

Abstrakt

Membránové receptory z rodiny TNFR (receptory faktorů nekrotizujících nádory) hrají významnou roli při regulaci buněčné imunitní a zánětlivé odpovědi a také ovlivňují řadu dalších biologických procesů (proliferaci, diferenciaci, přežívání buněk a i jejich odstraňování pomocí řízené buněčné smrti - apoptózy). Rodina TNFR obsahuje celkem 29 receptorů, jejichž společným rysem je přítomnost sekvenčních úseků obohacených cysteinem (CRD) v jejich extracelulárních částech. Signalizace z těchto receptorů je specificky aktivována některým z 19 ligandů z rodiny TNF. Osm členů rodiny TNFR tvoří zvláštní samostatnou skupinu nazývanou receptory „smrti“ (podle domény „smrti“ v jejich intracelulární části). Aktivace těchto receptorů má většinou za následek indukci apoptózy. Mezi tyto receptory patří i v roce 1998 objevený receptor „smrti“ (DR6), který pravděpodobně reguluje zejména proliferaci a diferenciaci T- a B-lymfocytů. Zevrubnějším objasnění jeho funkce a jím indukované signalizace však prozatím brání doposud nenalezený ligand a nejištěné složení membránového signalizačního komplexu.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo přispět k charakterizaci DR6 signalizačního komplexu. Pomocí kvasinkového dvouhybridního systému (Y2H) jsme vyhledávali proteiny, které specificky interagují s intracelulární částí DR6 a mohou se zúčastnit (či ovlivnit) signalizace z tohoto receptoru. Analýzou cDNA knihovny z HeLa buněk se nám podařilo identifikovat šest takových proteinů. Podrobněji jsme doposud charakterizovali dva z nich, a to Sorting nexin-3 (SNX3), cytoplazmatický protein přítomný v endozomech a pravděpodobně se účastnící recyklace membránových proteinů, a Copine-7 (CPNE7), také cytoplazmatický protein, který je možným regulátorem aktivace kinasy JNK. Zjistili jsme, že oba proteiny po jejich nadprodukci v HEK buňkách specificky koimunoprecipitují s DR6. SNX3 kolokalizuje s DR6 ve strukturách podobným endosomálním váčkům a Copine-7 inhibuje nadprodukcí DR6 indukovanou aktivaci JNK kinas. V další části diplomové práce jsme analyzovali proximální část DR6 promotoru a zjišťovali jsme, zda je exprese DR6 ovlivňována cytokiny TNF α (přes aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B) či Wnt3a (aktivace transkripčních faktorů z rodiny TCF).