

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta



*Autoreferát disertační práce*

**Molekulární a funkční charakterizace receptoru DR6**

Martin Klíma

Praha, 2011

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze  
a Akademie věd České republiky*

Program: Imunologie

Předseda oborové rady: Doc. RNDr. Vladimír Holáň, DrSc.

Školicí pracoviště: Laboratoř buněčné signalizace a apoptózy  
Ústav molekulární genetiky  
Akademie věd České republiky

Autor: Mgr. Martin Klíma

Školitel: RNDr. Ladislav Anděra, CSc.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách  
Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

# Obsah

I. Úvod a cíle práce .....	4
II. Abstrakt.....	5
III. Literární přehled .....	6
III.1. Proteiny rodiny TNFR .....	6
III.2. Proteiny skupiny "receptorů smrti" .....	7
III.3. Receptor DR6.....	9
IV. Výsledky a diskuse.....	10
IV.1. Funkční analýza posttranslačních modifikací receptoru DR6.....	10
IV.2. Aktivace T-lymfocytů spouští expresi receptoru DR6 závislou na transkripčních faktorech NF- $\kappa$ B a NF-AT .....	12
IV.3. Adaptérový protein ARAP1 se účastní mobilizace receptoru DR4 k plazmatické membráně .....	15
V. Závěr.....	17
VI. Literatura .....	19
Seznam publikací .....	20
Životopis.....	21

## I. Úvod a cíle práce

Proteiny z rodiny receptorů TNFR hrají významnou roli v mnoha biologických procesech, jako jsou buněčná proliferace, diferenciace, programovaná buněčná smrt, regulace imunitní odpovědi a hematopoézy, atd. Také se ale účastní vzniku a rozvoje některých chorob, např. autoimunitních onemocnění, neurodegenerativních chorob nebo potíží spojených s odhojováním transplantátů. Antagonisté faktoru TNF (např. *adalimumab*, *infliximab* či *etanercept*) již byly schváleny a jsou používány v humánní medicíně k léčení některých autoimunitních chorob. V současné době jsou ve vývoji i terapeutické nástroje založené na blokování či aktivaci funkce dalších členů rodiny receptorů TNFR, ve fázi klinického testování jsou např. farmakologické nástroje indukující apoptózu nádorových buněk závislou na receptorech ligandu TRAIL.

Receptor DR6 byl objeven v roce 1998. V následujících letech studie DR6-deficientních myší prokázaly jeho roli v regulaci imunitní odpovědi a naznačily možné využití terapeutických nástrojů založených na stimulaci či blokování funkce tohoto receptoru v humánní medicíně. Nicméně o struktuře proteinu DR6, regulaci jeho exprese, ligandech a dalších interagujících proteinech, signalizaci a funkci obecně (zvláště na lidském modelu) máme doposud jen velmi málo relevantních informací. Zevrubná molekulární a funkční charakterizace tohoto proteinu je přitom jednou z nezbytných podmínek pro jeho případné praktické využití. Hlavním cílem naší práce tedy bylo objasnění vlastností a funkcí receptoru DR6 na molekulární úrovni, a to zejména na lidských buňkách. Jednotlivé dílčí cíle této práce potom byly následující:

1. Molekulárně charakterizovat lidský DR6 včetně jeho posttranslačních modifikací a popsat funkci těchto modifikací.
2. Přispět k objasnění mechanismů regulace exprese DR6 na lidských hematopoietických buňkách.
3. Identifikovat ligand(y) receptoru DR6, případně připravit agonistické monoklonální protilátky, a využít je ke studiu buněčné signalizace spojené s receptorem DR6.
4. Objevit nové proteiny interagující s cytoplazmatickou částí receptoru DR6 a objasnit funkci těchto proteinů v signalizaci spojené s receptorem DR6.

## II. Abstrakt

Receptor DR6 ("receptor smrti-6", TNFRsf21/CD358) je členem rodiny TNFR, který se pravěpodobně účastní regulace proliferace a diferenciaci T- a B-lymfocytů a neurálních buněk. Lidský DR6 je 655 aminokyselin dlouhý transmembránový protein typu I, který obsahuje čtyři domény CRD ve své extracelulární části a po jedné doméně DD a CARD v části cytoplazmatické. Nadprodukce DR6 v některých nádorových buňkách vede k apoptóze, a/nebo aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B a kináz rodiny JNK.

V první naší práci jsme se věnovali charakterizaci molekulárních vlastností receptoru DR6 včetně analýzy jeho posttranslačních modifikací. Zjistili jsme, že DR6 je extenzivně modifikovaný protein a jeho posttranslační modifikace zahrnují *S*-palmitylaci a jak *N*-, tak i *O*-glykosylaci. Šest *N*-glykosylačních a jedno *S*-palmitylační místo jsme zamapovali do příslušných aminokyselinových zbytků. Spojovací část mezi doménami CRD v extracelulární části DR6 a jeho transmembránovou doménou, která obsahuje oblast bohatou na serin, threonin a prolin se seskupenými predikovanými *O*-glykosylačními místy, je nezbytná pro transport DR6 na plazmatickou membránu. *N*-glykosylace, ale překvapivě nikoli *S*-palmitylace, může hrát roli ve směřování DR6 do lipidových raftů.

V další části této práce jsme shrnuli výsledky studie analyzující regulaci exprese DR6 v lidských hematopoietických buňkách. Zjistili jsme, že DR6 není exprimován neaktivovanými T- a B-lymfocyty z lidské periferní krve, ale jeho exprese je významně zvýšena v aktivovaných jak CD4+, tak i CD8+ T-lymfocytech po stimulaci TCR, a že tento nárůst exprese DR6 je závislý na transkripčních faktorech NF- $\kappa$ B a NF-AT. Narozdíl od primárních lymfocytů exprimují buňky lidské T-lymfoblastické leukemie Jurkat receptor DR6 již před stimulací, pravděpodobně díky konstitutivně aktivní signalizaci z kinázy PI3K, a po stimulaci je tato exprese DR6 významně potlačena zřejmě na úrovni transkripce. Dále jsme analyzovali vliv jednotlivých predikovaných vazebných míst transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B a NF-AT v DR6 promotoru na expresi DR6.

Naše zjištění by tedy měla přispět jak k molekulární charakterizaci DR6, tak i k objasnění jeho role v imunitním systému.

### III. Literární přehled

#### III.1. Proteiny rodiny TNFR

Receptory rodiny TNFR a jejich ligandy, obvykle proteiny rodiny TNF, jsou důležitými molekulami ve zprostředkovávání mnoha důležitých funkcí v organismu, jako jsou buněčná proliferace, diferenciace, programovaná buněčná smrt, regulace imunitní odpovědi a hematopoézy, imunitní dozor a ochrana před vznikem nádorů. Naproti tomu špatná regulace exprese nebo funkce těchto proteinů může být pro organismus značně poškozující a může být příčinou vzniku a rozvoje mnoha onemocnění [1].

Receptor TNFR1 a jeho ligand TNF $\alpha$  je důležitý pro fungování vrozené, neadaptivní imunity. Některé receptory rodiny TNFR (např. CD27, CD30, OX40, 4-1BB, HVEM, GITR) fungují jako kostimulační molekuly T-lymfocytů, zatímco např. receptor CD40 slouží jako kostimulační molekula B-lymfocytů. S apoptózou jsou spojeny především proteiny ze skupiny "receptorů smrti", zejména Fas/CD95, TNFR1, DR4 a DR5 [2, 3]. Jejich funkci negativně regulují tlumivé receptory DcR1, DcR2, DcR3 a OPG [4]. Jiné proteiny rodiny TNFR mají význam i mimo imunitní tkáň, např. receptory EDAR a XEDAR jsou důležité především pro vývoj kůže a kožních derivátů, receptory NGFR pro vývoj nervové tkáně anebo receptor RANK pro vývoj kostní tkáně a mléčných žláz.

Je známo několik případů, kdy jsou konkrétní mutace v genech kódujících některé receptory rodiny TNFR nebo jejich ligandy spojeny se vznikem a rozvojem specifických onemocnění, jako jsou např. syndrom hyperimmunoglobulinémie IgM, autoimunitní lymfoproliferativní syndrom, ektodermální dysplázie či syndrom periodických horeček asociovaný s receptorem TNFR1. Častější jsou onemocnění spojená se špatnou regulací exprese či funkce receptorů rodiny TNFR nebo jejich ligandů. Ta může vést k zánětlivým autoimunitním onemocněním, jako jsou revmatoidní artritida, Bechtěrevova choroba, Crohnova choroba a ulcerózní kolitida, psoriáza a další. Proteiny rodin TNFR a TNF jsou spojovány i s celou řadou dalších chorob, jako jsou neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova a Huntingtonova choroba), ateroskleróza, odhojování transplantátů, ischemické choroby, toxiny-indukované choroby jater, apod.

Na molekulární úrovni jsou receptory rodiny TNFR obvykle transmembránovými proteiny I. třídy. Jejich společným znakem je přítomnost tzv. domén CRD ("*cystein-rich domains*") v jejich extracelulárních částech, které jsou zodpovědné za interakci receptorů s jejich příslušnými ligandy v obvyklé stechiometrii 3:3. Za vznik trimerních struktur je u některých z nich zodpovědná jejich *N*-koncová oblast zv. doména PLAD ("*preligand assembly domain*"). Cytoplazmatické části receptorů rodiny TNFR slouží k vazbě dalších molekul účastnících se přenosu signálu po spuštění buněčné signalizace příslušnými ligandy, např. adaptérových proteinů skupiny TRAF ("*TNF receptor-associated factors*"), které obvykle zprostředkovávají signalizaci vedoucí k aktivaci transkripčního faktoru NF-

κB a mitogeny aktivovaných proteinkináz jako JNK1/2, Erk1/2 a p38, anebo adaptérových proteinů FADD a TRADD, které obsahují tzv. doménu DD ("*death domain*") a obvykle zprostředkovávají signalizaci vedoucí k aktivaci kaspázové kaskády a k apoptóze. S adaptérovými proteiny obsahujícími doménu DD interaguje jen malá podskupina receptorů rodiny TNFR, tzv. receptory smrti ("*death receptors*"), které samy obsahují doménu DD ve svých intracelulárních částech, viz následující kapitolu.

### III.2. Proteiny skupiny "receptorů smrti"

Do této skupiny je řazeno celkem 8 proteinů, a to receptory Fas/CD95, TNFR1/CD120a, DR3, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2, DR6, NGFR a EDAR [2, 3]. Nejlépe jsou z nich prostudovány receptory Fas a TNFR1, signalizace spojená s těmito dvěma receptory se stala vzorem při objasňování signálních drah využívaných dalšími receptory rodiny TNFR.

#### Fas

Receptor Fas/CD95 [5] byl původně objeven a v roce 1991 klonován jako antigen monoklonálních protilátek schopných spouštět buněčnou smrt, jeho fyziologický ligand FasL/CD95L roku 1993. Zatímco receptor Fas je produkován v buňkách mnoha tkání, exprese jeho ligandu FasL je omezena zejména na aktivované T-lymfocyty, NK-buňky a buňky imunoprivilegovaných tkání. Mezi jejich hlavní funkce patří účast na zabíjení buněk infikovaných patogeny, odstraňování již nepotřebných a potenciálně nebezpečných lymfocytů na konci imunitní odpovědi a zabíjení zánětlivých buněk v imunoprivilegovaných tkáních. Spontánně se vyskytující mutace v genech pro Fas a FasL v myších kmenech *lpr* a *gld* vedou k autoimunitním chorobám podobným nemoci systémový lupus erythematosus.

Vazba ligandu FasL na receptor Fas iniciuje strukturní změny v jeho intracelulární části, umožňující sestavení komplexu DISC ("*death-inducing signaling complex*"), který dále obsahuje proteiny FADD, cFLIP a kaspáza-8. Sestavení komplexu DISC je zprostředkované homotypickými interakcemi mezi doménami DD ("*death domain*") v proteinech Fas a FADD, a mezi doménami DED ("*death effector domain*") v proteinech FADD a kaspáza-8. Aktivní iniciátorová kaspáza-8 po autoproteolytickém štěpení opouští komplex DISC a štěpí další substráty. V buňkách typu I jsou efektorové kaspázy aktivovány přímo iniciátorovými kaspázami (tzv. "*extrinsic pathway*"), zatímco v buňkách typu II je kaspázová kaskáda amplifikována za účasti proteinů z rodiny Bcl-2 (tzv. "*intrinsic pathway*"). V tomto případě proapoptotické proteiny skupiny Bax vytvářejí supramolekulární kanály ve vnější mitochondriální membráně, což mj. vede k uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru do cytoplazmy. Tento proces aktivují proapoptotické proteiny skupiny BH3 (např. Bid, substrát iniciátorové kaspázy-8) a inhibují anti-apoptotické proteiny skupiny Bcl-2. Cytochrom c po uvolnění do cytoplazmy vytváří společně s proteinem Apaf1 a kaspázou-9

komplex zvaný apoptozóm. V něm dochází k aktivaci iniciátorové kaspázy-9, která dále aktivuje efektorové kaspázy-3, -6 a -7. Ty pak štěpí své finální substráty, což v konečném důsledku vede k organizované a zánět nevyvolávající dezintegraci buňky na apoptotická tělíčka.

## TNFR1

Receptor TNFR1/CD120a [6] je receptorem pro dva ligandy z rodiny TNF, a to TNF $\alpha$  a LT $\alpha$ . Tyto proteiny se staly v letech 1984-5 prvními identifikovanými ligandy z rodiny TNF, ačkoliv aktivita těchto faktorů vedoucí k regresi nádorů byla poprvé popsána již v 19. století. Zatímco receptor TNFR1 je konstitutivně exprimován buňkami většiny tkání, ligand TNF $\alpha$  je produkován především aktivovanými makrofágy, např. v reakci na LPS. Je hlavním prozánětlivým cytokinem, je však i mediátorem buněčné proliferace a diferenciaci, anebo apoptózy. Též se účastní rozvoje mnoha autoimunitních chorob (např. revmatoidní artritidy). Některé blokátory TNF $\alpha$  dokonce byly schváleny a jsou používány v humánní medicíně k léčení těchto chorob. Fenotyp TNF $\alpha$ -deficientních myši a TNFR1-deficientních myši je podobný, nicméně nepříliš výrazný. Narušena je jejich vrozená neadaptivní imunita, tyto myši jsou rezistentní vůči septickému šoku indukovaném pomocí LPS, jsou však také velmi citlivé na infekci intracelulárními parazity (např. *M.tuberculosis* či *L.major*)

Vazba ligandu TNF $\alpha$  na receptor TNFR1 iniciuje sestavení receptorového komplexu zvaného komplex I, který dále obsahuje proteiny TRADD, RIP1, cIAP1/2 a TRAF2/5. Dochází v něm k poly-ubiquitinaci kinázy RIP1 (přes lysin K63) zprostředkované proteiny TRAF2/5 a cIAP1/2. Ta neslouží jako značka pro proteozomální degradaci, ale jako platforma pro vazbu dalších tří proteinových komplexů, a to komplexu TAK1/TAB2/TAB3, komplexu LUBAC (HOIL1/HOIP) a komplexu IKK (IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ /NEMO). Po fosforylaci IKK $\beta$  kinázou TAK1 a tzv. lineární ubiquitinaci NEMO ubiquitin-ligázou HOIL1 aktivní komplex IKK fosforyluje proteiny rodiny I $\kappa$ B, což vede k jejich polyubiquitinaci (přes lysin K48), proteozomální degradaci a uvolnění proteinů rodiny NF- $\kappa$ B. Transkripční faktor NF- $\kappa$ B je pak translokován z cytoplazmy do buněčného jádra, kde aktivuje transkripci celé řady genů, např. prozánětlivých cytokinů nebo antiapoptotických faktorů.

Za určitých podmínek může dojít po internalizaci receptorového komplexu I ke vzniku tzv. komplexu II. Ten obsahuje buď proteiny TRADD, FADD a kaspáza-8 (tzv. komplex IIA) anebo proteiny RIP1, FADD a kaspáza-8 (tzv. komplex IIB). Aktivovaná iniciátorová kaspáza-8 následně opouští komplex II a podobně jako v případě signalizace z receptoru Fas aktivuje kaspázovou kaskádu vedoucí k apoptóze. Pokud je kaspáza-8 inaktivovaná, sestavení komplexu kináz RIP1 a RIP3 vede k buněčné smrti podobné nekróze, tzv. nekroptóze.



### III.3. Receptor DR6

Gen lidského DR6 (synonyma TNFRSF21, CD358, BM-018, MGC31965) je lokalizován na chromozómu 6, lokus 6p21.1. Obsahuje 6 exonů, jediná známá sestřihová varianta obsahuje překládanou oblast délky 1968 párů bází. Sekvence mRNA v databázi NCBI má kód NM\_014452.3. Struktura DR6 je evolučně poměrně konzervovaná, orthology DR6 vykazující vysoký stupeň homologie k lidskému DR6 byly identifikovány v mnoha obratlovcích. Otevřený čtecí rámeček genu lidského DR6 kóduje transmembránový protein typu I délky 655 aminokyselin, proteinová sekvence v databázi NCBI má kód NP\_055267.1. Extracelulární část maturovaného proteinu obsahuje čtyři domény CRD ("*cystein rich domains*") a doménu přilehlou k membráně ("*juxtamembrane domain*"). Cytoplasmatická část DR6 obsahuje doménu DD ("*death domain*") následovanou oblastí podobnou doméně CARD ("*caspase recruitment domain*") [7].

Nadprodukce v buňkách některých nádorových linií (např. HeLa) vede ke spouštění apoptózy, závislé na doméně DD. DR6 neinteraguje s adaptérovými proteiny proteinem FADD, RAIDD a RIP1 a pouze velmi slabě interaguje s proteinem TRADD. Nadprodukce DR6 v buňkách HEK293 dále vede k aktivaci faktoru NF- $\kappa$ B a kináz JNK1/2. Zatímco aktivace NF- $\kappa$ B závisí na doméně, aktivace JNK1/2 absencí této domény není významně ovlivněna [7].

Většina poznatků o funkci receptoru DR6 pochází ze studia myši s inaktivovaným DR6, tzv. myších knock-outů. DR6-deficientní myši jsou životaschopné, schopné reprodukce a v jejich hlavních orgánech nebyly pozorovány žádné výrazné patologické změny. Aktivované DR6-deficientní CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty jsou hyperproliferativní a produkují zvýšené množství Th2 cytokinů (např. IL-4, -5, -10, -13). Zvýšená aktivace DR6-deficientních T- a B-lymfocytů se pak odráží ve vážnějších symptomech GVHD po jejich allogenní transplantaci. DR6-deficientní myši jsou též vysoce resistantní k experimentálně indukovaným autoimunitním onemocněním, např. MOG-indukované EAE nebo ovalbuminem-indukovanému astmatu. Předpokládá se tak, že identifikace ligandů receptoru DR6 nebo příprava agonistických protilátek by mohla vést k jejich terapeutickému užití v léčbě onemocnění zprostředkovaných T-lymfocyty [8, 9].

Zcela nový pohled na možnou fyziologickou funkci receptoru DR6 přinesla práce [10] publikovaná v roce 2009. Na modelu indukce apoptózy myších embryonálních míšních neuronů bylo ukázáno, že deprivace růstových faktorů vede ke štěpení proteinu APP (" *$\beta$ -amyloid precursor protein*") na fragmenty N-APP, A $\beta$  a AICD. N-APP pak slouží jako ligand DR6 a může spouštět buněčnou signalizaci spojenou s DR6. Ta vede jednak k aktivaci kaspázy-3 v tělech neuronů a následně k buněčné smrti, a dále také k aktivaci kaspázy-6 v nervových vláknech vedoucí k degeneraci axonů. Receptor DR6 tak může být důležitým faktorem pro vývoj nervového systému, ale může se zároveň také podílet na vývoji a progresi některých neurodegenerativních onemocnění.

## IV. Výsledky a diskuse

### IV.1. Funkční analýza posttranslačních modifikací receptoru DR6

Jednou z motivací pro naši studii vlastností receptoru DR6 byl zásadní rozpor mezi očekávanou (a dokonce i dříve uváděnou) a skutečnou mobilitou tohoto proteinu v polyakrylamidovém gelu během SDS elektroforézy, která odpovídá jeho zdánlivé molekulové hmotnosti. Molekulová hmotnost prekurzoru lidského DR6 vypočtená z jeho aminokyselinové sekvence je cca 72kDa, po odštěpení signálního peptidu pak cca 68kDa. Protilátky proti lidskému DR6 komerčně dostupné v době, kdy tato práce vznikala, skutečně rozlišovaly nějaký protein o zdánlivé molekulové hmotnosti kolem 68kDa v lyzátech většiny nádorových linií a molekulová hmotnost kolem 68kDa byla uváděná jako molekulová hmotnost lidského DR6 dokonce i v některých publikacích.

Králičí polyklonální protilátka proti DR6 připravená v naší laboratoři také rozeznávala nějaký protein o zdánlivé molekulové hmotnosti kolem 68kDa (dále značen jako p68) v lyzátech většiny nádorových linií. Nicméně první zásadní rozpor přineslo pozorování, že transfekce plasmidu pro eukaryotickou expresi lidského DR6 do buněk HEK293T vede k nadprodukci dvou proteinů o zdánlivých molekulových hmotnostech cca 110kDa a 85kDa (dále značeny jako p110 a p85). Následný experiment ukázal, že malá množství proteinů p110 a p85 jsou endogenně exprimována i buňkami některých lidských nádorových linií hematopoietického i nehematopoietického původu (např. nádorové linie Jurkat, KM3 a NCTC). Navazující důsledná analýza pak prokázala následující zjištění:

- (1) Exprese forem p110 a p85 v buňkách různých lidských nádorových linií zjištěná pomocí imunoprecipitace našimi monoklonálními protilátkami proti DR6 a následnou imunodetekcí pomocí naší králičí polyklonální protilátky proti DR6 výborně korelovala s povrchovou expresí receptoru DR6 zjištěnou pomocí průtokové cytofluorometrie i s expresí mRNA zjištěnou pomocí metody kvantitativní RT-PCR. Naproti tomu protein p68 je exprimován většinou testovaných nádorových linií v přibližně stejné míře.
- (2) Potlačení exprese DR6 pomocí siRNA v buňkách NCTC vedlo k výraznému snížení exprese forem p110 a p85, nikoli však ke změně exprese formy p68.
- (3) Působením faktoru TNF $\alpha$  na buňky nádorové linie LnCAP dochází k nárůstu exprese forem p110 a p85, který koreluje s obdobným nárůstem množství transkriptu DR6 zjištěným pomocí kvantitativní RT-PCR. Naproti tomu exprese formy p68 se nemění.
- (4) Frakcionace buněčných lyzátoů ukázala, že formy p110 a p68 jsou převážně transmembránové proteiny, zatímco forma p85 je převážně proteinem cytoplazmatickým.

Ukázalo se tedy, že zatímco hlavními funkčními formami DR6 jsou proteiny p110 a p85, protein p68 pravděpodobně vůbec není žádnou kratší ani jinak modifikovanou formou receptoru DR6. Identitu proteinu p68 se nicméně nepodařilo prokázat...

V další části práce jsme se věnovali důvodům rozdílu molekulové hmotnosti receptoru DR6 zjištěné z jeho elektroforetické pohyblivosti a vypočtené z jeho aminokyselinové sekvence. Nadprodukce delečních mutantů DR6 ukázala, že modifikace zodpovědné za tento rozdíl jsou přítomné v extracelulární části DR6. Analýzou primární sekvence DR6 jsme zjistili, že obsahuje 6 potenciálních *N*-glykosylačních míst (motivů Asn-X-Ser/Thr) a s využitím empirických webových nástrojů pro analýzu aminokyselinových sekvencí jsme objevili též 6 pravděpodobných *O*-glykosylačních míst. Využitím dvou nezávislých přístupů pro studium proteinové glykosylace (inhibice enzymů glykosylačních drah a biochemická deglykosylace vhodnými glykosidázami) jsme zjistili, že hlavním důvodem zkoumaného rozdílu v molekulové hmotnosti DR6 skutečně je jeho masivní glykosylace. Dále se ukázalo, že zatímco forma p110 je *N*- i *O*-glykosylována, forma p85 je pouze *N*-glykosylováný protein a je pravděpodobně pouze meziproduktem během syntézy plně modifikovaného receptoru DR6. Experimentálně jsme prokázali, že je modifikováno všech 6 potenciálních *N*-glykosylačních míst (tj. aminokyselinové zbytky Asn82, Asn141, Asn252, Asn257, Asn278 a Asn289), *O*-glykosylace se nám podařila zaměřovat do oblasti Thr213 až Thr254, v níž leží všech 6 pravděpodobných *O*-glykosylačních míst (tj. aminokyselinové zbytky Thr213, Thr221, Thr227, Thr238, Thr245 a Thr254).

Jelikož dva proteiny skupiny receptorů smrti Fas/CD95 a DR4/TRAIL-R1, tedy receptory příbuzné DR6, již byly popsány jako palmitylované proteiny, zajímali jsme se též o tuto posttranslační modifikaci i v případě proteinu DR6. Sekvence receptoru DR6 obsahuje evolučně konzervovaný cysteinový zbytek (Cys368 v případě lidského DR6) v proximální části své cytoplazmatické domény, který je vhodným cílem pro *S*-palmitylacii. Experimenty založené na bodové mutagenězi tohoto aminokyselinového zbytku, autoradiografii imunoprecipitovaného proteinu DR6 s inkorporovaným radioaktivně značeným palmitátem a použití specifického palmitylačního inhibitoru prokázaly, že receptor DR6 skutečně je *S*-palmitylován na tomto cysteinovém zbytku.

Dále jsme se věnovali analýze funkcí výše popsaných posttranslačních modifikací receptoru DR6. Glykosylace aminokyselinových zbytků v extracelulárních částech transmembránových proteinů, včetně některých proteinů z rodiny receptorů TNFR, byly popsány jako modifikace ovlivňující jejich správné sbalení, lokalizaci a fyziologickou funkci. V případě receptoru DR6 jsme ukázali, že *N*-glykosylace není vyžadována pro jeho lokalizaci na plazmatické membráně.

Všechna predikovaná *O*-glykosylační místa se nacházejí v oblasti mezi poslední doménou CRD a transmembránovou částí receptoru DR6. Tato oblast je bohatá na aminokyseliny prolin, serin a threonin a podobné sekvence se nacházejí i v některých

dalších receptorech rodiny TNFR, jako je CD30, NGFR nebo TNFR2. Je známo, že delece této oblasti v receptoru NGFR mění směřování proteinu v polarizovaných buňkách na jejich apikální vs. basolaterální stranu. V případě receptoru DR6 delece této oblasti zcela narušila jeho transport na plazmatickou membránu, zřejmě na úrovni váčků Golgiho systému.

S-palmitylace receptorů Fas/CD95 a DR4/TRAIL-R1 byla ukázána jako významný faktor ovlivňující směřování těchto proteinů do membránových mikrodomén, tzv. lipidových raftů, což je jeden z důležitých předpokladů pro jejich efektivní proapoptotickou signalizaci. Zjistili jsme, že v buňkách nádorových linií s vysokou expresí DR6 je tento receptor přítomen v lehkých membránových frakcích, které jsou nerozpustné v detergentu Brij98, ale rozpustné v detergentu NP40. Mutace palmitylačního místa v sekvenci DR6 ani použití specifického palmitylačního inhibitoru neměly na směřování receptoru do těchto mikrodomén žádný vliv. To by naopak mohlo být závislé např. na doméně DD jako v případě receptoru TNFR1 nebo na *N*-glykosylaci jako např. v případě kanálu TRPM8. Mutace *N*-glykosylačních míst v receptoru DR6 skutečně zabránily v jeho efektivním směřování do membránových mikrodomén, nicméně v případě použití *N*-glykosylačního inhibitoru jsme u endogenně exprimovaného DR6 tento efekt nepozorovali, takže vliv *N*-glykosylace receptoru DR6 na jeho směřování do membránových mikrodomén zůstává minimálně sporný.

#### **IV.2. Aktivace T-lymfocytů spouští expresi receptoru DR6 závislou na transkripčních faktorech NF- $\kappa$ B a NF-AT**

Většina informací o funkci receptoru DR6 pochází ze zvířecího modelu, ze studia fenotypu DR6-deficientní myši. Na tomto modelu se ukázalo, že receptor DR6 hraje roli v regulaci imunitní odpovědi, a to zejména v inhibici proliferace a diferenciaci CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů [8, 9]. Cílem této naší práce bylo srovnat myší a lidský model a popsat regulaci exprese DR6 na lidských primárních hematopoietických buňkách.

Pomocí metody průtokové cytofluorometrie jsme užitím našich vlastních monoklonálních protilátek analyzovali povrchovou expresi receptoru DR6 na lidských leukocytech z periferní krve a zjistili jsme, že žádná z testovaných subpopulací buněk neexprimuje DR6 v detekovatelném množství, a to včetně T- a B-lymfocytů, NK-buněk, monocytů, neutrofilních a eosinofilních granulocytů. Nicméně jsme zaznamenali významný nárůst exprese DR6 v T-lymfocytech stimulovaných různými faktory jako např. aktivační protilátkou proti CD3, PHA, nebo kombinací PMA a ionomycinu.

Publikovaná data ze studia DR6-deficientních myší naznačovala, že hlavní subpopulací myších T-lymfocytů exprimujících receptor DR6 by měly být CD4<sup>+</sup> T-buňky. Naše experimenty na magneticky separovaných subpopulacích lidských T-lymfocytů však

ukázaly, že po aktivaci exprimují DR6 jak CD4+, tak i CD8+ T-buňky, a to na úrovni mRNA detekované kvantitativní RT-PCR i na úrovni proteinové, detekované průtokovou cytometrií.

Dále jsme se zajímali o mechanismus, který expresi receptoru DR6 po T-buněčné aktivaci reguluje. Stimulace T-lymfocytů obecně vede ke spuštění mnoha signálních drah, mezi nimiž významnou roli hrají signální dráhy vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů z rodin NF- $\kappa$ B a NF-AT. Signální dráhy regulující aktivaci exprese DR6 jsme studovali za využití rozličných specifických inhibitorů a zjistili jsme, že skutečně jak inhibitory NF- $\kappa$ B dráhy (Bay 11-7085 a quinazoline), tak i inhibitory NF-AT dráhy (FK506 a cyklosporin A) významně snížily expresi DR6 po T-buněčné aktivaci. Podobný účinek měly i inhibitory signální dráhy PI3K-PKB/Akt (LY294002 a wortmannin) a v souladu s předchozím očekáváním též inhibitor kináz rodiny Src (PP2), inhibitor transkripce (aktinomycin D) a translace (cykloheximid). Naopak minimální, statisticky nevýznamný vliv na indukci exprese DR6 měly inhibitory kináz MAP-kinázových drah JNK1/2 (SP600125) a p38 (SB202190).

Experimentálně běžně používanou buněčnou linií pro studium T-receptorové signalizace jsou buňky T-buněčné leukemie Jurkat, které jsme v naší předchozí práci popsali jako DR6-positivní. Zajímalo nás tedy, jakým způsobem je regulována exprese receptoru DR6 v těchto buňkách po jejich stimulaci. Zjistili jsme, že aktivace buněk Jurkat vede k rychlému poklesu exprese DR6, na úrovni mRNA během 3-6 hodin, na úrovni proteinové během 2 dnů. Podobný účinek na expresi DR6 jako buněčná aktivace mělo u nestimulovaných buněk Jurkat použití inhibitorů signálních drah vedoucích k aktivaci transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B a NF-AT a také inhibitorů signální dráhy PI3K-PKB/Akt. Jedním z hlavních důvodů rozdílné regulace exprese DR6 mezi primárními lidskými T-lymfocyty a buňkami linie Jurkat tak může být aberantní konstitutivní aktivace transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B v buňkách Jurkat. Ta je pravděpodobně závislá na aktivitě protein-kináz PI3K a PKB/Akt, která souvisí s defektem v expresi fosfoinositid-fosfatázy PTEN v těchto buňkách.

V další části této práce jsme se věnovali analýze vazebných míst transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B a NF-AT v promotoru DR6. K jejich vyhledávání jsme použili software Genomatix MatInspector (<http://www.genomatix.de/products/MatInspector>). Tato analýza *in silico* skutečně odhalila několik seskupení předpokládaných NF- $\kappa$ B- a NF-AT- vazebných míst v oblasti posledních 3 kb před počátkem transkripce DR6. Za použití luciferázových reportérů obsahujících různé deleční této oblasti DR6 promotoru jsme zjistili, že *cis*-regulační elementy exprese DR6 se nacházejí v oblasti promotoru DR6 obsahující proximální seskupení předpokládaných NF- $\kappa$ B- a NF-AT- vazebných míst. Bodové mutace těchto míst nicméně významný rozdíl v regulaci exprese DR6 nepřinesly, což mohlo být způsobeno buď vzájemnou redundancí těchto míst anebo pouze nepřímou rolí transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B a NF-AT v regulaci exprese DR6.

Otevřenou otázkou pak zůstávají funkční důsledky exprese DR6 na aktivovaných T-lymfocytech. Přestože DR6 obsahuje doménu DD ("*death domain*") a bylo ukázáno, že se může účastnit aktivace buněčné smrti myších embryonálních nervových buněk [10], nemusí být jeho fyziologická funkce na lidských primárních T-lymfocytech nutně spojena s apoptózou. Tomu nasvědčuje naše pozorování, že receptor DR6 nadprodukovaný v lidských buňkách je výrazně slabším iniciátorem buněčné smrti než jiné příbuzné receptory jako Fas/CD95, TNFR1 a TRAILové receptory TRAIL-R1/DR4 a TRAIL-R2/DR5, a dále již publikovaná skutečnost, že delece DR6 nijak neovlivňuje aktivaci indukovanou buněčnou smrtí (AICD) aktivovaných myších T-lymfocytů [8, 9]. V tomto ohledu se receptor DR6 podobá jinému příbuznému proteinu, receptoru DR3, jehož hlavní funkcí je regulace diferenciaci Th17 CD4+ T-lymfocytů.

Expresí receptoru DR6 na aktivovaných T-lymfocytech nemusí být sama o sobě postačující podmínkou pro spuštění DR6-dependentní signalizace, podobně jako u dalších příbuzných proteinů může být vyžadována aktivace příslušným ligandem. Jedinými dosud publikovanými ligandy receptoru DR6 jsou *N*-koncové odštěpené formy proteinů APP (" *$\beta$ -amyloid precursor protein*") a APLP2 ("*amyloid precursor-like protein-2*"), které mohou během myší embryogeneze spouštět degeneraci axonů a buněčnou smrt míšních neuronů závislou na receptoru DR6 [10]. Protein APLP2 je exprimován na lidských primárních B-lymfocytech a monocytech, takže by jeho *N*-koncový fragment teoreticky mohl sloužit jako DR6 ligand, nicméně jeho interakci s DR6 *in vitro* ani *in vivo* s DR6 exprimovaným na lidských hematopoietických buňkách (aktivované primární T-lymfocyty, neaktivované buňky linie Jurkat) se nám nikdy nepodařilo detekovat žádnou z běžně užívaných metod, stejně jako DR6-dependentní aktivaci kaspázové kaskády nebo signálních drah vedoucích k aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B nebo stresových kináz z rodiny JNK. Důvodem pro toto pozorování může být rozdílnost mezi myším a lidským modelem anebo rozdílnost mezi nervovou a imunitní tkání, interakce mezi proteiny DR6 a *N*-APLP2 může např. vyžadovat přítomnost nějakého dosud neznámého koreceptoru přítomného pouze na embryonálních míšních neuronech apod.

V této naší práci se nám tedy podařilo přispět k charakterizaci regulace exprese receptoru DR6 na buňkách lidského imunitního systému, nicméně jeho funkce na těchto buňkách závislá na signalizaci spouštěné jeho dosud neznámým ligandem zůstává nadále neobjasněná.

### IV.3. Adaptérový protein ARAP1 se účastní mobilizace DR4 k plazmatické membráně

Jedním z proteinů příbuzných receptoru DR6 je receptor DR4 ("*death receptor-4*", TNFRsf10a/TRAIL-R1/Apo2), který po vazbě svého ligandu TRAIL ("*TNF-related apoptosis-inducing ligand*", TNFsf10/Apo2L) může spouštět signalizaci vedoucí k aktivaci kaspázové kaskády a případně až k apoptóze. Regulace apoptózy indukované ligandem TRAIL skrze receptor DR4 probíhá na několika úrovních, přičemž jednou z nich je regulace množství a vzájemného poměru proapoptotických a antiapoptotických receptorů ligandu TRAIL na cytoplazmatické membráně cílových buněk. A právě tato úroveň regulace TRAIlem indukované apoptózy se stala předmětem naší studie.

Naše práce začala vyhledáváním nových proteinů, které interagují s cytoplazmatickou částí receptoru DR4 a mohly by tak regulovat jeho signalizaci. Pro toto vyhledávání jsme použili metodu kvasinkového dvouhybridního systému a jako jednoho z kandidátů na nové interaktory s receptorem DR4 jsme objevili protein ARAP1 (centaurin- $\delta 2$ ), adaptérový protein vykazující aktivity Arf GAP a Rho GAP, tj. aktivity vedoucí ke stimulaci malých G-proteinů Arf a Rho, které se účastní vezikulárního transportu a organizace cytoskeletárních změn uvnitř buňky. ARAP1 má tři známé sestřihové varianty, přičemž námi objevená varianta interagující s receptorem DR4 neobsahuje produkt exonu 30, kterým je jedna z C-terminálních domén PH ("*pleckstrin homology*"). Další sestřihové varianty proteinu ARAP1 s receptorem DR4 neinteragovaly, stejně jako příbuzné proteiny ARAP2 a ARAP3.

V dalším kroku jsme interakci mezi proteiny DR4 a ARAP1 ověřili též v lidských buňkách. Oba proteiny, resp. jejich deleční mutanty, jsme nadprodukovali v buňkách lidské nádorové linie HEK293T a pomocí jejich koimunoprecipitace jsme zjistili, že tyto proteiny po nadprodukcí skutečně jsou přítomny ve stejném proteinovém komplexu a že pro interakci je důležitá proximální, k membráně přilehlá, doména intracelulární části receptoru DR4 a C-terminální část proteinu ARAP1. Kromě toho se ukázalo, že s proteinem ARAP1 slabě interaguje také receptor DR5, což je další receptor ligandu TRAIL sekvenčně příbuzný receptoru DR4.

Další nezávislý důkaz interakce proteinů DR4 a ARAP1 přinesla jejich vzájemná kolokalizace ve stejných buněčných kompartmentech. Nadprodukovali jsme tyto proteiny v nádorové linii NCTC a sledovali jejich lokalizaci po vystavení buněk působení ligandu TRAIL. V nestimulovaných buňkách je receptor DR4 přítomen především na plazmatické membráně, zatímco protein ARAP1 v endoplazmatickém retikulu a Golgiho systému. V buňkách stimulovaných ligandem TRAIL oba tyto proteiny mění svoji lokalizaci a kolokalizují v ranných endozómech detekovaných protilátkou proti proteinu Rab5.

V další části práce jsme se věnovali funkčním důsledkům interakce mezi proteiny DR4 a ARAP1. Zjistili jsme, že transientní nadprodukce proteinu ARAP1 nemá žádný vliv na buněčnou lokalizaci receptoru DR4 ani na citlivost buněk k apoptóze indukované ligandem

TRAIL. Naopak, po snížení exprese proteinu ARAP1 pomocí různých siRNA oligonukleotidů došlo v některých lidských nádorových liniích ke snížení množství receptoru DR4 lokalizovaného na plazmatické membráně a detekovaného průtokovou cytofluorometrií, anižby došlo k celkovému úbytku DR4 na úrovni mRNA nebo úrovni proteinové.

Navazující experimenty ukázaly, že úbytek receptoru DR4 lokalizovaného na plazmatické membráně vyvolaný potlačením exprese proteinu ARAP1 pomocí siRNA měl za následek též pomalejší nástup apoptózy vyvolané vystavením buněk působení ligandu TRAIL a kvantifikované pomocí detekce štěpení cytokeratinu-18, jednoho ze substrátů kaspázy-3. Obdobně zpožděné a zeslabené pak byly v těchto buňkách i další procesy spojené s apoptotickou signalizací, jako např. štěpení proteinů kaspáza-8, Bid a PARP, nebo fosforylace kinázy JNK.

Tato naše práce tedy přinesla objev nového interakčního partnera receptoru DR4, kterým je adaptérový protein ARAP1. Ten se kromě svých aktivit Arf GAP a Rho GAP může přímo účastnit vezikulárního transportu dalších proteinů mezi váčky Golgiho systému a plazmatickou membránou. Podobná schopnost již byla dříve popsána u proteinů příbuzných proteinu ARAP1, např. proteiny ASAP1 a ARAP3 regulují vezikulární transport receptoru EGFR, anebo proteiny AGAP1 a AGAP2 ovlivňují recyklaci transferinového receptoru. Potlačení exprese proteinu ARAP1 v našem modelu skutečně vede k narušení transportu receptoru DR4 (a částečně i DR5) na plazmatickou membránu. Tento defekt byl již dříve popsán jako důvod rezistence střevních nádorových buněk SW480 k apoptóze indukované ligandem TRAIL. A i v našem případě potlačení exprese proteinu ARAP1 vedlo ke snížení apoptotické signalizace po vystavení buněk působení tohoto ligandu.

Tato naše práce tedy přispívá k objasnění mechanismů ovlivňujících citlivost či rezistenci nádorových buněk k programované buněčné smrti indukované ligandem TRAIL prostřednictvím regulace vezikulárního transportu jeho receptorů.



## V. Závěr

Smyslem této práce bylo přispět k objasnění funkce proteinu DR6 na molekulární úrovni. Jednotlivé, předem vytyčené cíle, se nám podařilo naplnit pouze částečně. Podařilo se nám funkčně charakterizovat strukturu DR6 včetně jeho posttranslačních modifikací i objasnit mechanismy regulace exprese DR6 na hematopoeitických lidských buňkách. Konkrétně jsme z prezentovaných publikací získali zejména tyto dílčí závěry:

(1) Protein DR6 se přirozeně vyskytuje ve dvou formách o molekulových hmotnostech cca 85kDa a 110kDa. Dominantní forma 110kDa je extenzivně *N*- i *O*-glykosylovaná, *N*-glykosylační místa se nám podařila zamapovat do jednotlivých aminokyselin, *O*-glykosylační místa pak do poměrně malé oblasti, o níž jsme zjistili, že je nezbytná pro transport DR6 na plazmatickou membránu. Protein DR6 je dále modifikován i *S*-palmitylací, která zřejmě (narozdíl od *N*-glykosylace) nemá vliv na směřování DR6 do membránových mikrodomén.

(2) Protein DR6 je exprimován na aktivovaných CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-lymfocytech. Jeho exprese je závislá na transkripčních faktorech NF- $\kappa$ B a NF-AT. Též jsme analyzovali roli jednotlivých predikovaných vazebných míst těchto transkripčních faktorů v DR6 promotoru. Leukemické buňky Jurkat, narozdíl od primárních T-buněk, exprimují DR6 před stimulací a po ní jeho expresi potlačují. Exprese DR6 na neaktivovaných buňkách Jurkat je závislá na konstitutivně aktivní signalizaci z kinázy PI3K.

Dalším dílčím cílem našeho studia receptoru DR6 bylo objevování jeho nových interakčních partnerů, a případně objasnění funkce těchto proteinů v signalizaci z DR6. S využitím metody kvasinkového dvouhybridního systému jsme objevili několik zajímavých proteinů interagujících s intracelulární částí DR6 v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Tomuto tématu se již věnovaly diplomové práce [11] a [12]. Nezbytným předpokladem dalšího studia funkcí těchto interakcí v lidských buňkách jsou nástroje umožňující spouštět signalizaci z DR6, které jsme bohužel až do ukončení této disertační práce neměli k dispozici (viz níže).

Téma interakčních partnerů DR6 a jejich funkce v signalizaci z DR6 tedy není součástí této disertační práce, nicméně třetí prezentovaná publikace se věnuje tématu podobnému, a to funkční charakterizaci interakce mezi receptorem DR4 a adaptérovým proteinem ARAP1, která byla objevena právě pomocí kvasinkového dvouhybridního systému. Zjistili jsme, že receptor DR4 a protein ARAP1 spolu interagují v kvasinkách *S.cerevisiae* i v lidských buňkách, a že v buňkách vystavených působení ligandu TRAIL spolu kolokalizují v ranných endozómech. Snížení exprese proteinu ARAP1 vede ke snížení množství proteinu DR4 na plazmatické membráně, což má za následek snížení citlivosti buněk k působení ligandu TRAIL, ke zpomalení průběhu apoptózy i dalších procesů

spojených s apoptotickou signalizací. Protein ARAP1 je tak zřejmě důležitým regulátorem transportu receptoru DR4 z váčků Golgiho systému na plazmatickou membránu.

Jak již bylo zmíněno, jedním z hlavních cílů našeho studia receptoru DR6 bylo identifikovat jeho ligand(y), případně připravit agonistické monoklonální protilátky, a využít je ke studiu buněčné signalizace z DR6. Připravili jsme rekombinantní extracelulární část receptoru DR6 a pomocí průtokové cytofluorometrie jsme objevili nádorové buněčné linie exprimující povrchový antigen specificky vázající DR6, tedy potenciální DR6 ligand. Tento antigen se nám bohužel nepodařilo identifikovat.

Dále jsme připravili řadu monoklonálních protilátek proti extracelulární části receptoru DR6, a to izotypu IgG i IgM, nicméně žádné z těchto protilátek nebyly schopné (ani po prokřížení sekundární protilátkou) spustit obvyklé signální dráhy závislé na receptorech z rodiny TNFR, jako jsou kaspázová kaskáda, aktivace transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B nebo stresových kináz z rodiny JNK. Všechny tyto dráhy přitom mohou být spuštěny nadprodukcí DR6 v některých nádorových liniích.

V roce 2009 bylo publikováno, že odštěpená *N*-koncová část proteinu APP nebo jeho blízkého příbuzného APLP2 mohou v míšních nervových buňkách myších embryí spouštět aktivaci kaspáz-3 a -6 závislou na receptoru DR6, což má za následek degeneraci axonů a buněčnou smrt [10]. Zjistili jsme ale, že na našem modelu, tj. lidských buňkách hematopoietického původu, se proteiny *N*-APP a *N*-APLP2 na DR6 neváží a následně ani nespouštějí obvyklé signální dráhy spojené s proteiny rodiny TNFR. Důvody již byly diskutovány na straně 40, mohou spočívat v rozdílnosti mezi myším a lidským modelem anebo rozdílnost mezi nervovou a imunitní tkání, interakce mezi proteiny DR6 a *N*-APP/*N*-APLP2 může např. vyžadovat přítomnost nějakého dosud neznámého koreceptoru přítomného pouze na myších embryonálních míšních neuronech apod.

Další publikovaná data poukazující na možný dosud neidentifikovaný ligand receptoru DR6 pocházejí z práce [13]. Vystavení lidských primárních monocytů působení exogenního rekombinantního DR6 ovlivňovalo jejich *in vitro* diferenciaci do dendritických buněk pomocí IL4/GM-CSF. V naší práci [14] jsme však ukázali, že toto pozorování bylo nejspíše artefaktem založeným na nespecifickém efektu použitého rekombinantního DR6 produkovaného v hmyzích buňkách.

Ligand receptoru DR6 exprimovaný buňkami lidského imunitního systému tak zůstává stále neznámý (pokud vůbec existuje). V souvislosti s tím zůstává nadále ne plně charakterizovaná buněčná signalizace spojená s receptorem DR6 a funkce proteinů interagujících s DR6 v této signalizaci. Zrovna tak ne zcela objasněná zůstává i samotná funkce receptoru DR6 na buňkách lidského imunitního systému. Případný budoucí objev ligandu receptoru DR6 tak může přinést zásadní průlom v jeho molekulární a funkční charakterizaci, a případně i budoucí terapeutické využití farmakologických nástrojů založených na receptoru DR6 a jeho ligandu a jejich použití v humánní medicíně.

## VI. Literatura

1. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 745-56.
2. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
3. Wajant, H., *Death receptors*. Essays Biochem, 2003. **39**: p. 53-71.
4. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Apoptosis control by death and decoy receptors*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(2): p. 255-60.
5. Strasser, A., P.J. Jost, and S. Nagata, *The many roles of FAS receptor signaling in the immune system*. Immunity, 2009. **30**(2): p. 180-92.
6. Chen, G. and D.V. Goeddel, *TNF-R1 signaling: a beautiful pathway*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1634-5.
7. Pan, G., et al., *Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor*. FEBS Lett, 1998. **431**(3): p. 351-6.
8. Liu, J., et al., *Enhanced CD4+ T cell proliferation and Th2 cytokine production in DR6-deficient mice*. Immunity, 2001. **15**(1): p. 23-34.
9. Zhao, H., et al., *Impaired c-Jun amino terminal kinase activity and T cell differentiation in death receptor 6-deficient mice*. J Exp Med, 2001. **194**(10): p. 1441-8.
10. Nikolaev, A., et al., *APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases*. Nature, 2009. **457**(7232): p. 981-9.
11. Klíma, M., *Molekulární a funkční charakterizace „death“ receptoru 6 (DR6)*. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2003.
12. Zájedová, J., *Receptor „smrti“ 6 (DR6): interagující proteiny a expresní analýza*. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2006.
13. Derosa, D.C., et al., *Tumor-derived death receptor 6 modulates dendritic cell development*. Cancer Immunol Immunother, 2007.
14. Klíma, M., et al., *Functional analysis of the posttranslational modifications of the death receptor 6*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(10): p. 1579-87.

## Seznam publikací

- **Klíma M.**, Zájedová J., Doubravská L., Anděra L.: *Functional analysis of the posttranslational modifications of the death receptor-6*. *Biochim Biophys Acta*, 1793(10):1579-87, 2009. IF(2009) = 4,374.
- **Klíma M.**, Broučková A., Koc M., Anděra L.: *T-cell activation triggers death receptor-6 expression in a NF- $\kappa$ B and NF-AT dependent manner*. *Mol Immunol*. 2011 Apr 16. IF(2009) = 3,202.
- Šímová Š., **Klíma M.**, Čermák L., Šourková V., Anděra L.: *Arf and Rho GAP adapter protein ARAP1 participates in the mobilization of TRAIL-R1/DR4 to the plasma membrane*. *Apoptosis*, 13(3):423-36, 2008. IF(2008) = 3,971.

# Životopis

## Kontaktní informace

Martin Klíma  
Ústav molekulární genetiky Akademie věd ČR  
Václavská 1083/1, 14220 Praha 4  
telefon: +420 241 063 109  
e-mail: martin.klima@img.cas.cz

## Zaměstnání

2003+  
Laboratoř buněčné signalizace a apoptózy  
Ústav molekulární genetiky Akademie věd ČR, Praha  
2000 - 2002  
Laboratoř leukocytárních antigenů  
Ústav molekulární genetiky Akademie věd ČR, Praha

## Studium a dosažené vzdělání

2003+  
doktorské studium, dosud neukončeno  
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha  
obor/specializace: imunologie  
1998 - 2003  
magisterské studium, ukončeno 2003 (Mgr.)  
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha  
obor/specializace: biologie/imunologie  
1999 - 2003  
bakalářské studium, ukončeno 2006 (Bc.)  
Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy, Praha  
obor/specializace: aplikovaná informatika