowo-ceramidowego lub
- e) indukowanego stresem; wybór drogi zależy zwykle od typu komórki [36].

### **Szlak zewnątrzpochodny (receptorowy) apoptozy**

Jest wyzwalany wskutek pobudzenia receptorów śmierci - należących do nadrodziny receptora TNF - przez ich

ligandy. Do najlepiej poznanych par receptor/ligand należą: TNFR1/TNF- $\alpha$ , Fas/FasL oraz DR4 (lub DR5)/TRAIL [16]. Wspomniane receptory zawierają domenę zewnątrzkomórkową, swoiście rozpoznającą odpowiedni ligand, a także cytoplazmatyczną, zawierającą tzw. domeny śmierci (death domain, DD). Przyłączenie odpowiedniego ligandu prowadzi do trimeryzacji receptora. Domena śmierci receptora łączy się z homologiczną DD jednego z dwóch białek adaptorowych: FADD (receptora Fas i DR4) lub TRADD (TNFR1); to drugie przekazuje sygnał również do FADD [2,16,33]. Białka adaptorowe zawierają także domenę efektorową śmierci (death effector domain, DED), łącząc się z jej pomocą z homologiczną domeną prokaspazy 8. Trzy składowe: receptor, adaptor i prokaspaza, tworzą kompleks sygnałowy DISC (death inducing signaling complex), w obrębie którego zachodzi autokatalityczna aktywacja kaspazy 8. Uruchomieniu podlega kaskada kaspaz wykonawczych (3 i 7), co wywołuje nieodwracalną śmierć komórki [23,31,60,70].

### **Szlak wewnątrzpochodny (mitochondrialny) apoptozy**

Szlak wewnątrzpochodny jest wyzwalany przez wiele czynników, np. stres oksydacyjny, uszkodzenie DNA, utrata czynników wzrostu lub hipoksja [2]. Powoduje to zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej, co określa się jako permeabilizację zewnętrzną błony mitochondrium (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) [5]. Proces kontroluje grupa białek rodziny BCL, wśród których wyróżnia się czynniki proapoptotyczne - BAK oraz BAX (podrodzina BAX), a także antyapoptotyczne - BCL-2 i BCL-xL (podrodzina BCL-2). Pierwsze z nich rozszczelniają zewnętrzną błonę mitochondrium, drugie działają przeciwnie. Ich wzajemną równowagę regulują odgórnie białka podrodziny *BH3-only*, m.in. BIM, BID, BAD oraz PUMA [53]. W wyniku zjawiska MOMP do cytoplazmy zostaje uwolnionych wiele czynników, w tym cytochrom C i APAF-1, które wiążą prokaspazę 9; powstaje kompleks zwany apoptosomem. W jego obrębie zachodzi aktywacja kaspazy 9, co podobnie jak w szlaku receptorowym uruchamia kaskadę kaspaz wykonawczych i śmierć komórki [34,54]. We wczesnej fazie procesu oba zasadnicze szlaki apoptozy, zewnętrzny i wewnętrzny, spaja białko BID. Kaspaza 8 katalizuje wspomniany czynnik, a produkt reakcji, skrócona postać BID (truncated BID, tBID), wzbudza drogę mitochondrialną, gdyż aktywuje czynność BAX i BAK [2,14].

### **POJĘCIE I ROLA ZAPROGRAMOWANEJ MARTWICY**

#### **Klasyczna definicja martwicy (nekrozy)**

Do niedawna obowiązująca definicja martwicy podkreśla jej niezależny od genów charakter i opisuje ją jako wynik miejscowego uszkodzenia lub działania czynników chemicznych i termicznych, w tym hipoksji, zmiany temperatury, ciśnienia osmotycznego lub pH [22,49]. Nekroza jest niezależna od kaspaz - głównych mediatorów apoptozy i ma dotyczyć na ogół większej grupy komórek, nawet

całych tkanek i narządów [27,64]. W jej przebiegu dochodzi do obrzęku organelli komórkowych, onkozy czyli zwiększenia objętości komórki, przerwania ciągłości błony komórkowej i uwolnienia zawartości do otoczenia [46,52,63,67]. Miejscowo rozwija się stan zapalny [32]. Tak rozumiana nekroza jest więc przeciwieństwem kanonicznej apoptozy - zależnej od genów, niewywołującej zapalenia i dotyczącej zwykle pojedynczych komórek [27].

### Zaprogramowana martwica (zaprogramowana nekroza)

Klasyczna definicja martwicy przestała ostatecznie obowiązywać odkąd wykazano udział genów w regulacji jej zapoczątkowania i przebiegu. Wydaje się, że genom komórki dąży do możliwie jak najdłuższego sprawowania kontroli nad procesem własnej śmierci, nawet jeśli przebiega pod postacią martwicy. Dobrym przykładem jest aktywny udział w tych procesach enzymów grupy kalpain i katepsyn, a także kinazy RIP1 (receptor (TNFRSF) - interacting serine-threonine kinase 1), cyklofiliny D, czynnika PARP-1 i kojarzonego dotąd wyłącznie z apoptozą białka AIF [18,19]. Udowodniono też, że nawet po zapoczątkowaniu apoptozy, podanie inhibitorów kaspaz przekierowuje ten proces na drogę nekrozy [69]. Badania ostatnich lat zaowocowały więc opisaniem odmiany martwicy, która jest swoiście regulowana przez program genetyczny. Wyzwała ją m.in. alkilacyjne uszkodzenie DNA, egzocytotoksyny, a także pobudzenie receptorów śmierci przez ich ligandy, zachodzące w określonych warunkach [20].

Obecnie trudno o precyzyjną definicję zjawiska zaprogramowanej martwicy. Wśród przyczyn wymienia się zawiłość, niejednoznaczność i dowolność terminologii stosowanej przez badaczy. Wielu z nich, wraz z rozwojem wiedzy na temat molekularnych mechanizmów śmierci komórki, wprowadziło nowe pojęcia, odzwierciedlające zastosowane modele badawcze i wyływające wnioski. Opisano np. kilka różnych szlaków sygnalizacyjnych regulowanej martwicy, powstały też nowe terminy, takie jak nekroptoza, które to pojęcie wyjaśniono niżej.

Nieuzasadnione powielanie terminologii, wprowadzanie nowych oraz jednocześnie używanie starszych, ogólniejszych pojęć, skłoniło Komitet do spraw Nazewnictwa Śmierci Komórkowej (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) do uporządkowania stosowanej nomenklatury. W wytycznych z 2012 r., Komitet zalecił autorom, aby każdorazowo definiowali opisowo omawiane pojęcia regulowanej martwicy, a zwłaszcza badany mechanizm molekularny [20]. Ma to ułatwić porównanie poszczególnych ścieżek molekularnych regulujących zjawisko zaprogramowanej martwicy. Jednak autorzy często nie stosują się do tych zaleceń.

### Pojęcie nekroptozy

Szczególne postaci zaprogramowanej martwicy to: aponekroza i nekroptoza. Pojęcie „aponekroza” wprowadzono w celu opisanego procesu o jednoczesnych molekularnych

i morfologicznych cechach apoptozy i nekrozy [13]. Nekroptozę zdefiniowano pierwotnie jako proces zachodzący po ligacji TNF- $\alpha$  z jego receptorem (TNFR1), hamowany przez białko o złożonej nazwie: chemiczna nekrostatyna 1 hamująca RIP1 (RIP1-targeting chemical necrostatin-1) w obecności inhibitorów kaspaz; jest to więc proces od kaspaz niezależny [8]. Oba pojęcia bywają traktowane jako synonimy: starsze definicje nekroptozy również zwracały uwagę na obecność wspólnych cech apoptozy i martwicy, definiując ją jako mniej lub bardziej zaawansowaną apoptozę, która została przerwana i przeszła w martwicę [27,58]. Jest to *notabene* zgodne z pierwotną definicją aponekrozy [13].

Niekiedy termin nekroptozy stosuje się wymiennie z zaprogramowaną martwicą. Jest to jednak niezgodne z wytycznymi NCCD, który zaleca, by mianem nekroptozy określać regulowaną nekrozę, zależną od kinaz RIP1 i RIP3, pod warunkiem wyraźnego zasygnalizowania ich ekspresji przy pierwszym użyciu tego terminu [20]. Tę ostatnią definicję uściślono w wyniku dwóch obserwacji: 1) poznana wcześniej kinaza RIP1 przekazuje sygnały sprzyjające nekrozie za pośrednictwem interakcji ze swoim homologiem – RIP3; 2) odkryto postaci regulowanej martwicy zależne wyłącznie od RIP3 (a więc bez udziału RIP1) [17].

Obecnie przez nekroptozę uważa się kaskadę zdarzeń molekularnych prowadzącą do martwicy komórki, kontrolowaną przez jej genom i zależną od kinazy RIP3.

Nekroptoza jest szczególną odmianą bardziej ogólnego zjawiska, jakim jest zaprogramowana, a więc regulowana genetycznie martwica (nekroza). Zgodnie z najnowszym piśmiennictwem i zaleceniami NCCD, innymi odrębnymi postaciami regulowanej martwicy są również regulowana nekroza zależna od permeabilizacji błon mitochondrium oraz zjawisko *parthanatos* - niezależny od kaspaz proces, angażujący szczególnie enzymy naprawcze DNA jak PARP-1 [17,20].

### DOWODY NA UDZIAŁ MECHANIZMÓW GENETYCZNYCH W MARTWICY

O genetycznie zaprogramowanym charakterze nekrozy świadczy jej udział w procesach rozwojowych ssaków. Uczestniczy np. w śmierci ludzkich chondrocytów podczas wzrostu kości [19] lub w dojrzewaniu pęcherzyków Graffa [48]. Martwica bierze więc udział w fizjologicznych procesach rozwoju organizmu, co obaliło dogmat, w myśl którego nekrozę uważano wyłącznie za proces patologiczny - w opozycji do apoptozy mogącej być zarówno zjawiskiem fizjologicznym, jak i patologicznym.

Regulowaną martwicę wyzwała kontakt z niektórymi patogenami, zwłaszcza wirusami, stąd jest uważana obecnie za istotny mechanizm obronny [6]. Wiadomo, że wirus HIV-1 zabija limfocyty T CD4+ raczej w procesie nekrozy niż apoptozy [39,71]. Odkryto, że wirus cytomegalii (CMV) indukuje nekroptozę zależną od RIP3, ale nie RIP1, co potwierdza ważną rolę RIP3 w regulowanej martwicy w przebiegu niektórych infekcji wirusowych [62]. Opisaną postać martwicy istotną dla wyzwoleń antybakteryjnej odpowiedzi immunologicznej [66]. Nekroptoza



może wyzwolić „fizjologiczną” śmierć komórek układu immunologicznego i nerwowego, co potwierdzono, wykazując w tych przypadkach ekspresję licznych genów, przypuszczalnie regulujących proces martwicy, w tym udział RIP3 w homeostazie limfocytów [3]. Podobne wnioski wynikają z obserwacji Hitomi i wsp., którzy udowodnili, że nekrostatyna Nec-1, allosteryczny inhibitor RIP1, odgrywa istotną rolę w regulacji liczby makrofagów aktywowanych podczas infekcji, gdyż wydłuża czas ich przeżycia [28]. Wiele doniesień wskazuje również na istotną rolę nekroptozy w takich procesach, jak niedokrwienne uszkodzenie mózgu, zawał serca i śmierć komórek nowotworowych powodowana przez cytostatyki [8,24,42,55,58]. Proces ten uczestniczy również w patogenezie zapalenia trzustki, posocznicy, chorób neurodegeneracyjnych i chorób siatkówki (odwarstwienie, utrata fotoreceptorów) [10,26,61,62]. Zaprogramowana martwica bywa też skutkiem ekspozycji komórek na toksyny [71]. Nadmierna aktywacja PARP-1 (czyli proces *parthanatos*) uczestniczy w martwicy wywołanej alkilacją DNA [18].

Zaburzenia szlaków sygnalizacyjnych kontrolujących nekroptozę biorą udział w nowotworzeniu. W komórkach przewlekłej białaczki limfatycznej wykazano defekt ważnych efektorów tego procesu, takich jak RIP3 i CYLD, a w czerniaku dotyczył tylko CYLD. Polimorfizm genu RIP3 wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju chłoniaków nieziarniczych [1,43,67]. Nekroptoza, podobnie jak apoptoza, odpowiada za śmierć komórek nowotworu wywołaną radioterapią, terapią fotodynamiczną, promieniowaniem jonizującym, a także cytostatykami [15]. Zakłada się, że nekroptoza może być pomocniczym mechanizmem śmierci w niezdolnych do apoptozy komórkach nowotworowych, uruchamianym pod nieobecność niezbędnych determinantów apoptozy [18,28].

Jak wynika z powyższego przeglądu piśmiennictwa, to właśnie nekroptoza jest najczęściej obserwowaną odmianą regulowanej martwicy. Należy podkreślić, że zachodzi przy braku aktywacji kaspaz, a ponadto podlega dodatkowemu wzmocnieniu, jeśli ich inhibitory znajdują się w środowisku komórki [64].

## NEKROPTOZA - MOLEKULARNE MECHANIZMY. GŁÓWNA ROLA KINAZ RIP

Wystąpienie zjawiska nekroptozy zależy od czynników genetycznych, epigenetycznych i farmakologicznych [18]. Nie ma wątpliwości, że może ją wyzwolić połączenie receptorów śmierci z ich ligandami. I tak wzbudzenie TNFR1, Fas, receptorów TRAIL, a także RIP1 może spowodować zarówno apoptozę, jak i martwicę. O wyborze mechanizmu, w którym umiera komórka decyduje interakcja z innymi białkami, stężenie glukozy oraz dostępność ATP niezbędnego do aktywacji kaspaz [19,69].

### Kinazy RIP1 i RIP3

Aktywność kinaz RIP1 i RIP3 jest nieodzowna w mechanizmie nekroptozy, natomiast niektóre postaci zaprogramo-

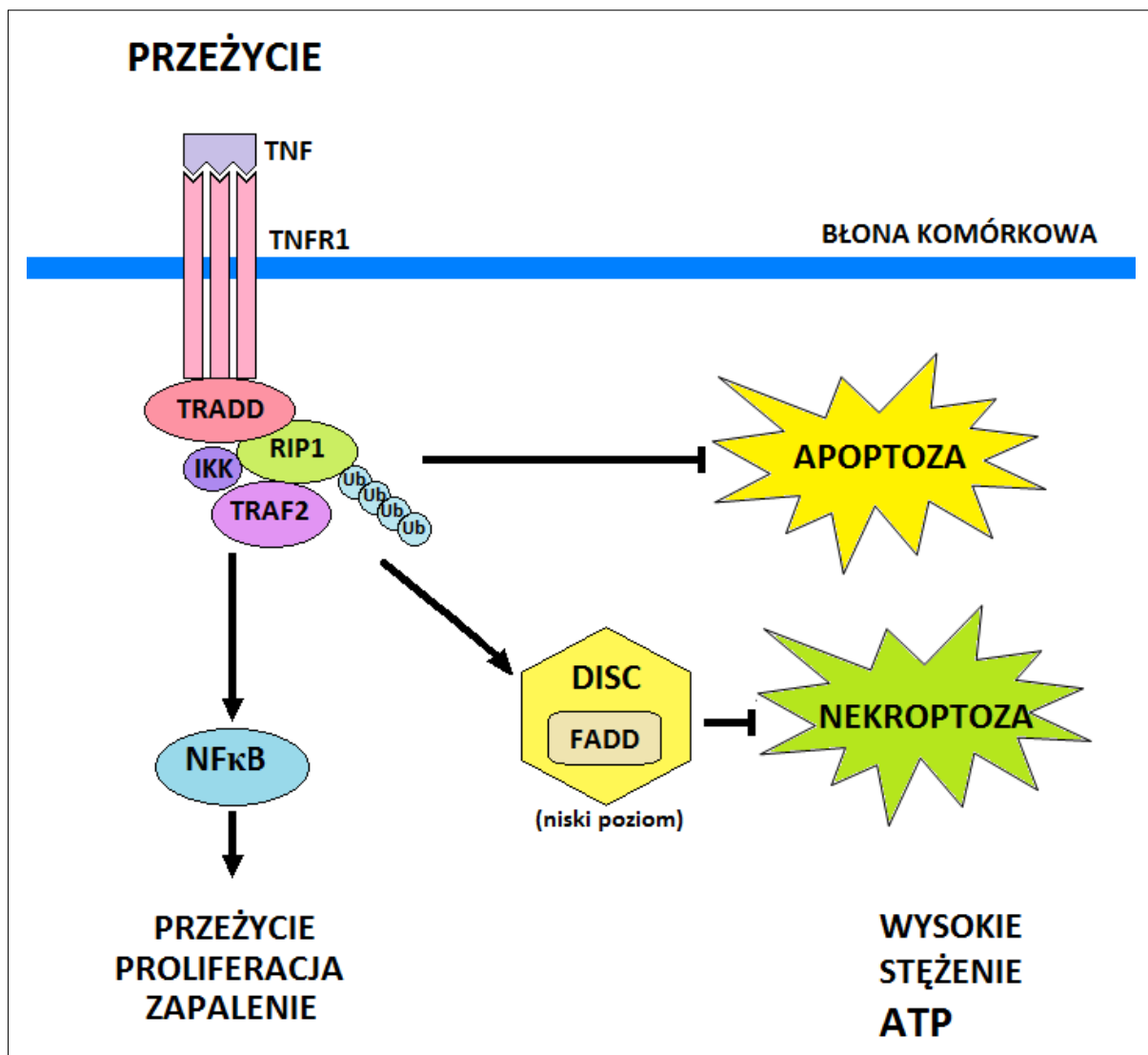
wanej nekrozy są od nich niezależne [65]. Białka te należą do rodziny kinaz serynowo-treoninowych. Kinaza RIP1 ma domenę śmierci (death domain, DD) i domenę rekrutującą kaspazy (caspase recruitment domain, CARD), tym samym przypomina swoją budową białko adaptorowe FADD. Są to cechy strukturalne niezwykle istotne dla pełnionych przez nią funkcji. Natomiast kinaza RIP3 zawiera homotypowy motyw (RIP homotypic interaction motif, RHIM), który występuje w jednej z domen kinazy RIP1. Umożliwia to wzajemną interakcję obu białek [12]. Wykazują aż 33% homologii domeny kinazowej, jednak różnice budowy sprawiają, iż inhibitor RIP1 - wspomniana nekrostatyna Nec-1 - nie hamuje kinazy RIP3 [7]. Kinaza RIP1 uczestniczy nie tylko w wyzwalaniu procesu zaprogramowanej nekrozy, ale też apoptozy. Pełni ponadto zasadniczą rolę w aktywacji NF- $\kappa$ B w wyniku działania TNF- $\alpha$  (*vide* niżej), co w przypadku krwinek białych stymuluje syntezę cytokin prozapalnych. Wraz ze swym homologiem - kinazą RIP3 - uwalnia alarminy, czyli białka promujące odpowiedź immunologiczną w wielu chorobach. Z rozważań tych płynnie wnioski o istotnej roli RIP1 i RIP3 w wywoływaniu zapalenia w dwóch mechanizmach - zależnym i niezależnym od nekrozy [40,46].

W procesie nekroptozy obie kinazy powodują swą wzajemną fosforylację i tworzą pronekrotyczny kompleks, kontrolujący wytwarzanie wolnych rodników tlenowych (reactive oxygen species, ROS) [6]. Aktywność kinaz RIP jest niezbędna dla nekroptozy mediowanej przez receptory śmierci w obecności inhibitora kaspaz Z-VAD.fmk, zarówno w komórkach mysich, jak i ludzkich [18]. RIP1 jest przy tym zaangażowana aż w trzy różne procesy regulujące żywotność komórki - apoptozę, nekroptozę i aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, który promuje przeżycie. Istotne dla zrozumienia w jaki sposób zapada „decyzja” o przeżyciu bądź śmierci jest poznanie mechanizmów regulujących działanie tej kinazy [7].

## PRZEŻYCIE, APOPTOZA I NEKROPTOZA - TRZY GŁÓWNE PROCESY WYZWALANE PRZEZ TEN SAM CZYNNIK

Czynnikiem inicjującym jest zwykle przyłączenie czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) do jego receptora typu I (TNFR1), co prowadzi do trimeryzacji i aktywacji tego ostatniego oraz rekrutacji wielu białek, np. TRADD, RIP1 i TRAF2 [15]. Opisując to zjawisko bardziej szczegółowo, do aktywnego receptora przyłącza się czynnik adaptorowy TRADD. Powstaje platforma, do której dołączają się kinazy RIP i białka adaptorowe FADD i TRAF2. Powstały kompleks uczestniczy w wielu szlakach molekularnych i jest punktem wyjścia do powstania podkompleksów zaangażowanych w sygnalizację komórkową [41]. To właśnie ligacja TNF- $\alpha$ /TNFR prowadzi do rozwoju jednego z trzech zupełnie odmiennych, wymienionych już scenariuszy: 1) przeżycia, 2) apoptozy i 3) nekroptozy. Na załączonych rycinach przedstawiono je z pominięciem mniej ważnych elementów w celu zachowania przejrzystości.

Za przeżycie komórki (ryc. 1) odpowiada inaktywacja RIP1, z jednoczesnym wzbudzeniem aktywnej postaci NF- $\kappa$ B. Ak-



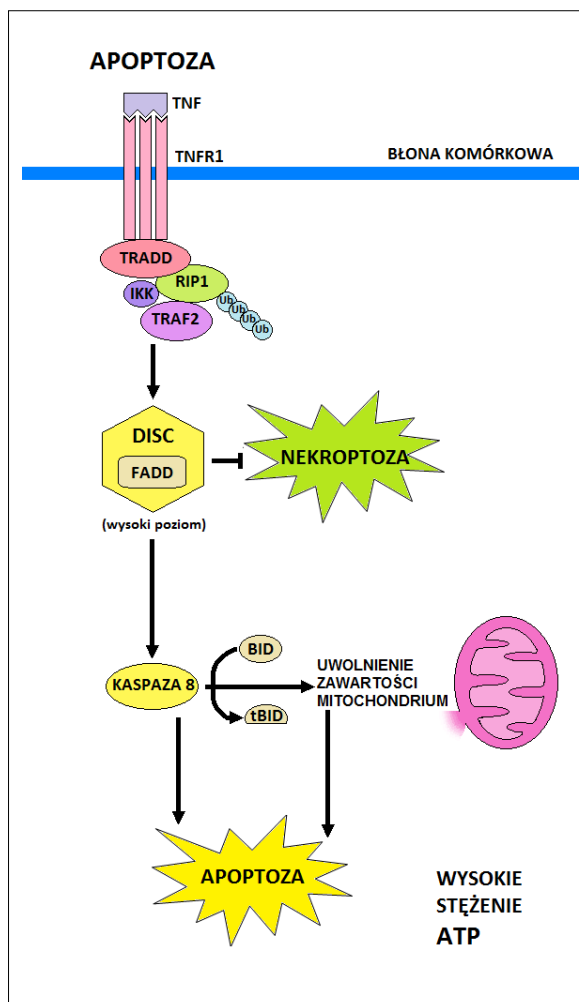
**Ryc. 1.** Ścieżki sygnalizacyjne wzbudzone przez ligację TNF-α z TNFR: PRZEŻYCIE; przyłączenie TNF-α prowadzi do trimeryzacji receptora TNFR1 i rekrutacji wielu białek przekaźnikowych, w tym TRADD, RIP1, TRAF2. Kinaza RIP1 jest ubikwitynowana, co jest równoznaczne z jej dezaktywacją. Zwykle zachodzi niskiego stopnia aktywacja kaspazy-8, która degradowuje kinazę RIP1, tym samym hamując ścieżkę nekroptozy. Po uformowaniu platformy TNFR1/TRADD/TRAF2/IKK i aktywacji kinazy IKK czynnik transkrypcyjny NF-κB zostaje uwolniony z kompleksu z jego inhibitorem. NF-κB podlega translokacji do jądra komórkowego i wzbudza geny docelowe, odpowiedzialne za przeżycie i proliferację komórki; w krwinkach białych sprzyja ekspresji genów promujących odczyn zapalny. W niewielkiej ilości jest formowany kompleks DISC, a białko FADD niezbędne do jego powstania, blokuje nekroptozę [7,9,41,65]. Szczegółowy opis procesu w tekście

tywacja tego czynnika zachodzi w wyniku rekrutacji RIP1 i jej następczej, zależnej od ligandu ubikwitynacji, która ogranicza powstanie proapoptotycznego kompleksu sygnalizacyjnego (DISC). Aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF-κB (dzięki działaniu IKK), zwiększa ekspresję genów odpowiedzialnych za przeżycie komórki. Korzystna wydaje się też częściowa aktywacja kaspazy 8: niewielkie jej stężenia nie są w stanie wzbudzić szlaku zewnątrzpochodnego apoptozy, ale wystarczają do skutecznej degradacji RIP1, tym samym hamując więc nekroptozę [9,40,50].

W przypadku apoptozy (ryc. 2) powstanie typowego kompleksu DISC dokonuje się za sprawą przyłączenia TNF-α do jego receptora, jednak w sytuacjach sprzyjających apopto-

zie, którymi w warunkach doświadczalnych są obecność inhibitorów syntezy białek, stosunkowo duże stężenie ATP, nadekspresja polipeptydu o nazwie zinc-finger like protein, a także niedostateczna sygnalizacja kinazy FAK (focal adhesion kinase). Wówczas na skutek działania nekrostatyn jest hamowany szlak nekroptozy, a niewielkie stężenie deubikwitynazy CYLD powoduje, iż kinaza RIP1 pozostaje nieaktywna. W tych warunkach program apoptozy jest realizowany w komórce przez opisany wyżej szlak zewnątrzpochodny [7,9].

Jeśli natomiast po inicjacji opisanego procesu nie zostają spełnione warunki zaistnienia apoptozy, komórka wchodzi w szlak nekroptozy (ryc. 3). Bezpośrednią przy-



**Ryc. 2.** Ścieżki sygnalizacyjne wzbudzone przez ligację TNF $\alpha$  z TNFR1: APOPTOZA; przyłączenie TNF- $\alpha$  do TNFR1 uruchamia w warunkach sprzyjających apoptozie jej szlak receptorowy. Powstaje w dużych ilościach kompleks DISC, w którego skład wchodzi białko adaptorowe FADD i prokaspaza-8. Następuje aktywacja kaspazy-8, kaspaz wykonawczych i faza efektorowa apoptozy. Po skróceniu białka Bid przez aktywną kaspazę-8, zachodzi zjawisko MOMP, uruchamiające mitochondrialną ścieżkę apoptozy. Oba szlaki apoptozy zbiegają się na poziomie aktywacji kaspaz wykonawczych [9,20,35,65]. Szczegółowy opis procesu znajduje się w tekście

czyną takiego zjawiska może być np. obserwowane w komórkach nowotworowych zahamowanie aktywności kaspaz w następstwie mutacji ich genów lub też opisywane w warunkach doświadczalnych działanie swoistych inhibitorów. Najczęstszą przyczyną wydaje się jednak nagła utrata ATP lub nadmierna ekspozycja komórki na wolne rodniki tlenowe i azotowe (reactive nitrogen species, RNS) [9]. Należy podkreślić, że głównym elementem uruchamiającym proces nekroptozy jest aktywacja kinazy RIP1, wyjściowo zahamowanej w wyniku ubikwitynacji. Proces ten dokonuje się pod wpływem enzymu deubikwitynazy CYLD. Tak więc, nekroptoza dokonuje się w obecności odpowiednio aktywnych RIP1 oraz - jak już wyjaśniono - RIP3 [7]. Szczegółowy opis tych procesów zawarto w opisach do ryc. 1-3.

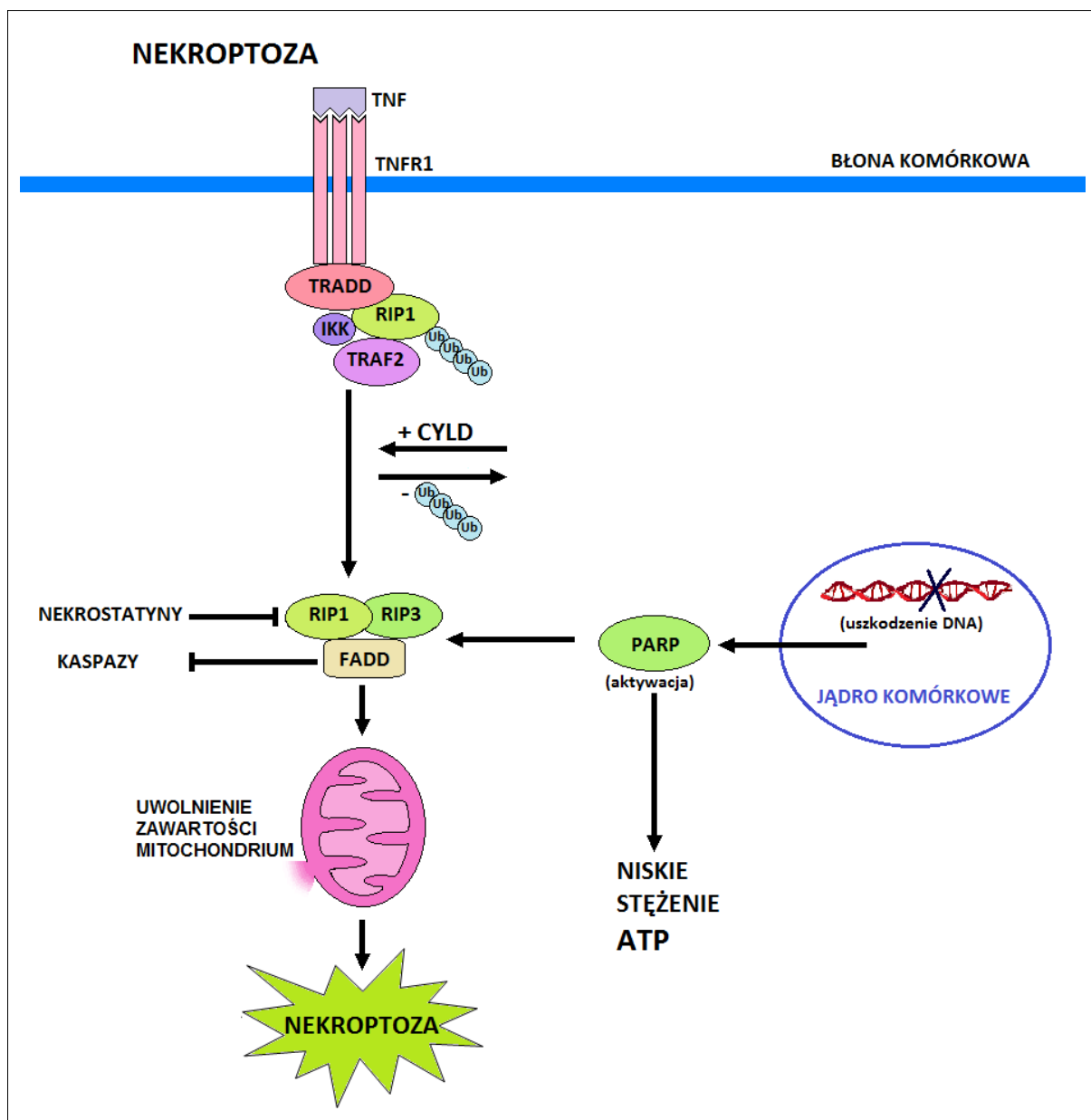
## ROLA FADD, ROS I INNYCH CZYNNIKÓW W REGULACJI NEKROPTOZY

Jak wcześniej wspomniano, białko adaptorowe FADD bierze udział w wyzwalaniu nekroptozy przez TNF- $\alpha$ . Odgrywa główną rolę w procesach apoptozy i nekroptozy wywołanych przez aktywację Fas, a utrata jego ekspresji hamuje indukcję obu procesów. Wydaje się, że w przypadku nekroptozy oligomeryzacja FADD jest wystarczającym sygnałem do zapoczątkowania procesu [59]. Przypuszczalnie także ligand śmierci TRAIL, działając przez FADD, może oprócz apoptozy indukować właśnie nekroptozę [38]. Wykazano, że nekroptoza może zachodzić mimo braku inhibitorów kaspaz. Jednak proces ten, jeśli wyzwała go stymulacja receptorów Fas, DR4 lub DR5, wymaga zahamowania czynności kaspaz.

Podsumowując, białko FADD jest niezbędne do zapoczątkowania nekroptozy, gdy proces śmierci jest wyzwalany przez FasL bądź TRAIL. Jeśli natomiast proces jest inicjowany przez TNF- $\alpha$ , to rola FADD jest sporna. Część doniesień przemawia za jego rolą jako negatywnego regulatora, który sprzyja apoptozie i hamuje nekroptozę [65]. Wiadomo jednak, że w przypadku nekroptozy wynikającej z ligacji TNF- $\alpha$ /TNFR1, FADD pośredniczy w akumulacji wolnych rodników tlenowych [41].

Komórki, w których białko RIP1 jest hamowane lub go brak, są na ogół odporne na nekroptozę mediowaną przez TNF- $\alpha$  i Fas [59]. Ostatnie badania prowadzone na modelu embrjonalnych fibroblastów mysich wskazują jednak, że TNF- $\alpha$  może z pominięciem RIP1 aktywować kinazę RIP3 i doprowadzić w ten sposób do zaprogramowanej martwicy, mimo braku RIP1. Warunkiem koniecznym jest ekspresja TNFR1 oraz TRADD [47].

Innym czynnikiem niezbędnym do wyzwolenia nekroptozy są jony wapnia, które pobudzają wytwarzanie kwasu mlekowego i tlenku azotu oraz aktywację kalpain. Mitochondria promują martwicę w razie gwałtownej permeabilizacji błon tej organelli. Długotrwały wzrost przepuszczalności błony wewnętrznej mitochondriów prowadzi do obrzęku organelli, przerwania jej błony zewnętrznej i uwolnienia do cytoplazmy wielu czynników, zwłaszcza cytochromu C, co może stanowić bezpośredni bodziec indukujący nekroptozę [57]. Wybór tego drugiego szlaku śmierci komórkowej (należy jeszcze raz podkreślić, że oba zjawiska mogą być następstwem działania m.in. TNF- $\alpha$ ), zależy przypuszczalnie od nadmiernego wytwarzania ROS i wyczerpania zapasów ATP, spowodowanego dysfunkcją mitochondriów [4]. W modelu embrjonalnych fibroblastów mysich Lin i wsp. wykazali, że głównym elementem warunkującym akumulację ROS w procesie nekroptozy wzbudzonej przez TNF- $\alpha$  są białka RIP, TRAF2 oraz - jak wspomniano wyżej - FADD [41]. Generacja ROS prowadzi do uszkodzeń DNA, a pośrednio stymuluje też uwalnianie PARP-1, odpowiedzialnego za naprawę nici DNA. Jest to jednak proces zależny od energii, więc działaniem niepożądanym wzmoczonej aktywności PARP-1 jest wyczerpanie zasobów NAD<sup>+</sup> i ATP. Znaczny spadek stężenia ATP w komórce stwarza warunki stymulujące rozwój nekroptozy.



**Ryc. 3.** Ścieżki sygnałowe wzbudzone przez ligację TNF- $\alpha$  z TNFR1: NEKROPTOZA; nekroptozę zachodzi z udziałem białka RIP1, które stanowi część kompleksu tworzącego się w oparciu o aktywowany receptor TNFR1. Proces ten hamują nekrostatyny. Rola RIP1 jest kluczowa, zaś do jego aktywacji niezbędna jest aktywność enzymu CYLD powodującego deubikwitynację RIP1. W nekroptozie uczestniczą także: kinaza RIP3 i FADD. Do regulowanej nekrozy dochodzi również po aktywacji PARP w wyniku uszkodzenia DNA. Dalsze etapy nekroptozy poznano słabo. Prawdopodobnie kompleks FADD/ RIP3/RIP1 sprzyja uwalnianiu ROS i permeabilizacji mitochondriów, co powoduje śmierć komórkową, między innymi w mechanizmie MPT, przez uwolnienie cytochromu C i AIF [4,7,9,15,20,38,65,68]. Szczegółowy opis procesu znajduje się w tekście

Natomiast całkowite wyczerpanie zasobów ATP wywołuje „katastrofę energetyczną”, która uruchamia proces odmienny zarówno od apoptozy, jak i regulowanej martwicy, przywodzący na myśl klasyczną nekrozę [4].

Należy podkreślić, że dane piśmiennictwa charakteryzujące rolę mitochondriów w nekroptozie są niekompletne [68]. Niguet i wsp. wykazali, że nekroza komórek nerwowych „dzieli” z apoptozą wewnętrzny szlak tego procesu, czyli uwolnienie do cytoplazmy cytochromu

C i powstanie apoptosomu, a nawet aktywację kaspazy 9 i kaspaz wykonawczych [49].

Nadal nie poznano dokładnie mechanizmów regulujących dalsze etapy aponekrozy. Są przypuszczalnie powiązane z aktywacją autofagii i zwiększoną syntezą jej markera LC3II, który jest efektywnie hamowany przez białko Nec-1 o potwierdzonych właściwościach inhibicyjnych wobec samej nekroptozy [28]. Autofagia to katalityczny proces polegający na degradacji wielko-



cząsteczkowych składników cytoplazmy, a nawet całych organelli komórkowych [36]. Odpowiada za zachowanie homeostazy i umożliwia przeżycie komórki w warunkach stresowych [51]. Degradowane cząsteczki i organella są zamykane w obłonionych pęcherzykach zwanych autofagosomami, które łączą się z lizosomami, co strawia ich zawartość [21]. Niektórzy badacze sugerują, iż autofagia jest mechanizmem wykonawczym nekroptozy, ze względu na częstą obecność autofagosomów w komórkach przechodzących aponekrozę. Uważa się, iż autofagia może stanowić swoisty mechanizm uprzętający zawartość komórki w przebiegu regulowanej martwicy [68].

## METODY DETEKЦИИ MARTWICY

Badanie mechanizmów zaprogramowanej nekrozy natrafia na liczne problemy natury technicznej. Z powodu braku jednoznacznych markerów martwicy identyfikacja komórek umierających w tym mechanizmie nie jest łatwa. O ile w apoptozie, określanej mianem śmierci typu I i mechanizmach śmierci powiązanych z autofagią (typ II), istnieje wiele biochemicznych cech służących do ich identyfikacji, o tyle w nekrozie (typ III) stosuje się raczej typowanie oparte na przesłankach negatywnych: braku aktywacji kaspaz, uwolnienia cytochromu C i oligonukleosomowej fragmentacji DNA [37]. Apoptoza i nekroza mogą przebiegać w nietypowy sposób. Pierwszy z tych mechanizmów może zachodzić bez oligonukleosomowej degradacji DNA, drugi – jak już wspomniano – z uwolnieniem cytochromu C z mitochondriów [20]. Ponadto, przy braku fagocytozy komórek apoptotycznych, wchodzi często we wtórną nekrozę o cechach wspólnych z pierwotnie zachodzącą martwicą [37]. Ze względu na to, że jedyną swoistą cechą nekrozy jest wzrost przepuszczalności błon, w celu jej oceny próbuje łączyć się mikroskopię elektronową z barwieniem hematoksyliną/eozyną. Inną metodą detekcji procesu jest połączenie reakcji TUNEL (wynik dodatni) i reakcji badającej aktywność kaspaz (wynik ujemny). Pozwala to na wizualizację degradacji DNA, charakterystycznej dla apoptozy i nekroptozy, a także aktywności kaspaz,

będącej cechą jedynie apoptozy. Do oceny nekroptozy *in vivo* służy również badanie ekspresji RIP1 i RIP3 [20].

Krysko i wsp. zaproponowali detekcję opartą na czterech parametrach. Pierwszym z nich jest morfologia komórki, którą oceniają badaniem przepuszczalności błon komórkowych w cytometrii przepływowej (np. jodkiem propidyny, a także na bazie parametrów FSC i SSC charakteryzujących odpowiednio wielkość i ziarnistość komórek). Zwykle bada się ją w kontekście charakterystycznych markerów powierzchniowych, które są drugim parametrem, zwłaszcza ekspozycji fosfatydyloseryny w barwieniu aneksyną V. Jako trzeci element oceniana jest obecność charakterystycznych zmian wewnątrzkomórkowych, takich jak fragmentacja DNA w cytometrii przepływowej, aktywacja kaspaz lub uwolnienie cytochromu C (techniką Western blotting). Ostatnim parametrem, dostępnym do oceny, zwłaszcza w hodowlach komórkowych, jest obecność uwalnianych do środowiska białek: kaspaz, HMGB-1 i cytokeratyny 18 [37]. Białko HMGB-1 jest uwalniane z komórek nekrotycznych, może również charakteryzować komórki apoptotyczne wchodzące we wtórną nekrozę [56]. Natomiast obecna pozakomórkowo cytokeratyna 18 jest dobrym markerem martwicy komórek nabłonkowych [37]. Wydaje się, że zastosowanie wymienionych wyżej kryteriów oceny pozwala na jednoznaczne odróżnienie komórek apoptotycznych od nekrotycznych.

## PODSUMOWANIE

Doładniejsze zrozumienie procesów odpowiedzialnych za zaprogramowaną martwicę, w tym za jej szczególną postać, nekroptozę, stwarza szansę na nowe sposoby leczenia, zwłaszcza w chorobach nowotworowych. Wiedza ta może się przyczynić do stworzenia leków aktywujących nekrotyczny szlak śmierci komórkowej w przypadkach opornych na apoptozę. Podobne nadzieje należy wiązać ze zrozumieniem złożonych mechanizmów decydujących o przeżyciu lub śmierci komórki. Umiejętne sterowanie tymi procesami mogłoby się stać cennym narzędziem zarówno badawczym, jak i terapeutycznym.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Alameda J.P., Moreno-Maldonado R., Navarro M., Bravo A., Ramírez A., Page A., Jorcano J.L., Fernández-Aceñero M.J., Casanova M.L.: An inactivating CYLD mutation promotes skin tumor progression by conferring enhanced proliferative, survival and angiogenic properties to epidermal cancer cells. *Oncogene*, 2010; 29: 6522-6532
- [2] Burz C., Berindan-Neagoe I., Balacescu O., Irimie A.: Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol.*, 2009; 48: 811-821
- [3] Ch'en I.L., Tsau J.S., Molkentin J.D., Komatsu M., Hedrick S.M.: Mechanisms of necroptosis in T cells. *J. Exp. Med.*, 2011; 208: 633-641
- [4] Chaabane W., User S.D., El-Gazzah M., Jaksik R., Sajjadi E., Rzeszowska-Wolny J., Los M.J.: Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2013; 61: 43-58
- [5] Chipuk J.E., Bouchier-Hayes L., Green D.R.: Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ.*, 2006; 13: 1396-1402
- [6] Cho Y.S., Challa S., Moquin D., Genga R., Ray T.D., Guildford M., Chan F.K.: Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, 2009; 137: 1112-1123
- [7] Christofferson D.E., Yuan J.: Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010; 22: 263-268
- [8] Degtarev A., Huang Z., Boyce M., Li Y., Jagtap P., Mizushima N., Cuny G.D., Mitchison T.J., Moskowitz M.A., Yuan J.: Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.*, 2005; 1: 112-119
- [9] Degtarev A., Yuan J.: Expansion and evolution of cell death pro-

grammes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008; 9: 378-390

[10] Duprez L., Takahashi N., Van Hauwermeiren F., Vandendriessche B., Goossens V., Vanden Berghe T., Declercq W., Libert C., Cauwels A., Vandenebee P.: RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity*, 2011; 35: 908-918

[11] Elmore S.: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 2007; 35: 495-516

[12] Festjens N., Vanden Berghe T., Cornelis S., Vandenebee P.: RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ.*, 2007; 14: 400-410

[13] Formigli L., Papucci L., Tani A., Schiavone N., Tempestini A., Orlandini G.E., Capaccioli S., Orlandini S.Z.: Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncratic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell. Physiol.*, 2000; 182: 41-49

[14] Fulda S.: Caspase-8 in cancer biology and therapy. *Cancer Lett.*, 2009; 281: 128-133

[15] Fulda S.: The mechanism of necroptosis in normal and cancer cells. *Cancer Biol. Ther.*, 2013; 14: 999-1004

[16] Fulda S., Debatin K.M.: Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 2006; 25: 4798-4811

[17] Galluzzi L., Kepp O., Krautwald S., Kroemer G., Linkermann A.: Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2014; 35: 24-32

[18] Galluzzi L., Kroemer G.: Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 2008; 135: 1161-1163

[19] Galluzzi L., Maiuri M.C., Vitale I., Zischka H., Castedo M., Zitvogel L., Kroemer G.: Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.*, 2007; 14: 1237-1243

[20] Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., Dawson T.M., Dawson V.L., El-Deiry W.S., Fulda S., Gottlieb E., Green D.R., Hengartner M.O., Kepp O., Knight R.A., Kumar S. i wsp.: Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.*, 2012; 19: 107-120

[21] Glick D., Barth S., Macleod K.F.: Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.*, 2010; 221: 3-12

[22] Golstein P., Kroemer G.: Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.*, 2007; 32: 37-43

[23] Guicciardi M.E., Gores G.J.: Life and death by death receptors. *FASEB J.*, 2009; 23: 1625-1637

[24] Han W., Li L., Qiu S., Lu Q., Pan Q., Gu Y., Luo J., Hu X.: Shikonin circumvents cancer drug resistance by induction of a necroptotic death. *Mol. Cancer Ther.*, 2007; 6: 1641-1649

[25] Hassan M., Watari H., AbuAlmaaty A., Ohba Y., Sakuragi N.: Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed. Res. Int.*, 2014; 2014: 150845

[26] He S., Wang L., Miao L., Wang T., Du F., Zhao L., Wang X.: Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- $\alpha$ . *Cell*, 2009; 137: 1100-1111

[27] Helewski K.J., Kowalczyk-Ziomek G.I., Konecki J.: Apoptoza i martwica – dwie drogi do jednego celu. *Wiad. Lek.*, 2006; 59: 679-684

[28] Hitomi J., Christofferson D.E., Ng A., Yao J., Degterev A., Xavier R.J., Yuan J.: Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*, 2008; 135: 1311-1323

[29] Hu W., Kavanagh J.J.: Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol.*, 2003; 4: 721-729

[30] Häcker G.: The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.*, 2000; 301: 5-17

[31] Jin Z., El-Deiry W.S.: Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.*, 2005; 4: 139-163

[32] Kelly K.J., Plotkin Z., Dagher P.C.: Guanosine supplementation reduces apoptosis and protects renal function in the setting of ischemic injury. *J. Clin. Invest.*, 2001; 108: 1291-1298

[33] Khan K.H., Blanco-Codesido M., Molife L.R.: Cancer therapeutics: targeting the apoptotic pathway. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2014; 90: 200-219

[34] Kopiński P.: Apoptoza limfocytów pęcherzykowych w wybranych śródmiąższowych chorobach płuc. Rozprawa habilitacyjna. Wydawnictwo Naukowe UMK, Bydgoszcz 2012

[35] Kopiński P., Chorostowska-Wynimko J., Dyczek A., Giżycka A.: Apoptoza limfocytów pęcherzykowych. Część 1 - szlaki apoptozy limfocytów *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2014; 82: 170-182

[36] Kopinski P., Gizycka A., Chorostowska-Wynimko J.: Zaprogramowana śmierć komórkowa: czy tylko apoptoza? *Pol. Merk. Lekarski*, 2014; 37: 201-205

[37] Krysko D.V., Vanden Berghe T., D'Herde K., Vandenebee P.: Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 2008; 44: 205-221

[38] Lee E.W., Seo J., Jeong M., Lee S., Song J.: The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis. *BMB Rep.*, 2012; 45: 496-508

[39] Lenardo M.J., Angleman S.B., Bounkeua V., Dimas J., Duvall M.G., Graubard M.B., Hornung F., Selkirk M.C., Speirs C.K., Trageser C., Orenstein J.O., Bolton D.L.: Cytopathic killing of peripheral blood CD4(+) T lymphocytes by human immunodeficiency virus type 1 appears necrotic rather than apoptotic and does not require *env*. *J. Virol.*, 2002; 76: 5082-5093

[40] Li H., Kobayashi M., Blonska M., You Y., Lin X.: Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 13636-13643

[41] Lin Y., Choksi S., Shen H.M., Yang Q.F., Hur G.M., Kim Y.S., Tran J.H., Nedospasov S.A., Liu Z.G.: Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 10822-10828

[42] Linkermann A., Bräsen J.H., Darding M., Jin M.K., Sanz A.B., Heller J.O., De Zen F., Weinlich R., Ortiz A., Walczak H., Weinberg J.M., Green D.R., Kunzendorf U., Krautwald S.: Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110: 12024-12029

[43] Liu P., Xu B., Shen W., Zhu H., Wu W., Fu Y., Chen H., Dong H., Zhu Y., Miao K., Xu W., Li J.: Dysregulation of TNF $\alpha$ -induced necroptotic signaling in chronic lymphocytic leukemia: suppression of CYLD gene by LEF1. *Leukemia*, 2012; 26: 1293-1300

[44] Malinowska I.: Rola apoptozy w patogenezie i leczeniu nowotworów układu hematopoetycznego. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 548-559

[45] Marek Ł.: Rola apoptosomu w aktywacji prokaspazy 9. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2013; 67: 54-64

[46] Moriwaki K., Chan F.K.: Necrosis-dependent and independent signaling of the RIP kinases in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2014; 25: 167-174

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

[48] Murdoch W.J., Wilken C., Young D.A.: Sequence of apoptosis and inflammatory necrosis within the formative ovulatory site of sheep follicles. *J. Reprod. Fertil.*, 1999; 117: 325-329

[49] Niquet J., Seo D.W., Wasterlain C.G.: Mitochondrial pathways of neuronal necrosis. *Biochem. Soc. Trans.*, 2006; 34: 1347-1351

- [50] Piotrowska A., Izykowska I., Podhorska-Okołów M., Zabel M., Dziegiel P.: Budowa białek z rodziny NF- $\kappa$ B i ich rola w procesie apoptozy. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 64-74
- [51] Polewska J.: Autofagia – mechanizm molekularny, apoptoza i nowotwory. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 921-936
- [52] Poon I.K., Hulett M.D., Parish C.R.: Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ.*, 2010; 17: 381-397
- [53] Przybylski G., Wielikdzien J., Kopiński P.: Mechanizmy zaprogramowanej śmierci efektorowych limfocytów T. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 1374-1390
- [54] Rupniewska Z., Bojarska-Junak A.: Apoptoza: Przepuszczalność błony mitochondrialnej i rola pełniona przez białka z rodziny Bcl-2. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 538-547
- [55] Saddoughi S.A., Gencer S., Peterson Y.K., Ward K.E., Mukhopadhyay A., Oaks J., Bielawski J., Szulc Z.M., Thomas R.J., Selvam S.P., Senkal C.E., Garrett-Mayer E., De Palma R.M., Fedarovich D., Liu A. i wsp.: Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumour suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. *EMBO Mol. Med.*, 2013; 5: 105-121
- [56] Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M.E.: Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 2002; 418: 191-195
- [57] Siu W.P., Pun P.B., Latchoumycandane C., Boelsterli U.A.: Bax-mediated mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), distinct from the mitochondrial permeability transition, is a key mechanism in diclofenac-induced hepatocyte injury: multiple protective roles of cyclosporin A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2008; 227: 451-461
- [58] Smith C.C., Davidson S.M., Lim S.Y., Simpkin J.C., Hothersall J.S., Yellon D.M.: Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent? *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 2007; 21: 227-233
- [59] Tait S.W., Green D.R.: Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene*, 2008; 27: 6452-6461
- [60] Thorburn A.: Death receptor-induced cell killing. *Cell. Signal.*, 2004; 16: 139-144
- [61] Trichonas G., Murakami Y., Thanos A., Morizane Y., Kayama M., Debouck C.M., Hisatomi T., Miller J.W., Vavvas D.G.: Receptor interacting protein kinases mediate retinal detachment-induced photo-receptor necrosis and compensate for inhibition of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 21695-21700
- [62] Upton J.W., Kaiser W.J., Mocarski E.S.: Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell Host Microbe*, 2010; 7: 302-313
- [63] Vanden Berghe T., Grootjans S., Goossens V., Dondelinger Y., Krysko D.V., Takahashi N., Vandenabeele P.: Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods*, 2013; 61: 117-129
- [64] Vandenabeele P., Melino G.: The flick of a switch: which death program to choose? *Cell Death Differ.*, 2012; 19: 1093-1095
- [65] Vanlangenakker N., Vanden Berghe T., Vandenabeele P.: Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death Differ.*, 2012; 19: 75-86
- [66] Willingham S.B., Allen I.C., Bergstralh D.T., Brickey W.J., Huang M.T., Taxman D.J., Duncan J.A., Ting J.P.: NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J. Immunol.*, 2009; 183: 2008-2015
- [67] Wu W., Liu P., Li J.: Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2012; 82: 249-258
- [68] Yuan J., Kroemer G.: Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev.*, 2010; 24: 2592-2602
- [69] Zhivotovsky B., Orrenius S.: Clinical perspectives of cell death: where we are and where to go. *Apoptosis*, 2009; 14: 333-335
- [70] Zielinski R.R., Eigel B.J., Chi K.N.: Targeting the apoptosis pathway in prostate cancer. *Cancer J.*, 2013; 19: 79-89
- [71] Zong W.X., Thompson C.B.: Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.*, 2006; 20: 1-15

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.