

Povzetek

Nekroptoza je oblika programirane celične smrti z morfološkimi značilnostmi nekroze, kjer se celična vsebina sprosti v okolico in aktivira imunski sistem. Kadar je preobsežna, se imunski sistem prekomerno odzove, kar privede do različnih vnetnih stanj. MLKL (ang. mixed lineage kinase-domain like) je protein, ki je ključen za potek nekroptoze. Sestavljen je iz N-končnega dela ter C-končnega psevdokinaznega dela, ki vključuje fosforilacijska mesta za njegovo aktivacijo. Do sedaj sta bili na ravni mRNA v celicah HT-29 dokazani izoobliki MLKL-1 in MLKL-2 [1], vendar njune zmožnosti, da povzročita celično smrt, še niso primerjali. Neznano je tudi mehanizem od MLKL odvisne nekroptoze, pomen in način oligomerizacije MLKL, vloga posameznih delov MLKL pri celični smrti in vloga MLKL v naravnem imunskem odzivu. V okviru doktorske disertacije smo uspeli pripraviti zadostne količine rekombinantnega N-končnega dela MLKLN-154 za NMR študije. Ugotovili smo, da je MLKLN-154 v raztopini sestavljen iz šestih α -vijačnic in da je prisoten v monomerni, dimerni in oligomerni obliki. Vpliv različnih delov proteina MLKL ter obeh izooblik na celično smrt smo preverili s transfekcijo celic HEK293T. Ugotovili smo, da nekroptotično celično smrt povzročijo delecijski mutanti MLKLN-126, MLKLN-139, MLKLN-201 ter obe izoobliki MLKL-1 in MLKL-2. Celične smrti nismo zaznali v primeru MLKLN-119, MLKLN-154 in MLKLN-166. Glede na rezultate sklepamo, da α -vijačnica (H6), ki sledi 126. ak dolgemu α -helikalnemu svežnju blokira nekroptozno aktivnost, kot je to v primeru MLKLN-154 in MLKLN-166. Aktivnost se povrne pri daljših konstrukcijskih (MLKLN-201). Verjetno je regija, ki sledi α -vijačnici z inhibitorno aktivnostjo (H6) pomembna za to, da H6 odstrani od ostalega dela N-končne domene in s tem aktivira nekroptozno aktivnost MLKL. Dokazali smo, da ima MLKL-2 višjo nekroptozno aktivnost kot MLKL-1. Na osnovi modelov obeh izooblik smo ugotovili, da v MLKL-2 manjka večji del psevdokinazne domene, ki v primeru MLKL-1 strukturno stabilizira C-končno vijačnico in vijačnico H6, kar omeji nekroptozno aktivnost v primeru MLKL-1, te stabilizacije pa ni v primeru MLKL-2. Tudi oznaka c-Myc/His₆ na C-koncu MLKL-1 tako stabilizacijo prepreči, zato ima C-končno označena MLKL-1 podobno nekroptozno aktivnost kot MLKL-2. Dokazali smo, da se obe izoobliki proteina MLKL izražata v človeških makrofagih, pri čemer je količina MLKL-2 na ravni mRNA približno 10-krat nižja kot MLKL-1. Izražanje obeh izooblik MLKL se poveča, če makrofagom dodamo agonista receptorjev TLR4 in TLR3, LPS in poli(I:C). Slednje smo za MLKL-1 dokazali tudi na ravni izražanja proteina v človeških in mišjih makrofagih. Potrdili smo tudi hipotezo, da je MLKL odgovoren za celično smrt, ki jo v mišjih makrofagih sproži bakterija *Salmonella enterica*, serovar Typhimurium. Okuženi makrofagi so sicer podlegli od kaspaz odvisni celični smrti, če pa smo kaspaze inhibirali z zVAD-om, je v makrofagih potekla od RIP3 in od MLKL odvisna nekroptoza. To potrjuje domnevo, da je nekroptoza alternativna pot regulirane celične smrti, ki poteče kadar so od kaspaz odvisne poti onemogočene.