

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra buněčné biologie

Praha 2010

## BAKALÁRSKA PRÁCA

# Rola adapterových proteinů obsahujících DD a DED v apoptotické signalizaci

Role of DD- and DED-containing adaptor proteins in apoptotic signaling



Fabián Čaja

Školitel': RNDr. Ladislav Anděra, CSc.

**Pod'akovanie:**

Ďakujem vedúcemu mojej práce RNDr. Ladislavovi Anděrovi, CSc. za pomoc pri zhromažďovaní literatúry a poskytované rady pri písaní práce.

Vyhlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracoval sám z uvedenej literatúry a na základe konzultácií so svojim školiteľom.

Praha 2010

Fabián Čaja

## Abstrakt

Proteíny obsahujúce zväzok šiestich antiparalelných  $\alpha$ -helixov, tzv. doménu smrti (death domain, DD) a jej podobné domény (DED, CARD), patria k významným regulátorom apoptotickej signalizácie. Zaraďujeme medzi ne povrchové receptory z rodiny TNFR, ktoré prijímajú proapoptotický signál, ale aj adapterové proteíny a ďalšie enzýmy ako proteíny a kinázy. Tieto receptory nazývané „receptory smrti“ interagujú s adapterovými proteínmi obsahujúcimi DED alebo DD, ktoré následne prenášajú signál na iniciačné kaspázy a tie aktivujú ďalšie zložky apoptotickej signalizačnej kaskády. DEDs a DDs sú súčasťou aj ďalších proteínov, ktoré regulujú aktiváciu kaspázovej signalizácie alebo sa zúčastňujú iných neapoptotických signalizácií. Ako bolo popísané na viacerých experimentálnych modeloch, defekty a deregulácie proteínov obsahujúcich DDs a DEDs sú často veľmi závažné až letálne. Najčastejšie sa prejavujú nádorovým bujnením, imunodeficienciami, poruchou správneho vývoja mnohých orgánov a v neposlednom rade aj poruchami expresie určitých génov.

Kľúčové slová: DD, DED, kaspáza, apoptóza, adapterový proteín, receptor, Fas, TNF, TRAIL, FADD, TRADD, RIP, TRAF, NF $\kappa$ B, FLIP

## **Abstract**

Proteins containing a bundle of six anti-parallel  $\alpha$ -helices in so-called “death domain” (DD) and similar structures (DED, CARD) represent important players in apoptotic signaling. To DD/DED/CARD domains-containing proteins belong pro-apoptotic membrane receptors from the TNFR superfamily, then adaptor proteins and enzymes as proteases or kinases. These pro-apoptotic „death receptors“ interact with adaptor proteins and initiator caspases containing DDs or DEDs and activate apoptotic signaling cascade. DEDs and DDs are in addition found in many proteins participating in activation of caspases or other non-apoptotic signaling. Many experimental models document that defects in and deregulations of proteins containing DDs and DEDs can have severe if not lethal consequences for an organism. Abberations in these proteins in many cases could lead to cancerogenesis, immunodeficiencies or developmental defects.

Key words: DD, DED, caspase, apoptosis, adaptor protein, receptor, Fas, TNF, TRAIL, FADD, TRADD, RIP, TRAF, NF $\kappa$ B, FLIP

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Úvod</b> .....  | 6  |
| <b>2. Apoptóza – programovaná bunková smrť</b> .....                          | 7  |
| <b>3. Receptory smrti (Death receptors) z rodiny TNFR</b> .....               | 9  |
| 3.1 Všeobecné vlastnosti proteínov z rodiny TNFR .....                        | 9  |
| 3.2 Štruktúra receptorov smrti .....  | 11 |
| 3.3 Funkcie receptorov smrti v apoptotickej signalizácii .....                | 13 |
| 3.4 Patologické prejavy spojené s defektmi proteínov rodiny TNFR .....        | 16 |
| <b>4. Adapterové proteíny z rodiny DD</b> .....                               | 17 |
| 4.1 Všeobecná štruktúra proteínov z rodiny DD .....                           | 17 |
| 4.2 Adapterové proteíny obsahujúce DD (Death domain) .....                    | 19 |
| 4.3 Adapterové proteíny obsahujúce DED (Death effector domain) .....          | 22 |
| 4.4 Adapterové proteíny obsahujúce CARD<br>(Caspase recruitment domain) ..... | 25 |
| 4.5 Patológie spojené s defektmi expresie proteínov rodiny DD .....           | 25 |
| <b>5. Záver</b> .....   | 27 |
| <b>Príloha</b> .....  | 28 |
| <b>Zoznam použitých skratiek</b> .....  | 32 |
| <b>Zoznam použitej literatúry</b> .....                                       | 34 |

# 1. Úvod

Život je nepochybne jedným z najúžasnejších stále sa vyvíjajúcich procesov prebiehajúcich na našej planéte. Pre uchovanie života musia existovať mechanizmy, ktoré umožnia živému organizmu odolávať nepriaznivým podmienkam prostredia - vnútorného, aj vonkajšieho. Jedným z týchto mechanizmov je aj apoptóza - programovaná bunková smrť. Uplatňuje sa v mnohých fyziologických procesoch prebiehajúcich v organizme. V dospelom ľudskom tele sa nachádza približne 60 biliónov buniek. Veľké množstvá buniek denne vznikajú a súčasne zanikajú. Denne je organizmus (napríklad človek) a náš imunitný systém vystavený pôsobeniu veľkého množstva život ohrozujúcich patogénov a transformujúcich sa buniek. V embryonálnom období sa vytvárajú jednotlivé orgány tela, nastavujú sa správne množstvá buniek pre konkrétne tkanivá. Apoptóza nádorových, infikovaných či nepotrebných buniek a jej správna lokalizácia a načasovanie sú kľúčovými pre zachovanie integrity organizmu.

Apoptotickú signalizáciu možno aktivovať ako z vonkajšieho prostredia bunky, tak aj vnútrobunkovo a nevyhnutnou súčasťou niektorých týchto dráh sú adapterové proteíny obsahujúce  $\alpha$ -helikálne proteín-proteínové interakčné motívy nazývané DD (Death Domain=smrťiaca doména), DED (Death Effector Domain=smrťiaca efektorová doména) a CARD (CAspase-Recruitment Domain). DD predstavuje sekvenciu približne 80-tich aminokyselinových zvyškov, ktorá je súčasťou niektorých membránových receptorov z rodiny TNFR a tiež aj adapterových proteínov. DEDs a CARDs podobne ako DDs sa uplatňujú v ďalších proteínoch, ktoré významne regulujú procesy apoptózy. Sú súčasťou iniciačných kaspáz (kaspáza-8 alebo kaspáza-9), adapterových proteínov, napr. FADDu (Fas-Associated Death Domain) a napokon regulačných proteínov akým je cFLIP (caspase-8 (FLICE)-like inhibitory protein). Poruchy v apoptotickej signalizácii sú výsledkom veľmi závažných defektov na úrovni molekulárnej a sú príčinou neurodegeneratívnych ochorení ako sú Alzheimerova a Parkinsonova choroba, autoimunitných ochorení a rôznych druhov nádorov. Iba pochopenie apoptózy na molekulárnej úrovni umožní vývoj nových terapeutických postupov proti týmto fatálnym ochoreniam.

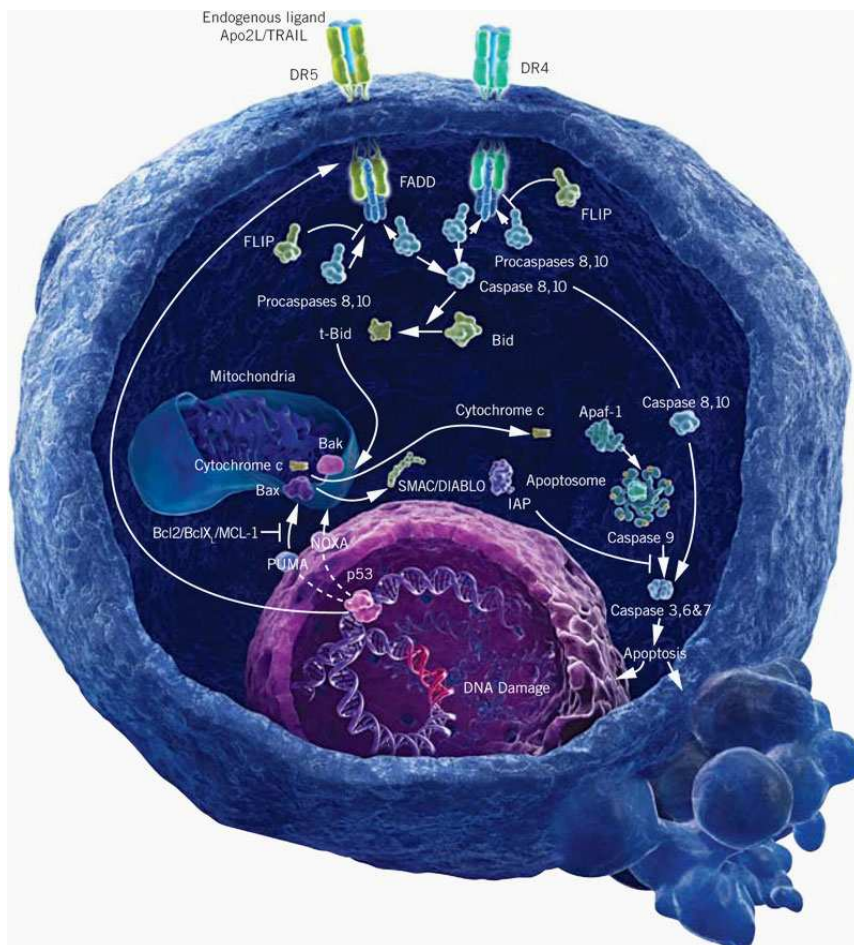
## 2. Apoptóza – programovaná bunková smrť

Apoptóza ako súčasť programovanej bunkovej smrti patrí medzi najzákladnejšie fyziologické procesy prebiehajúce v bunke. Prvýkrát biológovia pozorovali bunkovú smrť už v 19. storočí. Až v roku 1972 bol zavedený názov apoptóza (z gréckeho *apoptosis* = padať, zrútiť sa). Avšak pochopenie tohto procesu na molekulárnej úrovni bolo možné až na konci 20. storočia a tento trend trvá dodnes. O význame problematiky svedčí aj fakt, že v roku 2002 bola trojici vedcov udelená Nobelova cena za fyziológiu a medicínu za popis procesov programovanej bunkovej smrti.

Existuje niekoľko druhov programovanej bunkovej smrti, ale apoptóza je z nich najrozšírenejšia a súčasne pri nej nedochádza k výraznému poškodeniu okolitých buniek. K programovaným smrtiam zaraďujeme aj autofagiu-pohlcovanie vlastných organel, a aj tzv. nekroptózu alebo tiež programovanú nekrózu. Pri apoptóze sa po zachytení apoptotického signálu spustí signalizačná kaskáda, ktorej výsledkom je smrť bunky. Postupne sa bunka zmenšuje, vznikajú apoptotické telieska a dochádza ku kondenzácii a degradácii DNA. Zvyšky bunky sú odstránené okolitými bunkami alebo fagocytmi. Súčasťou apoptotickej signalizácie sú povrchové receptory (DR=death receptor), ďalej v intracelulárnom submembránovom priestore sú adapterové proteíny a napokon celá skupina proteáz-kaspáz, ktoré prenášajú apoptotický signál v podobe signálnej kaskády. Vo všeobecnosti existujú dve signálne dráhy, pomocou ktorých bunka iniciuje apoptózu. Takzvaná vonkajšia dráha je realizovaná pomocou povrchových receptorov smrti. Medzi ne zaraďujeme receptory Fas/CD95, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TNFR1, TNFR2, DR6 a ďalšie, zatiaľ málo popísané. V cytoplazme sa nachádzajú ďalšie adapterové proteíny, ktoré spolu s prokaspázami vytvárajú DISC (Death-Inducing Signaling Complex) komplex. Ten aktivuje iniciačné kaspázy 8 a 10, ktoré následne štiepia efektorové kaspázy 3, 6 a 7 (**Obr. 1**). Výsledkom signálnej kaskády je bunková smrť (Schultz et al, 2003).

Druhá, tzv. vnútorná dráha apoptotickej signalizácie, je iniciovaná viacerými podnetmi, ktoré môžu pochádzať z vnútorného prostredia bunky. Najčastejšie pri poškodení DNA, nahromadení voľných radikálov, pôsobením steroidov, radiácie, chemoterapeutík a pri nadmerných stresových situáciách. Proapoptotické proteíny z rodiny Bcl-2 (napr. Bax alebo Bak) multimerizujú a indukujú permeabilizáciu

vonkajšej mitochondriálnej membrány a tým tiež uvoľnenie cytochrómu c a ďalších proapoptotických proteínov z medzimembránového priestoru. V cytoplazme sa po interakcii cytochrómu c s proteínom Apaf-1 vytvorí tzv. apoptozóm, ktorý obsahuje kaspázu 9, ďalšiu iniciačnú kaspázu štiepiacu efektorové kaspázy. Výsledkom je opäť iniciácia apoptózy. Súčasťou mitochondriálnej membrány sú aj inhibičné proteíny typu Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> a v medzimembránovom priestore sú ďalšie proapoptotické proteíny, napr. enzýmy štiepiace DNA: EndoG a AIF či inhibítory antiapoptotických IAP proteínov Smac/DIABLO a HtrA2/Omi. Zaujímavé je, že vnútorná dráha môže byť prepojená s vonkajšou pomocou kaspázy 8, ktorá iniciuje premenu proteínu Bid na proapoptotický tBid, ktorý môže jednak aktivovať multidomérové proapoptotické proteíny Bax alebo Bak, jednak inhibovať funkciu antiapoptotických proteínov z rodiny Bcl-2 (Fadeel et al., 2005) (**Obr. 1**). Napokon môže byť apoptóza spustená aj treťou dráhou, a to bunkovým kontaktom, kde sa uvoľňuje perforin a granzyme B. Perforin vytvára v membráne póry, cez ktoré sa do cytoplazmy dostáva granzyme B a aktivuje efektorové kaspázy.



**Obr. 1** Základné dráhy apoptotickej signalizácie

(prevzaté z <http://www.biooncology.com/bioonc/research/apoptosis/index.m>)



### 3. Receptory smrti (Death receptors) z rodiny TNFR

#### 3.1 Všeobecné vlastnosti proteínov z rodiny TNFR

Približne pred tridsiatimi rokmi boli objavené ligandy lymfotoxín a TNF (tumor necrosis factor) produkované lymfocytmi a makrofágmi. Už vtedy bolo potvrdené, že sú schopné spôsobiť lýzu niektorých typov buniek, najmä nádorových. V roku 1984 po analýze ich cDNA sekvencií bolo potvrdené, že patria do jednej génovej rodiny. Následne boli objavené aj receptory, ktoré zachytávajú tieto ligandy (prehľadne v Locksley et al., 2001). Do rodiny týchto TNFR receptorov tiež patria tzv. receptory smrti - Death receptors (DRs), ktoré zohrávajú významnú úlohu pri indukcii apoptózy. DRs môžu byť aj glykofosfolipidové kotvené proteíny alebo voľne rozpustné proteíny (Wilson et al., 2009). Súčasťou receptora je niekoľko domén bohatých na cysteín (CRD-cysteine-rich domain). Významná je krátka intracelulárna sekvencia na C-konci obsahujúca ~80 AK zvyškov, ktorá sa nazýva Death Domain (DD). S týmto úsekom interaguje ďalšia DD, ktorá je súčasťou adapterového proteínu, napr. FADD, TRADD, cFLIP, RIP. DRs sa uplatňujú pri vonkajšej apoptotickej signalizácii. Ich funkcia spočíva v zachytení ligandov, cytokínov patriacich do TNF proteínovej nadrodiny. Nasleduje naviazanie adapterových proteínov a iniciatorových prokaspáz 8/10 a nakoniec prenos signálu v podobe signálnej kaskády. DRs sa podieľajú aj na iných významných procesoch v bunke, napr. bunkovej proliferácii, diferenciácii, produkcii chemokínov a zápalových reakciách (Guicciardi et al., 2009). Do TNFR nadrodiny zaraďujeme osem významných DRs. Pre zjednodušenie sú uvedené len najznámejšie skratky (**Tab. 1, str. 10**). FasL receptor je známy tiež ako CD95. Ďalšie sú TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor), DR3, TRAIL-R1 (TNF-related apoptosis-induced ligand receptor), TRAIL-R2. Menej známe sú DR6 a ďalšie dva, EDAR (Ectodysplasin A Receptor) a NGFR (Nerve Growth Factor Receptor). Ich funkcia pravdepodobne nesúvisí priamo s aktiváciou apoptózy. CD95 receptor viaže pomocou DD adapterový proteín FADD. Podobne aj receptory TNFR1 a DR3 viažu adapterový proteín FADD pomocným proteínom TRADD. Adapterový proteín TRADD viaže v týchto receptoroch aj ďalšie proteíny TRAF2 a RIP, ktoré regulujú expresiu inhibítorov apoptózy prostredníctvom NF- $\kappa$ B signalizácie. Preto receptory TNFR1 a DR3 majú špeciálnu funkciu v bunkovej signalizácii, pretože sa podieľajú na aktivácii aj iných procesov okrem apoptózy. DR4/TRAIL-R1 receptor je podobne schopný

aktivovať kaspázy a spustiť apoptózu pomocou adapterového proteínu FADD (Giucciardi et al, 2009). Zároveň bolo potvrdené, že TRAIL-R1 receptor je schopný aktivovať NF- $\kappa$ B. DR5/TRAIL-R2 receptor bol objavený v roku 1997 a prekvapujúce bolo, že štruktúrou pripomína TRAIL-R1 (Chaudhary et al., 1997). Podieľa sa najmä na aktivácii apoptotických dráh. Existujú aj tzv. DcRs (Decoy receptors), ktoré neobsahujú DD a dodnes poznáme štyri DcRs: DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4), DcR3 a osteoprotegrin (OPG) (Lavrik et al., 2005). DcRs pravdepodobne negatívne regulujú apoptózu väzbou ligandov smrti (Ashkenazi et al., 1999). Ďalej bolo zistené, že niektoré DRs môžu vykonávať svoju funkciu až po agregácii do väčšieho proteínového celku. Na základe jednoduchého experimentu bolo preukázané, že bez agregácie sa apoptóza neaktivuje. DRs najčastejšie vytvárajú trimérne komplexy a membránové rafty, ktoré pre ich trimerizáciu respektíve multimerizáciu poskytujú výhodné prostredie (Holler et al., 2002). Aktivované receptory CD95, TRAILR1/2 vytvárajú multimérny proapoptotický komplex DISC (Death Inducing Signaling Complex), obsahujúci adapterové proteíny a iniciačné prokaspázy 8/10. Súčasťou komplexu je aj proteín cFLIP, ktorý sa zúčastňuje na regulácii kaspáz. Predpokladá sa, že bráni správnej maturácii prokaspáz 8 a 10, a tým inhibuje apoptózu. Prehľadný obrázok popisujúci proteíny rodiny TNFR je uvedený v prílohe (**Obr. 2**).

**Tab. 1** Prehľad receptorov smrti a ich adapterových proteínov

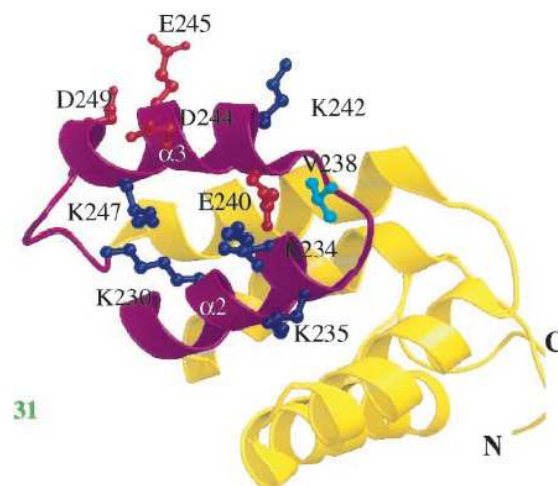
| Receptor smrti | Ligand       | MW (kDa)* | Adapterový proteín                               | Miesto expresie | Funkcia v bunke  |
|----------------|--------------|-----------|--|-----------------|--|
| TNFR1, TNFR2   | TNF $\alpha$ | ~60       | TRADD, RIP1/3, SODD, ARTS1, TRUSS, RAIDD, PEA-15 | Nešpecificky    | Viaže TNF $\alpha$ a lymfotoxin, aktivuje apoptózu pomocou FADD                              |
| Fas/CD95       | FasL         | ~37       | FADD, FAP, RIP1, PEA-15, FAF                     | Nešpecificky    | Viaže FasL, pomocou FADD aktivuje kaspázy  |
| TRAIL-R(1-4)   | TRAIL        | ~50       | FADD, RIP1, PEA-16                               | Nešpecificky    | Viaže TRAIL, pomocou FADD aktivuje kaspázy, viaže TRADD a RIP, reguluje NF- $\kappa$ B       |
| NGFR           | NGF          | ~45       | FAP, NADE, RIP2, NRAGE, IRAK, RhoA               | Nervové tk.     | Reguluje apoptózu alebo prežitie nervových buniek  |
| DR3            | VEGI         | ~45       | TRADD, RIP1                                      | T-lymfocyty     | Pomocou TRADD aktivuje apoptózu, reguluje NF- $\kappa$ B signalizáciu                        |
| DR6            | ?            | ~72       | TRADD  | Nešpecificky    | Aktivuje NF- $\kappa$ B a reguluje apoptózu, pomocou JNK reguluje diferenciáciu T-lymfocytov |
| EDAR           | EDA          | ~33       | EDARADD  | Ektoderma       | Reguluje NF- $\kappa$ B a JNK signalizáciu, spúšťa apoptózu nezávisle od kaspáz              |

\* MW=molecular weight-molekulová hmotnosť (v kilodaltonoch)

### 3.2 Štruktúra receptorov smrti

Receptory rodiny TNFR sa vyznačujú vysokou homológiou v extracelulárnej štruktúre. Typickým znakom všetkých receptorov smrti je pravidelné opakovanie CRD (Cysteine rich domain) domén, ktoré obsahujú niekoľko tandemovo sa opakujúcich cysteínových klastrov, väčšinou dva až šesť. Klastre sú priemerne zložené zo 40 aminokyselinových zvyškov a sú navzájom spojené tromi disulfidovými mostíkmi (Andera L., 2009). Predpokladá sa, že disulfidové mostíky v extracelulárnej časti vytvárajú lešenie s rôznou dĺžkou a sekvenciami aminokyselinových zvyškov. Zároveň sa tu prejavuje konzervovanosť štruktúry, čím každý receptor rozoznáva len určitý typ ligandu. Priemerne sa na povrchu bunky nachádza 200-10000 receptorov v závislosti od bunkového typu. Počet receptorov ale neovplyvňuje ďalší priebeh signalizácie (Beyaert et al., 1994). Molekulová hmotnosť proteínov z rodiny TNFR sa pohybuje okolo 50 kDa. Väčšina proteínov z tejto rodiny patrí k transmembránovým glykoproteínom typu I s extracelulárnymi N-koncovými sekvenciami a C-koncovými v cytoplazme. V centrálnej časti receptorov sa nachádza jedna transmembránová doména, ktorá ukotvuje proteín v membráne. Veľmi zaujímavou štruktúrou v extracelulárnej časti je aj tzv. PLAD doména (Pre-ligand assembly domain). Donedávna sa predpokladalo, že receptory smrti existujú vo forme monomérov a až po naviazaní ligandov vznikajú triméry. Dnes sa predpokladá, že pomocou PLAD domény vytvárajú oligomérené štruktúry, ktoré zvyšujú úspešnosť naviazania ligandu na receptor (Chan F. K., 2007). Doposiaľ nebolo preukázané, či je PLAD doména využívaná u všetkých receptorov smrti. Je potrebné dodať, že ligandy sa viažu do odlišnej domény v extracelulárnej časti receptoru. V intracelulárnej štruktúre je výrazne nižšia homológia, čo naznačuje odlišné funkcie jednotlivých receptorov smrti v apoptotickej signalizácii. V tejto časti receptorov je významným štruktúrnym prvkom tzv. doména smrti – Death domain (DD), ktorá je zložená zo šiestich antiparalelných, amfipatických  $\alpha$ -helixov (Huang et al., 1996) (**Obr. 3, str. 12**). U viacerých receptorov dochádza k posttranslačným modifikáciám. Napr. u oboch TNFR je typická N-glykozylácia, zatiaľ čo u TNFR2 bola pozorovaná iba O-glykozylácia (Fiers et al., 1991). Pomocou membránových alebo cytoplazmatických kináz sú mnohé receptory fosforylované, napr. u ľudského TNFR1 na Tyr-331 (Darnay et al., 1997).

Podobne aj u DR6 boli dokázané viaceré modifikácie. V extracelulárnom prostredí sa nachádza šesť asparagínových zvyškov, ktoré sú N-glykozylované, na seríne, treoníne a prolíne dochádza k O-glykozylyácii. Rádioaktívnym značením sa zároveň potvrdilo, že u DR6 dochádza k S-palmitoylácii na Cys-368, podobne ako u Fas/CD95 receptorov (Klima et al., 2009). Význam palmitoylácie spočíva v redistribúcii receptorov smrti v lipidových raftoch a u Fas/CD95 zabezpečuje aj oligomerizáciu (Feig et al., 2007). Podobne je palmitoylovaný aj DR4, zatiaľ čo u DR5 a TNFR1 nebola palmitoylácia potvrdená. Samotný DR6 sa svojou štruktúrou odlišuje od ostatných DR v tom, že okrem Cys zvyškov a DD obsahuje v extracelulárnej časti pomerne dlhý spojkový úsek, ktorý je posttranslačne modifikovaný. DD je na rozdiel od ostatných DR lokalizovaná bližšie k transmembránovému úseku, začína vo vzdialenosti približne 150 aminokyselinových zvyškov od C-konca. V intracelulárnej časti sa nachádza aj tzv. CARD-like doména (Saito et al. 2005, podľa Klímu et al., 2009).



**Obr. 3 Štruktúra interagujúcich DDs (death domains) Fas/CD95 receptoru (fialová) a adapterového proteínu FADD (žltá)**

Modrou farbou sú naznačené pozitívne nabité aminokyselinové zvyšky, červenou negatívne nabité a svetlo modrou hydrofóbny Val238. Helixy  $\alpha 2$  a  $\alpha 3$  majú rovnaké rozloženie náboja, čo naznačuje, že interakcie medzi oboma doménami sú antiparalelné. (Prevzaté z Jeong et al., 1999)

### 3.3 Funkcie receptorov smrti v apoptotickej signalizácii

Fas ligandy sú exprimované najmä NK bunkami a cytotoxickými lymfocytmi T vo forme transmembránových proteínov typu II. Po naviazaní na Fas receptor sa spustí apoptotická kaskáda. Vytvárajú sa trimérne a následne multimérne agregáty receptorov CD95, ktoré v cytozole viažu adapterové proteíny FADD pomocou DD. Na N-konci proteínov FADD sa nachádza DED, s ktorou interagujú prokaspázy (**Obr. 4, str. 15**). Až po vytvorení DISC komplexu zloženého z receptoru smrti, adapterových proteínov a prokaspáz, dochádza k aktivácii iniciátorových kaspáz, ktoré sa podieľajú na amplifikácii apoptotického signálu. Kaspázy existujú vo forme neaktívneho monoméru. Helix L2 je proteolyticky štiepený pomocou helixu L2' zo susedného monoméru na N-koncový segment obsahujúci Cys zvyšky a C-koncový segment stabilizujúci aktívne miesto susedného monoméru (Riedl et al., 2004). Dôležitým faktom je, že FasL receptor aktivuje apoptózu dvoma odlišnými, vzájomne prepojenými signálnymi dráhami – tzv. typ I vs typ II. Prvá je založená na aktivácii iniciátorových kaspáz 8 a 10 a následnou aktiváciou efektorových kaspáz 3, 6 a 7 (**Obr. 5** v prílohe). Druhý spôsob aktivácie (typ II) vyžaduje iniciáciu mitochondriálnej apoptotickej signalizácie cez proapoptotický proteín Bid, ktorý patrí do Bcl-2 proteínovej rodiny. Ten sa pomocou aktívnej kaspázy 8 mení na tBid (truncated Bid), ktorý spúšťa mitochondriálnu dráhu - uvoľnenie cytC z mitochondrií a následne tvorbu apoptozómu pomocou proteínu Apaf-1 a prokaspázy 9. Kaspáza 9 nakoniec aktivuje kaspázu 3. V roku 2007 bolo preukázané, že CD95 sa nespráva len ako receptor smrti, ale je schopný regulovať aj iné procesy v bunke podobne ako ďalšie receptory z rodiny TNFR. Podieľa sa na ochrane buniek pred smrťou, reguluje proliferáciu a diferenciáciu buniek (Peter et al., 2007).

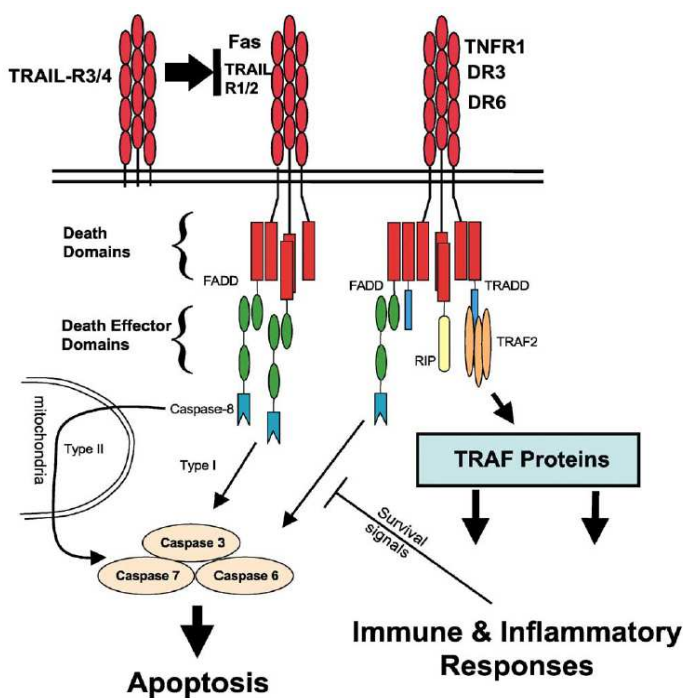
Ďalšími významnými receptorami sú TRAIL-R1 a TRAIL-R2 (DR4, DR5). Dodnes nie je celkom zrejmé, prečo sa v priebehu evolúcie zachovali obidva, keďže ich funkcia je podobná. Sú exprimované na rôznych typoch buniek, rozdiel je iba v miere ich využitia pre apoptotickú signalizáciu. TRAIL ligand sú schopné zachytiť aj ďalšie receptory, a to TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) a OPG (Osteoprotegrinový receptor). TRAIL je exprimovaný najmä na imunocytoch, napríklad v NK bunkách, CD4<sup>+</sup> T lymfocytoch a dendritických bunkách. Ako bolo spomenuté vyššie, DcRs nedisponujú DD, preto nemôžu spustiť apoptózu. Aj napriek tomu sa podieľajú na významnej regulácii apoptózy. Pravdepodobne pomocou lokalizácie v membránových raftoch bránia vytvoreniu DISC komplexu u TRAIL-R2. Pôvodne sa

predpokladalo, že aktivujú NF- $\kappa$ B signalizáciu, a tým inhibujú apoptózu. Už v 90. rokoch 20. storočia bolo potvrdené, že TRAIL je významným protinádorovým činidlom. Je schopný veľmi účinne zneškodniť nádorové bunky, pričom zdravé bunky sú nezasiahané (Wiley et al., 1995 a ďalšie skupiny). V súčasnej dobe prebiehajú testy v druhej klinickej fáze. TRAIL-R signalizácia je veľmi podobná CD95, ktorá je vysvetlená vyššie. U niektorých buniek (typu I) nie je potrebná internalizácia TRAIL-R pre vytvorenie DISC komplexu a aktiváciu apoptózy (Giucciardi et al., 2009, podľa Kohlhaas et al., 2007). Avšak u hepatocytov (bunky typu II) sa celý DISC komplex presúva do cytoplazmy až po internalizácii TRAIL-R, odkiaľ v lyzozómoch aktivuje apoptotickú signalizáciu (Guicciardi et al., 2009). Veľmi zaujímavý je aj fakt, že nadmerná glykozylácia TRAIL-R podporuje ich agregáciu a rýchlejšie spustenie apoptózy, čo by sa opäť dalo využiť v nádorovej terapii (Wagner et al., 2007).

Bolo zistené, že TRAIL-Rs sú schopné spustiť aj iné signalizačné dráhy, napr. NF- $\kappa$ B, proteínkinázu B (PKB) a MAP kinázu (**Obr. 5** v prílohe). V intracelulárnom prostredí sa nachádza sekvencia DD, do ktorej sa viaže adapterový proteín FADD. Do jeho DED sa viaže prokaspáza 8. Následne sa v cytoplazme vytvára tzv. sekundárny komplex zložený z proteínov FADD, prokaspáza 8, TRADD, RIP1, TRAF2 a IKK $\gamma$ . FADD v tomto komplexe viaže prokaspázu 8 a zároveň RIP1. Ten reaguje s proteínom TRAF-2 (TNF-associated factor 2), ktorý spúšťa IKK-komplex a kinázu NF- $\kappa$ B, ktorá aktivuje NF- $\kappa$ B. Ten sa následne podieľa na regulácii transkripcie v jadre. Tento princíp platí skôr pre TRAIL-R2. Druhá dráha typická pre oba TRAIL receptory spočíva v aktivácii MEKK1 (Mitogen-activated protein/ERK kinase kinase 1), následne MKK4, JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) a nakoniec c-Jun, ktorý podobne ako NF- $\kappa$ B reguluje transkripciu v jadre - tvorba cytokínov, chemokínov a cFLIPu. Podobne je pomocou TRAIL-R1 aktivovaná aj druhá MAP-kinázová dráha, na konci ktorej je transkripčný faktor p38. TRAIL-Rs aktivujú aj ERK signalizáciu, ktorá inhibuje apoptózu blokovaním kaspázy 8 a následne aj štiepenia Bid proteínov (Giucciardi et al., 2009).

Treťou skupinou receptorov obsahujúcich DD je podrodina TNFR, kde zaraďujeme TNFR1 receptor a menej známe DR3 a DR6. Existuje aj TNFR2 receptor, ale keďže neobsahuje DD, nepodieľa sa na aktivácii apoptózy. TNF $\alpha$  je produkovaný predovšetkým makrofágmi, monocytmi a T-lymfocytmi, a to v membránovej aj rozpustnej forme. Signalizácia TNFR1 je veľmi podobná TRAIL-R, TNFR1 však vytvára dva komplexy proteínov. Prvý komplex je lokalizovaný na

membráne. Pozostáva z receptoru pre TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ), adapterového proteínu TRADD a známych proteínov TRAF1/2, prípadne aj RIP1 (Receptor-interacting protein) a cIAP1/2 (Cytosolic inhibitor of apoptosis protein). Po polyubiquitylácii RIP1 pomocou cIAP1/2 sa aktivuje komplex TAK1. Ten pozostáva z TAK1 kinázy a pomocných proteínov TAB1, TAB2 a TAB3. Následne dochádza k aktivácii aj IKK komplexu, ktorý fosforyluje I $\kappa$ B $\alpha$ . Po jeho fosforylácii sa uvoľní NF- $\kappa$ B, ktorý sa presúva do jadra. Pomocou TNF-R1 sa aktivujú aj p38 MAPK dráhy alebo dráhy, ktorých výsledkom je aktivácia JNK a c-Jun. Tento komplex proteínov je označený ako komplex I a podieľa sa predovšetkým na spustení prozápalových reakcií. Po vytvorení komplexu I sa TNF-R1, TRADD, RIP1 a TRAF2 dostávajú endocytózou do bunky, kde sa na TNFR1 môže pomocou TRADD viazať aj adapterový proteín FADD, ktorý následne rekrutuje proteín cFLIP a prokaspázy 8/10. Tento komplex sa oddelí od membrány a v cytozole vytvára traddozóm alebo tiež komplex II (Micheau, Tchopp, 2003). Inicjuje premenu Bid na tBid, ten následne aktivuje uvoľnenie cytC, tvorbu apoptozómu a spustenie apoptózy. Asociácia komplexu I je regulovaná polyubiquityláciou RIP1 pomocou cIAPs. Tento proces je ďalej inhibovaný proteínmi A20 a CARP2 (Caspase 8/10-associated ring protein 2) (Wilson et al., 2009). Prehľadný obrázok sa nachádza v prílohe (**Obr. 6**).



**Obr. 4** Všeobecná predstava o pôsobení jednotlivých receptorov smrti v apoptotickej signalizácii (Prevzaté z Dempsey et al., 2003)

### 3.4 Patologické prejavy spojené s defektmi proteínov rodiny TNFR

Na základe viacerých štúdií bolo potvrdené, že FasL signalizácia zohráva významnú úlohu v imunitnom systéme. Geneticky modifikované transgenné myši mali zámerne indukované defekty v géne pre Fas receptor. U myši sa prejavila lymfadenopatia (zväčšenie lymfatických uzlín), splenomegália (zväčšenie sleziny), hepatomegália (zväčšenie pečene) a ďalšie autoimunitné poruchy (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). U človeka sa takisto pri poruche FAS génu prejaví autoimunitný lymfoproliferatívny syndróm (ALPS), (Fisher et al., 1995). Celkovo existujú štyri typy ALPS ochorení. Typ IA vzniká mutáciou Fas génov, typ IB Fas ligandových génov a typy IIA a IIB sú spôsobené mutáciami génov pre kaspázy 8 a 10. Typ IA predstavuje 75 % všetkých prípadov ALPS. Druhou formou sú delečné mutácie v intracelulárnej DD Fas receptorov (Straus et al., 2001). V nadmernom množstve sa vytvárajú atypicky vyzerajúce „double“ negatívne lymfocyty (neexprimujú CD4<sup>+</sup> ani CD8<sup>+</sup> receptory) a u týchto pacientov je výrazne zvýšené riziko vzniku rakoviny. Znižuje sa schopnosť zneškodniť nádorové bunky, následkom čoho sa vytvorí napríklad tyroidný karcinóm (Mitsiades et al., 2006). Nadmerná expresia Fas receptoru (CD95) môže takisto znamenať nebezpečenstvo. U transgenných myši došlo k výraznému poškodeniu hepatocytov ako dôsledok nadmernej aktivácie T lymfocytov, čo napokon vyvolalo hepatitídu (Strasser et al., 2009).

Na základe výskumu pomocou knockout myši sa potvrdilo, že nefunkčný TRAILR prispieva k vzniku lymfómov a nádorov po pôsobení dietylnitrozamínu (Finnberg et al., 2008). V mnohých nádorových bunkách cholangiokarcinómov, hepatocelulárnych karcinómov a karcinómov hrubého čreva bola zvýšená TRAIL aktivácia NF-κB (Kim et al., 2002). Na myšom modeli bolo tiež preukázané, že TRAIL zohráva významnú rolu pri prevencii formácie hepatokarcinómu (Seki et al., 2003). Aj s TNFR1 súvisí mnoho abnormalít. Bolo pozorované, že deregulácia tejto signalizácie viedla k vzniku hemoragickej nekrózy, reumatoidnej artritídy a Crohnovej choroby, ako píše Carswell a ďalšie tímy (Carswell et al., 1975). Veľmi závažný je aj tzv. TRAPS syndróm (TNF receptor associated syndrome), pri ktorom sa opakovane vyskytujú silné horúčky a bolesti brucha. Prvýkrát bol popísaný v roku 1982. Je to autozomálne dominantné ochorenie vyvolané viacnásobnou mutáciou génu pre TNFR1 receptor (Rezaei N., 2006).



## 4. Adapterové proteíny z rodiny DD

Ako adapterové proteíny označujeme všetky proteíny, ktoré väčšinou neplnia katalytickú funkciu, ale sú dôležité pre samotný priebeh signalizácie. V apoptotickej signalizácii sa uplatňujú proteíny, ktoré obsahujú DD, DED a CARD doménu. Všetky sú súčasťou DD nadrodiny proteínov. DD je súčasťou adapterových proteínov a povrchových receptorov (DRs), ktorých vlastnosti a popis sú uvedené vyššie. DED (Death Effector Domain) je súčasťou adapterových proteínov, proteínu cFLIP a prokaspáz 8 a 10, ktorých vlastnosti sú rozobrané ďalej. Medzi tieto adapterové proteíny sa tradične zaraďujú FADD, TRADD, ďalej menej známe DEDD, DEDD2, RIP a PEA-15. Tieto proteíny sa zúčastňujú nielen regulácie apoptózy, ale aj regulácie transkripcie, migrácie, proliferácie, v embryonálnom vývoji a zabezpečujú homeostázu v imunitnom systéme (Valmiki et al., 2008). Už z tohto prehľadu je zrejmé, že v tomto systéme existuje veľké množstvo abnormalít a defektov. Pre ilustráciu je možné uviesť, že DD je len u človeka súčasťou asi 31 proteínov, zatiaľ čo DED je obsiahnutá v 8 najznámejších proteínoch (Yu et al, 2008). Zaujímavý je aj fakt, že okrem proteínov obsahujúcich DED doménu boli objavené aj ďalšie proteíny ako HIPPI, HIP, BAR, Bap31, Flash a Dap3, ktoré obsahujú pseudo-DED (Reed et al., 2004). V nasledujúcom oddiele sú rozobrané vlastnosti najznámejších proteínov, ktoré obsahujú DED prípadne DD.

### 4.1 Všeobecná štruktúra proteínov z rodiny DD

V súčasnej dobe je štruktúra DD a DED pomerne dobre známa. Vychádzajúc z mnohých štúdií platí, že DD adapterových proteínov interaguje s receptorom smrti pomocou elektrostatických interakcií a DED doména uplatňuje hydrofóbne interakcie. Niektorým skupinám sa podarilo zostaviť štruktúru DED. Valmiki a kol. uvádzajú, že DED obsahuje šesť antiparalelných helixov v konformácii gréckeho kľúča, pričom  $\alpha_2$  a  $\alpha_5$  navzájom interagujú s  $\alpha_1$  a  $\alpha_4$  na tandemovej DED (Valmiki et al. 2008). Na  $\alpha_3$  helixe DED sa nachádza typický motív KRKLH bazických aminokyselín, ktoré sú kľúčové pre funkciu adapterového proteínu. Pomocou NMR spektroskopie bolo dokázané, že na  $\alpha_6$  helixe je typický ďalší motív RxDL potrebný pri aktivácii apoptózy (Kaufmann et al., 2002). Ďalšie pokusy ukázali, že mutácie v RxDL motíve sú fatálne a zapríčiňujú neschopnosť FADD proteínu aktivovať apoptotickú signalizáciu

(Carrington et al., 2006). Význam RxDL motívu spočíva aj v inhibícii apoptózy pomocou proteínu MC159 (Molluscum Contagiosum virus protein 159), ktorý zabraňuje väzbe DED na tandemovú DED prokaspázy 8. Pravdepodobne tu dochádza k blokácii asociácie proteínu a následnej oligomerizácie, ktorá je dôležitá pre aktiváciu kaspáz (Valmiki et al., 2008). V roku 2004 bolo preukázané, že naviazanie adapterového proteínu FADD na receptor vyvoláva vznik receptorových zhlukov, ktoré boli pomenované SPOTS (Signaling Protein Oligomeric Transduction Structures) (Siegel et al., 2004). SPOTS sú významné pre amplifikáciu apoptotického signálu a pre správnu aktiváciu prokaspáz.

V roku 1999 sa podarilo pomocou NMR spektroskopie popísať štruktúru DD FADD (Jeong et al., 1999). DD pozostáva zo šiestich  $\alpha$ -helixov, podobne ako DD na receptore. Helixy  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  a  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  sú orientované v strede domény a tvoria hydrofóbne core. Helixy  $\alpha 3$  a  $\alpha 6$  sú výrazne oddelené na opačných stranách domény. Helixy  $\alpha 2$  a  $\alpha 3$  majú opačnú polaritu AK zvyškov. Helix  $\alpha 3$  je zároveň najviac flexibilný. Interakcia oboch DD (na FADD a receptore) je zabezpečená vzájomnou asociáciou pomerne komplementárnych povrchov, pričom najviac sa na nej podieľajú helixy  $\alpha 3$  a  $\alpha 2$  (Jeong et al., 1999).

Ďalšou významnou doménou je CARD doména (Caspase recruitment domain), ktorá je súčasťou proteínu Apaf-1 a Prokaspázy-9, ktoré zohrávajú v apoptóze významnú úlohu. Zároveň je súčasťou aj mnohých ďalších proteínov, ktoré sú uvedené v prehľadnom obrázku č. 7 v prílohe. Štruktúra CARD domény je podobná DD a DED. Je zložená zo šiestich  $\alpha$ -helixov v antiparalelnom usporiadaní. Je tu rozdiel v usporiadaní  $\alpha 1$  helixu, ktorý má tendenciu rozpadávať sa na dva helixy označené ako  $\alpha 1a$  a  $\alpha 1b$ . Navyše orientácie a dĺžky jednotlivých helixov sa líšia medzi proteínmi obsahujúcimi CARD doménu. Štruktúrna plasticita helixov je značne obmedzená a jednotlivé helixy obsahujú bazické aj kyslé aminokyseliny, čo významne prispieva k proteín-proteínovej interakcii (Qin et al., 1999). Interakcia CARD domén Apaf-1 a Prokaspázy-9 sa uskutočňuje pomocou kladne nabitých aminokyselinových zvyškov na  $\alpha 1a$ ,  $\alpha 1b$  a  $\alpha 4$  na Apaf-1 s negatívne nabitými zvyškami na helixoch  $\alpha 2$  a  $\alpha 4$  na prokaspáze-9 (Qin et al., 1999). Zatiaľ ostáva nejasné, či podobné iónové interakcie existujú aj u ostatných proteínov obsahujúcich CARD doménu.

## 4.2 Adapterové proteíny obsahujúce DD (Death domain)

Do tejto skupiny môžeme zaradiť proteíny FADD, TRADD a RIP, ktoré boli najviac preskúmané. V prílohe (**Obr. 7**) je uvedený prehľad ďalších proteínov obsahujúcich DD, ale ich význam a vlastnosti sú málo známe.

Proteín FADD (Fas-associated death domain) je jedným z najvýznamnejších adapterových proteínov. Mechanizmus aktivácie apoptózy pomocou FADD už bol popísaný vyššie (str. 13). Dôležité je pripomenúť, že kaspáza 8 môže súčasne spustiť apoptózu pomocou proteínu Bid a následne uvoľnením cytC z mitochondrií. FADD viaže aj proteín cFLIP, ktorý sa uplatňuje ako inhibítor apoptózy. FADD reaguje so všetkými proteínmi pomocou homotypických interakcií v DD alebo DED (Yu et al, 2008).

Proteín FADD sa okrem regulácie apoptózy podieľa aj na regulácii mnohých iných procesov prebiehajúcich v bunke. Podľa nedávnych výskumov sa FADD podieľa na regulácii bunkovej proliferácie. Počas skorej fázy mitózy, kazeín kináza I $\alpha$  interaguje s FADD na deliacom vretienku. FADD je fosforylovaný na C-konci a následne reguluje priebeh bunkového cyklu v G<sub>2</sub> a M fáze (Yu et al., 2008). Najviac sa táto schopnosť prejavuje u lymfocytov a NK buniek. FADD zohráva veľmi dôležitú úlohu aj v embryogenéze. Dysfunkcia FADD sa prejavuje vo veľmi závažných poruchách vývoja, ktoré sú často letálne. Problémy sa prejavujú už v žltkovom vaku, najmä abnormálnym vývojom srdca a neurálnej trubice (Valmiki et al., 2008).

V roku 2000 bolo zistené, že FADD je schopný indukovať bunkovú smrť aj iným mechanizmom, nezávislým od kaspáz. Ukázalo sa, že DED je schopná vyvolať oxidatívny stres pomocou kyslíkových radikálov, ktorý sa prejavuje vážnymi poruchami DNA a ďalšími mutáciami. Po pridaní vitamínu E ako antioxidantu alebo po zvýšenej expresii niektorých enzýmov, napríklad superoxid dysmutázy (SOD), sa letalita výrazne znižuje (Lee et al., 2000).

Posledná zaujímavá informácia o proteíne FADD sa týka jeho výskytu v bunke. V roku 2003 bolo preukázané, že FADD pravdepodobne nie je lokalizovaný v submembránovom priestore, ako sa pôvodne myslelo, ale je to jadrový proteín zúčastňujúci sa regulácie mitózy, ktorý sa môže do cytozolu transportovať pomocou zatiaľ neznámeho mechanizmu (Sheikh and Huang, 2003).

TRADD (Tumor necrosis factor receptor 1-associated death domain) proteín je ďalším významným predstaviteľom adapterových proteínov. TRADD je intracelulárny proteín naviazaný na DD receptorov TNFR-1, DR3 a pravdepodobne aj

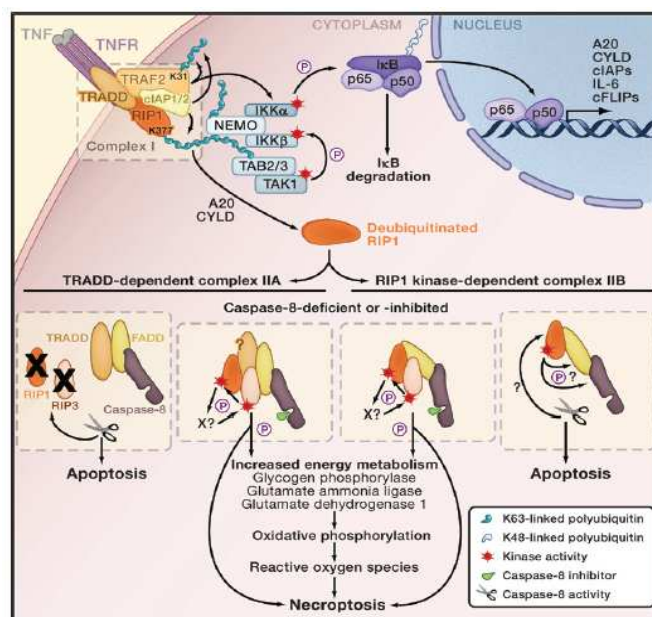
DR6 pomocou homotypickej interakcie. Podieľa sa nielen na regulácii apoptózy, ale aj na aktivácii signálnej dráhy NF- $\kappa$ B, JNK, ERK a p38. Zároveň sa ukázalo, že zohráva dôležitú úlohu v aktivácii T-lymfocytov a pri zápalových reakciách. TRADD interaguje aj s proteínom FADD, čím dochádza k naviazaniu prokaspáz a následnej aktivácii apoptotickej dráhy. Na druhej strane reaguje aj s proteínmi RIP1, TRAF2/5 a cIAPs1/2, ktoré napomáhajú aktivovať neapoptotické dráhy ako JNK a NF- $\kappa$ B. TRADD reaguje aj s inými receptormi, ktoré nepatria do TNF-R nadrodiny, ako napríklad receptor IFN $\gamma$  (Wesemann et al., 2004). Chen neskôr dokázal, že TRADD sa podieľa aj na aktivácii MAPK kaskády. Pripravil knockout myši s deléciou *tradd* génu, ktorá sa prejavila v neschopnosti aktivovať MAPK kaskádu v prítomnosti ligandu TNF $\alpha$  (Chen et al., 2008). Rovnaká situácia nastala aj v JNK a ERK dráhe. V posledných rokoch sa podarilo objasniť úlohu TRADD v signalizácii imunitných buniek (Wilson et al., 2009). Podieľa sa na neapoptotickej signalizácii T lymfocytov, kde vytvára komplexy s TCRs (T cell receptor), TLRs (Toll-like receptors) a RLHs (Retinoic acid-inducible gene I-like helicases) (Wilson et al., 2009). Zároveň existuje predpoklad, že signalizácia z TRADD môže byť prepojená s FADD dráhou a naopak. Napríklad TRADD reaguje s RIP1 a FADD a aktivuje prokaspázu 8 alebo DR4/5 aktivujú MAPK a NF- $\kappa$ B prostredníctvom FADD a prokaspázy 8 (Wilson et al., 2009).

Zaujímavý je mechanizmus aktivácie neapoptotických dráh. Najvýznamnejším proteínom v tejto skupine je RIP (Receptor interacting protein). RIP1 je súčasťou RIP serín/treonínových kináz, ktoré obsahujú na N-konci kinázovú doménu. V C-koncovej oblasti sa nachádza DD, pomocou ktorej interagujú s receptormi smrti. Zároveň interagujú s proteínmi TRADD a FADD. RIP1 interaguje pomocou homotypických interakcií s proteínom RIP3. Jeho dysfunkcie sa prejavujú závažnými poruchami vo vývoji embrya, ktoré sú letálne. Kultivované bunky sú výrazne citlivé na prítomnosť cytokínu TNF $\alpha$ , pretože nie sú schopné aktivovať záchrannú signalizáciu pomocou NF- $\kappa$ B (Kelliher et al., 1998). Na bunkovej membráne sa vytvára komplex I zložený z receptoru smrti, napríklad TNFR1. V cytoplazme sa do DD viaže adapterový proteín TRADD a ten viaže RIP1. Súčasťou komplexu sú aj proteíny TRAF 2 a cIAP1/2. Vychádzajúc z mnohých štúdií platí, že po aktivácii apoptózy receptorom smrti najskôr cIAP1/2 ubiquitinyľujú RIP1 (Varfolomeev et al., 2008). Ubiquitinylácia je kľúčová pre ďalší priebeh signalizácie, kde RIP1 môže pôsobiť ako inhibítor alebo iniciátor apoptózy. Ak je ubiquitinylovaný na Lys63, aktivuje MAPK kaskádu a NF- $\kappa$ B, ktorý funguje ako záchranný proteín. Aktivita cIAPs je inhibovaná proteínmi A20 a

CYLD (Cylindromatosis deubiquitinase), ktoré pôsobia opačne. V tomto prípade je ubiquitinylácia Lys63 dôležitá pre spustenie signálnej dráhy. Podobne nastane inhibícia aj ubiquitinyláciou Lys63 RIP1 pomocou CARP2 (Caspase 8/10-associated ring protein 2), ktorá umožní RIP1 interagovať s proteínom TAK 1 (Transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1) s naviazanými proteínmi TAB 2 a 3. Následne je aktivovaný IKK-komplex, ktorý obsahuje IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  a najvýznamnejší IKK $\gamma$ /NEMO, ktorý fosforyluje I $\kappa$ B proteín. Fosforylovaný I $\kappa$ B je polyubiquitinylovaný na Lys48 a následne je degradovaný v proteazómoch. To umožňuje prechod NF- $\kappa$ B do jadra, kde reguluje expresiu mnohých génov (**Obr. 8**). V tomto prípade Lys48 slúži ako značka pre degradáciu I $\kappa$ B.

V prípade, kedy RIP1 nie je ubiquitinylovaný na Lys63, TNFR1 prechádza do cytoplazmy, kde vytvára komplex IIA. Viaže na seba proteíny TRADD a FADD, následne pomocou kaspázy 8 štiepi proteín RIP1. Zároveň v cytoplazme môže vzniknúť aj komplex IIB zložený z FADD a RIP1, ktoré aktivujú kaspázy 8, a tým aj celú apoptotickú signalizáciu (Wang et al., 2008) (**Obr. 8**).

Proteín RIP3 sa podieľa na aktivácii apoptózy nezávisle od kaspáz. Avšak ukázalo sa, že u myši s deletovaným génom *rip3* sa neprejavili žiadne poruchy vo vývoji embrya, aktivácii NF- $\kappa$ B a apoptózy (Newton et al., 2004). Viacero skupín preukázalo, že RIP3 zohráva významnú úlohu v programovanej nekróze-nekroptóze (Declercq et al., 2009).



**Obr. 8** Prehľad procesov prebiehajúcich po aktivácii proteínu RIP1

(Prevzaté z Declercq et al., 2009)

### **4.3 Adapterové proteíny obsahujúce DED (Death effector domain)**

DED doménu obsahujú viaceré proteíny, okrem iného aj FADD a TRADD, ktoré boli popísané vyššie. Medzi ďalšie najvýznamnejšie zaraďujeme DEDD, DEDD2, PEA-15, Kaspázy 8 a 10 a ich regulátor cFLIP. Ich vlastnosti sú rozobrané v nasledujúcich odstavcoch.

V roku 1998 Stegh a jeho tím objavili ďalší adapterový proteín, ktorý nazvali DEDD (DED-containing DNA-binding protein) (Stegh et al., 1998). Dnes vieme, že je to asi 37kDa proteín, DED sa nachádza na N-konci a v štruktúre sa nachádzajú dva signály NLS, ktoré po aktivácii CD95 umožňujú vstup DEDD do jadra, kde aktivuje apoptózu pomocou jadrovej kaspázy 6. Nutná je aj prítomnosť proteínu DEDAF. Tu okrem toho dochádza k regulácii génovej expresie. Viaže sa na DNA a nukleozómy, kde blokuje syntézu viacerých významných proteínov. DEDD môže aktivovať apoptózu aj pomocou cytozolovej kaspázy 3. Dokonca bolo dokázané, že DEDD reaguje aj s kaspázami 8 a 10, pravdepodobne tu dochádza k translokácii do jadra a inhibícii proteosyntézy (Alcivar et al., 2003). Ďalej sa predpokladá, že príbuzný proteín DEDD2 vyvoláva apoptózu pomocou C-koncovej sekvencie a v jadre reaguje s proteínom DEDD. DEDD2 objavil v roku 2002 Roth a nezávisle aj Zhan.

Je zaujímavé, že DEDD2 interaguje s proteínom cFLIP, ale nereaguje s kaspázou 8 a FADD (Roth et al., 2002). DEDD sa v cytoplazme vyskytuje prednostne v diubiquitinylovanom stave a je naviazaný na keratín 18 a prokaspázu 3. Po iniciácii apoptózy sa aktivuje kaspáza 3, ktorá proteolyticky degraduje keratín 18 a ten vytvára vnútrobunkové inklúzie (Lee et al., 2002). Tým teda DEDD reguluje organizáciu intermediárnych filamentov. Neskôr sa ukázalo, že DEDD plní v bunke aj iné funkcie. Viaže sa na mitotický Cdk1/cyklín B1, a tým inhibuje bunkový cyklus a dokonca aj veľkosť bunky (Arai et al., 2007).

Ďalším významným adapterovým proteínom obsahujúcim DED je PED/PEA-15 (Phosphoprotein Enriched in Astrocytes 15). Je to 15kDa proteín obsahujúci jednu DED doménu. V niektorých typoch buniek sa podieľa na inhibícii apoptózy podobne ako cFLIP. Bolo zistené, že je zodpovedný za inhibíciu FADD a TNF $\alpha$  signalizácie. PEA-15 musí byť pre správnu funkciu fosforylovaný na Ser104 a Ser114 pomocou proteínkinázy C $\alpha$  a proteínkinázy B (Xiao et al., 2002). Fosforylovaný PEA-15 sa viaže na DISC, a tým inhibuje apoptózu. Zároveň bolo potvrdené, že PEA-15

neobsahuje KRKLH motív bazických AK, DED je na C-konci a helix  $\alpha 3$  je kratší ako u FADDu (Kaufmann et al., 2002). PEA-15 reguluje aj bunkovú proliferáciu. Fosforylovaná forma sa viaže na FADD, nefosforylovaná sa viaže na ERK/MAPK a tým bráni jeho akumulácii v jadre, čím inhibuje transkripciu proteínov regulujúcich bunkový cyklus. PEA-15 viaže aj ribozomálnu S6 kinázu 2 (RSK2), ktorá reguluje proliferáciu pomocou p27<sup>kip1</sup> a GSK3 $\alpha$  (Valmiki et al., 2008). PEA-15 takisto reguluje migráciu buniek. V mnohých nádorových bunkách bola indikovaná zvýšená expresia. Mechanizmus spočíva v inhibícii Ras signalizácie integrínov, ktoré sú kľúčové pre invazivitu nádorových buniek. Naopak u nádorov pŕs a astrocytov bola expresia PEA-15 znížená. Ako zaujímavosť môžeme uviesť ešte jeden proteín CLARP (Caspase-like apoptosis regulatory protein), ktorý interaguje s kaspázou 8 a reguluje apoptózu (Inohara et al., 1997). Je to však menej známy proteín a nezohráva takú významnú úlohu ako ostatné vyššie popísané proteíny.

Kaspázy (Cysteine-dependent Aspartate-specific Proteases) sú najvýznamnejšie proteíny apoptotickej signalizácie. Pomocou nich sa signál prenáša v podobe kaskády buď vonkajšou, alebo vnútornou dráhou apoptózy. Vo svojom aktívnom mieste obsahujú Cys a substrát štiepia za Asp. Sú syntetizované ako prokaspázy vo forme zymogénu, pretože ich aktívna forma by bola za bežných podmienok v bunke nebezpečná. Tradične pozostávajú z N-koncového prodomény, malej podjednotky ~10 kDa, veľkej podjednotky 20 kDa a niektoré obsahujú spojkový úsek aminokyselín. Do dnešnej doby bolo popísaných 14 kaspáz u cicavcov. U ostatných organizmov boli popísané aj ďalšie kaspázy. Všeobecne sa kaspázy delia na iniciátorové a efektorové. Iniciátorové, ako kaspázy 2, 8, 9 a 10, sa podieľajú na aktivácii ďalších tzv. efektorových kaspáz, najmä 3, 6, a 7. V tejto práci je rozobraná funkcia kaspáz 8 a 10, ktoré obsahujú DED a priamo interagujú s adapterovými proteínmi. Regulácia celého systému kaspáz je zabezpečená pomocou mnohých proteínov. Pre funkciu iniciátorových kaspáz 8 a 10 je významným aj proteín cFLIP. Objavené boli aj neapoptické kaspázy, ako napríklad kaspáza 1, ktoré sa podieľajú na aktivácii zápalových reakcií pomocou interleukínov.

Funkciou kaspáz je nielen regulácia apoptózy, ale aj regulácia zápalových reakcií, správneho vývoja a iných procesov. Vonkajšia apoptotická dráha je zodpovedná za reguláciu nepotrebných buniek v embryogenéze, pri maturácii lymfocytov a pri eliminácii nádorových buniek (Boatright et al., 2003). Najlepším príkladom je aktivácia pomocou CD95, kedy dochádza k naviazaniu FADD

a napokon aj aktivácii prokaspázy 8 a u človeka aj prokaspázy 10. Keďže tieto formy sú neaktívne, vo forme zymogénu, je tu potrebná určitá štruktúrna zmena. Kaspázy sa viažu na FADD pomocou homofilnej interakcie N-koncovej DED. Najvýznamnejším procesom je dimerizácia kaspáz, ktorá vedie k ich aktivácii a stabilizácii DISC komplexu. N-koncové DEDs sú odstránené, čím umožňujú uvoľnenie kaspáz do cytozolu. Efektorové prokaspázy existujú vo forme diméru a aktívna forma vzniká konformačnou zmenou a odhalením aktívneho miesta. Zaujímavá je najmä kaspáza 10, ktorá u myši nebola identifikovaná. Existuje viacero špekulácií o funkcii kaspázy 10 u človeka, ale pravdepodobne plní iné funkcie ako kaspáza 8. Pri delícii génu pre kaspázu 10 sa prejavili autoimunitné ochorenia. Bolo dokázané, že dysfunkcia kaspázy 8 je pre bunku fatálna a zároveň sa znižuje aj expresia kaspázy 10, takže jej schopnosť nahradiť funkciu kaspázy 8 je diskutabilná (Kischkel et al., 2001). Ukázalo sa, že iniciátorové kaspázy môžu pravdepodobne nahradiť funkciu efektorových kaspáz v prípade, kedy efektorové kaspázy nie sú dostatočne aktivované (Philchenkov, 2004).

Spôsob inhibície iniciátorových prokaspáz popisuje mnoho štúdií. Najvýznamnejším regulátorom je proteín cFLIP. Je exprimovaný v troch formách, a to cFLIP<sub>L</sub>, cFLIP<sub>S</sub> a cFLIP<sub>R</sub> (Yu et al., 2008). L-long obsahuje tandemové DEDs na N-konci a neaktívnu proteolytickú doménu na C-konci. S-short a R-Raji obsahujú iba N-koncovú DED. Zatiaľ čo S a R forma inhibujú apoptózu, L-forma je schopná za určitých okolností a koncentrácií aktivovať prokaspázy. Píše o tom Micheau, ktorý uvádza, že cFLIP<sub>L</sub> je štruktúrny homológ kaspáz a inhibuje apoptózu tvorbou heterodiméru s kaspázou 8, ale zároveň iniciuje proteolytickú aktivitu prokaspázy 8 a tým aktivuje apoptózu (Micheau et al., 2002). O inhibícii a aktivácii rozhoduje množstvo exprimovaného FLIPu. Pri vysokých koncentráciách kompetuje s kaspázou 8 a inhibuje apoptózu. Pri fyziologickej koncentrácii ~1% aktivuje kaspázu 8 (Chang et al., 2002). cFLIP plní v bunke aj ďalšie funkcie. Proteolytická úprava L-formy a S-formy pomocou prokaspázy 8 zohráva dôležitú úlohu pri regulácii bunkovej proliferácie, kde sa FLIP podieľa na aktivácii ERK dráhy a NF-κB dráhy. Produkt proteolytického štiepenia cFLIPu, FLIP(p43) interaguje s proteínom TRAF2 a aktivuje NF-κB dráhu (Kataoka et al., 2004). Existuje aj ďalší inhibítor kaspázy 8. Je to vírusový proteín p35, ktorý sa viaže na aktívne miesto kaspázy pomocou N-koncovej oblasti. Cys360 kaspázy 8 sa pomocou tioesterovej väzby viaže na Asp87 p35 (Riedl et al., 2004).



## **4.4 Adapterové proteíny obsahujúce CARD (Caspase recruitment domain)**

CARD doména je súčasťou mnohých proteínov (**obr. č. 7** v prílohe). V súčasnej dobe sú najviac popísané proteíny Apaf-1 a Kaspáza 9. Keďže práca sa zaoberá proteínmi obsahujúcimi DD a DED, ich vlastnosti sú uvedené len v stručnosti.

Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor) proteín je významným členom apoptotickej signalizácie. Podmienkou aktivácie apoptózy je existencia proapoptotického signálu, napríklad poškodenie DNA, radiácia, pôsobenie cytostatík alebo nedostatok záchranných signálov. Výsledkom iniciácie je aktivácia aj tzv. vnútornej apoptotickej dráhy, kedy sa z medzimembránového priestoru mitochondrií uvoľňuje proteín cytochróm c. Ten za spotreby ATP vytvára v cytoplazme makromolekulový komplex s molekulovou hmotnosťou ~1,4 MDa nazývaný apoptozóm. Je zložený zo siedmich proteínov Apaf-1. Súčasťou Apaf-1 je CARD doména, do ktorej viaže neaktívnu formu kaspázy-9, prokaspázu-9 (Pérez-Payá et al., 2010). Procesy, ktoré vedú k vytvoreniu aktívnej kaspázy-9 sú dodnes nepreskúmané. Kaspáza-9 existuje po štiepení asociovaná s apoptozómom. Je zložená z veľkej 35 kDa podjednotky a malej 15 kDa (Jiang et al., 2000).

Ďalej je známe, že po naviazaní do apoptozómu sa zvýši enzymatická aktivita kaspázy-9 2000 násobne. Boli vytvorené dva modely, ktoré popisujú aktiváciu kaspázy-9. Prvý model predpokladá, že po priblížení sa viacerých prokaspáz dochádza k autoproteolytickému štiepeniu a aktivácii (Salvesen et al., 2004). Avšak tento model nepopisuje procesy, ktoré vedú k ich aktivácii. Druhá predstava je založená na tom, že kaspáza-9 je aktivovaná dimerizáciou, ktorá je uľahčená jej naviazaním do apoptozómu (Renatus et al., 2001). Vďaka dimerizácii sa pravdepodobne spustia konformačné zmeny, ktoré odhalia aktívne miesto. Aktivovaná kaspáza-9 funguje ako iniciátorová kaspáza, ktorá ďalej aktivuje efektorové kaspázy 3, 6, a 7.

## **4.5 Patologické prejavy spojené s defektmi expresie proteínov rodiny DD**

Na základe mnohých genetických manipulácií bolo potvrdené, že dysfunkcia FADD a ďalších proteínov je fatálna pre priebeh proliferácie. Dôkazom je štúdia, pri ktorej boli pripravené transgenné myši, ktoré mali Asp mutáciu na Ser191. U myší sa

prejavila anémia, splenomegália a ďalšie veľmi závažné poruchy imunity, ktoré súvisia s proliferáciou T lymfocytov (Hua et al., 2003). Zvýšený výskyt fosforylovaného FADD je prítomný aj v pľúcnych nádorových bunkách. Zároveň sa tu prejavuje zvýšená expresia NF- $\kappa$ B, zníženie počtu buniek v G<sub>2</sub> fáze bunkového cyklu a zvýšená expresia cyklínov (Chen et al., 2005). Neskôr bolo dokázané, že rovnaký princíp platí aj pre nádory prs (Matsuyoshi et al., 2006). S dysfunkciou PEA-15 súvisia ďalšie závažné abnormality. Bolo dokázané, že nadmerná expresia PEA-15 spôsobuje aktiváciu proteínkinázy C, zníženie produkcie inzulínu, čím sa vyvinie diabetes II. typu (Vigliotta et al., 2004). V roku 2005 bolo preukázané, že v nádoroch prs je PEA-15 nadmerne exprimovaný pomocou proteínu AKT (Stassi et al., 2005). Aj ďalšie skupiny dokázali, že deregulácia v proteíne PEA-15 je fatálna a spôsobuje vznik nádorov (Formisano et al., 2005). Jeho nadmerná expresia zvyšuje pravdepodobnosť vzniku rakoviny kože po pôsobení chemických iniciátorov. S dysfunkciou kaspáz súvisí mnoho závažných abnormalít. Deregulácia expresie kaspáz 8 a 10 spôsobuje viacero typov detských nádorov a neuroendokrinné pľúcne nádory (Harada et al., 2002). Strata expresie kaspázy 8 vyvoláva vysokometastázujúce ľudské neuroblastómy (Hopkins-Donaldson et al., 2000). V nedávnej dobe boli vyvinuté potenciálne chemické inhibítory kaspáz využiteľné v nádorovej terapii (Philchenkov, 2004). Mutácie v génoch kódujúcich kaspázu 10 sa prejavujú ALPS syndrómom II typu (IIA). Podstata ochorenia bola popísaná v roku 1999. Pacientom bolo 11-ročné dievča, u ktorého diagnostikovali adenopatiu, hepatosplenomegáliu, hemolytickú anémiu a hypergamaglobulinémiu. Koncentrácia lymfocytov bola indikovaná s 42% nárastom v porovnaní so zdravým človekom (Wang et al., 1999). V nasledujúcich rokoch boli popísané ďalšie prípady, spojené s veľmi závažnými poruchami imunitného systému. ALPS typu IIB vzniká ako dôsledok mutácií v génoch pre kaspázu 8. Jeho fenotypové prejavy sú veľmi podobné typu IIA (Puck et al., 2004).

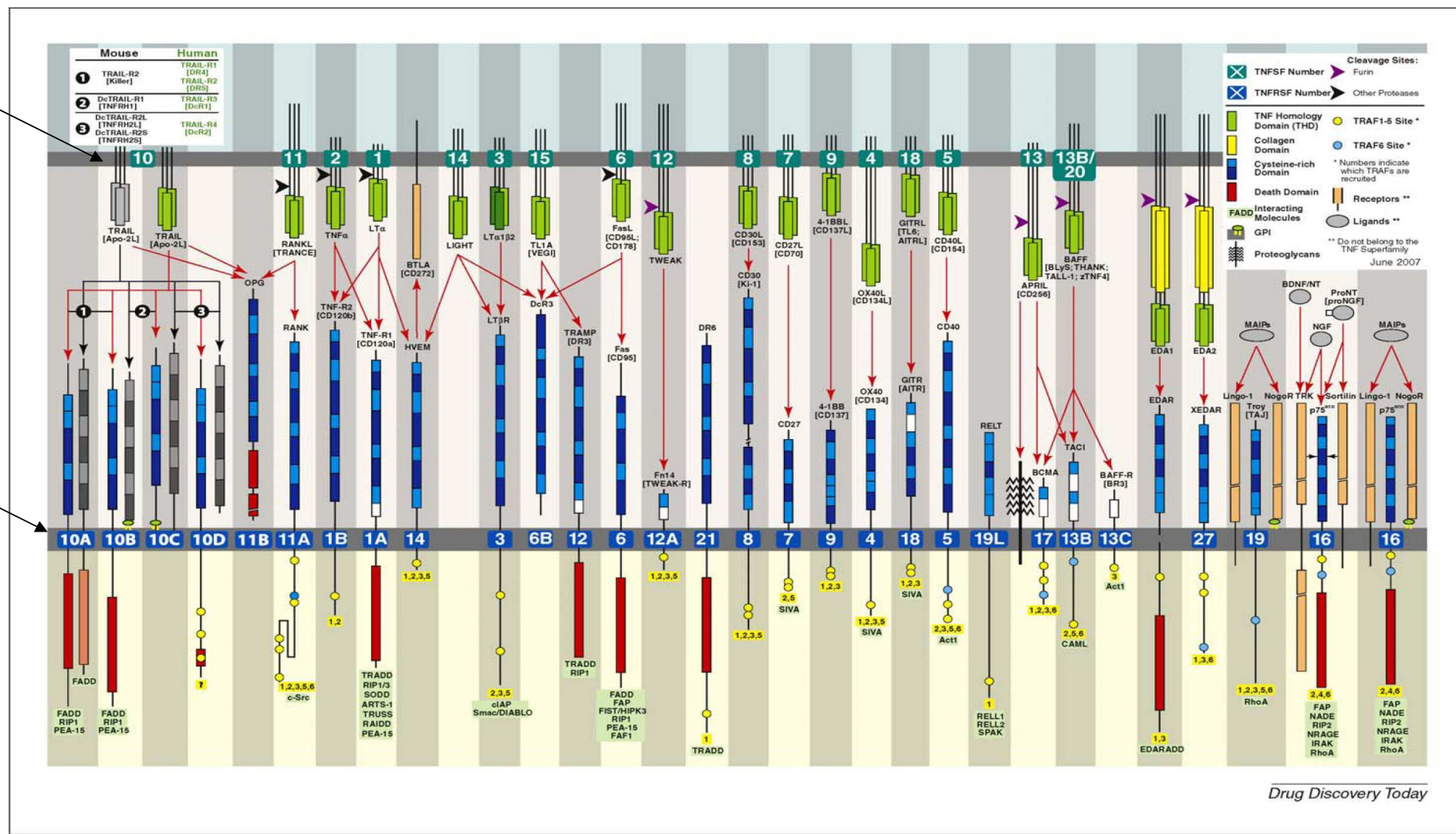
## 5. Záver

Cieľom tejto bakalárskej práce bol popis vlastností a funkcií adapterových proteínov obsahujúcich DD a DED. Je nepochybné, že práve adapterové proteíny zohrávajú významnú úlohu v aktivácii a regulácii apoptotickej signalizácie. Ich zapojenie do apoptotickej signalizácie je realizované pomocou povrchových receptorov smrti, ktoré prijímajú apoptotický signál. Pomocou ďalších proteínov vonkajšej apoptotickej dráhy sa šíri až na efektorové kaspázy, ktoré proteolyticky štiepia jednotlivé bunkové zložky. Adapterové proteíny sa nepodieľajú len na regulácii apoptózy, ale aj ďalších významných dráh v organizme, ako sú regulácia proliferácie, správneho embryonálneho vývoja, zápalových reakcií, regulácie expresie mnohých génov a v neposlednom rade aj mnohé regulácie na úrovni imunitných buniek. Pre človeka má apoptóza obrovský význam z mnohých hľadísk. Na viacerých modeloch bolo ukázané, že deregulácie a dysfunkcie takmer všetkých proteínov apoptotickej signalizácie vedú k závažným defektom a abnormalitám. Výraznejšie pochopenie procesov apoptózy na molekulárnej úrovni by posunulo súčasné možnosti liečby neurodegeneratívnych, autoimunitných alebo nádorových ochorení u človeka.

Aj napriek tomu, že základné molekulárne aspekty apoptózy sú známe, ešte stále tu existujú otázky týkajúce sa najmä ich regulácie, bunkovej špecificity a prepojenia s ďalšími signálnymi dráhami, napr. autofagocytózou apod. Internalizácia receptorov smrti je nevyhnutná pre iniciáciu apoptózy. Ukazuje sa, že v niektorých typoch buniek to neplatí a v rôznych receptoroch môže viesť k aktivácii neapoptotických dráh. Ďalším problémom je aktivácia iniciačných kaspáz. Bolo navrhnutých niekoľko modelov, v dnešnej dobe sa uprednostňuje dimerizácia prokaspáz, ktorá vyvolá ich aktiváciu. Uvažuje sa aj o konformačných zmenách, ktoré by vznikli po interakcii DED adapterového proteínu s kaspázou. Dnes je zrejmé, že receptory smrti aktivujú apoptotické aj iné signálne dráhy. Predpokladá sa, že táto odlišná funkcia je zabezpečená konformačnými zmenami v ich štruktúre. Zatiaľ táto hypotéza nebola jednoznačne potvrdená. Stále aktuálnejšou je predstava využitia apoptózy ako jedinečného nástroja v nádorovej terapii. Najväčšie nádeje boli vkladané do ligandu TRAIL, ktorý bol spočiatku veľmi účinný. Ukázalo sa, že TRAIL podporuje aj proliferáciu, migráciu a diferenciáciu buniek, a teda aj vznik malígneho fenotypu. Riešením by bolo zosilnenie proapoptotickej schopnosti TRAILu.

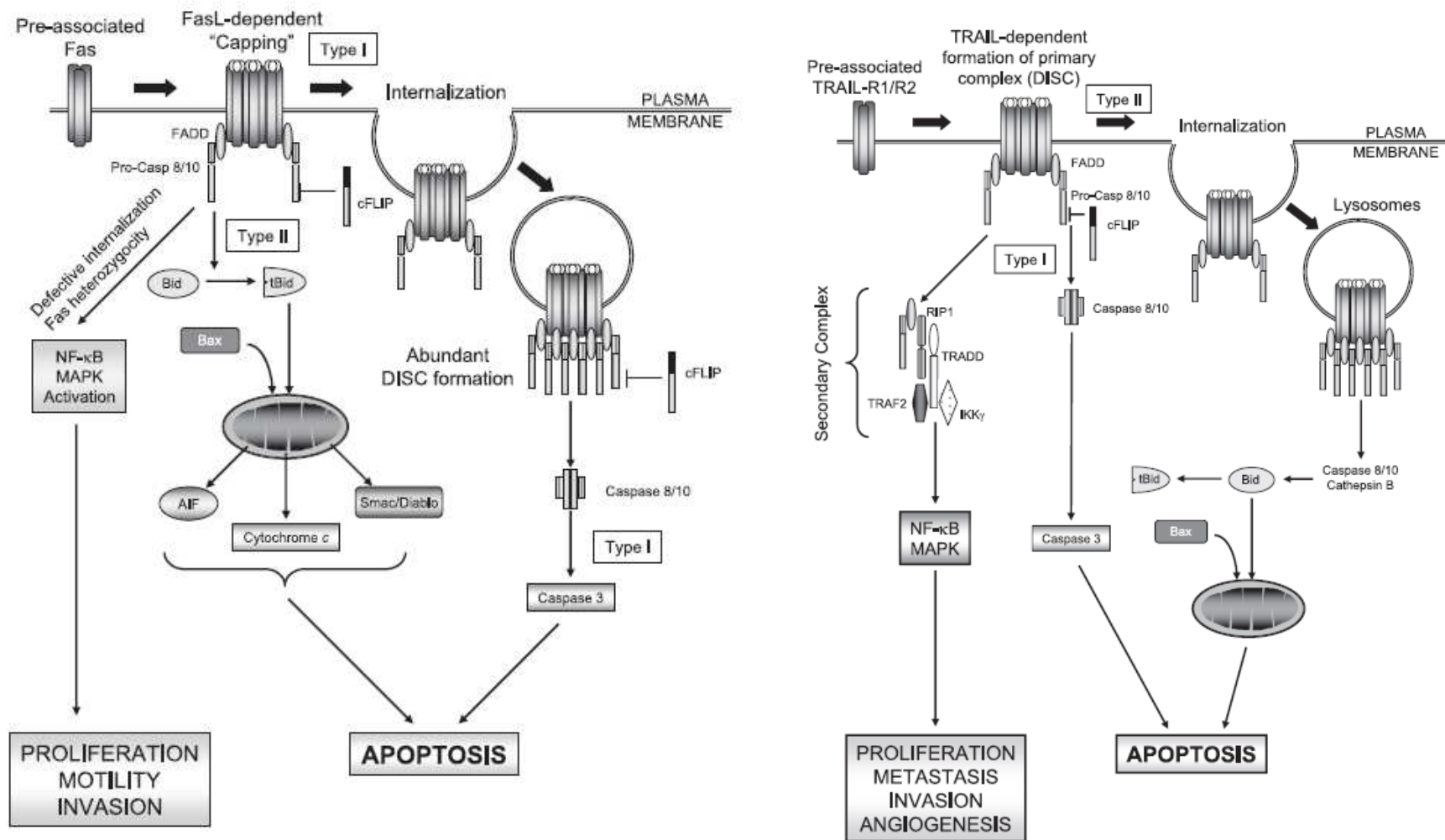
TNFSF

TNFRSF

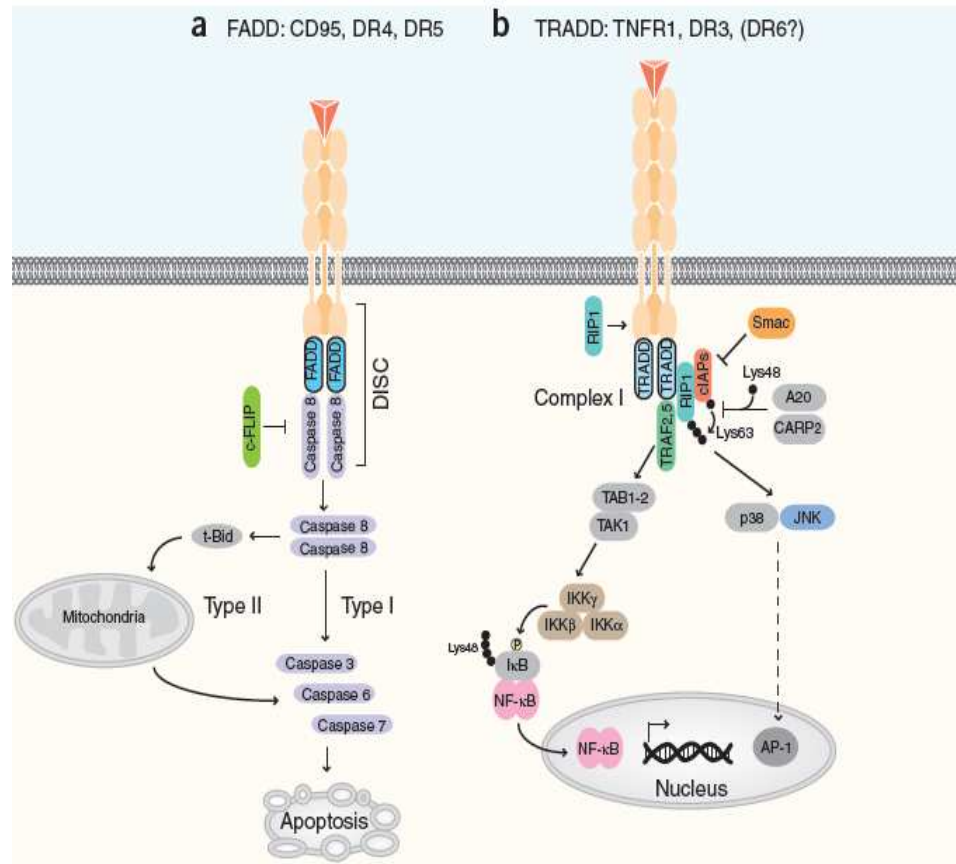
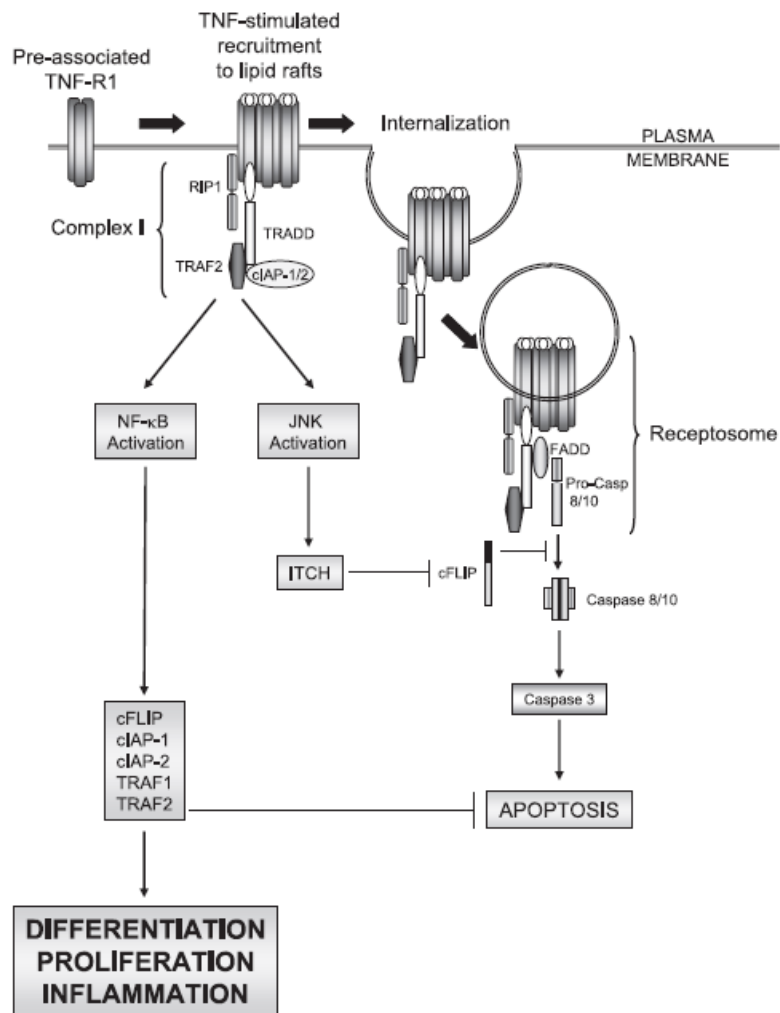


**Obr. 2** Prehľad interakcií ligandov a proteínov rodiny TNFR

V hornej časti obrázku sú znázornené jednotlivé ligandy, dole ich interakcie s proteínmi z rodiny TNFR. Najvýznamnejšie pre apoptotickú signalizáciu sú receptory smrti (Death receptors), ktoré obsahujú DD (Death domain) znázornenú ako červený obdĺžnik. Číselnými kódmi sú označené jednotlivé proteíny z rodiny TNFSF (Tumor necrosis factor superfamily) a TNFRSF (Tumor necrosis factor receptor superfamily) v proteínovej databáze PDB - <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>. (Prevzaté z Tansey et al., 2009).

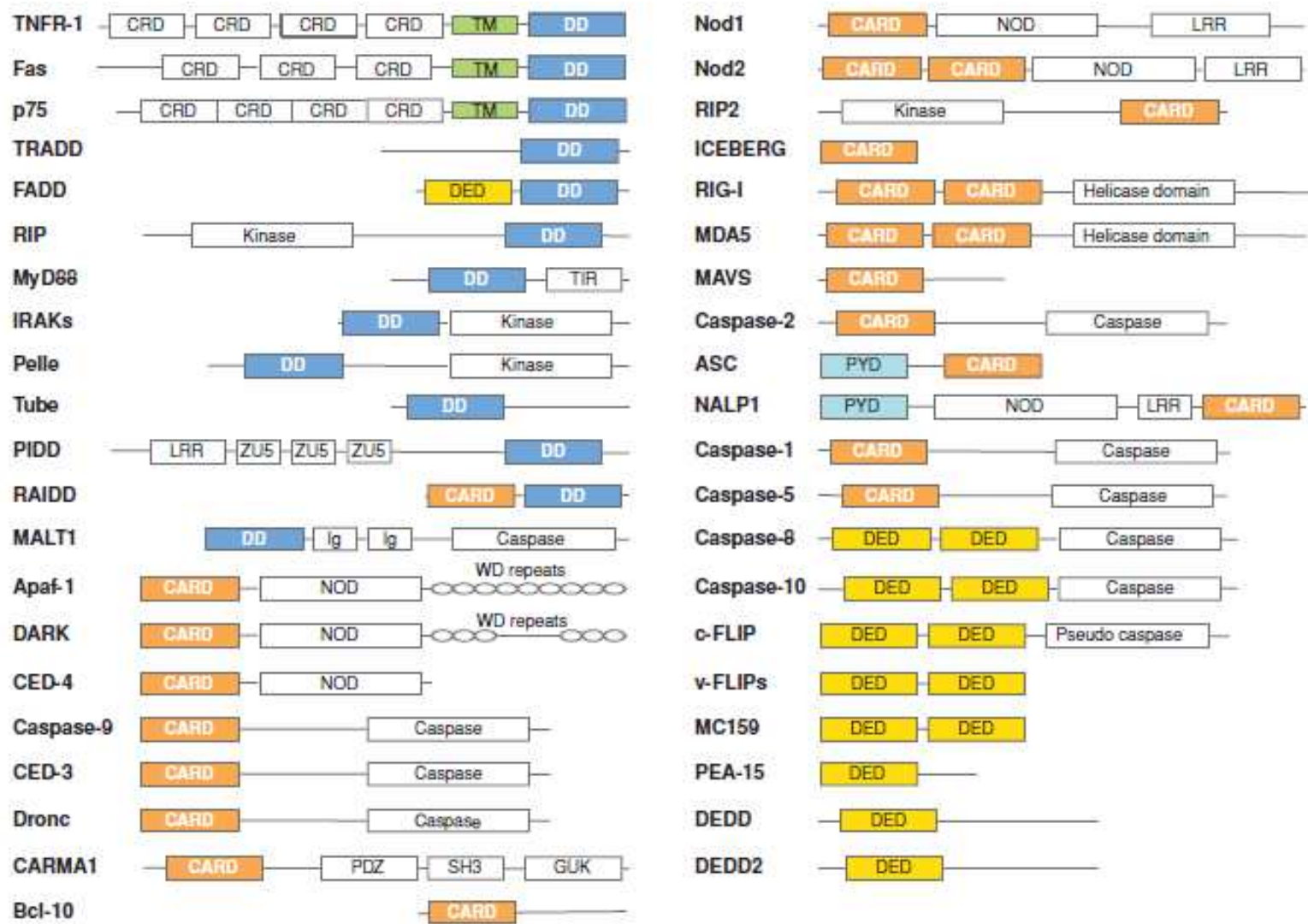


Obr. 5 Porovnanie signalizácie pomocou CD95 receptorov (vľavo) a TRAIL-R (vpravo)  
(Prevzaté z Giucciardi et al., 2009)



**Obr. 6 Apoptická signalizácia pomocou TNFR1 receptorov**  
 Vpravo popis procesov prebiehajúcich v komplexe I receptorov TNFR1  
 (Prevzaté z Giucardi et al., 2009 a Wilson et al., 2009)





**Obr. 7 Usporiadanie jednotlivých domén u vybraných proteínov z Death domain (DD) proteínovej nadrodiny**  
 Tmavomodré obdĺžniky popisujú Death domain (DD), žlté Death effector domain (DED) a hnedé Caspase recruitment domain (CARD)  
 (Prevzaté z Park et al., 2007)

## Zoznam použitých skratiek

|               |  |
|---------------|--|
|               | Proteínová rodina, členovia ktorej sú tiež nazvaní |
| AKT           | proteinkinázy B (PKB)                              |
| AIF           | apoptosis-inducing factor                          |
| ALPS          | autoimmune lympho-proliferative syndrome           |
| Apaf          | apoptosis protease-activating factor               |
| Ask           | apoptosis signal-regulated kinase                  |
| Bak           | Bcl-2 antagonist killer                            |
| Bax           | Bcl-2 associated X protein                         |
| Bcl           | B-cell CLL/lymphoma                                |
| BH            | Bcl homology                                       |
| Bid           | BH3 interacting domain                             |
| CARD          | caspase-recruitment domain                         |
| CARP          | caspase 8/10-associated ring protein               |
| Cdk           | cyklin-dependent kinase                            |
| clAP          | cytosolic inhibitor of apoptosis protein           |
| CLARP         | caspase-like apoptosis regulatory protein          |
| CRD           | cysteine-rich domain                               |
| DAXX          | death domain-associated protein                    |
| DcR           | decoy receptor                                     |
| DD            | death domain                                       |
| DED           | death effector domain                              |
| DEDAF         | death effector domain-associated factor            |
| DEDD          | DED-containing DNA-binding protein                 |
| DISC          | death-inducing signaling complex                   |
| DR            | death receptor                                     |
| EDAR          | ectodysplasin A receptor                           |
| EndoG         | endonuclease G                                     |
| ERK           | extracellular signal-regulated kinase              |
| FADD          | Fas-associated death domain                        |
| FasL          | Fas ligand   |
| cFLIP         | caspase-8 (FLICE)-like inhibitory protein          |
| GSK3 $\alpha$ | glycogen synthase kinase 3                         |
| IFN $\gamma$  | interferon $\gamma$                                |
| IKK           | I $\kappa$ B kinase                                |
| JNK           | c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase             |
| MAPK          | mitogen-activated protein (MAP) kinase             |
| MC159         | Molluscum Contagiosum virus protein 159            |
| MEKK          | mitogen-activated protein/ERK kinase kinase        |
| MKK           | mitogen-activated protein kinase kinase            |
| NEMO          | NF- $\kappa$ B essential modulator                 |
| NF $\kappa$ B | nuclear factor $\kappa$ B                          |
| NGFR          | nerve growth factor receptor                       |
| NK            | natural killer                                     |
| NLS           | nuclear localisation signal                        |
| OPG           | osteoprotegrin                                     |
| PKB/AKT       | proteinkinase B                                    |
| PEA           | phosphoprotein Enriched in Astrocytes              |



|             |   |
|-------------|---|
| PLAD        | preligand association domain                                |
| PRR         | pattern-recognition receptor                                |
| RIP         | receptor-interacting protein                                |
| RLH         | retinoic acid-inducible gene I-like helicase                |
| RSK6        | ribosomal S6 kinase   |
| Smac/DIABLO | second mitochondria-derived activator of caspase            |
| SOD         | superoxide dysmutase  |
| SPOTS       | signaling protein oligomeric transduction structures        |
|             | transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1- |
| TAB         | binding protein   |
| TAK         | transforming growth factor $\beta$ -activated kinase        |
| TCR         | T-cell receptor   |
| TLR         | Toll-like receptor  |
| TNF         | tumor necrosis factor                                       |
| TRADD       | tumor necrosis factor receptor 1-associated death domain    |
| TRAF        | TNF-associated factor                                       |
| TRAIL       | TNF-related apoptosis-induced ligand receptor               |
| TRAPS       | TNF receptor-associated syndrome                            |

## Zoznam použitej literatúry

**Alcivar, A., Hu, S., Tang, J. and Yang, X.** (2003). DEDD and DEDD2 associate with caspase-8/10 and signal cell death. *Oncogene* 22, 291–297.

**Andera, L.** (2009). Signaling activated by the death receptors of the TNFR family. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 153, 173–180.

**Arai, S., Miyake, K., Voit, R., Nemoto, S., Wakeland, E. K., Grummt, I. and Miyazaki, T.** (2007). Death-effector domain containing protein DEDD is an inhibitor of mitotic Cdk1/cyclin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 2289–2294.

**Ashkenazi, A., Dixit, V. M.** (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 255-260.

**Beyaert, R., Fiers, W.** (1994). Molecular mechanism of tumor necrosis factor induced cytotoxicity: What we do understand and what we do not. *FEBS Letters* 340, 9-16.

**Boatright, K. M., Salvesen, G. S.** (2003). Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 725–731.

**Carrington, P. E., Sandu, C., Wei, Y., Hill, J.M., Morisawa, G., Huang, T.** (2006). The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell* 22, 599–610.

**Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B.** (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3666–3670.

**Chan, F. K.** (2007). Three is better than one: Pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine.* 37,101-107.

**Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimnich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E., Yang, X.** (2002). c-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *The EMBO Journal* Vol. 21 No. 14, 3704-3714.

**Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., Hood, L.** (1997). Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF- $\kappa$ B pathway. *Immunity* Vol. 7, 821–830.

**Chen, N.-J., Chio, N., Lin, W., Duncan, G., Chau, H., Katz, D., Huang, H., Pike, K.A., Hao, Z., Su, Y., Yamamoto, K, F. de Pooter R., Pflucker, J.C., Wakeham, A., Yeh, W.-Ch., Mak, T. W.** (2008). Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors. *PNAS* 105, 12429-12434.

**Darnay, B. G., Aggarwal, B. B.** (1997). Inhibition of protein tyrosine phosphatases causes phosphorylation of tyrosine-331 in the p60 TNF receptor and inactivates the receptor-associated kinase. *FEBS Lett.* 410, 361-367.

**Declercq, W., Berghe, T. V., Vandenabeele, P.** (2009). RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell* 138, 229-232.

- Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q., Cheng, G.** (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 14, 193–209.
- Fadeel, B., Orrenius, S.** (2005). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine* 258, 479–517.
- Feig, Ch., Tchikov, V., Schütze, S., Peter, M. E.** (2007). Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *The EMBO Journal* 26, 221–231.
- Fiers, W.** (1991). Tumor necrosis factor: Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS* 285, 199–212.
- Finnberg, N., Klein-Szanto, A. J., El-Deiry, W. S.** (2008). TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* 118, 111–123.
- Fisher, G. H., Rosenberg, F. J., Straus, S. E., Dale, J. K., Middleton, L. A., Lin, A. Y., Strober, W., Lenardo, M. J., Puck, J. M.** (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81, 935–946.
- Formisano, P., Perruolo, G., Libertini, S., Santopietro, S., Troncone, G., Raciti, G. A., Oriente, F., Portella, G., Miele, C. and Beguinot, F.** (2005). Raised expression of the antiapoptotic protein ped/pea-15 increases susceptibility to chemically induced skin tumor development. *Oncogene* 24, 7012–7021.
- Guicciardi, M. E., Gores, G. J.** (2009). Life and death by death receptors. *FASEB J.* 23, 1625–1637.
- Harada, K., Toyooka, S., Shivapurkar, N., Maitra, A., Reddy, J. L., Matta, H., Miyajima, K., Timmons, C. F., Tomlinson, G. E., Mastrangelo, D., Hay, R. J., Chaudhary, P. M., Gazdar, A. F.** (2002). Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res.* 62, 5897–5901.
- Holler, N., Tardivel, A., Kovacsovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., Engel, J., Schneider, P., Tschopp, J.** (2003). Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol.* 23, 1428–1440.
- Hopkins-Donaldson, S., Bodmer, J. L., Boursoud, K. B., Brognara, C. B., Tschopp, J., and Gross, N.** (2000) Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res.* 60, 4315–4319.
- Hua, Z. C., Sohn, S. J., Kang, C., Cado, D., Winoto, A.** (2003). A function of Fas-associated death domain protein in cell cycle progression localized to a single amino acid at its C-terminal region. *Immunity* 18, 513–521.
- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Fesik, S. W.** (1996). NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* 384, 638–641.

- Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S., Nunez, G.** (1997). CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, 10717–10722.
- Jeong, E., Bang, S. H., Lee, T. H., Park, Y., Simi, W. S., Kim, K. S.** (1999). The solution structure of FADD death domain. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 274, 16337–16342.
- Jiang, X. and Wang, X.** (2000). Cytochrome *c* promotes acspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 275, 31199–31203.
- Kataoka, T., Tschopp, J.** (2004). N-terminal fragment of c-FLIPL processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2627–2636.
- Kaufmann, M., Bozic, D., Briand, C., Bodmer, J. L., Zerbe, O., Kohl, A., Tschopp, J., and Grutter, M. G.** (2002) Identification of a basic surface area of the FADD death effector domain critical for apoptotic signaling. *FEBS Lett.* 527, 250–254.
- Kelliher, M. A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stranger, B. Z., Leder, P.** (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- $\kappa$ B signal. *Immunity* Vol. 8, 297–303.
- Kim, Y., Suh, N., Sporn, M., Reed, J. C.** (2002). An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 22320–22329.
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., Ashkenazi, A.** (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 276, 46639–46646.
- Klima, M., Zájedová, J., Doubravská, L., Anděra, L.** (2009). Functional analysis of the posttranslational modifications of the death receptor 6. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1793, 1579–1587.
- Kohlhaas, S. L., Craxton, A., Sun, X. M., Pinkoski, M. J., Cohen, G. M.** (2007). Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 282, 12831–12841.
- Lavrik, I., Golks, A., Krammer, P.H.** (2005). Death receptor signaling. *Journal of Cell Science* 118, 265-267.
- Lee, J. C., Schickling, O., Stegh, A. H., Oshima, R.G., Dinsdale, D., Cohen, G. M., Peter, M. E.** (2002). DEDD regulates degradation of intermediate filaments during apoptosis. *J. Cell Biol.* 158, 1051–1066.
- Locksley, R. M., Killeen, N., Leonardo, M. J.** (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* Vol. 104, 487–501.
- Matsuyoshi, S., Shimada, K., Nakamura, M., Ishida, E., and Konishi, N.** (2006). FADD phosphorylation is critical for cell cycle regulation in breast cancer cells. *Br. J. Cancer* 94, 532–539.

- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, Ch. and Grutter, M. G.** (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas Death-inducing signaling complex. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 277, 45162–45171.
- Micheau, O., Tschopp, J.** (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181-190.
- Mitsiades, C. S., Poulaki, V., Fanourakis, G., Sozopoulos, E., McMillin, D., Wen, Z., Voutsinas, G., Tseleni-Balafouta, S., Mitsiades, N.** (2006). Fas signaling in thyroid carcinomas is diverted from apoptosis to proliferation. *Clin Cancer Res* 12, 3705-3712.
- Newton, K., Sun, X., Dixit, V. M.** (2004). Kinase RIP3 is dispensable for normal NF- $\kappa$ B signaling by the B-cell and T-cell receptors, Tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4. *Molecular and Cellular Biology* 24, 1464–1469.
- Park, H. H., Lo, Y., Lin, S., Wang, L., Yang, J. K., Wu, H.** (2007). The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* Vol. 25, 561–586.
- Pérez-Payá, E., Orzáez, M., Mondragón, L., Wolan, D., Wells, J. A., Messegue, A., Vicent, M. J.** (2010). Molecules that modulate Apaf-1 activity. *Med Res Rev.* 1-27.
- Peter, M. E., Budd, R. C., Desbarats, J., Hedrick, S. M., Hueber, A., Newell, M. K., Owen, L. B., Pope, R. M., Tschopp, J., Wajant, H., Wallach, D., Wiltrout, R. H., Zörnig, M., Lynch, D. H.** (2007). The CD95 receptor: Apoptosis revisited. *Cell* 129, 447-450.
- Philchenkov, A.** (2004). Caspases: potential targets for regulating cell death. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 8, 432-444.
- Puck, J. M., Straus, S. E.** (2004). Somatic mutations--not just for cancer anymore. *New Eng. J. Med.* 351, 1388-1390.
- Qin, H., Srinivasula, S. M., Wu, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S., Shi, Y.** (1999). Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* 399.549-557.
- Reed, J. C., Doctor, K. S., and Godzik, A.** (2004) The domains of apoptosis: a genomics perspective. *Sci. STKE*, 689-695.
- Renatus, M., Stennicke, H. R., Scott, F. L., Liddington, R. C., Salvesen, G. S.** (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14250-14255.
- Rezaei, N.** (2006). TNF-receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): an autosomal dominant multisystem disorder. *Clin Rheumatol* 25, 773–777.
- Riedl, S., Shi, Y.** (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature* vol. 5, 897-906.
- Roth, W., Stenner-Liewen, F., Pawlowski, K., Godzik, A., and Reed, J. C.** (2002). Identification and characterization of DEDD2, a death effector domain-containing protein. *J.Biol. Chem.* 277, 7501–7508.

- Saito, K., Inoue, M., Koshiba, S., Kigawa, T., Yokoyama, S.** (2005). Solution structure of the carboxyl-terminal CARD-like domain in human TNFR-related death receptor-6. *Riken, Structural Genomics Proteomics Initiative (RSGI)*.
- Salvesen, G. S., Dixit, V. M.** (2004). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10964-10967.
- Schultz, R. D., Harrington, W. J.** (2003). Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum* 32, 345-369.
- Seki, N., Hayakawa, Y., Brooks, A. D., Wine, J., Wiltrout, R. H., Yagita, H., Tanner, J. E., Smyth, M. J., Sayers, T. J.** (2003). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis is an important endogenous mechanism for resistance to liver metastases in murine renal cancer. *Cancer Res.* 63, 207–213.
- Sheikh, M. S., Huang, Y.** (2003). The FADD is going nuclear. *Cell Cycle* 2, 346–347.
- Siegel, R. M., Muppidi, J. R., Sarker, M., Lobito, A., Jen, M., Martin, D.** (2004). SPOTS: signaling protein oligomeric transduction structures are early mediators of death receptor-induced apoptosis at the plasma membrane. *J Cell Biol* 167, 735–744.
- Stassi, G., Garofalo, M., Zerilli, M., Ricci-Vitiani, L., Zanca, C., Todaro, M., Aragona, F., Limite, G., Petrella, G., and Condorelli, G.** (2005) PED mediates AKT-dependent chemoresistance in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 65, 6668–6675.
- Stegh, A. H., Schickling, O., Ehret, A., Scaffidi, C., Peterhansel, C., Hofmann, T. G., Grummt, I., Krammer, P. H., Peter, M. E.** (1998) DEDD., a novel death effector domain-containing protein, targeted to the nucleolus. *EMBO J.* 17, 5974–5986.
- Strasser, A., Jost, P. J., Nagata, S.** (2009). The many roles of Fas receptor signaling in the immune system. *Immunity* vol. 30, 180-192.
- Straus, S. E., Jaffe, E. S., Puck, J. M., Dale, J. K., Elkon, K. B., Rösen-Wolff, A., Peters, A. M., Sneller, M. C., Hallahan, C. W., Wang, J., Fischer, R. E., Jackson, C. M., Lin, A. Y., Bäuml, C., Siegert, E., Marx, A., Vaishnav, A. K., Grodzicky, T., Fleisher, T. A., Lenardo, M. J.** (2001). The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood.* 98, 194-200.
- Tansey, M. G., Szymkowski, D. E.** (2009). The TNFR superfamily in 2009: new pathways, new indications, and new drugs. *Drug Discovery Today* 14, 1082-1088.
- Valmiki, G., Ramos, J. W.** (2009). Death effector domain-containing proteins. *Cell.* 66, 814 – 830.
- Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A. V., Dynek, J. N., Zobel, K., Deshayes, K., Fairbrother, W. J., Vucic, D.** (2008). c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 283, 24295-24299.

- Vigliotta, G., Miele, C., Santopietro, S., Portella, G., Perfetti, A., Maitan, M. A., Cassese, A., Oriente, F., Trencia, A., Fiory, F., Romano, C., Tiveron, C., Tatangelo, L., Troncone, G., Formisano, P., Beguinot, F.** (2004) Overexpression of the ped/pea-15 gene causes diabetes by impairing glucose-stimulated insulin secretion in addition to insulin action. *Mol. Cell Biol.* 24, 5005–5015.
- Wagner, K.W.** (2007). Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat. Med.* 13, 1070–1077.
- Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F. K., Dale, J., Sneller, M., Yao, X., Puck, J. M., Straus, S. E., Lenardo, M. J.** (1999). Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 98, 47-58.
- Wang, L., Du, F., Wang, X.** (2008). TNF- $\alpha$  induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133, 693–703.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Nagata, S.** (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314–317.
- Wesemann, D. R., Qin, H., Kokorina, N., Benveniste, E. N.** (2004). TRADD interacts with STAT1- $\alpha$  and influences interferon- $\gamma$  signaling. *Nat. Immunology* 5, 199-207.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, D., Rauch, C., Smith, C. A., Goodwin, R. G.** (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673–682.
- Wilson, N. S., Dixit, V., Ashkenazi, A.** (2009). Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature* vol.10, 348-355.
- Xiao, C., Yang, B. F., Asadi, N., Beguinot, F., Hao, C.** (2002) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced death-inducing signaling complex and its modulation by c-FLIP and PED/PEA-15 in glioma cells. *J. Biol. Chem.* 277, 25020–25025.
- Yu, J. W. and Shi, Y.** (2008). FLIP and the death effector domain family. *Oncogene* (2008) 27, 6216–6227.