

Přírodovědecká fakulta
Univerzity Karlovy v Praze

Diplomová práce

2006

Jitka Zájedová

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra biochemie

**Receptor „smrti“ 6 (DR6) : interagující
proteiny a expresní analýza**

(Death receptor 6 : interacting proteins and expression
analysis)

Diplomová práce

Jitka Zájedová

Vedoucí diplomové práce:
RNDr. Ladislav Anděra, CSc.

Konzultant:
Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Ladislava Anděry, CSc. a konzultanta Doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 26.4. 2006

Štěpánka Jilková
.....

Tato diplomová práce byla vypracována v Laboratoři buněčné signalizace a apoptózy Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky. Mé díky patří všem spolupracovníkům za vytvoření velice příjemného a přátelského prostředí, obzvláště pak RNDr. Ladislavu Anděrovi, CSc. a Mgr. Martinu Klímovi za jejich trpělivost, odborné znalosti a všestrannou pomoc v laboratoři. Dále děkuji Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za cenné připomínky.

Poděkování patří také mým rodičům za vytvoření příjemného rodinného zázemí a podporu během celého studia.

Obsah

Obsah	4
Seznam použitých zkratk	7
Abstrakt	12
1 Úvod	13
1.1 Receptory rodiny TNFR a jejich ligandy	13
1.1.1 Obecné rozdělení a buněčná exprese	13
1.1.2 Struktura ligandů TNF a receptorů rodiny TNFR	15
1.1.2.1 Struktura ligandů TNF	15
1.1.2.2 Struktura receptorů rodiny TNFR	16
1.1.3 Signalizace	17
1.1.3.1 Signalizační dráhy receptorů rodiny TNFR s TRAF proteiny	17
1.1.3.2 Signalizační dráhy „inhibičních“ receptorů.....	17
1.2 Receptory rodiny TNFR obsahující doménu „smrti“	19
1.2.1 Fas (CD95)	19
1.2.2 TNFR1	20
1.2.3 DR3.....	20
1.2.4 DR4 a DR5	20
1.2.5 EDAR.....	22
1.2.6 NGFR.....	22
1.3 Receptor „smrti“ DR6	23
1.3.1 Struktura a exprese DR6	23
1.3.2 Signalizace z DR6	23
1.3.2.1 Apoptóza indukovaná DR6	25
1.3.2.2 Role DR6 v T- a B-buněčné imunitní odpovědi	25
1.3.2.3 DR6 a GVHD („Graft-Versus-Host Disease“)	26
2 Cíle práce	27
3 Materiál a metody	28
3.1 Bakteriální a kvasinkové kmeny, savčí buněčné linie, kultivační média a protilátky	28
3.1.1 Bakteriální, kvasinkové kmeny a savčí buněčné linie	28
3.1.1.1 Kvasinkové kmeny (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	28
3.1.1.2 Bakteriální kmeny (<i>Escherichia coli</i>).....	28
3.1.1.3 Savčí buněčné linie.....	28
3.1.2 Kultivační média	29
3.1.2.1 Média pro kultivaci <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
3.1.2.2 Média pro kultivaci <i>Escherichia coli</i>	30
3.1.2.3 Média pro kultivaci savčích buněčných linií a použité protilátky.....	30

3.1.3	Použité protilátky	30
3.2	Příprava rekombinantních vektorů.....	31
3.2.1	Vektory použité pro přípravu rekombinantních vektorů.....	31
3.2.1.1	Vektory pro expresi v <i>S. cerevisiae</i>	31
3.2.1.2	Vektory pro expresi v <i>E. coli</i>	31
3.2.1.3	Vektory pro expresi v savčích buňkách	32
3.2.2	Klonování.....	32
3.2.2.1	Transformace bakterií	33
3.2.2.2	Produkce a purifikace plazmidové DNA	34
3.2.3	Použité rekombinantní vektory.....	34
3.2.3.1	Rekombinantní vektory pro expresi v <i>S. cerevisiae</i>	34
3.2.3.2	Rekombinantní vektory pro expresi v <i>E. coli</i>	35
3.2.3.3	Rekombinantní vektory pro expresi v savčích buňkách.....	35
3.3	Kvasinkový dvouhybridní systém	36
3.3.1	Základní princip GAL4 – kvasinkového dvouhybridního systému	36
3.3.2	Transformace plasmidů do <i>S. cerevisiae</i>	37
3.3.3	Vyhledávání proteinů interagujících s intracelulární částí DR6	38
3.3.4	Izolace plazmidové DNA z kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
3.3.5	Transformace bakterií <i>Escherichia coli</i> kmene TOP10 pomocí elektroporace	42
3.3.6	Kotransformace kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pomocí párování	43
3.3.7	Izolace proteinů z kvasinek.....	43
3.3.8	Sekvenování a identifikace GAL4-AD inzertů	44
3.4	Analýza proteinů pomocí SDS polyakrylamidové elektroforézy a Western přenosu.....	45
3.4.1	SDS polyakrylamidová elektroforéza	45
3.4.2	Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu.....	46
3.4.3	Imunodetekce	46
3.5	Ověření interakce mezi nalezenými proteiny a intracelulární částí DR6 v savčích buňkách	47
3.5.1	Transfekce přisedlých savčích buněk s použitím polyethyleniminu ..	47
3.5.2	Koimunoprecipitace	48
3.5.2.1	Navazování protilátky na CNBr Sepharosu	49
3.5.2.2	Koimunoprecipitace	49
3.5.3	Analýza exprimovaných proteinů pomocí imunocytochemie.....	50
3.6	Produkce a purifikace rekombinantního proteinu His-SNX3 denaturační metodou	51
3.7	Analýza DR6 promotoru	52
3.7.1	Polymerasová řetězová reakce pomocí DNA polymerasy Phusion ..	52
3.7.2	Luciferasové reportérové testy.....	54
4	Výsledky	55

4.1	Identifikace proteinů interagujících s intracelulární částí DR6	55
4.1.1	Testy mutantů GAL4 DNA-BD – DR6(IC) fúzního proteinu.....	55
4.1.2	Vyhledávání proteinů interagujících s intracelulární částí DR6 pomocí kvasinkového dvouhybridního systému	57
4.1.2.1	Výběr vhodné cDNA knihovny.....	57
4.1.2.2	Selekce pozitivních klonů.....	57
4.1.2.3	Izolace plazmidové DNA a její restriční analýza	57
4.1.2.4	Odstranění falešných pozitivit	58
4.1.2.5	Identifikace neznámých proteinů interagujících s DR6	59
4.1.3	Ověření interakce DR6(C-term) a nalezených proteinů	60
4.2	Charakterizace interakce DR6 s SNX3	62
4.2.1	Ověření interakce mezi intracelulární částí DR6 a SNX3 v savčích buňkách pomocí koexprese a koimunoprecipitace	62
4.2.2	Analýza buněčné kolokalizace DR6 a SNX3 pomocí konfokální mikroskopie.....	64
4.2.3	Příprava a charakterizace protilátek proti SNX3	65
4.2.3.1	Produkce a purifikace rekombinantního HisSNX3.....	65
4.2.3.2	Příprava a charakterizace králičí polyklonální protilátky rozpoznávající SNX3	66
4.3	Charakterizace DR6 s Copine 7 (CPNE7).....	67
4.3.1	Ověření interakce mezi intracelulární částí DR6 a CPNE7 v savčích buňkách pomocí koexprese a koimunoprecipitace	67
4.3.2	Regulační role CPNE7 v signalizaci z receptoru DR6	69
4.4	Analýza DR6 promotoru	70
4.4.1	PCR amplifikace fragmentů DR6 promotoru a příprava luciferasových reportérových konstruktů	71
4.4.2	Analýza aktivit jednotlivých mutantů DR6 promotoru po stimulaci TNF a Wnt3a	72
5	<i>Diskuse</i>.....	74
6	<i>Závěr</i>.....	77

Seznam použitých zkratk

ADAM	„a disintegrin and metalloproteinase domain“, rodina metalloproteas
Amp	ampicilin
APRIL	„a proliferation-inducing ligand“, ligand indukující proliferaci
APS	amonium-persulfát, peroxodisíran amonný
BAFF	“B-cell-activating factor“, ligand rodiny TNF
BAFFR	“BAFF receptor“, receptor rodiny TNFR
Bcl-2	„B-cell lymphoma-2“, protein nadprodukováný u B-buněčného lymfomu
BCMA	“B-cell maturation antigen“, receptor rodiny TNFR
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
CD	„cluster of differentiation“, názvoslovná jednotka leukocytárních antigenů
cDNA	komplementární DNA
CIAP	„calf intestine alcalic phosphatase“, alkalická fosfatasa z trávicí soustavy hovězího skotu
CNBr ⁻	bromidokyanatan
CPNE7	Copin 7
CRD	„cystein-rich domain“, doména bohatá na cystein
DcR1-3	„decoy“ receptor 1 až 3
DD	„death domain“, doména smrti
DED	„death effector domain“, výkonná doména smrti
DISC	„death inducing signaling complex“, smrtící signální komplex
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA-AD	DNA-aktivační doména
DNA-BD	DNA-vazebná doména
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
dox	doxycyklin
DR3-6	„death receptor“ 3 až 6, receptor smrti
DR6(IC)	intracelulární část receptoru DR6
DTT	1,4-dithio-D,L-threitol

ECL	„enhanced chemiluminiscence“, roztok pro chemiluminiscenční imunodetekci proteinů přenesených na membránu
EDA	„ectodermal dysplasin“, ligand rodiny TNF
EDAR	„ectodyplasin-A-receptor“, receptor rodiny TNFR
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykol-di(aminoethylether)tetraoctová
EST	„expressed sequence tag“
EtBr	ethidium bromid
FADD	„Fas-associated death domain“, protein obsahující doménu smrti asociovaný s receptorem Fas
Fc	konstantní doména imunoglobulinů
FIP1L1	„FIP1 like 1“, receptor rodiny TNFR
Fn14	„FGF-inducible gene 14“, receptor rodiny TNFR
GAM	„goat anti mouse“ kozí protilátka proti myšímu imunoglobulinu
GAM-Px	kozí protilátka proti myšímu imunoglobulinu konjugovaná s křenovou peroxidázou
GAR-Px	kozí protilátka proti králíčimu imunoglobulinu konjugovaná s křenovou peroxidázou
GITR	„glucocorticoid-induced TNFR family recptor“, receptor rodiny TNFR
GITRL	„GITR ligand“, ligand rodiny TNF
GPI	glykosylfosfatidylinositol
GTPbp	„GTP-binding protein“, protein vázající GTP
GVHD	„graft-versus-host-disease“, reakce štěpu proti hostiteli
HA	hemaglutinin
HEK	„human embryonic kidney“, lidská buněčná linie odvozená z embryonálních buněk ledviny
HeLa	lidské buňky cervikálního karcinomu
HVEM	„herpes-virus entry mediator“, receptor rodiny TNFR
CHORDC1	„CHORD-domain containing, zinc binding protein 1“, receptor rodiny TNFR
IAP	„inhibitors of apoptosis protein“, proteiny inhibující apoptózu
IPTG	isopropylthiogalaktosid
JNK	„c-Jun N-terminal kinase“, N-koncová kinasa c-Jun

Kan	kanamycin
LnCAP	„lymph node carcinoma of the prostate“, buněčná linie z nádoru prostaty
LB médium	Luria-Bertani médium
LiAc	octan lithný
LIGHT	„lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D (gD) for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes“, jeden z ligandů rodiny TNF
LT	lymphotoxin
LZ	„leucin-zipper domain“, doména leucinového zipu
MAP kinase	„mitogen-activated protein kinase“, proteinkinasa aktivovaná mitogeny
MATa/α	„mating type a/α, kvasinkový párovací typ a/α
MCF7	„mammary carcinoma cell line“, lidské buňky karcinomu prsu
MDCK	„Madin-Darby kidney cell“, psí epiteliální buněčná linie z nádoru ledvin
MHC	„major histocompatibility complex“, hlavní histokompatibilní komplex
NF-ATc	„nuclear factor of activated T cells“, transkripční faktor
NFM	„non-fat milk“, netučné mléko
NFκB	„nuclear factor κB“, transkripční faktor
NGFR	„nerve growth-factor receptor“, receptor rodiny TNFR
NIK	„NFκB-inducing kinase“, kinasa indukující NFκB
NK	„natural killer“, „přirození zabijáci“
OD ₆₀₀	optická denzita při vlnové délce 600nm
OPG	osteoprotegerin, receptor z rodiny TNFR
PBS	„phosphate-buffered saline“, druh fyziologického roztoku
PCR	„polymerase chain reaction“, polymerasová řetězová reakce
PEG	polyetylen glykol
PEI	polyetylenimin
PLB	„Passive Lysis Buffer“, pasivní lyzační pufr
PX	„Phox“ homologní doména
RAIDD	„RIP-associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a death domain“, adapterový protein
RANK	„receptor activator of NFκB“, receptor aktivující NFκB z rodiny TNFR
RANKL	„receptor activator of nuclear faktor κB ligand“, ligand z rodiny TNF

RELT	„receptor expressed in lymphoid tissues“, receptor rodiny TNFR
RING	„really interesting new gene“, proteinová doména
RIP	„receptor-interacting protein“, adapterová protein kinasa
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu
SD	„syntetic drop-out“, minimální médium pro kultivaci <i>S. cerevisiae</i>
SDS	„sodium dodecyl sulphate“; n-dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza
SNX3	Sorting nexin 3
SV40	simian virus 40
TACI	„transmembrane activator and cyclophilin ligand interactor“, receptor rodiny TNFR
TANK	„TRAF-associated NFκB activator“
TCF	„T-cell factor“, faktor T-buněk
TCR	„T-cell receptor“, receptor T lymfocytů pro antigen
TE	pufr obsahující Tris.HCl a EDTA (poměr 10:1) v H ₂ O
TEMED	N,N,N',N' - tetramethylethyldiamin
Th	„T helper“, pomocné T buňky
THD	“TNF-homology domain“, TNF-homologní doména
TIM	“TRAF-interacting motifs“, TRAF-interakční motivy
TNF	„tumor necrosis factor“, faktor nekrotizující nádory
TNFR	„tumor necrosis factor receptor“, receptory faktorů nekrotizující nádory
TRADD	„TNFR-associated death domain“, adapterový protein obsahující doménu smrti asociovaný s TNFR
TRAF	„TNF receptor-associated factor“, faktor asociovaný s TNF-receptorem
TRAIL	„TNF-related apoptosis inducing ligand“, ligand z rodiny TNF
Trk	„tropomyosin-related kinase“, rodina kinas
TWEAK	„TNF-like weak inducer of apoptosis“, ligand z rodiny TNF
Tween 20	polyoxyethylensorbitanmonolaurát, druh detergentu
UAS	„upstream activating sequence“
VEGI	„vascular endothelial cell-growth inhibitor“, ligand z rodiny TNF
Wnt	rodina ligandů indukujících proliferaci a přežití buněk
XEDAR	„X-linked EDA receptor“, receptor rodiny TNFR

Y2H kvasinkový dvouhybridní systém
YPDA kompletní médium pro kultivaci kvasinek *S.cerevisiae*

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).

1 Úvod

1.1 Receptory rodiny TNFR a jejich ligandy

Ligandy rodiny TNF byly původně identifikovány jako produkty lymfocytů a makrofágů, které způsobovaly lýzy některých, zejména nádorových buněk [1]. Jak ligandy, tak i jejich receptory jsou si navzájem strukturně a doménově podobné, trimerní, většinou transmembránové molekuly, a byly tak kolektivně zařazeny do rodiny TNF/TNFR [2].

Členové rodiny TNFR jsou významnými modulátory zánětlivé a buněčné imunitní odpovědi a účastní se regulace řady biologických procesů počínaje od proliferace, diferenciace a apoptózy až k buněčnému přežití [2-4].

1.1.1 Obecné rozdělení a buněčná exprese

Receptory rodiny TNFR lze rozdělit do 3 základních skupin [5]:

- a) obsahující jeden nebo více TRAF-interakčních motivů (TIM) v cytoplazmatické části (viz Tab. 1).

Receptor	Exprimován na:	Ligand	Exprimován na:
TNFR2	endoteliální a buňky imunitního systému	TNF LT α	makrofágy, NK, T a B buňky NK, T a B buňky
CD40	Reed-Sternbergovy buňky	CD40L	T a B buňky
CD30	Reed-Sternbergovy buňky	CD30L	T buňky a monocyty
CD27	CD4 ⁺ a CD8 ⁺ T buňky	CD27L	NK, T a B buňky
LT β R	NK, CD4 ⁺ a CD8 ⁺ T buňky nelymfoidní hematopoetické buňky a buňky stromy	LT β LIGHT	dendritické, T, B, NK buňky a monocyty T, dendritické buňky, granulocyty a monocyty
OX40	T buňky	OX40L	T a B buňky
4-1BB (CD 137)	NK, aktivované T buňky a monocyty	4-1BBL	B, dendritické buňky a makrofágy
BAFFR	B buňky, klidové T lymfocyty, lymfocyty v periferní krvi, lymfatické a slezinné uzliny	BAFF	T, dendritické buňky, monocyty a makrofágy

BCMA	B buňky, lymfocyty v periferní krvi, buňky sleziny, thymu, lymfatických uzlin, jater, nadledvinek	APRIL BAFF	makrofágy, lymfoidní a nádorové buňky T, dendritické buňky, monocyty a makrofágy
TACI	B, aktivované T buňky, lymfocyty v periferní krvi, buňky sleziny, thymu a tenkého střeva	APRIL BAFF	makrofágy, lymfoidní a nádorové buňky T, dendritické buňky, monocyty a makrofágy
RANK	osteoklasty, osteoblasty a aktivované T buňky	RANKL	aktivované T buňky a osteoblasty
GITR	CD4 ⁺ a CD25 ⁺ T buňky	GITRL	?
HVEM	T buňky	LIGHT	T, dendritické buňky, granulocyty a monocyty
TROY	kožní embryonální buňky, epitelální buňky, vlasové folikuly a mozkové buňky	?	?
XEDAR	ektodermální deriváty	EDA-A2	kožní buňky
RELT	lymfoidní tkáň	?	?
Fn14	endoteliální buňky a fibroblasty	TWEAK	monocyty

Tab. 1: Receptory obsahující TRAF-interakční motivy v intracelulární části, jejich ligandy a buňky, na kterých jsou produkovány (zpracováno dle [6]).

b) neobsahující žádnou funkční doménu nebo motiv v cytoplazmatické části, tzv. „inhibiční“ receptory (z anglického decoy) (viz Tab. 2).

Receptor	Exprimován na:	Ligand	Exprimován na:
TRAIL-R3 (DcR1)	většina buněk	TRAIL	NK, T a dendritické buňky
TRAIL-R4 (DcR2)	většina buněk	TRAIL	NK, T a dendritické buňky
decoy-R3 (DcR3)	plicní buňky a buňky tlustého střeva	FasL	aktivované splenocyty, thymocyty,
osteoprotegerin (OPG)	prekurzory osteoklastů, endoteliální buňky a další	TRAIL RANKL	NK, T a dendritické buňky aktivované T buňky a osteoblasty

Tab. 2: „Bezdoménové“ receptory, jejich ligandy a buňky, ve kterých jsou produkovány (zpracováno dle [6]).

c) obsahující doménu „smrti“ (DD) v cytoplazmatické části (viz Tab. 3).

Receptor	Exprimován na:	Ligand	Exprimován na
Fas (CD95)	většina buněk	FasL (CD95L)	aktivované splenocyty, thymocyty, nelymfoidní tkáň
TNFR1	všechny buňky	TNF LT α	makrofágy, NK, T a B buňky NK, T a B buňky
DR3	aktivované T buňky	VEGI	endoteliální buňky
TRAIL-R1 (DR4)	většina buněk	TRAIL	NK, T a dendritické buňky
TRAIL-R2 (DR5)	většina buněk	TRAIL	NK, T a dendritické buňky
DR6	klidové T buňky	?	?
EDAR	ektodermální deriváty	EDA-A1	kožní buňky
NGFR	nervové buňky	NGF	nervové buňky

Tab. 3: Receptory obsahující v intracelulární části doménu „smrti“, jejich ligandy a buňky, na kterých jsou produkovány (zpracováno dle [6]).

1.1.2 Struktura ligandů TNF a receptorů rodiny TNFR

1.1.2.1 Struktura ligandů TNF

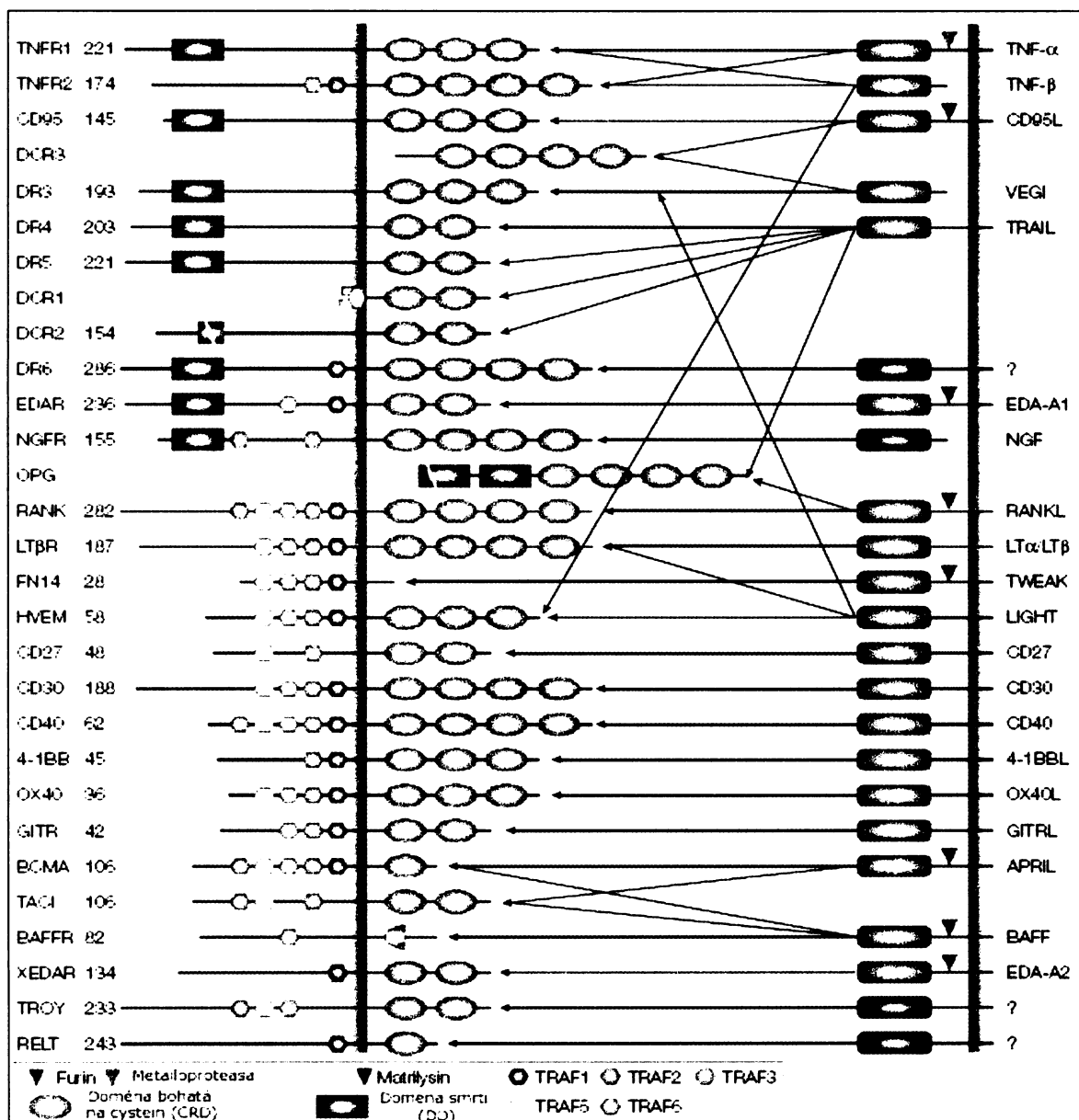
Ligandy rodiny TNF jsou zejména produkovány jako transmembránové proteiny II. typu, charakterizované C-koncovou doménou nazývanou „TNF homologní“ doména (THD) [7, 8]. Tato trimerická doména se skládá ze 150 aminokyselin a je odpovědná za vazbu receptoru. THD jsou β -sendvičové struktury složené ze dvou antiparalelních β -skládaných listů, tvořených 5 antiparalelními β -vláknými.

Ačkoli je většina ligandů syntetizována ve formě do membrány zakotvených proteinů, jejich funkční extracelulární části mohou být odštěpeny několika ligand-specifickými proteasami :

- metalloproteasami z rodiny ADAM - ligandy TNF a RANKL [5, 9]
- matrilysinem - ligandy FasL [10]
- proteasami ze „subtilisin-furinové“ rodiny - ligandy BAFF, EDA, TWEAK, APRIL [11, 12] (viz Obr. 1).

1.1.2.2 Struktura receptorů rodiny TNFR

Receptory rodiny TNFR jsou většinou transmembránové proteiny I. typu, jejichž extracelulární části obsahují 1-6 charakteristických motivů bohatých na cystein (CRD), každý se třemi cysteinovými můstky [5]. Prostřednictvím těchto motivů se váží k THD příslušného ligandu. Dále se skládají z transmembránové domény a intracelulární části, která může obsahovat DD nebo TIM. (viz Tab. 1-3, Obr. 1)



Obr. 1 Přehled receptorů rodiny TNFR a jejich ligandů

Upraveno dle [6].

1.1.3 Signalizace

1.1.3.1 Signalizační dráhy receptorů rodiny TNFR s TRAF proteiny

Proteiny z rodiny faktorů asociovaných s TNF-receptorem (TRAF) tvoří významnou skupinu intracelulárních adaptorových molekul (TRAF1-TRAF6), charakterizovanou C-koncovým motivem nazývaným TRAF doména, která umožňuje vazbu k receptorům, formování homo- nebo heterodimerů a interakci s řadou intracelulárních proteinů a signalizačních molekul. Obsahuje 200 aminokyselin a skládá se z TRAF-N a TRAF-C domén [13, 14]. TRAF-C doména váže signalizační molekuly jako TANK a NIK a TRAF-N doména antiapoptické molekuly jako c-IAP1 a c-IAP2 [15-18].

N-konec TRAF proteinů (kromě TRAF1) má tzv. „RING finger“ motiv [19, 20], který je rozhodující pro aktivaci NFκB, a za ním následuje 5-7 zinkových prstů [21] významných pro aktivaci JNK a NFκB [22-25].

Ačkoli nemají TRAF proteiny žádné enzymatické aktivity, mohou indukovat aktivaci několika kinasových kaskád, jenž vedou k indukci jiných signálních drah (např. NFκB), které mohou regulovat buněčné procesy počínaje od buněčné proliferace a diferenciaci až k apoptóze [26] (viz Obr. 2(A)).

Někteří členové rodiny TNFR s DD se váží s TRAF proteiny nepřímo přes adapterové proteiny TRADD a RIP, jiní bez DD se váží přímo přes cytoplazmatický motiv zvaný TIM. Aminokyselinové složení TIM motivů je pro každý TNFR jiné, proto se různé TRAF proteiny váží k různým TNFR (viz Obr. 2(B)).

1.1.3.2 Signalizační dráhy „inhibičních“ receptorů

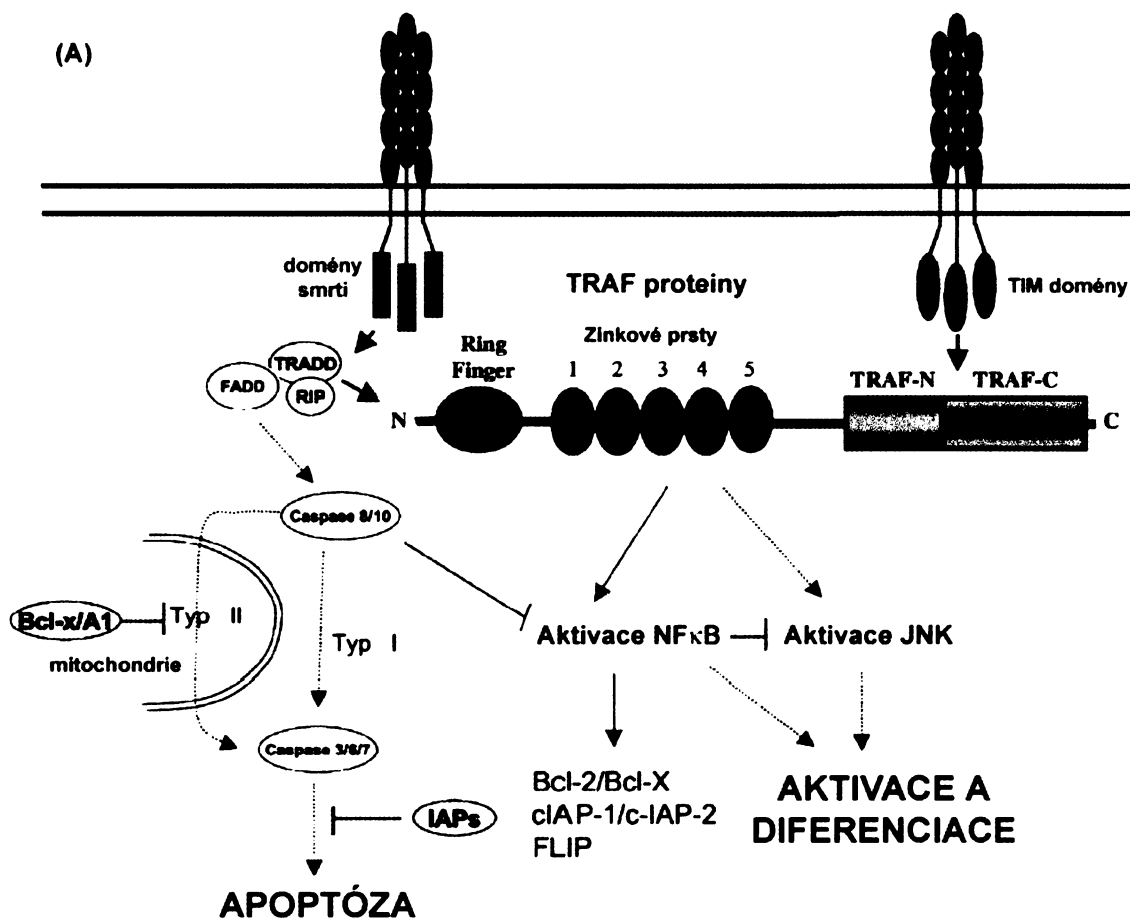
Ačkoli tato skupina TNFR receptorů neposkytuje sama intracelulární signalizaci, může kompetovat s ostatními dvěma skupinami signalizačních receptorů o vazbu jejich společných ligandů a tím zabraňovat aktivaci jejich signalizačních drah [26].

DcR1 a DcR2 kompetují s DR4 a DR5 o ligand TRAIL. DcR1 (nazývaný také jako TRAIL-R3) [27, 28] je protein zakotvený v buněčném povrchu pomocí glykosyl fosfatidylinositolu (GPI), podobající se receptorům DR4 a DR5, ale postrádající cytoplazmatickou část s DD, která je nepostradatelná pro indukci apoptózy. DcR2 (nazývaný TRAIL-R4) [27, 29] je dalším receptorem, který se podobá DR4 a DR5,

ale má podstatně zkrácenou cytoplazmatickou DD, která je rozhodující pro aktivaci apoptózy a transkripčního faktoru NFκB [30].

„Inhibiční“ receptor OPG kompetuje se signalizačním receptorem RANK o ligand RANKL a tím inhibuje aktivaci osteoklastů [31].

DcR3 je „inhibičním“ receptorem pro FasL, obsahuje 4 CRD a žádnou transmembránovou doménu. Konkuruje Fas receptoru, a tudíž působí jako antiapoptická molekula.



(B)

	T R A F					
	1	2	3	4	5	6
RELT						
BAFF-R						
4-1BB						
CD27						
TNF-R2						
EDAR, AITR, Fn14, BCMA						
CD40						
XEDAR						
TACI						
LT R						
Troy, OX40, HVEM, CD30						
RANK						
p75NGFR						

Obr. 2

(A) Signalizační dráhy aktivované TRAF proteiny (aktivace NFκB a JNK) a jejich regulační role v TNFR signalizaci (anti-apoptické nebo diferenciační signály jsou znázorněny zeleně a pro-apoptická regulace červeně).

(B) Vazebné specifity TRAF proteinů (znázorněny šedou barvou), které jsou rozhodující pro vazbu TNFR obsahujících TIM.

Upraveno dle [26].

1.2 Receptory rodiny TNFR obsahující doménu „smrti“

Receptory „smrti“ charakterizuje homologní cytoplazmatická sekvence nazývaná doména „smrti“ (DD) [30, 32], která hraje významnou roli při přenosu apoptotické signalizace z povrchu buněk k intracelulárním efektorovým drahám [33].

1.2.1 Fas (CD95)

Fas (CD95) , transmembránový protein I. typu o molekulové hmotnosti 48 kDa, je produkován jak v aktivovaných lymfocytech a různých tkáních lymfoidního i nelymfoidního původu (např. hepatocytech), tak také v nádorových buňkách. Jeho ligand FasL, transmembránový protein II. typu o velikosti 40 kDa, je produkován pouze cytotoxickými T buňkami, NK buňkami a buňkami některých imunoprivilegovaných tkáních.

Fas a FasL hrají důležitou roli převážně ve třech typech fyziologické apoptózy [32]:

- periferní odstraňování aktivovaných zralých T buněk na konci imunitní odpovědi
- zabíjení cílových (virem infikovaných nebo nádorových) buněk cytotoxickými T buňkami a NK buňkami
- zabíjení zánětlivých buněk v imunoprivilegovaných tkáních (např. oko)

FasL je homotrimer interagující s trimerem Fas receptoru [2, 32]. Po navázání FasL vzniká v intracelulární části receptoru signalační komplex (DISC), složený z adaptorového proteinu (FADD) a prokaspasy-8 [34, 35] nebo-10 [36, 37]. FADD obsahuje dvě odlišné domény, DD schopnou interagovat s Fas receptorem a efektorovou doménu „smrti“ (DED). Tato doména homotypicky interaguje s obdobnou DED prokaspas [38], které se díky zvýšené lokální koncentraci samy vzájemně proteolyticky aktivují [39] (viz Obr. 3(A)).

Aktivní iniciátorová kaspasa-8 může indukovat apoptózu dvěma způsoby [40, 41]:

- vnější cestou (tzv. typ I)- přímo štěpí efektorové kaspasy-3, -7
- vnitřní cestou (tzv. typ II)- štěpí proapoptický faktor Bid (z rodiny Bcl-2) do výsledné formy tBid („truncated“ Bid), která je translokována do mitochondrií [42], kde aktivuje mitochondriální apoptotickou kaskádu.

1.2.2 TNFR1

TNFR1 je receptorem pro TNF a LT α . TNF je produkován aktivovanými makrofágy a T- buňkami odpovídajícími na infekci [43].

Signalizace prostřednictvím TNF a TNFR1 může vést ke dvěma různým závěrům - apoptóze a zánětlivé odpovědi. Antiapoptická (prozánětlivá) dráha vede k aktivaci transkripčního faktoru NF κ B [44] a kinas z rodiny JNK, proapoptotická dráha pak k aktivaci kaspas a následné apoptóze. TNFR1 interaguje prostřednictvím DD s DD adaptorového proteinu TRADD (TNFR-associated death domain) [45], jehož funkce spočívá v přitahování různých signalizačních molekul k aktivovanému receptoru: TNFR-asociovaného faktoru-2 (TRAF2) [18, 46] a receptor-interagujícího proteinu (RIP) [47], stimuluje dráhy vedoucí k aktivaci NF κ B a JNK nebo adaptorového proteinu FADD (Fas-associated death domain), který zprostředkovává aktivaci apoptózy [46, 48] (viz Obr. 3(B)).

1.2.3 DR3

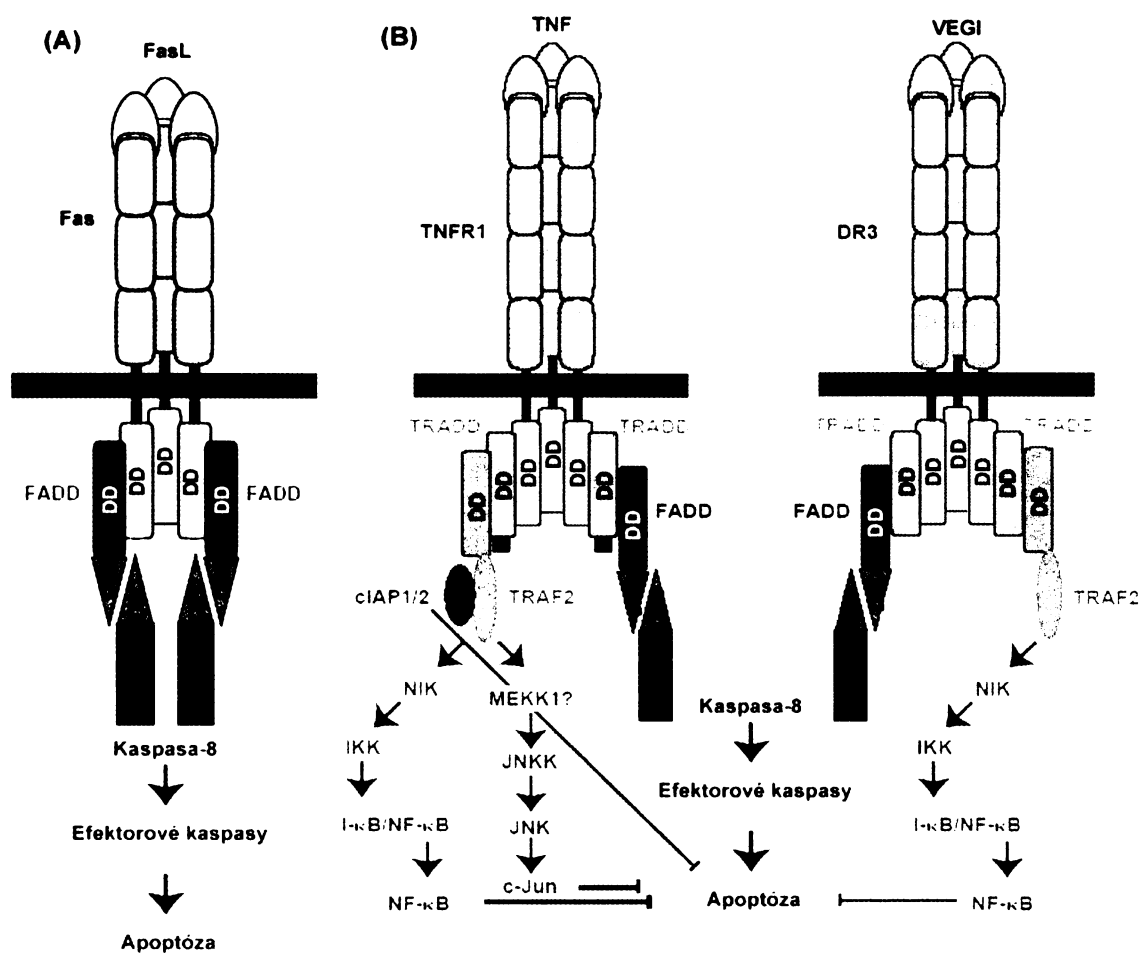
DR3 se sekvenačně velice podobá TNFR1 [48]. Obdobně jako tento receptor aktivuje NF κ B přes TRADD, TRAF2 a RIP a apoptózu přes TRADD, FADD a kaspasu-8 (viz Obr. 3(B)). DR3 se váže s ligandem VEGI [49], který aktivuje NF κ B skrze TRADD, TRAF2, RIP, NIK a apoptózu spouští přes TRADD a FADD, stejně jako TNFR1. S ohledem k regulaci NF κ B a apoptózy, se VEGI velice podobá TNF. Nejsou mezi nimi význačné rozdíly kromě jejich produkce. TNF je produkován aktivovanými makrofágy a lymfocyty [43], zatímco mRNA ligandu VEGI je exprimovaná v mnoha tkáních [49, 50]. TNFR1 je produkován všemi buňkami, zatímco DR3 především buňkami sleziny, thymu, periferní krve a aktivovanými makrofágy [48]. Navzdory podobným signalizačním mechanismům mají interakce DR3-VEGI a TNFR1-TNF odlišné biologické role.

1.2.4 DR4 a DR5

DR4 a DR5 (TRAIL-R1 a TRAIL-R2) mají podobnou strukturu svých genů a jsou produkovány ve většině tkání. Jejich společný ligand TRAIL je podobný FasL a indukuje apoptózu zejména nádorových buněk, zatímco většina normálních buněk

je k TRAILem indukované apoptóze rezistentní [51-53]. Jeho transkripce, stejně jako u FasL, je zvyšována během stimulace v periferních krevních T buňkách [54, 55]. Signalizace z TRAILem aktivovaných DR4 nebo DR5 probíhá podobně jako u Fas a FasL. Navázání ligandu na receptory iniciuje vznik komplexu DISC, obsahujícího adaptorový protein FADD a prokaspasu-8 [56, 57] nebo -10 [58, 59]. TRAIL-DR4/DR5 může tedy aktivovat jak vnější, tak vnitřní apoptickou signalizační kaskádu.

Podobně jako FasL hraje TRAIL významnou roli při spouštění apoptózy v nádorových buňkách [60-62] a spolu se svými receptory představuje potenciální protinádorové terapeutikum příští generace.



Obr. 3

(A) Apoptóza indukovaná Fas receptorem (sestavení signalizačního DISCu složeného z FADD a kaspasy-8).

(B) Pro-apoptické a anti-apoptické signalizační dráhy zprostředkované receptory TNFR1 a DR3.

Upraveno dle [33].

1.2.5 EDAR

EDAR (ectodyplasin-A-receptor) spolu se svým ligandem EDA pomáhají při formování vlasových folikulů. EDA je produkován při rozvíjení kůže v naštěpené difuzní podobě. EDA nebo EDAR deficientní myši nemají vyvinuté primární vlasové folikuly nebo potní žlázy a mají znetvořené zuby [63]. Lidské mutace v ligandu EDA nebo receptoru EDAR se projevují obdobným způsobem [64].

1.2.6 NGFR

NGFR (nerve growth-factor receptor) je nejvíce se odlišujícím členem rodiny TNFR vytvářející spíše dimery než trimery. Ve své intracelulární části obsahuje DD a také TIM motivy a podporuje vývoj sekundárních neuronů pomocí interakcí s vysokoafinitními nervovými růstovými faktory [65]. Samotný NGFR může jak indukovat apoptózu, tak asociovat s receptory rodiny Trk (tropomyosin-related kinase) a podporovat tak diferenciaci nervových buněk [66]. NGFR hraje významnou roli ve zprostředkování strukturální plasticity vyžadované pro vývoj smyslových kožních obvodů citlivých na podněty z okolí. U NGFR deficientních myší se projevují těžké kožní sensorineurální defekty [67].

1.3 Receptor „smrti“ DR6

DR6 je nejmladším členem rodiny TNFR obsahujícím DD. Byl identifikován v roce 1998 vyhledáváním v databázi EST pomocí proteinové sekvence extracelulární, na cystein bohaté a ligand-vázající domény TNFR2 [68, 69].

1.3.1 Struktura a exprese DR6

DR6 je transmembránový protein typu I. Obsahuje 350 aminokyselin dlouhou extracelulární část, z níž prvních 41 aminokyselin tvoří signální peptid. Aminokyseliny 67-211 obsahují čtyři na cystein bohaté motivy (CRD), které jsou nejvíce podobné CRD osteoprotegerinu a TNFR2. Transmembránová doména (351-370 aminokyselin) je následována 285 aminokyselin dlouhou cytoplazmatickou doménou, která obsahuje DD charakteristickou pro všechny receptory smrti. Tato doména vykazuje největší podobnost k DD receptoru TNFR1. Na rozdíl od ostatních receptorů smrti následuje za DD receptoru DR6 150 aminokyselin dlouhá C-koncová část, jež obsahuje pravděpodobně sekvenci leucinového zipu překrývající se s oblastí bohatou na prolin připomínající SH3 doménu-vázající motiv [70] (viz Obr. 4).

4 kb dlouhý transkript DR6 byl nalezen v mnoha tkáních, např. v srdci, mozku, placentě, pankreatu, lymfatických uzlinách, thymu nebo prostatě. Menší množství bylo detekováno v plicích, ledvinách, varlatech, děloze, tlustém střevě, slezině, kostní dřeni a embryonálních játrech.

1.3.2 Signalizace z DR6

Na rozdíl od ostatních receptorů „smrti“, které využívají k signalizaci buď adaptového proteinu FADD (např. Fas a TRAIL receptory), anebo současně FADD a TRADD (např. TNFR1 a DR3), bylo zjištěno, že DR6 neinteraguje s proteinem FADD a pouze slabě interaguje s proteinem TRADD. DR6 neinteraguje ani s dalšími známými vazebnými partnery ostatních receptorů „smrti“, jako jsou proteiny RIP a RAIDD [71].

Nadprodukce DR6 v savčích buňkách vede k apoptóze, k aktivaci transkripčního faktoru NF-κB a k aktivaci JNK1. Exprese DR6 může být také u buněk LnCAP (prostatický karcinom) indukována signalizací z receptoru TNF přes aktivaci transkripčního faktoru NF-κB [72].

```

MGTSPSSSTALASCRIARRATATMIAGSLLLLGFLSTTTAQPEQKASNLIGTYRHVDRATGQVLTCDCK 70
PAGTYVSEHCTNTSLRVCSSCPVGTFFTRHENGIEKCHDCSQPCWPMIEKLPCAALTDRECTCPPGMFQS 140
NATCAPHTVCPVGGVRRKGTETEDVRCKQCARGTFSDVPSSVMKCKAYTDCLSONLVVIKPGTKETDNV 210
CGTLPSPSSSTSPSPGTAIFPRPEHMETHEVPSSTYVPKGMNSTESNSASVRPKVLSSIQEGTVPDNTS 280
SARGKEDVNKTLPNLQVVNHQQGPHRHILKLLPSMEATGGEKSSTPIKGPKRGHPRQNLHKHFDINEHL 350
PMIVLFLLLVLVVIWVCSIRKSSRTLKKGPRQDPSAIVEKAGLKKSMTPTQNREKWIYYCNGHGIDILK 420
LVAAQVGSQWKDIYQFLCNASEREVAAFSNGYTADHEKAYAALQHWTIRGPEASLAQLISALRQHRRNDV 490
VEKIRGLMEDTYQLETDKLALPMSPLSPSPISPNAKLENSALLTVEPSPQDKNGFFVDESEPLLRC 560
DSTSSGSSALSRNGSFITKEKKDTVLRQVRLDPCDLQPIFDDMLHFLNPEELRVIEEIPQAEDKLDRLFE 630
IIGVKSQEASQTLLDSVYSHLPDLL 655

```

Obr. 4

Aminokyselinová sekvence receptoru DR6

Otevřený čtecí rámeček (ORF) DR6 určuje transmembránový protein I. třídy délky 655 aminokyselin. Signální peptid (aminokyseliny 1-41) je podtržen modře. Transmembránová doména (aminokyseliny 353-370) je podtržena červeně. Intracelulární doména „smrti“ (aminokyseliny 429-495) je podtržena zeleně. Doména bohatá na prolin s možným motivem leucinového zipu (aminokyseliny 497-526) je podtržena žlutě. Šest N-glykosylačních míst je vyznačeno černými tečkami.

Existuje též „zkrácená varianta“ DR6, která postrádá prvních 183 aminokyselin, tzn. že začíná methioninem vyznačeným červenou šipkou.

Upraveno dle [71].

1.3.2.1 Apoptóza indukovaná DR6

Apoptóza je aktivní proces buněčné smrti, která je nutná pro normální vývoj a homeostázu mnohobuněčných organismů [73]. Je charakterizována morfologickými změnami ve struktuře buňky, ztrátou adheze a intracelulárních kontaktů, kondenzací chromatinu, fragmentací jader a rozpadem buňky do apoptických tělísek [74].

Tyto změny charakteristické pro apoptózu byly pozorovány při nadprodukci DR6 v HeLa buňkách. Ukázalo se, že její indukce závisí na přítomnosti DD. Naopak při nadprodukci DR6 v MCF7 buňkách apoptóza indukovaná nebyla, ačkoli např. nadprodukce receptoru DR4 u nich apoptózu vyvolávala. Proto se předpokládá, že DR6 používá jiný mechanismus signalizace než ostatní receptory „smrti“.

1.3.2.2 Role DR6 v T- a B-buněčné imunitní odpovědi

Během imunitní odpovědi naivní T (CD4⁺) pomocné buňky diferencují do dvou funkčně odlišných podskupin, Th1 a Th2, založených na jejich cytokinovém sekrečním profilu a imunomodulační funkci. DR6 je vysoce exprimovaný v myších klidových T buňkách a po jejich aktivaci se jeho exprese výrazně snižuje. U DR6-deficientní myši došlo po imunizaci vhodným antigenem nebo stimulaci TCR k hyperproliferaci T (CD4⁺) buněk a zvýšené produkci Th2 cytokinů [75]. Aktivované T (CD4⁺) lymfocyty z DR6-deficientní myši v odpovědi na stimulaci interleukinu-2 více proliferovaly. Předpokládá se, že DR6 ovlivňuje T buněčnou diferenciaci aktivací kinasy JNK1 a transkripčního faktoru NF-AT [76].

DR6 je produkován na klidových myších B buňkách, ale po jejich aktivaci jeho exprese výrazně klesá. Podobně jako T buňky i B-buňky z myši s odstraněným DR6 rychleji proliferují v odpovědi na stimulaci jejich imunoglobuliných receptorů. Tyto buňky také vykazují zvýšenou aktivitu transkripčního faktoru NF- κ B, vyšší expresi antiapoptického proteinu Bcl-X_L a zvýšenou expresi CD86 [77].

Nalezení ligandu DR6 by mohlo být možnou strategií pro léčbu onemocnění spojených s Th2 imunitní odpovědí, jako jsou alergie či astma. Charakterizace signalizačních drah DR6L/DR6 by pak umožnila lépe porozumět regulaci imunitní odpovědi při revmatické artritidě, reakci štěpu proti hostiteli (GVHD), stejně jako u dalších autoimunitních onemocnění [75].

1.3.2.3 DR6 a GVHD („Graft-Versus-Host Disease“)

Reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) je hlavní komplikací při alogenní transplantaci kostní dřeně. GVHD je způsobena aloreaktivitou T-lymfocytů dárce - ty jsou totiž schopné rozeznávat jako cizí buňky příjemce, jehož odlišné alelické formy MHC (major histocompatibility complex) glykoproteinů váží jiné peptidové fragmenty normálních buněčných proteinů. Alogenní buňky příjemce se tak T-lymfocytům příjemce jeví jako silně infikované.

Akutní GVHD nastává několik dní až týdnů po transplantaci kmenových buněk, dochází zejména k poškození jater, kůže a střevní sliznice. Je jí možno alespoň částečně zabránit výběrem dárce geneticky co nejpodobnějšího s hostitelem, odstraněním T-lymfocytů z transplantované suspenze a účinnou imunosupresí.

Jelikož DR6 ovlivňuje proliferaci CD4⁺ T-lymfocytů a produkci cytokinů ovlivňujících Th1/Th2 diferenciaci T-lymfocytů, lze předpokládat, že by DR6 mohl ovlivňovat též intenzitu reakce štěpu proti hostiteli. Skutečně, přenos T-lymfocytů z dárcovské DR6-deficientní myši do alogenního příjemce způsobil rychlejší nástup GVHD se zvýšenou razancí a u příjemců došlo k rychlejšímu rozvoji typických symptomů GVHD, jako je rychlá ztráta hmotnosti, histopatologické poškození některých orgánů (např. thymus, slezina, tenké střevo), a rychlejší smrti [78].

2 Cíle práce

Hlavními cíly této práce bylo :

- **vyhledávání proteinů interagujících s intracelulární částí DR6 pomocí kvasinkového dvouhybridního systému a jejich molekulární a funkční charakterizace**
 - mapování interakce DR6(IC) a nalezených proteinů
 - charakterizace SNX3 (Sorting nexin 3)
 - charakterizace CPNE7 (Copine 7)

- **analýza DR6 promotoru.**
 - příprava luciferasových reportérových konstruktů
 - analýza a ověření vazebných míst pro transkripční faktory (NFκB, TCF)

3 Materiál a metody

3.1 Bakteriální a kvasinkové kmeny, savčí buněčné linie, kultivační média a protilátky

3.1.1 Bakteriální, kvasinkové kmeny a savčí buněčné linie

3.1.1.1 Kvasinkové kmeny (*Saccharomyces cerevisiae*)

Y187 (MAT α , ura3-, his3-, ade2-, trp1-, leu2-,
GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ) (*Clontech*)

AH109 (MAT α , ura3-, his3-, ade2-, trp1-, leu2-,
GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,
GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2,
MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ) (*Clontech*)

Kultivace kvasinek a manipulace s nimi byly prováděny podle postupů z *Yeast Protocol Handbook (Clontech)*, strana 10.

3.1.1.2 Bakteriální kmeny (*Escherichia coli*)

TOP-10 (F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *ara* Δ 139
 Δ (*ara-leu*)7697 *gaU* *gaK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*) (*Invitrogen*)
(příprava plasmidové DNA)

BL-21 (F⁻, *ompT*, *hsdS*(r-B, m-B), *gal*, *dcm*, *lacI*, *lacUV5*-T7 *gene 1*, *ind1*, *sam7*,
nin5) (*Invitrogen*)
(produkce rekombinantního proteinu)

Manipulace s bakteriemi sledovaly standardní molekulárně-biologické protokoly (viz kapitola 1, oddíl I).

3.1.1.3 Savčí buněčné linie

HEK293FT (buněčná linie z lidských embryonálních ledvin, epiteliální buňky)
(*Invitrogen*)

MDCK (psí epiteliální buněčná linie z nádoru ledvin)

Při kultivacích a experimentech se savčími buněčnými liniemi jsme vycházeli ze standardních protokolů (viz appendix 3F).

3.1.2 Kultivační média

3.1.2.1 Média pro kultivaci *Saccharomyces cerevisiae*

YPDA (komplexní) médium

peptone	20 g/l (<i>Difco</i>)
kvasničný lyzát (yeast extract)	10 g/l (<i>Sigma Aldrich</i>)
agar pro pevné médium	20 g/l (<i>Sigma Aldrich</i>)
deionizovaná H ₂ O do finálního objemu	900 ml

po sterilizaci v autoklávu a ochlazení na teplotu 55°C byla přidána:
glukosa do finální koncentrace 2,0 %

SD (minimální) médium

NH ₄ (SO ₄)	2,0 g/l (<i>Sigma Aldrich</i>)
kvasinkový zdroj dusíku (nitrogen base)	6,7 g/l (<i>Biogen</i>)
agar pro pevné médium	20 g/l (<i>Sigma Aldrich</i>)
deionizovaná H ₂ O do finálního objemu	800 ml
po sterilizaci v autoklávu a ochlazení na teplotu 55°C byly přidány: glukosa do finální koncentrace	2,0 %
10x roztok připravený vyřazením některé níže uvedené komponenty	100 ml/l

10x roztok připravený vyřazením některé níže uvedené komponenty

L-isoleucin	300 mg/l
L-valin	1500 mg/l
L-adenin-hemisulfát	200 mg/l
L-arginin.HC	1200 mg/l
L-histidin.HCl-monohydrát	200 mg/l
L-leucin	1000 mg/l
L-lysin.HCl	300 mg/l
L-methionin	200 mg/l
L-fenylalanin	500 mg/l
L-threonin	2000 mg/l
L-tryptofan	200 mg/l (<i>Sigma Aldrich</i>)

Pozn. Např. SD/-His médium neobsahuje aminokyselinu histidin.

3.1.2.2 Média pro kultivaci *Escherichia coli*

LB (Luria-Bertani) médium

LB Broth Miller	20 g/l (<i>Amresco</i>)
agar pro pevné médium	18 g/l (<i>Sigma Aldrich</i>)
deionizovaná H ₂ O	

Antibiotika

ampicilin	100 µg/ml média (<i>Sigma</i>)
kanamycin	40 µg/ml média (<i>Sigma</i>)

3.1.2.3 Média pro kultivaci savčích buněčných linií a použité protilátky

RPMI médium (*Sigma Aldrich*)

RPMI médium + 10% fetální sérum (*Gibco BRL*[®]) + **1% ATB** (*Sigma Aldrich*)

D-MEM médium (*Sigma Aldrich*)

D-MEM médium + 10% fetální sérum (*Gibco BRL*[®]) + **1% ATB** (*Sigma Aldrich*)

Uvedená média byla dodávána z přípravný medií ÚMG AV ČR, Praha, ČR.

3.1.3 Použité protilátky

9E10 : myší monoklonální protilátka proti značce „Myc“

12CA5 : myší monoklonální protilátka proti hemaglutininové (HA) značce

DR6(IC) : králičí polyklonální protilátka proti intracelulární části DR6

DR6(EC) : králičí polyklonální protilátka proti N-koncovému peptidu (*PharMingen*)

DR6(4G7) : myší monoklonální protilátka proti extracelulární části DR6

SNX3 : králičí polyklonální protilátka proti SNX3

JNK : králičí polyklonální protilátka proti JNK

pJNK : králičí polyklonální protilátka proti fosforylované JNK

GAM-Px : kozí protilátka proti myšimu Ig konjugovaná s křenovou peroxidasou
(*Bio-Rad Laboratories*)

GAR-Px : kozí protilátka proti králičímu Ig konjugovaná s křenovou peroxidasou
(*Bio-Rad Laboratories*)

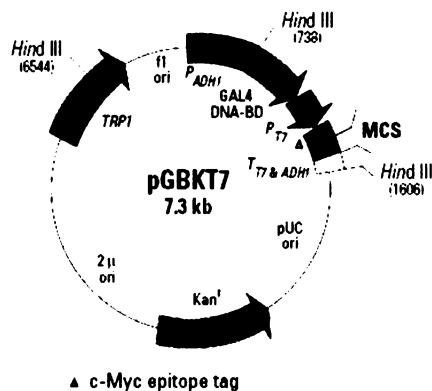
3.2 Příprava rekombinantních vektorů

3.2.1 Vektory použité pro přípravu rekombinantních vektorů

3.2.1.1 Vektory pro expresi v *S. cerevisiae*

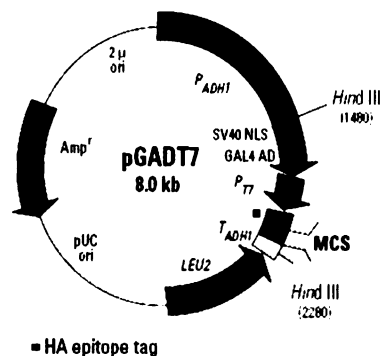
pGBKT7 (Clontech)

- kanamycinová rezistence
- GAL4 DNA vazebná doména
- TRP1 – gen komplementující mutaci v histidinovém metabolismu *S. cerevisiae*
- „c-Myc“ značka



pGADT7 (Clontech)

- ampicilinová rezistence
- GAL4 aktivační doména
- LEU2- gen komplementující mutaci v leucinovém metabolismu *S. cerevisiae*
- „HA“ (hemagglutininová) značka



3.2.1.2 Vektory pro expresi v *E. coli*

pBluescript II SK (Stratagene)

- ampicilinová rezistence
- není expresní vektor, používá se zejména pro sekvenování

pET28 (Novagen)

- kanamycinová rezistence
- sekvence kódující His-Tag

3.2.1.3 Vektory pro expresi v savčích buňkách

pK-Myc

- kanamycinová rezistence
- N-koncová značka „myc“
- čtecí rámec C1, C2, C3
- připraven v naší laboratoři

pCMVFlag5 (*Sigma Aldrich*)

- ampicilinová rezistence
- C-koncová značka “FLAG“

pGL3 basic (*Promega*)

- ampicilinová rezistence
- gen pro luciferasu (luc⁺)

3.2.2 Klonování

Materiál a chemikálie:

- příslušný vektor
- inzert (úsek, který je vkládán do vektoru)
- restriční endonukleasy (např. *HindIII*) (*Fermentas*)
- pufr pro restriční endonukleasu 10x ředěný (např. R⁺ pufr) (*Fermentas*)
- deionizovaná H₂O
- alkalická fosfatasa CIAP (*Fermentas*)
- 0,5M EGTA (*Sigma*)
- 10% SDS (*Merck*)
- 1% agarosa (4 g agarosy (*Amresco*) rozvařené ve 400 ml 1xTAE (40mM Tris (*Sigma*), 20mM kyselina octová (*Lachema*), 1mM EDTA, pH=8 (*Sigma*)), vytemperované na 56°C, nakonec přidáno 20μ EtBr (10 mg/ml, *Sigma*)
- sada pro DNA elektroforézu (*Serva*)
- vzorkový pufr pro DNA elektroforézu (30% glycerol a 0,25% Orange G ve vodě)
- standardy pro DNA elektroforézu (*Fermentas*)
- souprava *ZymoClean Gel DNA Recovery Kit* (*Zymo Research*) pro izolaci fragmentů DNA z agarosového gelu, rozdělených pomocí elektroforézy
- T4-DNA ligasa (*Fermentas*)
- 10x ligační pufr (*Fermentas*)

Postup:

- Připravili jsme reakční směs:

DNA (vektor nebo inzert)	4μg
10x pufr	4μl
restrikční endonukleasa(y)	0,8-1μl
H ₂ O do finálního objemu	40μl

a inkubovali ji 3-6 hodin při 37°C .

(Pro plánování přípravy rekombinantních vektorů bylo využito programového vybavení od firmy *DNAStar* (zejména programů *MapDraw* a *EditSeq*).

- Do reakční směsi s vektorem jsme pak přidali 1μl alkalické fosfatasy CIAP a inkubovali 30 min-1hod při 37°C. Defosforylační reakci jsme zastavili 4 μl 0,5M EGTA a 4 μl 10% SDS a 30 min inkubací při 85°C.
- K reakční směsi (jak s vektorem, tak inzertem) jsme přidali 8 μl 6x vzorkového pufru pro DNA elektroforézu, nanесли na 1% agarosový gel a připojili ke zdroji napětí (100 V).
- Po skončení elektroforézy (cca. 1-3 hod) jsme skalpelem vyřízli příslušné fragmenty a provedli izolaci DNA z gelu dle návodu přiloženého v soupravě *ZymoClean Gel DNA Recovery Kit* (*Zymo Research*).
- Připravili jsme ligační směs:

vektor	3 μl
inzert nebo H ₂ O (kontrola)	15 μl
10x ligační pufr	2 μl
T4-DNA ligasa	0,8 μl
H ₂ O do finálního objemu	20 μl

inkubovali 1 hod při pokojové teplotě a transformovali do bakterií (viz 3.2.2.1).

3.2.2.1 Transformace bakterií

- Na ledu jsme smíchali směs obsahující DNA (1-5 μl) a 50 μl kompetentních bakterií *Escherichia coli* kmene TOP-10 a inkubovali 30-60 min.
- Provedli jsme tepelný šok (vodní lázeň o teplotě 42°C, 1 min), přidali 1 ml LB média a třepali 30-60 min při 37°C.
- Směsi jsme vyseli na misky LB/agar o Ø 10cm (*Corning Costa*) s příslušným antibiotikem a inkubovali přes noc při 37°C (misky dnem vzhůru).

3.2.2.2 Produkce a purifikace plazmidové DNA

- Bakterie *Escherichia coli* kmene TOP-10 transformované příslušnou plazmidovou DNA jsme kultivovali v LB médiu s příslušným antibiotikem a plazmidovou DNA následně izolovali jednou z níže uvedených metod:
 - Alkalickou lýzí (viz kapitoly 1.25-1.27)
 - Minipreparací s použitím soupravy *Zippy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research)* pro získání menšího množství DNA (např. pro transformaci kvasinek či sekvenování)
 - Midipreparací s použitím soupravy *JET Star (Genomed)* nebo izopyknické centrifugace v CsCl (viz., kapitoly 1.42-1.50) pro získání většího množství DNA.

3.2.3 Použité rekombinantní vektory

3.2.3.1 Rekombinantní vektory pro expresi v *S. cerevisiae*

pGBKT7-DR6(IC) (aminokyseliny 371-656, tj. celá intracelulární část)

- inzert amplifikován metodou RT-PCR z celkové RNA z HeLa buněk za použití primerů DR6-111U a DR6-1968L
- inzert štěpen restriční endonukleasou *BglIII* a subklonován do restričního místa *BamHI* vektoru pGBKT7

pGBKT7-DR6(C-term) (aminokyseliny 528-655, tj. C-koncová část)

- inzert amplifikován metodou RT-PCR z celkové RNA z HeLa buněk za použití primerů DR6_1582U a DR6(3)
- inzert štěpen restriční endonukleasou *BglIII* a subklonován do restričního místa *BamHI* vektoru pGBKT7

pGBKT7-DR6(DD) (aminokyseliny 371-496, tj. doména smrti)

- inzert amplifikován metodou RT-PCR z celkové RNA z HeLa buněk za použití primerů DR6-1111U a DR6-1488L
- inzert štěpen restričními endonukleasami *BglIII/NsiI* a subklonován do restričních míst *BamHI/PstI* vektoru pGBKT7

pGBKT7-DR6(DD+LZ) (aminokyseliny 371-528, tj. doména smrti a doména obsahující motiv leucinového zipu)

- inzert amplifikován metodou RT-PCR z celkové RNA z HeLa buněk za použití primerů DR6-1111U a DR6-1584L
- inzert štěpen restričními endonukleasami *BglIII/NsiI* a subklonován do restričních míst *BamHI/PstI* vektoru pGBKT7

(Uvedené rekombinantní vektory byly připraveny Mgr. Martinem Klímou metodami popsány v kapitole 3.2.2 a ověřeny sekvenováním).

pGBKT7-p53
pGBKT7-lamin
pGADT7- T antigen

(Tyto rekombinantní vektory byly dodány jako součást soupravy pro kvasinkový dvouhybridní systém *MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3* (Clontech)).

cDNA knihovna z HeLa buněk zaklonovaná do vektoru **pGADT7** a předtransformovaná do *S.cerevisiae* kmene Y187 (zakoupeno od firmy Clontech).

pGADT7-SNX3

- inzert vyštěpen restričními endonukleasami *BamHI/EcoRI* z vektoru pKMyc-SNX3 a vložen do restričních míst *EcoRI/BamHI* vektoru pGADT7

3.2.3.2 Rekombinantní vektory pro expresi v *E. coli*

pET28-SNX3

- inzert vyštěpen restričními endonukleasami *SacI/BamHI* z vektoru pKMyc-SNX3 a vložen do restričních míst *SacI/XhoI* vektoru pET28 (strana štěpená *XhoI* zatupena T4-DNA polymerasou)

pET28-CPNE7

- inzert vyštěpen restričními endonukleasami *HindIII/XhoI* z vektoru pKMyc-CPNE7 a vložen do restričních míst *HindIII/XhoI* vektoru pET28b

3.2.3.3 Rekombinantní vektory pro expresi v savčích buňkách

pFlag CMV-DR6 (aminokyseliny 1-655, tj. celý DR6)

- inzert vyštěpen restričními endonukleasami *NotI/SalI* z vektoru pBSK-DR6ΔStop a vložen do restričních míst *NotI/SalI* vektoru pCMV Flag 5a

pFlag CMV-DR6ΔIC (aminokyseliny 1-385, tj. extracelulární část a transmembránová doména)

- inzert vyštěpen restričními endonukleasami *NotI/BamHI* z vektoru pFlag CMV-DR6 a vložen do restričních míst *NotI/BamHI* vektoru pFlag-CMV-5b

pFlag CMV-DR6ΔC-term (aminokyseliny 1-533, tj. extracelulární část, transmembránová doména, DD a doména leucinového zipu)

- inzert vyštěpen restriční endonukleasou *EcoRI* z vektoru pFlag CMV-DR6 a vložen do restričního místa *EcoRI* vektoru pFlag-CMV-5b

(Uvedené rekombinantní vektory byly připraveny Mgr. Martinem Klímou metodami popsanými v kapitole 3.2.2 a ověřeny sekvenováním).

pKMyc-SNX3

- inzert připraven metodou PCR z leukocytární cDNA pomocí primerů SNX3_U a SNX3_L, naštěpen restričními endonukleasami *EcoRI/BamHI* a vložen do restričních míst *EcoRI/BamHI* vektoru pKMyc-C2

pEGFP-SNX3

- inzert vyštěpen restričními endonukleasami *EcoRI/BamHI* z vektoru pKMyc-SNX3 a vložen do restričních míst *BglII/BamHI* vektoru pEGFP-C2

pKMyc-CPNE7

- inzert připraven metodou PCR ze zakoupeného *i.m.a.g.e.* klonu pomocí primerů CPNE7_U a CPNE7_L, naštěpen restričními endonukleasami *HindIII/KpnI* a vložen do restričních míst *HindIII/KpnI* vektoru pKMyc-C3

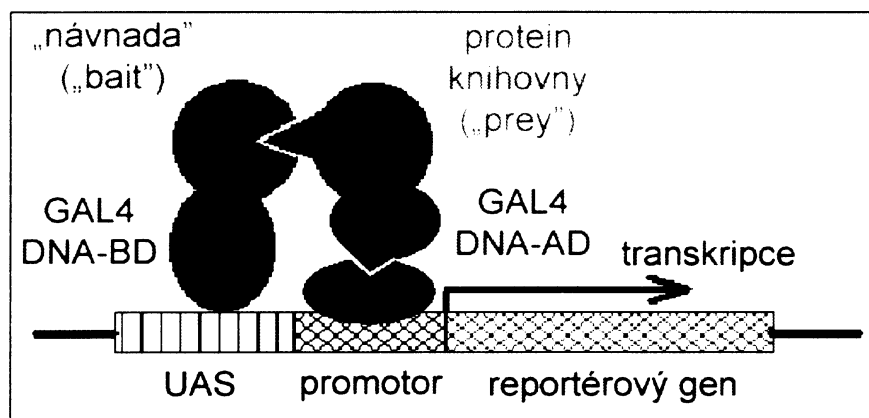
(Všechny produkty připravené metodou PCR byly sekvenovány.)

3.3 Kvasinkový dvouhybridní systém

3.3.1 Základní princip GAL4 – kvasinkového dvouhybridního systému

Kvasinkový dvouhybridní systém slouží k nalezení nových vazebných partnerů zkoumaného proteinu či ověření interakce dvou zvolených proteinů. Je založen na interakci dvou hybridních proteinů, z nichž první zvaný „návnada“ („bait“) je fúzovaný s GAL4 - vazebnou doménou (GAL4 DNA-BD) a druhý zvaný „kořist“ („prey“) je fúzovaný s GAL4 - transaktivační doménou (GAL4 AD).

GAL4 DNA-BD doména se váže na operátorové sekvence UAS („upstream activating sequence“) v promotorech selektivních/reportérových genů. Jako selektivní a reportérové geny jsou v GAL4- kvasinkovém dvouhybridním systému použity geny His3, Ade2 a LacZ. K transkripci těchto selektivních/reportérových genů dojde pouze v případě interakce mezi „návnadou“ a „kořistí“ (viz Obr. 5). Po výsevu na pevné selektivní médium SD neobsahující histidin a adenin tedy vyrostou pouze ty kvasinky, u nichž dochází ke zmíněné interakci.



Obr. 5

Schématický popis aktivace reportérových genů v dvouhybridním kvasinkovém systému

3.3.2 Transformace plasmidů do *S. cerevisiae*

Materiál a chemikálie:

- AH109 a Y187 kmeny *Saccharomyces cerevisiae*
- YPDA nebo SD médium
- SD/agar misky o \varnothing 10cm (*Corning Costar*)
- TE/LiAc (10 mM Tris.HCl; 1 mM EDTA; 0,1 M octan litný, pH, 7,5 (*Sigma*))
- PEG/LiAc (10 mM Tris.HCl; 1 mM EDTA; 0,1 M octan litný, pH 7,5; 40% polyetylglykol 3350 (*Sigma*))
- 100% DMSO (dimetylsulfoxid) (*Sigma*)
- TE pufr (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 7,5)
- nosičová ssDNA z lososích spermií (salmon sperm)
- transformované plazmidy, např. pGBKT7-DR6(IC)

Postup:

Pro transformaci kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* byl použit protokol uvedený v manuálu *Yeast Protocol Handbook (Clontech)*, str. 18-22.

- Do 1 ml příslušného SD nebo YPDA média jsme zaočkovali 1-3 kolonie kvasinkového kmene AH109 nebo Y187 a shluky buněk jsme resuspendovali pomocí minimixeru (MS2 MINISHAKER (*IKA*)).
- Obsah zkumavky jsme přenesli do 50 ml příslušného SD nebo YPDA média a kultivovali za stálého třepání 16-18 hodin (třepačka (*Biotech*), 30°C, 200 rpm) do $A_{600} > 1,5$ (měřena na přístroji BIOPHOTOMETER (*Eppendorf*)).
- 30 ml takto narostlé kultury jsme zaočkovali do 300 ml příslušného média tak, aby A_{600} byla mezi 0,2 a 0,3.

- Kulturu jsme inkubovali za stálého třepání 2-3 hodiny (30°C, 200 rpm) do A_{600} mezi 0,4 a 0,6 a poté centrifugovali (Centrifuge 5810 (*Eppendorf*), 20°C, 4000 rpm, 10 min).
- Odstranili jsme supernatant a buněčný pelet jsme resuspendovali ve 100 ml destilované vody.
- Po další centrifugaci (20°C, 4000 rpm, 10 min) a odstranění supernatantu jsme buněčný pelet resuspendovali v 1,5 ml roztoku Te/LiAc, čímž jsme získali kompetentní buňky.
- Ke směsi 0,1 µg plazmidové DNA a 0,1 mg nosičové ssDNA (kterou jsme před transformací 10 min povařili) ve sterilní zkumavce jsme přidali 0,1 ml kompetentních buněk.
- Dále jsme přidali 0,7 ml roztoku PEG/LiAc a směs po dobu 10 s promíchávali pomocí minimixeru.
- Zkumavky jsme inkubovali za stálého třepání po dobu 30 min (30°C, 200 rpm).
- Ke směsi jsme přidali 70 µl 100% DMSO a promíchali.
- Po tepelném šoku (42°C, 15 min) jsme směs ochladili 1-2 min na ledu a centrifugovali (Centrifuge 5415D (*Eppendorf*), 20°C, 14000 rpm, 5 s)
- Odstranili jsme supernatant, přidali 0,5 ml TE pufru a po promíchání jsme 100 µl buněčné suspenze vyseli na příslušné SD/agar médium a agarové misky jsme nechali inkubovat 3-4 dny při 30°C do objevení kolonií.

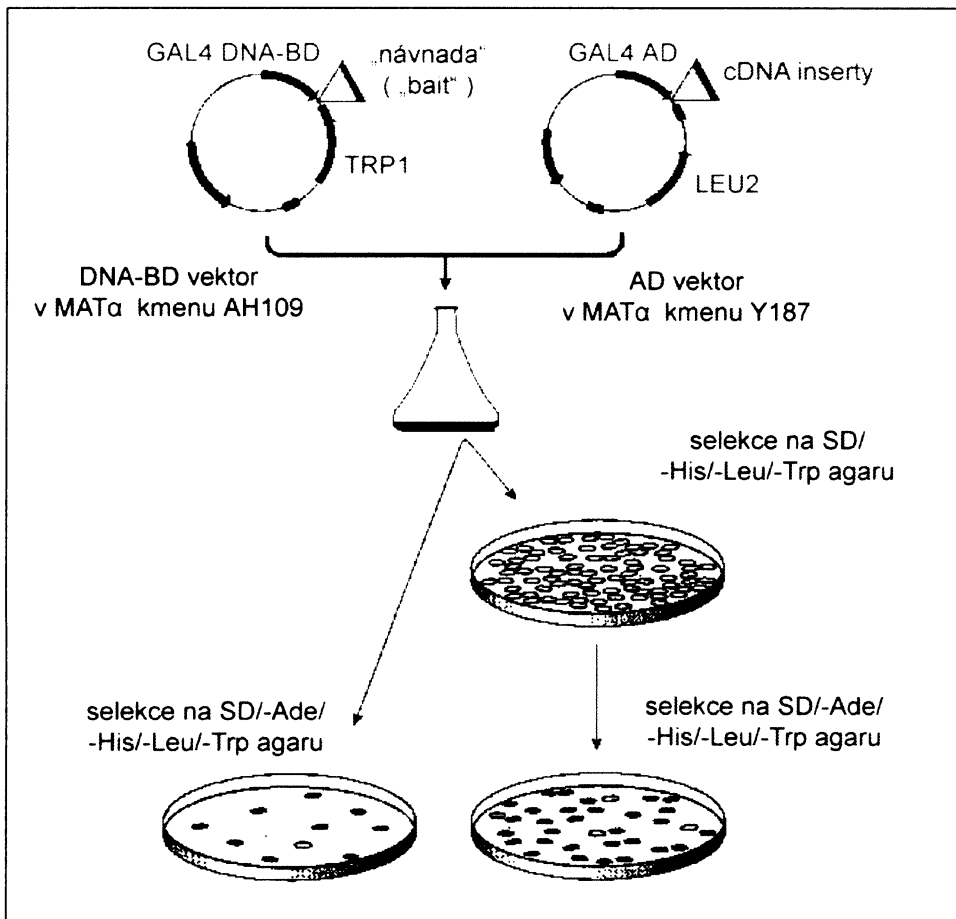
3.3.3 Vyhledávání proteinů interagujících s intracelulární částí DR6

Materiál a chemikálie:

- cDNA knihovna z HeLa buněk, subklonovaná do vektoru pGADT7 (klonovací místa *BamHI/EcoRI*) a pretransformovaná do kmene *Saccharomyces cerevisiae* Y187 (*Clontech*)
- Kvasinky kmene AH109 transformované vektorem pGBKT7-DR6(IC)
- médium SD/-Trp
- médium 2x YPDA/Kan (2x YPDA; 0,003% adenin-hemisulfát; 15 µg/ml kanamycin)
- misky se selektivním médiem SD/agar/-Trp, SD/agar/-Leu, SD/agar/-Trp/-Leu, SD/agar/-Trp/-Leu/-His, SD/agar/-Trp/-Leu/-His/-Ade

Postup:

- Do 1 ml média SD/-Trp jsme zaočkovali 1 kolonii kvasinkového kmene AH109 transformovanou vektorem pGBKT7-DR6(IC) a shluky buněk jsme resuspendovali vortexováním.
- Obsah zkumavky jsme přenesli do 100 ml média SD/-Trp a kultivovali za stálého třepání 24 hodin (30°C, 200 rpm) do $A_{600} > 1,0$.
- Buňky jsme centrifugovali (20°C, 4000 rpm, 10 min) a po odstranění supernatantu resuspendovali v 50 ml média 2x YPDA/Kan.
- Ve vodní lázni o pokojové teplotě jsem rozmrazili alikvot (cca 1 ml) kultury kvasinkového kmene Y187 s pretransformovanou příslušnou cDNA knihovnou. 10 μ l jsme odebrali pro pozdější určení titru knihovny a zbytek zkombinovali s kulturou kmene AH109.
- Směs buněk různých párovacích typů jsme inkubovali za mírného třepání (50 rpm) po dobu 24 hodin (30°C, 60 rpm) ve dvoulitrové Erlenmeyerově baňce, aby došlo k jejich párování a vzniku diploidů.
- Párovací směs jsme centrifugovali (20°C, 4000 rpm, 10 min) a po odstranění supernatantu 2x promyli 50 ml YPDA/Kan média. Pelet jsme nakonec resuspendovali v 10 ml média 0,5x YPDA/Kan.
- 100 μ l směsi buněk ředěné v poměrech 1:10000, 1:1000, 1:100 a 1:10 jsme rozetřeli na misky s médii SD/agar/Trp,SD/agar/-Leu a SD/agar/-Trp/-Leu, abychom mohli spočítat účinnost párování.
- Zbytek směsi jsme rozetřeli na padesát 150mm misek se selektivním médiem (200 μ l směsi na misku). Použili jsme dvě selektivní metody (viz Obr. 6) :
 - a) zpárované kvasinky jsme vyseli nejdříve na misky SD/agar/-Trp/-Leu/-His a inkubovali při 30°C 3-8 dní. Narostlé kolonie jsme přetřeli na misky se selektivním médiem SD/agar/-Trp/-Leu/-His/-Ade a inkubovali při 30°C dalších 3-8 dní.
 - b) zpárované kvasinky jsme vyseli přímo na misky se selektivním médiem SD/agar/-Trp/-Leu/-His/-Ade a inkubovali při 30°C 8-21 dní do objevení kolonií.



Obr. 6 Schématický přehled hledání GAL4 AD klonů interagujících s intracelulární částí DR6

Selekci pozitivních klonů můžeme provádět

- nejdříve na selektivním médiu SD/agar/-His/-Leu/-Trp a následně na médiu SD/agar/-Ade/-His/-Leu/-Trp
- přímo na selektivním médiu SD/agar/-Ade/-His/-Leu/-Trp. V tomto případě dochází k omezení výskytu „falešných“ pozitiv, ale též k omezení detekce slabě interagujících proteinů.

3.3.4 Izolace plazmidové DNA z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*

Materiál a chemikálie:

- *Saccharomyces cerevisiae* transformované izolovaným plazmidem
- TE-pufr (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 7,5)
- lyzační roztok (2% Triton X-100 (*Sigma*), 1% SDS, 100mM NaCl (*Lachema*), 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0)
- skleněné kuličky (průměr 150 μ m)
- fenol/chloroform/isoamylalkoholová směs (25:24:1)
- chloroform (*Lachema*)
- 3M octan amonný (*Sigma*)
- 100% a 70% ethanol (*Merck*)

Postup:

- Do 1 ml TE-pufu jsme přenesli jednu kvasinkovou kolonii pozitivní na expresi reportérových genů a resuspendovali pomocí minimixeru.
- Buněčnou suspenzi jsme centrifugovali (20°C, 13.000 rpm, 1 min) a odstranili supernatant.
- K peletě jsem přidali 200 μ l lyzačního roztoku, 200 μ l skleněných kuliček a 200 μ l fenol/chloroform/isoamylalkoholové směsi.
- Směs jsme roztřepávali na minimixeru při maximální rychlosti po dobu 2 minut a poté centrifugovali (20°C, 13.000 rpm, 6 min).
- Vodní fázi jsme přenesli do nové 1,5 ml zkumavky (*Eppendorf*), přidali 200 μ l chloroformu, 20 sekund roztřepávali a poté opět centrifugovali (20°C, 13.000 rpm, 2 min).
- Vodní fázi (cca 150 μ l) jsme opět přenesli do nové 1,5 ml zkumavky a přidali k ní 150 μ l TE-pufu, 8 μ l 3M octanu amonného a 700 μ l 100% ethanolu.
- Směs jsme inkubovali 3 min při pokojové teplotě a poté centrifugovali (20°C, 13.000 rpm, 12 min).
- Po odstranění supernatantu jsme pelet promyli 500 μ l 70% ethanolu, opět centrifugovali (20°C, 13.000 rpm, 1 min) a odstranili supernatant.
- Precipitovanou DNA jsme sušili na vzduchu cca 15 min a poté resuspendovali ve 20 μ l TE-pufu.

3.3.5 Transformace bakterií *Escherichia coli* kmene TOP10 pomocí elektroporace

Materiál a chemikálie:

- bakterie kmene TOP10
- LB médium
- plazmidová DNA izolovaná z kvasinek
- vychlazená deionizovaná H₂O
- elektroporační kyvety a Multiporator (*Eppendorf*)
- LB/agar/příslušné antibiotikum

Postup:

- Do 10 ml LB média s příslušným antibiotikem jsme zaočkovali jednu kolonii bakteriálního kmene TOP10 a nechali třepat přes noc (37°C, 220 rpm).
- 4 ml této kultury jsme přenesli do 400ml LB média, rozdělili do dvou jednolitrových Erlenmeyerových baněk po 200 ml a nechali kultivovat 2-3 hodiny (37°C, 220 rpm) tak, aby byla A₆₀₀ mezi 0,5-0,7.
- Dále jsme bakteriální kulturu ochladili na ledu a poté centrifugovali (2°C, 4000 rpm, 15 min).
- Po odstranění supernatantu jsme spojili pelety z obou Erlenmeyerových baněk, 2x promyli ve 200 ml vychlazené deionizované vody a nakonec peletu resuspendovali ve 2,5 ml vychlazené destilované vody.
- Z takto připravené směsi bakterií kompetentních pro transformaci jsme pipetovali po 100 µl do vychlazených elektroporačních kyvet, poté přidávali 3 µl DNA a elektroporovali DNA do kompetentních buněk (impulz 2500V, 5 ms).
- Po provedení elektroporace jsme vyjmuli kyvetu z elektroporátoru, ke směsi přidali 500 ml LB média, celý obsah kyvety přenesli do 1,5 ml zkumavky a třepali 1 hodinu (37°C).
- Nakonec jsme takto připravené buněčné směsi centrifugovali (20°C, 4000 rpm, 4 min), odsáli přebytečné LB médium, vyseli na pevné LB selekční médium s ampicilinem a nechali inkubovat přes noc ve 37°C.
- Z narostlých kolonií byla alkalickou metodou (viz [80]) izolována plazmidová DNA a analyzována restrikčním štěpením pomocí enzymů *BamHI* a *EcoRI*.

3.3.6 Kotransformace kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* pomocí párování

Materiál a chemikálie:

- 2x YPDA médium
- kmen *S.cerevisiae* AH109 (párovací typ A) transformovaný rekombinantním plazmidem pGBKT7
- kmen *S.cerevisiae* Y187 (párovací typ α) transformovaný rekombinantním plazmidem pGADT7
- SD/agar/-Trp/-Leu, SD/agar/-Trp/-Leu/-His/-Ade

Postup:

- 35 μ l 2x YPDA média, v němž byly resuspendovány kvasinky kmene AH109, jsme smíchali s 35 μ l 2x YPDA média obsahujícím kvasinky kmene Y187 a nechali kultivovat přes noc (30°C, 60 rpm).
- Poté jsme vysévali po 20 μ l této směsi na SD/agar/-Trp/-Leu a kultivovali při 30°C .
- Narostlé kolonie jsme přenesli pomocí sterilního filtračního papíru na SD/agar/-Trp/-Leu/-His/-Ade a opět kultivovali při 30°C.

3.3.7 Izolace proteinů z kvasinek

Materiál a chemikálie:

- YPDA médium
- kvasinkové kmeny transformované příslušnými vektory (např. pGBKT7-DR6(IC))
- 2x redukující vzorkový pufr (100 mM Tris-HCl pH = 6,8, 20% glycerol (Merck), 4% SDS, 0,02% bromfenolová modř (Lachema), 0,5% DTT (Sigma))

Postup:

- Do 1 ml YPDA média jsme zaočkovali kvasinky a nechali třepat přes noc (30°C, 200 rpm)
- Narostlou kvasinkovou kulturu jsme přendali do 1,5 ml zkumavky a centrifugovali (20°C, 10.000 rpm, 1 min)
- Po odstranění supernatantu jsme peletu resuspendovali ve 40 μ l 2x redukujícího pufru, denaturovali 5 min při 95°C, krátce ochladili na ledu, opět centrifugovali (20°C, 13.200 rpm, 1 min) a takto připravený kvasinkový lyzát analyzovali pomocí SDS-PAGE elektroforózy a Western přenosu (viz kapitola 3.4).

3.3.8 Sekvenování a identifikace GAL4-AD inzertů

Materiál a chemikálie:

- sekvenační reakční směs Big Dye terminator (*Applied Biosystems*)
- sekvenační ředící roztok halfBD 5x koncentrovaný (*Applied Biosystems*)
- denaturující vzorkový roztok HiDi-formamide (*Applied Biosystems*)
- templátová DNA (pGADT7 s cDNA inzerty)
- sekvenační primer (5'-TATTCGATGATGAAGATACCC-3')
- 75% a 100% ethanol (*Merck*)
- 3M octan sodný , pH 4,6 (*Sigma*)
- automatický sekvenátor ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (*Applied Biosysteme*)

Postup:

- Připravili jsme následující reakční směs:

reakční směs Big Dye	2 µl
ředící roztok halfBD	2 µl
templátová DNA	10 µl (1 µg)
sekvenační primer	0,3 µl (3,2 pmol)
deionizovaná H ₂ O do finálního objemu	15 µl

- Na PCR cyklu jsme provedli 25 cyklů následující sekvenační reakce:

denaturace	30 s při 96°C
vazba primerů	30 s při 50°C
polymerace	4 min při 60°C

- Ke každé sekvenační reakci jsme v 1,5 ml zkumavce přidali 2 µl 3M octanu sodného a 50 µl 100% ethanolu.
- Směs jsme inkubovali 15 min při pokojové teplotě a poté centrifugovali (20°C, 13.200 rpm, 20 min).
- Po odstranění supernatantu jsme peletu promyli 250 µl 750% ethanolu, opět centrifugovali (20°C, 13.200 rpm, 5 min), vysušili, rozpustili v 15 µl denaturujícího vzorkového roztoku a nechali analyzovat v automatickém sekvenátoru (sekvenační servis MBÚ AV ČR).
- Výsledné sekvence jsme editovali pomocí programu Chromas (*Technelysium*).
- Editované sekvence jsme porovnali se sekvencemi v databázi dostupné na webové adrese <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (National Institutes of Health / National Library of Medicine / National Center for Biotechnology Information). K prohlédávání byl použit program BlastN (Basic Local Alignment Search Tool).

3.4 Analýza proteinů pomocí SDS polyakrylamidové elektroforézy a Western přenosu

3.4.1 SDS polyakrylamidová elektroforéza

Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu v denaturujícím prostředí SDS (SDS-PAGE) je metoda, při které dochází k dělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti M_r .

Materiál a chemikálie:

- standardy pro SDS-PAGE (*Bio-Rad Laboratories*)
- 40% nebo 30% akrylamid (*Serva*)
- 1,5M Tris-HCl, pH 8,8 (*Sigma*)
- 0,5M Tris-HCl, pH 6,8 (*Sigma*)
- 10% SDS (dodecylsulfát sodný) (*Merck*)
- 10% APS (peroxodisíran amonný) (*Lachema*)
- deionizovaná H_2O
- TEMED (N,N,N',N'-tetraethylethylendiamin) (*USB Corporation*)
- SDS elektrodotový pufr (250mM glycin (*Sigma*), 10mM Tris-HCl, 0,1% SDS, pH 8,3)
- součásti „sendviče“ tvořící formu gelu
- přístroj pro SDS-PAGE Mighty Small II (*Hofer Scientific Instruments*)

Postup:

- Připravili jsme :

12% separační gel – 3ml 40% akrylamidu; 2,5 ml Tris-HCl (pH 8,8); 0,1 ml 10% SDS; H_2O do finálního objemu 10 ml; 100 μ l 10% APS; 5 μ l TEMED. Polymerace 30 min.

zaostřovací gel – 0,8 ml 40% akrylamidu; 2,5 ml Tris-HCl (pH 6,8); 0,1 ml 10% SDS; H_2O do finálního objemu 10 ml; 100 μ l 10% APS; 10 μ l TEMED. Polymerace 30 min.

- Nanesli jsme vzorky včetně standardů a na přístroji Mighty Small II provedli standardní SDS-PAGE (20 min 80 V, poté 180 V).

3.4.2 Přenos proteinů na nitrocelulóзовou membránu

Materiál a chemikálie:

- pufr pro přenos na membránu (48 mM Tris.HCl, 39 mM glycin, 20% methanol (*Penta*))
- nitrocelulózová membrána PROTRAN (*Schleicher&Schuel*)
- přístroj pro přenos na membránu Transblot (*Amersham Bioscience*)
- filtrační papír *Whatman*

Postup:

- Proteiny rozdělené podle molekulové hmotnosti jsme z polyakrylamidového gelu přenesli tak, že jsme na přístroj pro přenos proteinů položili nejprve filtrační papír (o velikosti 4,5 cm x 8 cm) navlhčený v pufru pro přenos, na něj navlhčenou nitrocelulóзовou membránu o téže velikosti, pak polyakrylamidový gel a nakonec opět puftrem nasycený filtrační papír.
- Uzavřeli jsme přístroj, připojili ke zdroji napětí a nechali 75 min přenášet proteiny z gelu na membránu (0,8 mA/cm² membrány, tj. 29 mA/membránu o velikosti 4,5 cm x 8 cm).

3.4.3 Imunodetekce

Materiál a metody:

- sušené odtučněné mléko (NFM) (*Promil*)
- roztok PBS/TWEEN (0,05% Tween-20 (*Sigma*) v PBS (1,9 mM NaH₂PO₄ (*Lachema*), 8,1 mM Na₂HPO₄, 154 mM NaCl, pH=7,2))
- roztok primární protilátky (1% sušené odtučněné mléko; 500-1000x zředěná primární protilátka; 0,1% azid sodný (*Sigma*); v PBS/TWEEN)
- roztok sekundární protilátky (1% sušené odtučněné mléko v PBS/TWEEN; 4000x zředěná sekundární protilátka GAM-Px (resp.GAR-Px) (*Bio Rad*) - kozí polyklonální protilátka proti Fc-částem myších (resp. králíčích) imunoglobulinů konjugovaná s křenovou peroxidázou)
- roztok ECL1 (2,5 mM luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalazindion) ve 100 mM Tris.HCl, pH 8,8)
- roztok ECL2 (5,4 mM H₂O₂ (*Calbiochem*) ve 100mM Tris.HCl, pH 8,8)
- rentgenový film X-OMAT AS (*Kodak*)

Postup:

- Nitrocelulózová membrána s navázanými proteiny byla :
 - omyta v PBS-T
 - 1 hodinu promývána v PBS-T + 5% NFM

- 1 hodinu inkubována v roztoku primární protilátky
- 3x 10 min promývána v PBS-T
- 1 hodinu inkubována v roztoku sekundární protilátky
- 3x promývána v PBS-T
- 1 min inkubována v 1 ml ECL roztoku (0,5 ml ECL1+0,5 ml ECL2)
- chemiluminiscence konjugovaná s detekovanými proteiny byla zachycena na rentgenový film X-OMAT AS. K vyvolání byl použit přístroj FOMEI Optimax (*Fomei*).

3.5 Ověření interakce mezi nalezenými proteiny a intracelulární částí DR6 v savčích buňkách

3.5.1 Transfekce přisedlých savčích buněk s použitím polyethyleniminu

Materiál a chemikálie:

- sterilní 150 mM NaCl
- plazmidová DNA
- 7,5 mM roztok polyethylenimin (PEI) (*Sigma Aldrich*)
- bezsérové médium (např. RPMI)
- médium se sérem
- savčí buněčná linie (např. HEK293)

Postup:

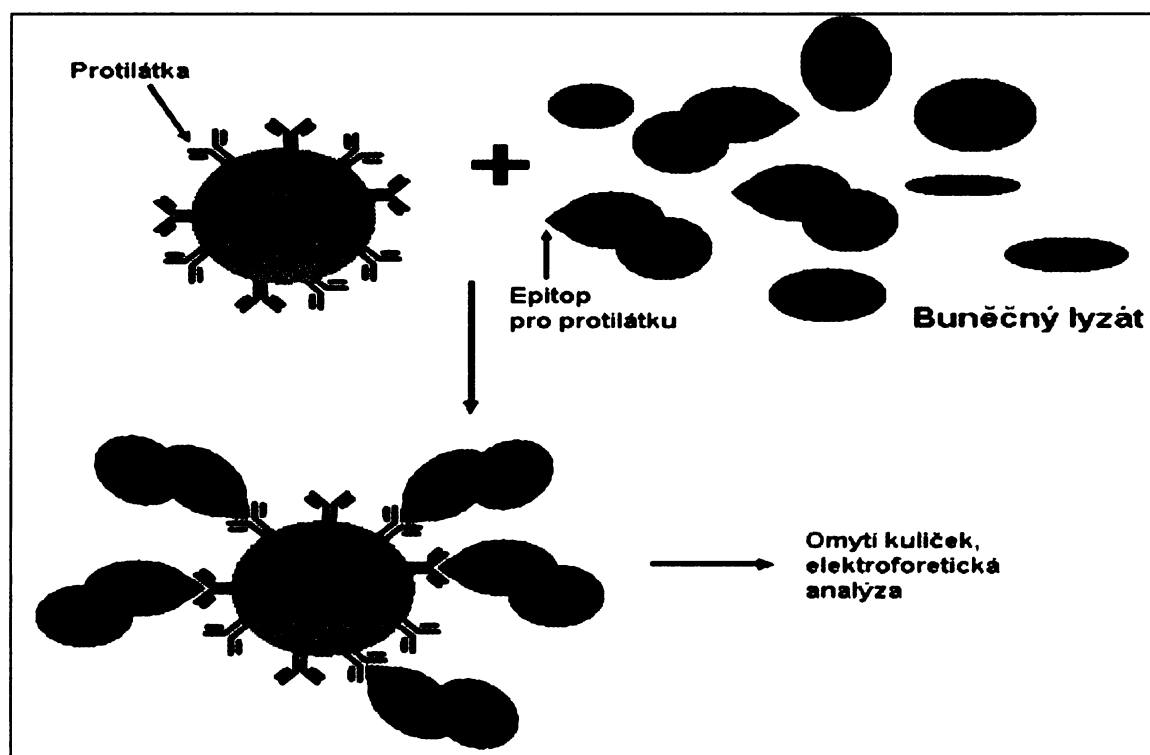
- Několik dní před transfekcí jsme buňky rozdělili na 10mm Petriho misky nebo 6-jamkovou destičku tak, aby byly v den transfekce z 90-95% konfluentní.
- Namíchali jsme směs DNA + NaCl a PEI+NaCl (množství viz Tab. 4) a nechali stát 15 min.
- Poté jsme směsi smíchali dohromady a nechali stát 10 min. Mezitím jsme vyměnili původní médium na buňkách za bezsérové.
- Napipetovali jsme směs DNA+PEI na buňky a lehce zamíchali.
- Natransfekované buňky jsme inkubovali 3 hodiny při 37°C v CO₂ inkubátoru.
- Nakonec jsme vyměnili bezsérové médium za médium se sérem a nechali buňky inkubovat přes noc při 37°C v CO₂ inkubátoru.

	objem média	množství DNA/NaCl	množství PEI/NaCl
10mm Petriho miska	10 ml	30µg/750µl	90µl/750µl
6-jamková destička	1 ml	5µg/125µl	15µl/125µl

Tab. 4: Množství přísad v transfekčních směsích

3.5.2 Koimunoprecipitace

Koimunoprecipitace (viz Obr. 7) je metoda založená na izolaci proteinových komplexů z buněčných lyzátů pomocí sepharosových kuliček s navázanými protilátkami proti některému z proteinů komplexu.



Obr. 7 Schéma koimunoprecipitace

3.5.2.1 Navazování protilátky na CNBr Sepharosu

Materiál a chemikálie:

- CNBr aktivovaná Sepharosa (*Amersham Biosciences*)
- 1mM HCl
- navazovací pufr (0,1M NaHCO₃, pH 8,3 (*Lachema*), 0,5M NaCl)
- protilátka (5-10mg)
- glycin (*Sigma*)
- PBS
- pufr o pH 8 (0,1M Tris, 0,5M NaCl) a pH 4 (0,1M acetátový pufr o pH 4, 0,5M NaCl)

Postup:

- 0,5 g CNBr aktivované Sepharosy vytemperované na pokojovou teplotu jsme na fritě promyli 100ml 1mM HCl, přenesli do 15 ml zkumavky (*TPP*), resuspendovali ve 4,5 ml navazovacího pufru a přidali protilátku.
- Směs jsme lehce protřepávali 2 hodiny při pokojové teplotě, poté přidali 0,5 mg glycinu a opět protřepávali 2 hodiny.
- Sepharosu s navázanou protilátkou jsme promyli na fritě střídavě pufr o pH 8 a pH 4 a nakonec resuspendovali v PBS.

3.5.2.2 Koimunoprecipitace

Materiál a chemikálie:

- transfekovaná lidská embryonální buněčná linie HEK293 v 10mm Petriho miskách
- vychlazený PBS pufr
- škrabka na buňky
- lyzační pufr (20mM Tris, pH 7,5; 100mM NaCl; 50mM NaF (*Sigma*); 10mM EDTA; 10% glycerol; 1% detergent NP40 (*Fluka AG*) ; 1mM orthovanadát sodný - inhibitor fosfatáz; complete (1/25) - inhibitor proteáz)
- promývací pufr (20mM Tris, pH 7,5; 100mM NaCl; 50mM NaF; 10mM EDTA; 10% glycerol)
- Sepharosa s navázanou protilátkou
- 2x redukující vzorkový pufr (100 mM Tris.HCl, pH 6,8; 20% glycerol; 4% SDS; 0,02 % bromfenolová modř; 0,5% DTT)

Postup pro přisedlé buňky:

- Natransfekované buňky v misce o \varnothing 10cm jsme po odstranění média promyli 10ml vychlazeného PBS, na ledu seškrabali, resuspendovali v 5 ml PBS a centrifugovali (2°C, 800 rpm, 5 min).

- Buněčnou peletu jsme resuspendovali ve 220 μ l lyzačního pufru, inkubovali 30 min na ledu a centrifugovali (2°C, 13.200rpm, 30 min).
- 20 μ l supernatantu jsme smíchali s 20 μ l 2x redukujícího vzorkového pufru (pro kontrolu - celkové buněčné lyzáty), 200 μ l smíchali s 20 μ l sepharosových kuliček promytých 3x v promývacím pufru (2°C, 3000 rpm, 1 min) a nechali promíchávat v chladové místnosti 1 hodinu.
- Sepharosu s navázanými proteiny jsme 3x promyli promývacím pufrem (2°C, 3000 rpm, 1 min), resuspendovali ve 40 μ l 2x redukujícího vzorkového pufru a třepali 15 min při 37°C.
- Nakonec jsme vzorky zfiltrovali přes skelnou vatu umístěnou ve 200 μ l špičkách, denurovali včetně celkových buněčných lyzátů (95°C, 5 min) a analyzovali pomocí SDS-PAGE a přenosu na nitrocelulosoovou membránu.

3.5.3 Analýza exprimovaných proteinů pomocí imunocytochemie

Podstatou této metody je vazba specifických protilátek na proteiny exprimované v buněčných kulturách a jejich následná vizualizace pomocí fluorescenčně značené sekundární protilátky za využití např. konfokálního mikroskopu.

Materiál a chemikálie:

- PBS pufr
- transfekované savčí buňky kultivované na krycích sklíčkách (12 mm)
- aceton (*Penta*)
- methanol (*Penta*)
- primární protilátka (1-10 μ g/ml, např. α DR6(IC) 3 μ g/ml)
- sekundární protilátka (konjugovaná s fluorescenčními barvivy od *Molecular Probes*, např. GAR-Alexa 488)
- podložní sklíčko
- roztok moviolu (6 g glycerolu; 2,4 g moviolu; 6 ml destilované vody; 12 ml 0,2M Tris.HCl, pH 8,5)
- bezbarvý lak na nehty
- konfokální mikroskop (*Leica*)

Postup:

- Od transfekovaných buněk kultivovaných na krycích sklíčkách ve 24-jamkové destičce jsme odstranili médium a 3x jsme je promyli PBS.
- Buňky byly fixovány nejprve 250 μ l methanolu po dobu 10 min, poté permeabilizovány 250 μ l acetonu po dobu 5 s.
- Dále jsme buňky 3x jsme promyli PBS a 30 min inkubovali v primární protilátce.
- Opět jsme je 3x promyli PBS a 30 min inkubovali v naředěné sekundární protilátce.
- Nenavázanou sekundární protilátku jsme odmyli (3x PBS) a pomocí pinzety položili krycí sklíčko na podlažní s 3,5 μ l moviolu (obsahujícím DRAQ-5 – fluorescenční barvení jaderné DNA) buňkami dolů.
- Po zaschnutí moviolu jsme okraje sklíček potřeli bezbarvým lakem a opět nechali zaschnout.
- Takto připravené vzorky jsme analyzovali pomocí konfokálního mikroskopu a poté uchovávali ve tmě pro případ dalšího použití.

3.6 Produkce a purifikace rekombinantního proteinu His-SNX3 denaturační metodou

Tato metoda slouží k izolaci a purifikaci fúzních proteinů obsahujících sekvenci 6xHis na nosiči s kobaltnatým komplexem.

Materiál a chemikálie:

- bakterie kmene BL-21 transformované plazmidem pET28-SNX3
- médium LB/Kan
- IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktosid, 100 mg/ml) (*Serva*)
- afinitní nosič BD TALON Superflow Resin (*BD Clontech*)
- kolonka BD TALONspin Column (*BD Clontech*)
- lyzační pufr (20mM Tris-HCl, pH 7,5; 100mM NaCl; 8M močovina)
- promývací pufr (20mM Tris-HCl, pH 7,5; 100mM NaCl; 8M močovina (*Lachema*); 2mM imidazol (*Sigma*))
- eluční pufr (20mM Tris-HCl, pH 7,5; 100mM NaCl; 8M močovina; 100mM imidazol)
- dialyzační pufr (6M močovina v PBS)
- dialyzační střevo

Postup:

- Do 20 ml média LB/Kan jsme zaočkovali 1 kolonii bakteriálního kmene BL21 transformovaného plazmidem pET28-SNX3 a kultivovali za stálého třepání přes noc (37°C, 200 rpm)
- 10 ml z takto narostlé kultury jsme přenesli do 1 litru média LB/Kan, kultivovali (37°C, 200 rpm) do A_{600} mezi 0,7 a 0,75, přidali IPTG do finální koncentrace 0,3 mg/ml a kultivovali další 4 hodiny (37°C, 200 rpm).
- Buňky jsme centrifigovali (4°C, 4000 rpm, 15 min) a po odstranění supernatantu resuspendovali ve 40 ml lyzačního pufru.
- Lyzát jsme centrifigovali (Beckman ultracentrifuge, Rotor 70Ti, 4°C, 35.000 rpm, 45 min).
- Supernatant (cca 40 ml) jsme přidali k 800 μ l TALONu předem promytého v lyzačním pufru a promíchávali 30 min při pokojové teplotě za pomalého otačení.
- Směs jsme centrifigovali (20°C, 800 rpm, 5 min), promyli 3x 50 ml lyzačního pufru, resuspendovali ve 3 ml promývacího pufru, nanесли na kolonku a opět promyli 20 ml promývacího pufru.
- Navázavé proteiny jsme eluovali 4 ml elučního pufru a sbírali frakce po 200 μ l.
- Eluát jsme dialyzovali přes noc proti 500 ml dialyzačního pufru.
- Frakce jsme analyzovali pomocí SDS elektroforézy a purifikovaný His-SNX3 byl zamražen v - 80°C a dále použit na imunizaci králíků a přípravu protilátek.

3.7 Analýza DR6 promotoru

3.7.1 Polymerasová řetězová reakce pomocí DNA polymerasy Phusion

Polymerázová řetězová reakce je metoda, která slouží k syntéze definovaného úseku DNA *in vitro*. Pro reakci je nutné navrhnout specifické krátké oligonukleotidové primery, které jsou komplementární k 3' a 5' koncovým sekvencím úseku, který má být amplifikován.

Materiál a chemikálie:

- chromozomální DNA připravená z buněčné kultury HEK293 pomocí ZR *Genomic DNA II Kitu* (Zymo Research)
- 10mM směs dNTP (Pharmacia Biotech)
- 5x HF pufr (Finnzymes)
- polymerasa Phusion (Finnzymes)
- primery (viz Tab. 5)
- deionizovaná voda

Postup:

- Připravili jsme reakční směs:

chromozomální DNA z HEK293	50-500ng
5x HF pufr	10 µl
10mM dNTPs	1 µl
primery	0,3 µl (každého)
polymerasa Phusion	0,5 µl
H ₂ O do finálního objemu	50 µl

- Na PCR cykléru jsme provedli 30 cyklů následující reakce:

předdenaturace	30s při 98°C
denaturace	15s při 98°C
nasednutí primerů	30s při 55°C
syntéza DNA	60s při 72°C

nakonec ještě jeden cyklus při 72°C po dobu 5 minut a analýzu reakční směsi na 1% agarosovém gelu.

Kod primeru	sekvence primeru	restrikční místo
DR6_prom_U1933	5'-CCGGAGCTCCTTAAAGGCATTCTTAAGCCA-3'	SacI
DR6_prom_U3164	5'-AACACCAGGAATTCATGAAG-3'	EcoRI
DR6_prom_U3403	5'-CCGGAGCTCTCTTTAATACCTATGTAACCT-3'	SacI
DR6_prom_U4243	5'-CCGGAGCTCTTGGGGGAAGGGTGATTAATA-3'	SacI
DR6_prom_L3183	5'-CTTCATGAATTCCTGGTGTT-3'	EcoRI
DR6_prom_L5548	5'-ATCGCTCGAGAAGCGCTCAC-3'	XhoI

Tab. 5: Primery použité pro amplifikaci různých úseků DR6 promotoru

3.7.2 Luciferasové reportérové testy

Tato metoda je založena na expresi reportérového genu (v tomto případě enzymu luciferasy) v závislosti na aktivaci příslušného promotoru a kvantifikaci této exprese pomocí enzymatické reakce. Využívá se jí jak k mapování aktivních míst na promotorech, tak i k analýze transaktivačních vlastností zkoumaných transkripčních faktorů či signálních drah.

Materiál a chemikálie:

- buněčná linie HEK293 transfekovaná příslušným plazmidem (např. pGL3 basic-DR6 promotor) a kontrolním plazmidem (pRLSV40 - slouží jako kontrola transfekce) ve 24-jamkové destičce (*Corning Costar*)
- vychlazený PBS
- 5X PLB lyzační pufr (*Promega*)
- škrabka na buňky
- Stop & Glo[®] Substrate 50x ředěný Stop & Glo[®] Buffer (*Promega*) - substrát pro rennilu (*Promega*)
- Luciferase Assay Substrate ředěný 1:1 s Luciferase Assay Buffer (*Promega*) - substrát pro luciferasu
- Luminometr(*Berthold*)
- 5 ml zkumavky (75x12mm) (*Sarstedt*)

Postup:

- Transfekované buňky jsme promyli 1x vychlazeným PBS a poté na ledu seškrabali a resuspendovali ve 100 µl PLB pufru.
- Do 5-ml zkumavky jsme napipetovali vždy 10 µl zlyzovaných buněk a 50 µl příslušného substrátu a změřili signál pomocí luminometru.
- Nejprve jsme proměřili všechny vzorky se substrátem pro luciferasu, poté se substrátem pro rennilu a výsledky vyhodnotili programem Microsoft Excel.

4 Výsledky

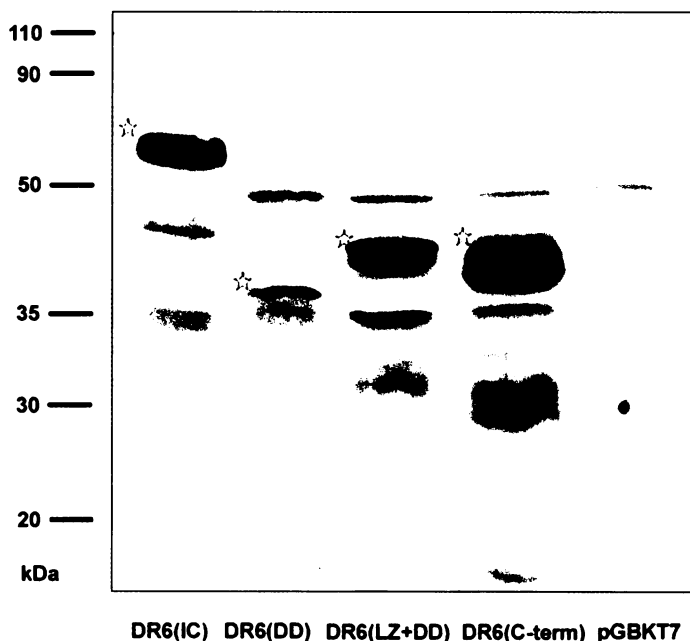
4.1 Identifikace proteinů interagujících s intracelulární částí DR6

4.1.1 Testy mutantů GAL4 DNA-BD – DR6(IC) fúzního proteinu

Plazmidem pGBKT7-DR6(IC) a jeho delečními mutanty (viz 3.2.3.1) byly transformovány kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kmene AH109 (viz 3.2.2.1). S takto transformovanými kvasinkami jsme provedli následující testy nezbytné pro jejich použití v kvasinkovém dvouhybridním systému a zjistili jsme, že :

- **GAL4-BD – DR6(IC) fúzní proteiny jsou produkovány v kvasinkách *S. cerevisiae* kmene AH109.**

Z transformovaných kvasinek jsme proteiny izolovali způsobem uvedeným v kapitole 3.3.7 a analyzovali pomocí SDS-PAGE, přenosu proteinů z elektroforetického gelu na nitrocelulosovou membránu a imunodetekce monoklonální protilátkou proti „myc“ epitopu (viz 3.4). Jako kontrola byl použit prázdný vektor pGBKT7 (viz Obr. 8).



Obr. 8

Expresse pGBKT7-DR6(IC) a jeho mutantů pGBKT7-DR6(DD), pGBKT7-DR6(DD+LZ) a pGBKT7-DR6(C-term) v kvasinkovém kmeni AH109 *S. cerevisiae*

(Příslušné produkované proteiny jsou v obrázku označeny červenou hvězdičkou).

- **GAL4 DNA-BD – DR6(IC) fúzní proteiny neaktivují expresi reportérových genů v GAL4-Y2H.**

Kmen AH109 *S. cerevisiae*, párovacího typu MAT α , transformovaný mutanty pGBKT7-DR6(IC) jsme párovali (viz 3.3.3) s kmenem Y187, párovacího typu MAT α , transformovaným vektory pGADT7 (kódující GAL4 AD) a pGADT7-T (kódující fúzní protein GAL4 AD – T antigen z SV40). Testovali jsme, zda po párování těchto kvasinek dojde k jejich růstu na minimálním médiu SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade.

Jako pozitivní kontrolu jsme použili interakci proteinu p53 s T antigenem z SV40 (pGBKT7-p53 a pGADT7-TAg).

Zjistili jsme tedy, že GAL4 DNA-BD – DR6(IC) fúzní proteiny neaktivují expresi reportérových genů His3 a Ade2 v GAL4 – kvasinkovém systému (viz Tab. 6). Celá intracelulární část DR6 již byla v naší laboratoři pro vyhledávání proteinů pomocí kvasinkového dvouhybridního systému použita, u žádného objeveného proteinu interagujícího s intracelulární částí DR6 v kvasinkách však nebyla prokázána interakce s DR6 v lidských buňkách ani případná funkce této interakce. Je možné, že dochází ke špatnému skládání mutantu GAL4 DNA-BD – DR6(IC), případně k jeho omezenému transportu do jádra kvůli jeho velikosti. Pro další vyhledávání interagujících proteinů jsme tedy vybrali fúzní protein GAL4 DNA-BD – DR6(C-term). Ten jsme upřednostnili před mutanty obsahujícími DD, jelikož C-koncová doména je obsažena výlučně v DR6 (narozdíl od DD obsažené a dobře prozkoumané u ostatních členů skupiny receptorů „smrti“) a její studium by mohlo přispět k objevení výlučných vlastností DR6.

	GAL4 AD	GAL4 AD – T antigen
GAL4 DNA-BD – DR6(IC)	-	-
GAL4 DNA-BD – DR6(C-term)	-	-
GAL4 DNA-BD – DR6(DD)	-	-
GAL4 DNA-BD – DR6(DD+LZ)	-	-
GAL4 DNA-BD – p53	-	+

Tab. 6: Růst kvasinek produkujících uvedené fúzní proteiny na selektivním médiu SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade.

4.1.2 Vyhledávání proteinů interagujících s intracelulární částí DR6 pomocí kvasinkového dvouhybridního systému

4.1.2.1 Výběr vhodné cDNA knihovny

Pro vyhledávání proteinů interagujících s intracelulární částí DR6 v kvasinkovém dvouhybridním systému jsme vybrali cDNA knihovnu z HeLa buněk (HeLa buňky exprimují DR6) [69]. Knihovna vnesená do vektoru pGADT7 byla zakoupena od firmy *Clontech* a předtransformovaná do *S. cerevisiae* kmene Y187 párovacího typu MAT α . Takto transformované kvasinky kmene Y187 jsme nechali párovat s kvasinkami kmene AH109 párovacího typu MATa transformované vektorem pGBKT7-DR6(C-term) (viz 3.3.3).

4.1.2.2 Selektce pozitivních klonů

Kultura po párování (objem 10 ml) byla vyseta na 10 cm misky se selekčním médiem SD/agar/-Trp, SD/agar/-Leu (100 μ l, v ředění 1:100), SD/agar/-Trp/-Leu (100 μ l, v ředění 1:10, 1:100, 1:1000) a zbytek na 50 15cm misek s SD/agar/-Trp/-Leu/-His/-Ade.

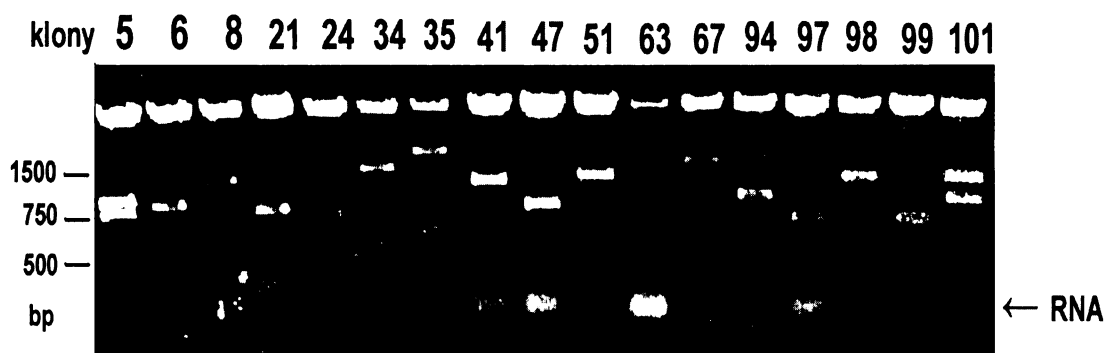
Kvasinkové kolonie po několikadenní kultivaci narostly jak na selekčním médiu SD/agar/-Trp a SD/agar/-Leu (tím byla potvrzena přítomnost obou plazmidů), tak na SD/agar/-Trp/-Leu. Účinnost párování byla 4,4% a bylo celkem otestováno $2,0 \times 10^6$ nezávislých klonů z této cDNA knihovny.

Na padesáti 15cm miskách s SD/agar/-Trp/-Leu/-His/-Ade narostlo během třítydenní inkubace při 30°C 106 kvasinkových kolonií (klonů), s nimiž jsme prováděli další testy.

4.1.2.3 Izolace plazmidové DNA a její restriční analýza

Ze všech pozitivních kolonií jsme izolovali plazmidovou DNA (viz 3.3.4). Tu jsme elektroporací transformovali do bakteriálního kmene *Escherichia coli* TOP10 (viz 3.3.5) a transformované bakterie vyseli na selekčním médiu LB/agar/Amp, které umožnilo růst pouze bakteriím transformovaným plazmidem pGADT7, nikoli bakteriím nesoucím plazmid pGBKT7.

Z těchto bakteriálních kolonií jsme alkalickou lyzí (viz kapitoly 1.25-1.27) izolovali plazmidovou DNA a následně ji analyzovali štěpením restriktivními endonukleasami *EcoRI* a *BamHI*, které by měly vyštěpit inzert – cDNA z příslušné knihovny. Restriktivní analýza, spojená s elektroforézou v agarosovém gelu, ukázala, že většina izolovaných vektorů nesla inzert délky minimálně 400 párů bází, což považujeme za dostatečné, aby jimi byly kódovány fragmenty proteinů, jejichž interakci s „baitovým“ proteinem studujeme pomocí kvasinkového dvouhybridního systému (viz Obr. 9).



Obr. 9

Ukázka kontrolního štěpení pGADT7 s inzerty z cDNA knihovny, jejichž produkty interagovaly s DR6(C-term) v kvasinkovém dvouhybridním systému

Plazmidová DNA byla štěpena enzymy *EcoRI* a *BamHI* a následně rozdělena pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu (s použitím standardu Lambda od *Fermentas*). Uvedená čísla jsou označeními původních kvasinkových klonů, z nichž byla DNA získána.

4.1.2.4 Odstranění falešných pozitivit

Vybrané plazmidy byly zpětně transformovány do kvasinkového kmene AH109. Takto transformované kvasinky byly párovány s kvasinkami kmene Y187 transformovanými vektory :

- pGBKT7-DR6(C-term) - pro zpětnou kontrolu interakce
- pGBKT7-lamin - pro kontrolu falešných pozitivit

Zpárované kvasinky byly vysety na selektivní médium SD/agar/-Trp/-Leu/-His/-Ade. Za pozitivní kolonie, tj. kolonie exprimující neznámé GAL4 DNA-AD – fúzní proteiny v kvasinkách specificky interagující s C-koncem intracelulární částí DR6, považujeme ty, které rostou na tomto médiu po párování s kvasinkami transformovanými vektorem pGBKT7-DR6(C-term) a které nerostou na tomto médiu po párování s kvasinkami transformovanými vektorem pGBKT7-lamin.

Takto jsme nakonec získali **54** pozitivních klonů.

4.1.2.5 Identifikace neznámých proteinů interagujících s DR6

Inzerty z izolovaných plazmidů byly sekvenovány a jejich sekvence porovnány s databází GenBank (cDNA a EST) pomocí programu BLAST (viz 3.3.8). Celkem se podařilo identifikovat **6** různých proteinů specificky interagujících s intracelulární částí DR6 v kvasinkovém dvouhybridním systému (viz Tab. 7). Ostatní klony obsahovaly buď nekódující oblasti cDNA nebo měly cDNA v jiném čtecím rámci.

Název proteinu	Lokalizace	Počet aminokyselin v kompletním proteinu	Úsek proteinu, který interagoval s DR6(IC)	Kód genu (GenBank)
Sorting nexin 3 (SNX3)	cytoplazma	162	1 - 162	NM 003795
Copine 7 (CPNE7)	cytoplazma	558	339 - 558	NM 153636
CHORDC1	jádro	332	151- 332	NM 012124
FIP1L1	jádro	594	43 -147	NM 030917
GTPbp	cytoplazma	396	277 - 396	AF134478
CGI-107	cytoplazma	211	59 - 211	AF151865

Tab. 7: Přehled identifikovaných proteinů interagujících s DR6(C-term) v kvasinkovém dvouhybridním systému.

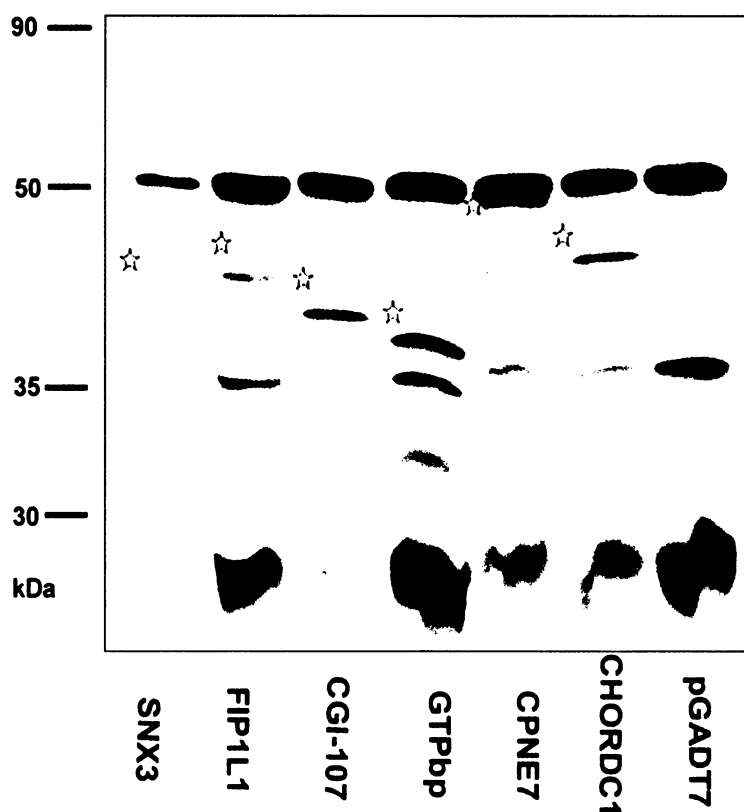
4.1.3 Ověření interakce DR6(C-term) a nalezených proteinů

Kvasinkový dvouhybridní systém byl dále využit pro ověření interakce mezi DR6(IC) a nalezenými 6 proteiny. Pro lokalizaci interakce jsme použili 3 mutanty DR6(IC) zaklonované do vektoru pGBKT7 (3.2.3.1). Tyto plazmidy jsme natransformovali do kvasinkového kmene AH109 párovacího typu MAT α (jejich exprese ověřena v kapitole 4.1.1, viz Obr. 8).

Plazmidy izolované z pozitivních kolonií jsme natransformovali do kvasinkového kmene Y187 párovacího typu MAT α a ověřili jejich expresi pomocí SDS-PAGE, přenosu proteinů z elektroforetického gelu na nitrocelulosovou membránu a imunodetekce monoklonální protilátkou proti „HA“ epitopu (viz Obr. 10).

Po ověření exprese jsme testovali, zda po párování těchto kvasinek dojde k jejich růstu na minimálním médiu SD/agar/-Trp/-Leu/-His/-Ade (viz Obr. 11).

Jako pozitivní kontrolu jsme použili interakci proteinu p53 s T antigenem z SV40.



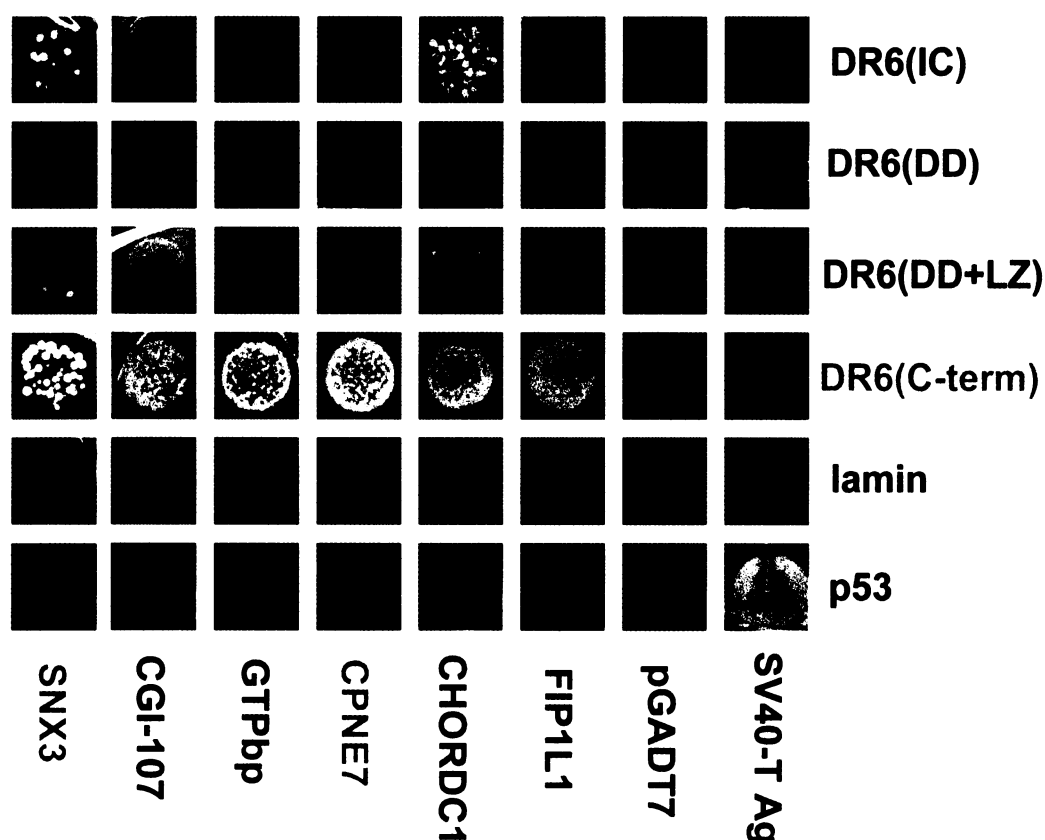
Obr. 10

Expresa proteinů nalezených pomocí kvasinkového dvouhybridního systému v kmeni Y187 *S. cerevisiae*

(Příslušné produkované proteiny jsou v obrázku označeny červenou hvězdičkou).

Zjistili jsme, že (viz Obr. 11):

- všech 6 nalezených proteinů v kvasinkách specificky interaguje s C-koncovou částí intracelulární části DR6 (aminokyseliny 529- 656)
- Pouze SNX3 a CHORDC1 interagují v kvasinkách specificky s celou intracelulární částí DR6 (aminokyseliny 371- 656)



Obr. 11

Mapování interakce mezi nalezenými proteiny a intracelulární částí DR6

(všech 6 nalezených proteinů specificky interaguje s C-koncovou částí DR6 – v obrázku označenou modrou barvou, červenou barvou jsou označeny proteiny vybrané pro další analýzu).

Pro další analýzy jsme vybrali proteiny SNX3 a CPNE7. SNX3 je členem rodiny tzv. sorting nexinů, které interagují s mnoha různými receptory a hrají roli v jejich recyklaci. Doposud nebyl objeven žádný protein interagující se SNX3. Rozhodli jsme se tedy prozkoumat, zda SNX3 nehraje roli v recyklaci DR6. CPNE7 je členem rodiny tzv. copinů, jejichž jeden člen (CPNE1) je znám jako možný

regulátor signalizace z TNFR1. Proto jsme se rozhodli ověřit možnou roli proteinu CPNE7 v signalizaci z DR6.

4.2 Charakterizace interakce DR6 s SNX3

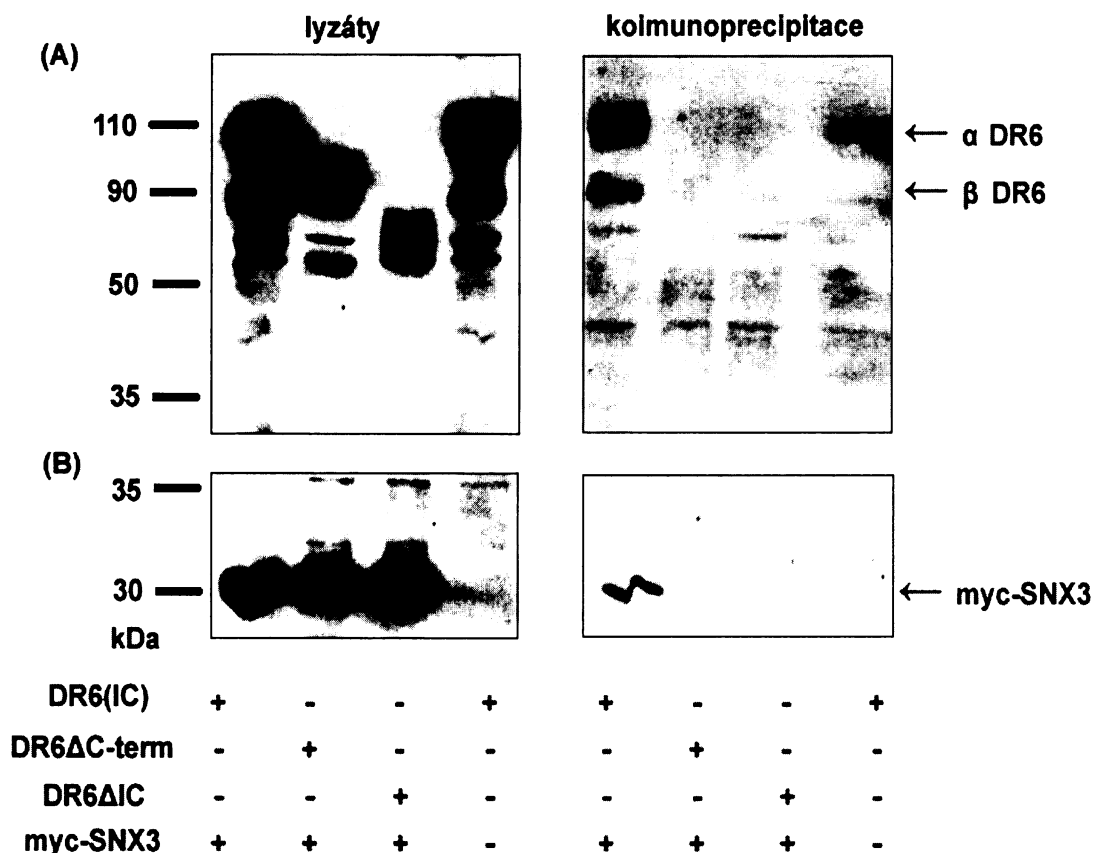
Sorting nexin 3 (162 aminokyselin), člen rodiny proteinů SNX (Sorting nexin) [79, 80], je přítomný v endozomech a pravděpodobně se účastní recyklace membránových proteinů. Obsahuje tzv. PX („phox“) homologní doménu, díky které interaguje s fosfatidylinositol-3-fosfátem. Nadprodukce SNX3 pozměňuje morfologii endozomů a zabraňuje transportu do lysozomů [81].

4.2.1 Ověření interakce mezi intracelulární částí DR6 a SNX3 v savčích buňkách pomocí koexprese a koimunoprecipitace

Interakce dvou proteinů v kvasinkovém dvouhybridním systému ještě neznamená, že spolu interagují i za přirozených podmínek v savčích buňkách. Pro potvrzení interakce s DR6 byl tedy SNX3 společně s ním nadprodukován v savčí buněčné linii HEK293FT (viz 3.5.1) a koimunoprecipitován (viz 3.5.2). K nadprodukci SNX3 byly použity rekombinantní vektory pKMyc-SNX3, k nadprodukci DR6 pFlag CMV-DR6 a také pFlag CMV-DR6 Δ IC a pFlag CMV-DR6 Δ C-term pro ověření specifity jejich interakce (viz 3.2.3.3). Exprese proteinů ze všech výše uvedených expresních vektorů byla nejprve potvrzena pomocí tranzientní transfekce HEK293FT. Z těchto buněk byly den po transfekci připraveny buněčné lyzáty (viz 3.5.2.2) a exprese proteinů v nich byla analyzována pomocí Western přenosu a imunodetekce produkovaných proteinů protilátkami proti „myc“ epitopu a proti intracelulární části DR6 (data neukázána).

Po ověření exprese jsme uvedené proteiny nadprodukovali v různých kombinacích a koimunoprecipitovali je pomocí specifických protilátek navázaných na Sepharose (viz Obr. 12). Z obrázku je patrné, že spolu **lze koimunoprecipitovat SNX3 a DR6**, a to jak pomocí anti-DR6, tak i anti-Myc (SNX3) protilátek. Oba spolu tedy v buňkách HEK293FT vytvářejí interakční komplex. Naproti tomu DR6 mutant neobsahující C-koncovou část intracelulární domény DR6 s SNX3 ne-

koprecipitoval. Je tedy zřejmé, že C-koncová část intracelulární domény DR6 je jak v kvasinkách, tak v HEK buňkách zodpovědná za interakci DR6 se SNX3.



Obr. 12

(A) Koimunoprecipitace SNX3 a delečních mutantů DR6 pomocí protilátky proti „myc“ epitopu.

(Lyzáty z buněk HEK293FT transfekovaných vektory pFlag CMV-DR6, pFlag CMV-DR6ΔIC, pFlag CMV-DR6ΔC-term a pMyc-SNX3 v uvedených kombinacích byly inkubovány se Sepharosou s navázanou protilátkou proti „myc“ epitopu. Zachycené proteiny byly analyzovány pomocí SDS PAGE na 8% gelu, Western přenosu a imunodetekcí protilátkou proti DR6).

Pozn. Protilátkou proti DR6 jsou detekovatelné 2 různé formy DR6 o zdánlivých molekulových hmotnostech cca 110kDa (na obrázku označen jako α) a 90kDa (na obrázku označen jako β). Tento jev souvisí s rozdílnými posttranslačními modifikacemi (zejména glykosylacemi) DR6.

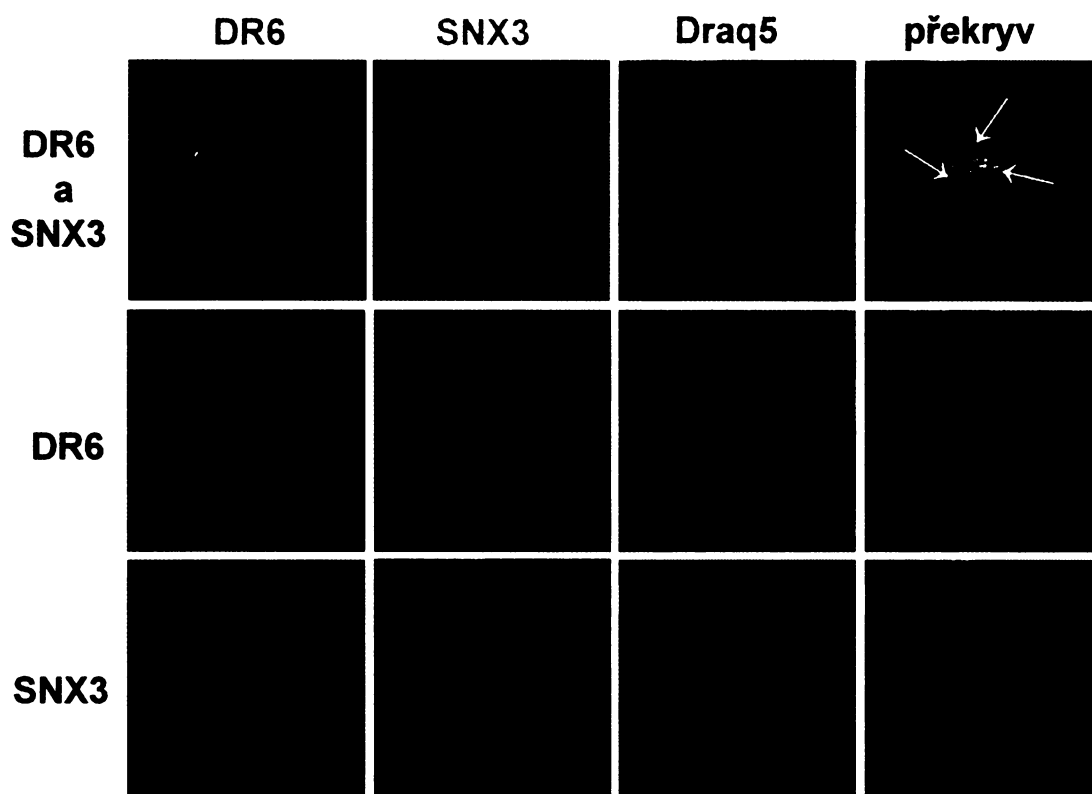
(B) Koimunoprecipitace SNX3 a delečních mutantů DR6 pomocí protilátky proti extracelulární části DR6.

(Lyzáty z buněk HEK293FT transfekovaných výše uvedenými kombinacemi expresních vektorů byly inkubovány se Sepharosou s navázanou protilátkou proti extracelulární části DR6. Zachycené proteiny byly analyzovány pomocí SDS PAGE na 12% gelu a Western přenosu s imunodetekcí protilátkou proti „myc“ epitopu)

4.2.2 Analýza buněčné kolokalizace DR6 a SNX3 pomocí konfokální mikroskopie

Vedle ověření vzájemné interakce DR6 a SNX3 jsme pomocí konfokální mikroskopie (viz 3.5.3) také analyzovali jejich vzájemnou buněčnou kolokalizaci. MDCK buňky jsme transfekovali vektory pKMyc-SNX3 a pFlag CMV-DR6 a exprimované proteiny po fixaci (viz 3.5.3) inkubovali nejprve v roztoku primární protilátky proti „myc“ epitopu (resp. proti intracelulární části DR6) a poté v sekundární protilátce GAM konjugované s fluorochromem Alexa488 (resp. GAR konjugované s fluorochromem Alexa594). Takto obarvené proteiny jsme vizualizovali pomocí konfokálního mikroskopu (u fluorochromu Alexa488 se excitační maximum nachází v oblasti vlnové délky 488 nm – zelená barva, u fluorochromu Alexa594 se excitační maximum nachází v oblasti vlnové délky 594 nm – červená barva). Draq5 označuje buněčná jádra.

Z Obr. 13 je patrné, že nadprodukce DR6 a SNX3 vede k jejich kolokalizaci ve vezikulárních strukturách podobných endozomům – viz šipky.



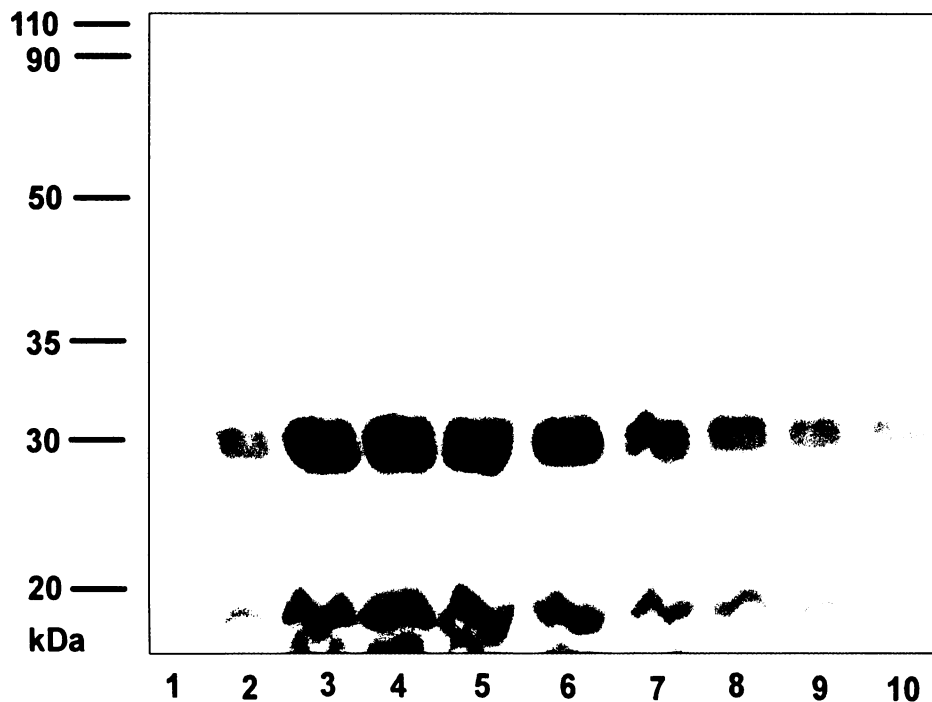
Obr. 13 Buněčná kolokalizace DR6 a SNX3

4.2.3 Příprava a charakterizace protilátek proti SNX3

4.2.3.1 Produkce a purifikace rekombinantního HisSNX3

Bakteriální kmen BL-21 jsme transformovali expresním plazmidem pET28-SNX3 (viz 3.2.3.2). Rekombinantní protein HisSNX3 jsme po nadprodukci v tomto kmenu vyčistili afinitní chromatografií na koloně TALON (viz 3.6) a jeho čistotu ověřili pomocí SDS-PAGE a barvením gelu Coomassie Blue (viz Obr. 14).

HisSNX3 byl použit pro imunizaci králíků (příprava polyklonálních protilátek).



Obr. 14

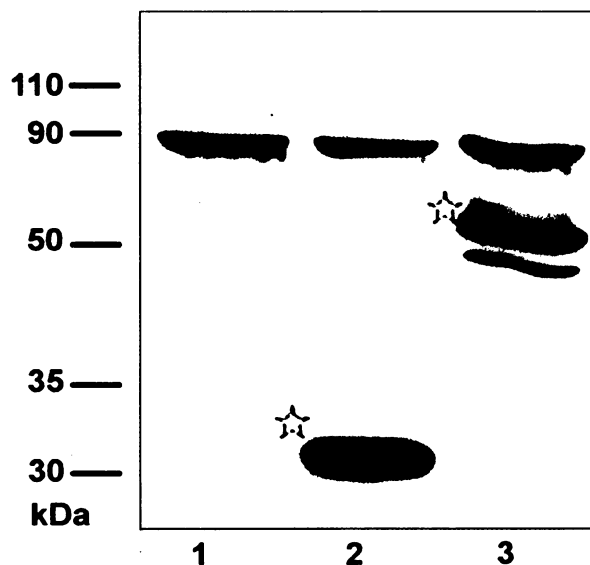
Jednotlivé frakce po eluci HisSNX3, analyzované SDS elektroforézou na 12% polyakrylamidovém gelu a barvené Coomassie Blue.

(Protein HisSNX3 představují proužky o velikosti 30 kDa, proužky o velikosti 20 kDa jsou zřejmě degradační produkty tohoto proteinu).

4.2.3.2 Příprava a charakterizace králičí polyklonální protilátky rozpoznávající SNX3

Pro získání polyklonálních anti-SNX3 protilátek jsme purifikovaným rekombinantním proteinem HisSNX3 (viz 4.2.3.1) nechali imunizovat laboratorní králíky. Reaktivitu získaného králičího antiséra jsme ověřili pomocí SDS-PAGE, přenosu proteinů z elektroforetického gelu na nitrocelulosoovou membránu a imunodetekce na lyzátech připravených z buněčné linie HEK293 transfekované rekombinantními vektory pKMyc-SNX3, pEGFP-SNX3 (viz 3.2.3.3). Proteiny z buněk lyzovaných v redukujícím vzorkovém pufru jsme rozdělili na 12% polyakrylamidovém gelu a po přenesení na nitrocelulosoovou membránu jsme je barvili anti-SNX3 králičím sérem ředěným 1:1000 (viz Obr. 15).

Podářilo se nám detekovat všechny proteiny, jež měly být připravenou protilátkou obarveny a tím jsme ověřili její reaktivitu i specifitu.



Obr. 15

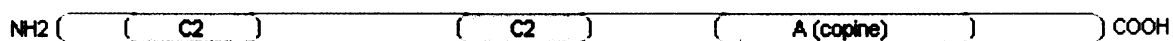
**Ověření reaktivity
polyklonální protilátky proti
SNX3 na lyzátech 1-3
připravených z buněčné linie
HEK293:**

- 1 – netransfekované buňky
- 2 – transfekcí vektorem pKMyc-SNX3
- 3 – transfekcí vektorem pEGFP-SNX3

4.3 Charakterizace DR6 s Copine 7 (CPNE7)

Copine-7 patří do rodiny cytoplazmatických proteinů, jež mají své orthology např. v *Arabidopsis*, *Paramecium*, *Dictyostelium*, *Caenorhabditis*, ale nemají je v *Saccharomyces* nebo *Drosophila*. U člověka bylo nalezeno nejméně 8 členů z této rodiny. Jejich společnou vlastností je vápníkem indukovaná vazba fosfolipidů [82].

Obsahují dvě C2 domény v N-koncové části a jednu A doménu v C-koncové části (viz Obr. 16). C2 domény obsahují Ca^{2+} -vazebný motiv vyskytující se ve fosfolipasach nebo protein-kinasach C. Funkce domény A nebyla doposud určena. U CPNE1 bylo zjištěno, že by mohl být možným regulátorem signalizace z receptoru TNFR1 [83].



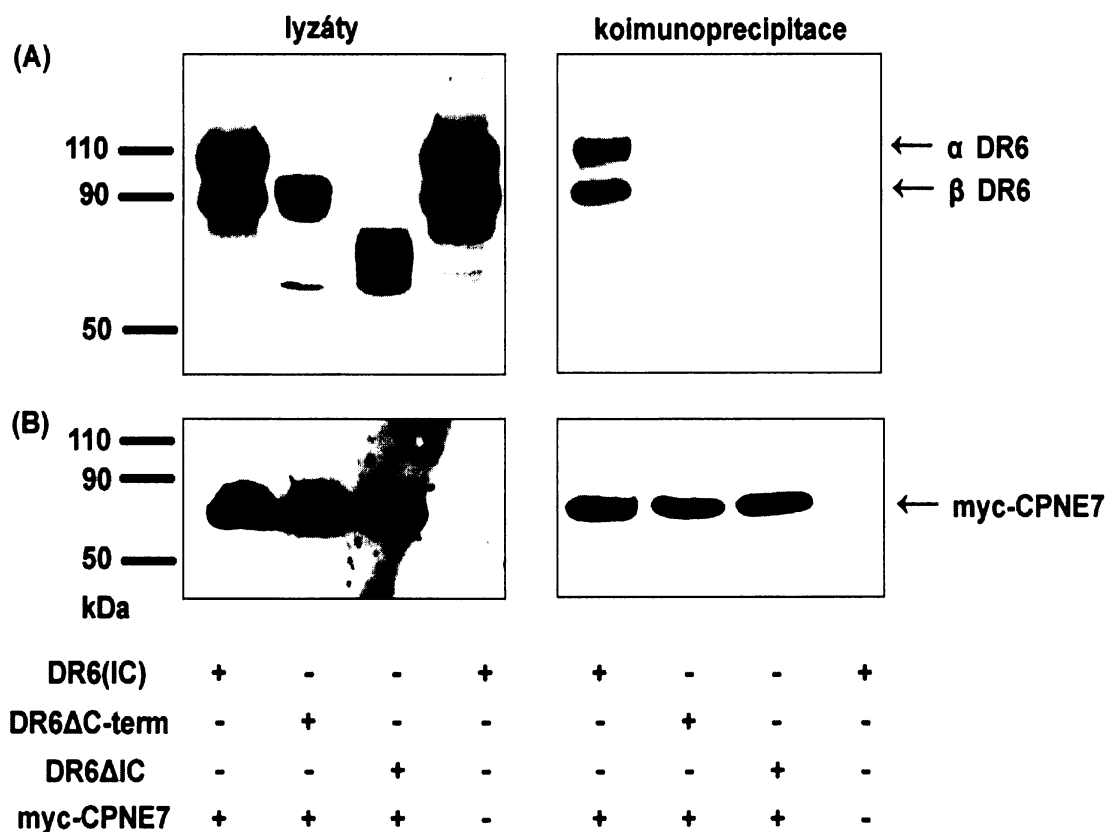
Obr. 16 Struktura členů rodiny CPNE

4.3.1 Ověření interakce mezi intracelulární částí DR6 a CPNE7 v savčích buňkách pomocí koexprese a koimunoprecipitace

Pro potvrzení interakce s DR6 byl CPNE7 společně s ním nadprodukován v savčí buněčné linii HEK293FT (viz 3.5.1) a koimunoprecipitován (viz 3.5.2). K nadprodukci uvedených proteinů byly použity rekombinantní vektory pMyc-CPNE7, pFlag CMV-DR6, pFlag CMV-DR6 Δ IC a pFlag CMV-DR6 Δ C-term (viz 3.2.3.3), jejichž exprese byla nejprve předem ověřena (viz 4.2.1).

Po ověření exprese byly uvedené proteiny v různých kombinacích nadprodukovány a pomocí specifických protilátek navázaných na sepharosových kuličkách koimunoprecipitovány. Z Obr. 17 je patrné, že **CPNE7 lze specificky koimunoprecipitovat s C-koncovou částí DR6, ale pouze za použití protilátky proti „myc“ epitopu**. Při použití protilátky proti extracelulární části DR6 koimunoprecipituje CPNE7 kromě DR6 také s jeho delečními mutanty postrádajícími C-koncovou doménu nebo dokonce i celou intracelulární část. Tato

„krosreaktivita“ může být způsobena nespecifickou vazbou proteinu CPNE7 na Sepharosu s navázanou monoklonální protilátkou proti extracelulární části DR6.



Obr. 17

(A) Koimmunoprecipitace CPNE7 a různých mutantů DR6 pomocí protilátky proti „myc“ epitopu.

(Lyzáty z buněk HEK293FT transfekovaných vektory pFlag CMV-DR6, pFlag CMV-DR6ΔIC, pFlag CMV-DR6ΔC-term a pMyc-CPNE7 v uvedených kombinacích byly inkubovány se Sepharosou s navázanou protilátkou proti „myc“ epitopu. Zachycené proteiny byly analyzovány pomocí SDS PAGE na 8% gelu, Western přenosu a imunodetekcí protilátkou proti DR6).

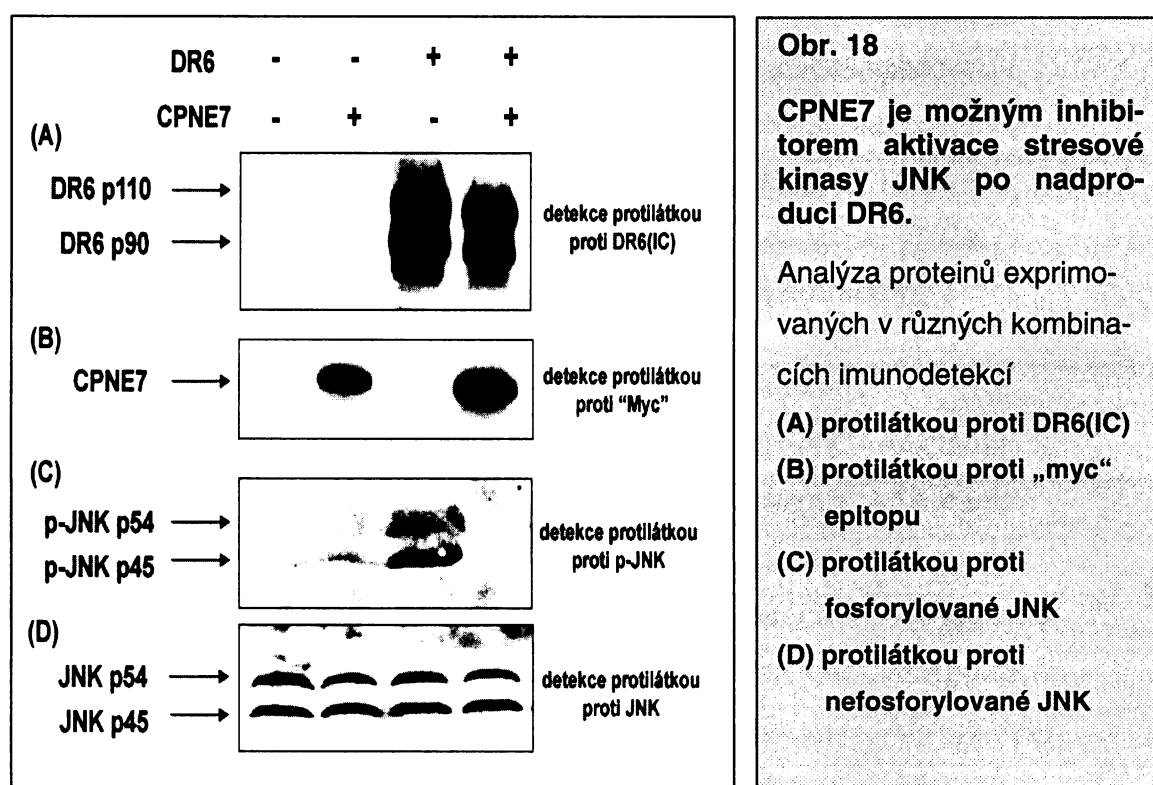
(B) Koimmunoprecipitace CPNE7 a různých mutantů DR6 pomocí protilátky proti extracelulární části DR6.

(Lyzáty z buněk HEK293FT transfekovaných vektory pFlag CMV-DR6, pFlag CMV-DR6ΔIC, pFlag CMV-DR6ΔC-term a pMyc-CPNE7 v uvedených kombinacích byly inkubovány se Sepharosou s navázanou protilátkou proti extracelulární části DR6. Zachycené proteiny byly analyzovány pomocí SDS PAGE na 12% gelu, Western přenosu a imunodetekcí protilátkou proti „myc“ epitopu).

4.3.2 Regulační role CPNE7 v signalizaci z receptoru DR6

Jelikož se jeden z členů rodiny CPNE pravděpodobně účastní regulace signalizace z receptoru TNFR1, rozhodli jsme se ověřit, zda i CPNE7 nehraje určitou roli v regulaci signalizace z receptoru DR6. V buněčné linii HEK293 jsme nadprodukovali DR6 a CPNE7 za použití rekombinantních vektorů pFlag CMV-DR6 a pMyc-CPNE7, (viz 3.5.1). Den po transfekci jsme analyzovali expresi proteinů pomocí SDS-PAGE a Western přenosu spojeného s imunodetekcí analyzovaných proteinů protilátkami proti „myc“ epitopu, intracelulární části DR6 a proti JNK (viz Obr. 18).

Z obrázku 18 (C) je patrné, že po nadprodukcí DR6 v buňkách HEK293 dochází k aktivaci stresové kinasy JNK. Jakmile však společně s DR6 nadprodukujeme i CPNE7 tak k aktivaci JNK již nedochází, což znamená, že CPNE7 je možným regulátorem JNK zprostředkované signalizace z receptoru DR6.



4.4 Analýza DR6 promotoru

K analýze DR6 promotoru nás vedlo zjištění, že exprese proteinu DR6 může být v některých buněčných liniích indukována ligandem TNF α přes aktivaci transkripčních faktorů rodiny NF- κ B nebo proteinem Wnt3A přes aktivaci transkripčních faktorů rodiny TCF/Lef [72]. Nejprve jsme tedy pomocí programu MatInspector (www.genomatix.de) zjistili počet, polohu a sekvenci jednotlivých DNA vazebných míst těchto faktorů v oblasti DR6 promotoru (viz Tab. 8,9).

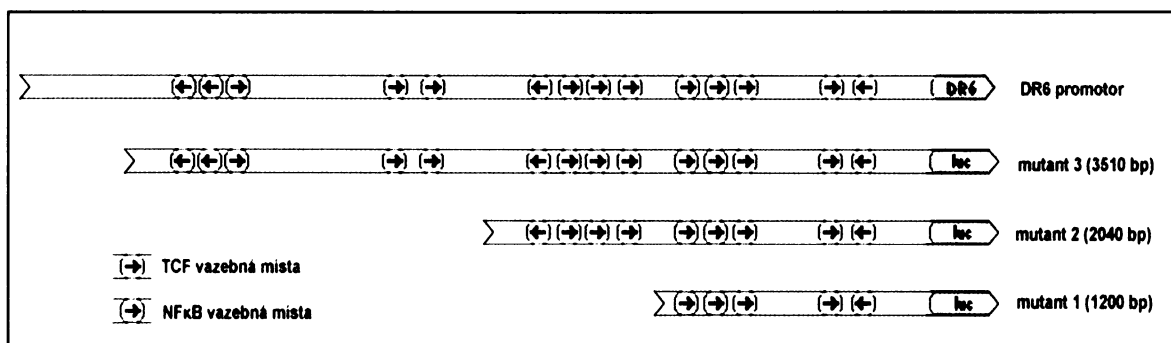
Na základě této informace jsme připravili 3 deleční mutanty DR6 promotoru (viz 4.5.1) tak, abychom po indukci TNF α (resp. Wnt3a) specifikovali vazebná místa pro NF- κ B (resp. TCF), přes která dochází k vazbě těchto faktorů a následné indukci exprese DR6 (viz Obr. 19).

NF κ B místa	DNA vlákno	aminokyseliny	sekvence
1	-	-3317 až -3305	caGGGAttacc
2	-	-3202 až -3190	ttgGGGAgaccct
3	+	-3184 až -3172	ctGGCAtttcct
4	+	-1035 až -1023	gtttggatTTCCt
5	+	-817 až -805	ccaggtgaTTCCa

Tab. 8: Přehled vazebných míst pro NF κ B v oblasti DR6 promotoru

TCF místa	DNA vlákno	aminokyseliny	sekvence
1	+	-2444 až -2428	ttcaattCAAAgtaata
2	+	-2263 až -2247	gaagtttCAAAgtggtc
3	-	-1824 až -1808	tgaaattCAAAggagtt
4	+	-1679 až -1663	aaagaatCAAAggacaa
5	+	-1550 až -1534	atgggacCAAAggagcc
6	+	-1372 až -1356	ggtgaaaCAAAgaaaag
7	+	-803 až -787	agggcagCAAAgtttga
8	+	-468 až -452	gacatcaCAAAgggccg
9	-	-322 až -306	gagagagCAAAggaacg

Tab. 9: Přehled vazebných míst pro TCF v oblasti DR6 promotoru



Obr. 19 Přehled mutantů DR6 promotoru a vazebných míst pro transkripční faktory NFκB a TCF.

4.4.1 PCR amplifikace fragmentů DR6 promotoru a příprava luciferasových reportérových konstruktů

Nejprve jsme připravili chromozomální DNA z buněčné linie HEK293 pomocí ZR Genomic DNA II Kitu. Metodou PCR a pomocí navržených primerů (viz 3.7.1) jsme amplifikovali následující fragmenty DR6 promotoru :

- **fragment 1 (velikost 1200 bp)**
 - primery DR6_prom_U4243 a DR6_prom_L5548
- **fragment 2 (velikost 2040 bp)**
 - primery DR6_prom_U3403 a DR6_prom_L5548
- **fragment 3 (velikost 3510 bp)**
 - tento fragment nešel amplifikovat (pravděpodobně kvůli své délce), proto jsme připravili fragment o velikosti 2400 bp pomocí primerů DR6_prom_U3164 a DR6_prom_L5548, poté fragment o velikosti 1110 bp pomocí primerů DR6_prom_U1933 a DR6_prom_L3183 a následně tyto dva fragmenty spojili metodou „linking PCR“ pomocí primerů DR6_prom_U1933 a DR6_prom_L5548.

Takto amplifikované fragmenty DR6 promotoru jsme naštěpili restrikními endonukleasami *SacI/XhoI*, vložili do restrikních míst vektoru pBSK (viz 3.2.2) a sekvenovali (viz 3.3.8).

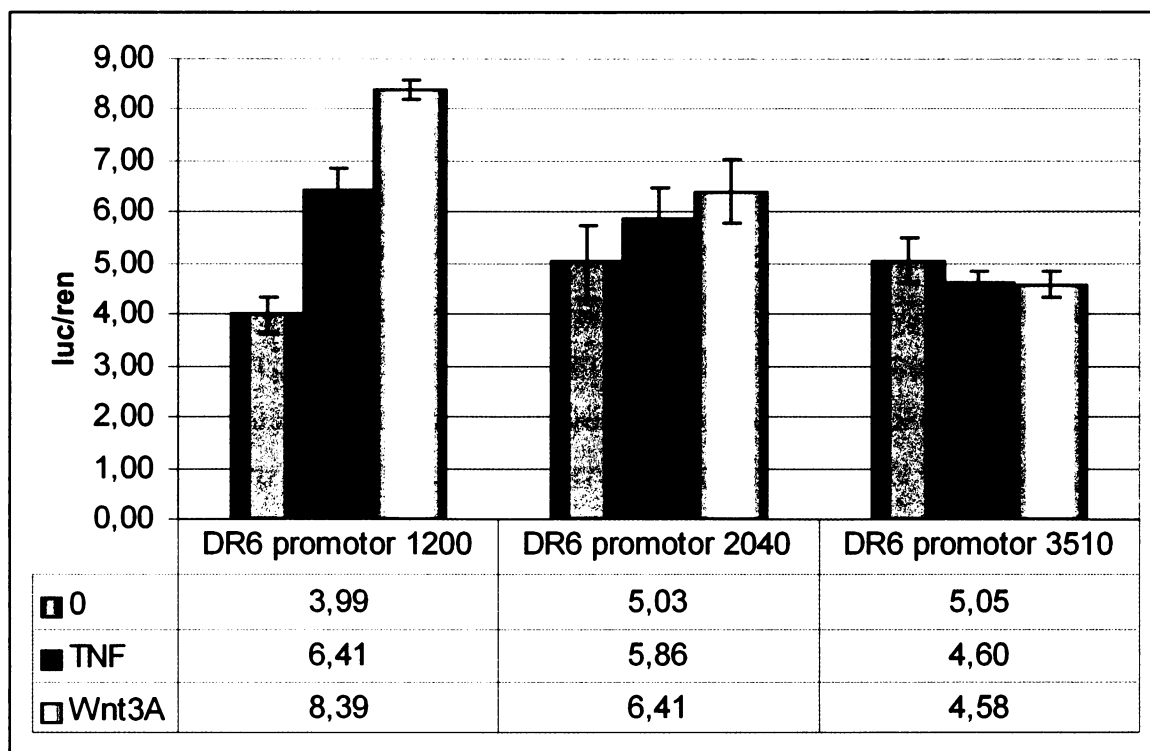
Po ověření sekvence jsme jednotlivé fragmenty vyštěpili opět restrikními endonukleasami *SacI/XhoI* a vložili je do restrikních míst *SacI/XhoI* reportérového vektoru pGL3 basic.

4.4.2 Analýza aktivit jednotlivých mutantů DR6 promotoru po stimulaci TNF a Wnt3a

Takto připravenými mutanty DR6 promotoru (viz 4.5.1) a kontrolním plazmidem (renilla, kontrola transfekce) jsme transfekovali buněčnou linii HEK293 (viz 3.5.1). Den po transfekci jsme buňky stimulovali TNF α (20ng/ml) a Wnt3a (3x naředěný supernatant Wnt3a produkujících buněk) a nechali opět inkubovat do druhého dne. Poté jsme z buněk připravili lyzáty (viz 3.7.2) a pomocí luminometru měřily aktivitu luciferas (jak „firefly“ tak kontrolní renilla luciferasy). Aktivita luciferasy byla normalizována na účinnost transfekce (tj. k aktivitě kontrolní renilla luciferasy) a vynesena do grafu (viz Obr. 20).

Z Obr. 20 je zřejmé, že pro expresi DR6 jsou důležitá NF κ B vazebná místa a TCF místa nacházející se v mutantu DR6 promotoru o velikosti 1200 bp.

Analýza promotoru DR6 bude dále provedena na různých buněčných liniích a po nalezení vhodného NF κ B (resp. TCF) místa bude provedena jeho mutace a analyzován efekt této mutace na TNF α (resp. Wnt3a) odpověď, ale tyto experimenty již nebudou součástí této práce.



Obr. 20

Grafické znázornění aktivit jednotlivých mutantů DR6 promotoru po stimulaci TNF α a Wnt3A.

Buněčné lyzáty připravené z buněk transfekovaných mutanty DR6 promotoru a kontrolním plazmidem (renilla) a den po transfekci stimulovaných TNF α , Wnt3A nebo nestimulovaných jsme použili k měření aktivity luciferasy pomocí luminometru. Aktivita luciferasy byla normalizována na účinnost transfekce (tj. k aktivitě kontrolní renilla luciferasy).

5 Diskuse

Receptory z rodiny TNFR mají zásadní význam v regulaci buněčně zprostředkované imunitní odpovědi, v regulaci zánětlivé odpovědi a zprostředkovávají řadu biologických funkcí, jakými jsou buněčná proliferace, diferenciace a apoptóza. Tato rodina membránových receptorů je charakterizována přítomností dvou nebo více domén bohatých na cystein ve své extracelulární části. Po navázání příslušných ligandů spouštějí různé signální dráhy vedoucí např. k aktivaci kaspas, transkripčního faktoru NF κ B nebo stresových kinas z rodiny JNK či MAP kinas.

Osm členů této rodiny tvoří samostatnou skupinu nazývanou receptory „smrti“ podle domény „smrti“ v jejich intracelulární části, která umožňuje interakci s různými adaptorovými proteiny. Funkce těchto proteinů spočívá ve zprostředkování interakce receptorů s jinými signálními molekulami a následně pak v závislosti na „připravenosti“ a typu buňky aktivaci výše zmíněných biologických odpovědí (proliferace, diferenciace, apoptóza).

Posledním objeveným členem této rodiny je receptor „smrti“ 6 (DR6). Ligand DR6 nebyl doposud objeven. Podle publikovaných údajů neinteraguje s žádnými známými vazebnými partnery ostatních receptorů „smrti“ kromě slabé interakce s adaptorovým proteinem TRADD [71]. Nadprodukce DR6 v HeLa buňkách vede ke zvýšené apoptóze, nadprodukce DR6 v buňkách HEK293 způsobuje aktivaci NF κ B a JNK [71].

Charakterizace DR6-deficientních myší ukázala, že DR6 pravděpodobně hraje významnou roli v proliferaci a diferenciaci jak T-lymfocytů, tak B-lymfocytů [76, 77]. Jelikož přenos T-lymfocytů z dárcovské DR6-deficientní myši do alogenního příjemce způsobuje rychlejší nástup reakce štěpu proti hostiteli, předpokládá se, že by identifikace a využití ligandu DR6 nebo agonistických protilátek proti extracelulární části DR6 mohlo vést k vývoji terapeutických prostředků proti T-lymfocyty či B-lymfocyty zprostředkovaným onemocněním, jako je akutní reakce štěpu proti hostiteli.

Vzhledem k významu DR6 při regulaci imunitní odpovědi je (kromě identifikace ligandu) nesporně důležité i charakterizovat signalizaci indukovanou aktivovaným DR6. Jedním z přístupů je vyhledávání a charakterizace proteinů interagujících s jeho intracelulární částí. K tomuto vyhledávání jsme použili kvasinkový dvouhyb-

ridní systém a DR6 interagující proteiny jsme vyhledávali v cDNA knihovně z HeLa buněk, a to zejména kvůli výrazně zvýšené expresi DR6 v této buněčné linii [71]. Podařilo se nám identifikovat celkem 6 různých proteinů- SNX3, CPNE7, CHORDC1, FIP1L1, GTPbp, CGI-107, interagujících v kvasinkách *S. cerevisiae* specificky s C-koncovou doménou DR6. V rámci této diplomové práce jsme pak podrobněji charakterizovali dva z nich – Sorting Nexin 3 (SNX3) a Copine 7 (CPNE7).

SNX3 je součástí endozomů a pravděpodobně se účastní recyklace membránových proteinů [81]. CPNE7 ovlivňuje aktivaci JNK1 z TNFR1 receptoru [83] a tedy by mohl analogicky ovlivňovat i signalizaci z DR6.

Interakci SNX3 s DR6 v lidských epiteliální buněčné linii HEK293 jsme prokázali pomocí jejich koimunoprecipitace oběma směry (SNX3 koprecipitoval s DR6 a také DR6 koprecipitoval se SNX3). Analýza buněčné distribuce nadprodukovaných proteinů v MDCK buňkách pomocí konfokální mikroskopie prokázala jejich kolokalizaci v buněčných strukturách podobných endosomům. Nezodpovězenou a další studium vyžadující otázkou zatím zůstává funkční rozměr interakce SNX3 s DR6. Sorting Nexiny obsahují tzv. SNX Phox homologní doménu (SNX-PX). Tato doména váže fosfatidyl inositidy (SNX3 váže fosfatidylinositol-3-fosfát a je pravděpodobně důležitá pro membánovou lokalizaci sorting nexinů [79]. SNX3 patří k nejmenším z celkem 29 členů této rodiny a kromě SNX-PX domény neobsahuje žádnou jinou funkčně definovanou oblast. Nadprodukce SNX3 negativně ovlivní funkci recyklujících a pozdních endosomů [81, 84]. SNX3 je také mutován u pacientů s mikrocephalií a mikroftalémií [85]. SNX3 by mohl ovlivňovat jak recyklaci, tak degradaci DR6. K další funkční charakterizaci interakce SNX3 s DR6 využijeme jak nadprodukovaného (stabilní transfektant v HeLa buňkách), tak buněk s pomocí SNX3 shRNA sníženou expresí SNX3 a budeme sledovat vliv těchto podmínek na buněčnou lokalizaci, signalizaci (nadprodukovaný DR6) a stabilitu DR6. K této analýze také využijeme námi připravenou anti-SNX3 polyklonální protilátku.

Oproti „oboustranné“ koprecipitaci SNX3 s DR6 jsme specificky precipitovali pouze DR6 s Myc značeným CPNE7. Při použití DR6 protilátky pro koprecipitaci CPNE7 se nám CPNE7 koprecipitoval i s mutantním DR6 neobsahujícím intrace-

lulární část (čili neobsahujícím DR6 interakční doménu). Pravděpodobně je nadprodukován CPNE7 tzv. „lepivý“ a jedná se o nespecifickou vazbu CPNE7 na anti-DR6 Sepharosu či krosreaktivitu s DR6 protilátkou.

Copiny tvoří rodinu na vápníku závislých (obsahuje vápník vazebnou C2 doménu), fosfolipidy vazebných proteinů účastnících se membránového transportu a protein-proteinových interakcí [86]. Dominantně negativní mutant CPNE1 blokuje TNF α iniciovanou aktivaci NF κ B, čímž ovlivňuje TNFR1 indukovanou signalizaci [83]. V našich experimentech nadprodukováný CPNE7 inhiboval nadprodukováným DR6 způsobenou aktivaci JNK. Jakým způsobem mohou copiny ovlivňovat aktivaci NF κ B či stresových kinas z těchto receptorů je předmětem našeho dalšího výzkumu. Bez zajímavosti také není zjištění, že CPNE7 je mutován v karcinomech prsu [87].

Vzhledem k možné funkci DR6 v regulaci imunitní odpovědi by bylo zajímavé analyzovat signalizaci, která ovlivňuje transkripci DR6. Jedním z regulátorů této exprese je i TNF α , pravděpodobně přes aktivaci NF κ B [72]. Dalším regulátorem exprese/transkripce DR6 mohou být i transkripční faktory rodiny TCF (Wnt indukovaná signalizace). Analýza delečních mutantů DR6 promotoru ukázala, že jak TNF α , tak i Wnt3a aktivovaly expresi DR6. Avšak pouze nejkratší deleční mutant DR6 promotoru (1200 nt) byl výše zmíněnými cytokiny významně aktivovatelný. Je možné, že delší úseky DR6 promotoru obsahují sekvenční elementy negativně ovlivňující transkripci z tohoto promotoru. V naší další práci chceme analyzovat vliv TNF α a ligandů rodiny Wnt na transkripci DR6 i v jiných buněčných liniích a také chceme pomocí chromatinové imunoprecipitace zjistit, která vazebná místa pro NF κ B či TCF transkripční faktory jsou důležitá pro TNF α či Wnt3a aktivovanou expresi DR6.

6 Závěr

- Pomocí kvasinkového dvouhybridního systému s intracelulární částí DR6 za použití cDNA knihovny z HeLa buněk bylo nalezeno šest proteinů, které v kvasinkách *S. cerevisiae* specificky interagují s intracelulární částí receptoru DR6
 - SNX3
 - CPNE7
 - CHORDC1
 - FIP1L1
 - GTPbp
 - CGI-107
- Mapováním interakce pomocí kvasinkového dvouhybridního systému bylo ověřeno, že všech šest nalezených proteinů interaguje specificky v kvasinkách s C-koncovou doménou intracelulární části DR6. K další analýze byly vybrány proteiny Sorting nexin-3 a Copine-7
- Interakce SNX3 a CPNE7 s DR6 byla potvrzena pomocí koexprese a následné koimunoprecipitace také v savčích buňkách.
- Nadprodukce SNX3 a DR6 v MDCK buňkách vedla k jejich kolokalizaci ve vezikulárních strukturách podobných endozomům. SNX3 hraje pravděpodobně roli v recyklaci v nitrobuněčné lokalizaci DR6.
- V *E. coli* byl nadprodukován SNX3, purifikován a použit na přípravu králičí polyklonální protilátky, jejíž specifita a reaktivita byla také ověřena.
- Po nadprodukcí CPNE7 a DR6 v buňkách HEK293 nedocházelo k aktivaci stresové kinasy JNK způsobené samotnou nadprodukcí DR6, což znamená, že CPNE7 je možným regulátorem signalizace z receptoru DR6.
- Transkripce DR6 je aktivovatelná cytokiny TNF α a Wnt3a, a to zřejmě přes aktivaci transkripčních faktorů z rodiny NF κ B a TCF.

Použitá literatura

1. Granger, G.A., Shacks, S. J., Williams, T. W., Kobl, W.P., *Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells*. Nature, 1969. **221**(5186): p. 1155-1157.
2. Smith, C.A., T. Farrah, and R.G. Goodwin, *The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death*. Cell, 1994. **76**(6): p. 959-962.
3. Baichwal, V.R. and P.A. Baeuerle, *Activate NF-kappa B or die?* Curr Biol, 1997. **7**(2): p. R94-R96.
4. Cleveland, J.L. and J.N. Ihle, *Contenders in FasL/TNF death signaling*. Cell, 1995. **81**(4): p. 479-482.
5. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
6. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 745-756.
7. Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., Lu, S.D., *A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF*. Cell, 1988. **53**(1): p. 45-53.
8. Tang, P., M.C. Hung, and J. Klostergaard, *Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer*. Biochemistry, 1996. **35**(25): p. 8216-8225.
9. Mariani, S.M. and P.H. Krammer, *Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage*. Eur J Immunol, 1998. **28**(3): p. 973-982.
10. Powell, W.C., Fingleton, B., Wilson, C. L., Boothby, M., Matrisian, L. M., *The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis*. Curr Biol, 1999. **9**(24): p. 1441-1447.
11. Chen, Y., Molloy, S. S., Thomas, L., Gambee, J., Bachinger, H. P., Ferguson, B., Zonana, J., Thomas, G., Morris, N. P., *Mutations within a furin consensus sequence block proteolytic release of ectodysplasin-A and cause X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7218-7223.
12. Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J. L., Holler, N., Ambrose, C., Lawton, P., Bixler, S., Acha-Orbea, H., Valmori, D., Romero, P., Werner-Favre, C., Zubler, R. H., Browning, J. L., Tschopp, J., *BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1747-1756.
13. Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., Goeddel, D. V., *A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor*. Cell, 1994. **78**(4): p. 681-692.
14. Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., Goeddel, D. V., *TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1*. Nature, 1996. **383**(6599): p. 443-446.
15. Cheng, G. and D. Baltimore, *TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD 40L-mediated NF-kappaB activation*. Genes Dev, 1996. **10**(8): p. 963-973.

16. Malinin, N.L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V., Wallach, D., *MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1*. Nature, 1997. **385**(6616): p. 540-544.
17. Song, H.Y., Regnier, C. H., Kirschning, C. J., Goeddel, D. V., Rothe, M., *Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9792-9796.
18. Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., Goeddel, D. V., *The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins*. Cell, 1995. **83**(7): p. 1243-1252.
19. Saurin, A.J., Borden, K. L., Boddy, M. N., Freemont, P. S., *Does this have a familiar RING?* Trends Biochem Sci, 1996. **21**(6): p. 208-214.
20. Freemont, P.S., *RING for destruction?* Curr Biol, 2000. **10**(2): p. R84-R87.
21. Chung, J.Y., Park, Y. C., Ye, H., Wu, H., *All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 4): p. 679-688.
22. Dadgostar, H. and G. Cheng, *An intact zinc ring finger is required for tumor necrosis factor receptor-associated factor-mediated nuclear factor-kappaB activation but is dispensable for c-Jun N-terminal kinase signaling*. J Biol Chem, 1998. **273**(38): p. 24775-24780.
23. Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., Goeddel, D. V., *TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40*. Science, 1995. **269**(5229): p. 1424-1427.
24. Takeuchi, M., M. Rothe, and D.V. Goeddel, *Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins*. J Biol Chem, 1996. **271**(33): p. 19935-19942.
25. Brink, R. and H.F. Lodish, *Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 2A (TRAF2A), a TRAF2 splice variant with an extended RING finger domain that inhibits TNFR2-mediated NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 4129-4134.
26. Dempsey, P.W., Doyle, S. E., He, J. Q., Cheng, G., *The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(3-4): p. 193-209.
27. Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G., Gentz, R., Dixit, V. M., *An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL*. Science, 1997. **277**(5327): p. 815-818.
28. Sheridan, J.P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C. L., Baker, K., Wood, W. I., Goddard, A. D., Godowski, P., Ashkenazi, A., *Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors*. Science, 1997. **277**(5327): p. 818-821.
29. Marsters, S.A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A. D., Godowski, P., Ashkenazi, A., *A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain*. Curr Biol, 1997. **7**(12): p. 1003-1006.

30. Tartaglia, L.A., Ayres, T. M., Wong, G. H., Goeddel, D. V., *A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death*. Cell, 1993. **74**(5): p. 845-853.
31. Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., Boyle, W. J., *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell, 1998. **93**(2): p. 165-176.
32. Nagata, S., *Apoptosis by death factor*. Cell, 1997. **88**(3): p. 355-365.
33. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-1308.
34. Gumieny, T.L., Brugnera, E., Tosello-Trampont, A. C., Kinchen, J. M., Haney, L. B., Nishiwaki, K., Walk, S. F., Nemergut, M. E., Macara, I. G., Francis, R., Schedl, T., Qin, Y., Van Aelst, L., Hengartner, M. O., Ravichandran, K. S., *CED-12/ELMO, a novel member of theCrkl/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration*. Cell, 2001. **107**(1): p. 27-41.
35. Zhou, L., Schnitzler, A., Agapite, J., Schwartz, L. M., Steller, H., Nambu, J. R., *Cooperative functions of the reaper and head involution defective genes in the programmed cell death of Drosophila central nervous system midline cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5131-5136.
36. Hengartner, M.O. and H.R. Horvitz, *C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2*. Cell, 1994. **76**(4): p. 665-676.
37. Brodsky, M.H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G. M., Abrams, J. M., *Drosophila p53 binds a damage response element at the reaper locus*. Cell, 2000. **101**(1): p. 103-113.
38. Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V. M, *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis*. Cell, 1995. **81**(4): p. 505-512.
39. Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Dixit, V. M., *An induced proximity model for caspase-8 activation*. J Biol Chem, 1998. **273**(5): p. 2926-2930.
40. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. **94**(4): p. 481-490.
41. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., Peter, M. E., *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. Embo J, 1998. **17**(6): p. 1675-1687.
42. Zha, J., Weiler, S., Oh, K. J., Wei, M. C., Korsmeyer, S. J., *Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1761-1765.
43. Tartaglia, L.A. and D.V. Goeddel, *Two TNF receptors*. Immunol Today, 1992. **13**(5): p. 151-153.
44. Beg, A.A. and D. Baltimore, *An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death*. Science, 1996. **274**(5288): p. 782-784.

45. Hsu, H., J. Xiong, and D.V. Goeddel, *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation*. Cell, 1995. **81**(4): p. 495-504.
46. Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G., Goeddel, D. V., *TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways*. Cell, 1996. **84**(2): p. 299-308.
47. Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V., Goeddel, D. V., *TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex*. Immunity, 1996. **4**(4): p. 387-96.
48. Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Yu, G. L., Lyons, R. H., Garg, M., Duan, D. R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J., Dixit, V. M., *Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95*. Science, 1996. **274**(5289): p. 990-992.
49. Marsters, S.A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Brush, J., Goddard, A., Ashkenazi, A., *Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3*. Curr Biol, 1998. **8**(9): p. 525-528.
50. Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., Hsu, Y. M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., Browning, J. L., *TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 32401-32410.
51. Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-682.
52. Marsters, S.A., Pitti, R. M., Donahue, C. J., Ruppert, S., Bauer, K. D., Ashkenazi, A., *Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA*. Curr Biol, 1996. **6**(6): p. 750-752.
53. Mariani, S.M., Matiba, B., Armandola, E. A., Krammer, P. H, *Interleukin 1 beta-converting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells*. J Cell Biol, 1997. **137**(1): p. 221-229.
54. Screaton, R.A., L.Z. Penn, and C.P. Stanners, *Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, cooperates with Myc and Bcl-2 in cellular transformation*. J Cell Biol, 1997. **137**(4): p. 939-952.
55. Jeremias, I., Herr, I., Boehler, T., Debatin, K. M, *TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(1): p. 143-152.
56. Sprick, M.R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H., Walczak, H., *FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 599-609.
57. Kischkel, F.C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J., Ashkenazi, A., *Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 611-620.
58. Kischkel, F.C., Lawrence, D. A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., Ashkenazi, A., *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 46639-46646.

59. Wang, J., Chun, H. J., Wong, W., Spencer, D. M., Lenardo, M. J., *Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13884-13888.
60. LeBlanc, H.N. and A. Ashkenazi, *Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 66-75.
61. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy*. Apoptosis, 2002. **7**(5): p. 449-459.
62. Walczak, H. and P.H. Krammer, *The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems*. Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 58-66.
63. Headon, D.J. and P.A. Overbeek, *Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 370-374.
64. Monreal, A.W., Ferguson, B. M., Headon, D. J., Street, S. L., Overbeek, P. A., Zonana, J., *Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 366-369.
65. Bibel, M. and Y.A. Barde, *Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system*. Genes Dev, 2000. **14**(23): p. 2919-2937.
66. Salehi, A.H., Roux, P. P., Kubu, C. J., Zeindler, C., Bhakar, A., Tannis, L. L., Verdi, J. M., Barker, P. A., *NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis*. Neuron, 2000. **27**(2): p. 279-288.
67. Lee, K.F., Li, E., Huber, L. J., Landis, S. C., Sharpe, A. H., Chao, M. V., Jaenisch, R., *Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system*. Cell, 1992. **69**(5): p. 737-749.
68. Baker, S.J. and E.P. Reddy, *Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins*. Oncogene, 1996. **12**(1): p. 1-9.
69. Tartaglia, L.A. and D.V. Goeddel, *Tumor necrosis factor receptor signaling. A dominant negative mutation suppresses the activation of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor*. J Biol Chem, 1992. **267**(7): p. 4304-4307.
70. Pawson, T. and J.D. Scott, *Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins*. Science, 1997. **278**(5346): p. 2075-2080.
71. Pan, G., Bauer, J. H., Haridas, V., Wang, S., Liu, D., Yu, G., Vincenz, C., Aggarwal, B. B., Ni, J., Dixit, V. M., *Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor*. FEBS Lett, 1998. **431**(3): p. 351-356.
72. Kasof, G.M., Lu, J. J., Liu, D., Speer, B., Mongan, K. N., Gomes, B. C., Lorenzi, M. V., *Tumor necrosis factor-alpha induces the expression of DR6, a member of the TNF receptor family, through activation of NF-kappaB*. Oncogene, 2001. **20**(55): p. 7965-7975.
73. Jacobson, M.D., M. Weil, and M.C. Raff, *Programmed cell death in animal development*. Cell, 1997. **88**(3): p. 347-354.
74. Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie, *Cell death: the significance of apoptosis*. Int Rev Cytol, 1980. **68**: p. 251-306.
75. Liu, J., Na, S., Glasebrook, A., Fox, N., Solenberg, P. J., Zhang, Q., Song, H. Y., Yang, D. D., *Enhanced CD4+ T cell proliferation and Th2 cytokine production in DR6-deficient mice*. Immunity, 2001. **15**(1): p. 23-34.

76. Zhao, H., Yan, M., Wang, H., Erickson, S., Grewal, I. S., Dixit, V. M., *Impaired c-Jun amino terminal kinase activity and T cell differentiation in death receptor 6-deficient mice.* J Exp Med, 2001. **194**(10): p. 1441-1448.
77. Schmidt, C.S., Liu, J., Zhang, T., Song, H. Y., Sandusky, G., Mintze, K., Benschop, R. J., Glasebrook, A., Yang, D. D., Na, S., *Enhanced B cell expansion, survival, and humoral responses by targeting death receptor 6.* J Exp Med, 2003. **197**(1): p. 51-62.
78. Liu, J., Heuer, J. G., Na, S., Galbreath, E., Zhang, T., Yang, D. D., Glasebrook, A., Song, H. Y., *Accelerated onset and increased severity of acute graft-versus-host disease following adoptive transfer of DR6-deficient T cells.* J Immunol, 2002. **169**(7): p. 3993-3998.
79. Worby, C.A. and J.E. Dixon, *Sorting out the cellular functions of sorting nexins.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(12): p. 919-931.
80. Haft, C.R., de la Luz Sierra, M., Barr, V. A., Haft, D. H., Taylor, S. I., *Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(12): p. 7278-7287.
81. Xu, Y., Hortsman, H., Seet, L., Wong, S. H., Hong, W., *SNX3 regulates endosomal function through its PX-domain-mediated interaction with PtdIns(3)P.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(7): p. 658-666.
82. Creutz, C.E., Tomsig, J. L., Snyder, S. L., Gautier, M. C., Skouri, F., Beisson, J., Cohen, J., *The copines, a novel class of C2 domain-containing, calcium-dependent, phospholipid-binding proteins conserved from Paramecium to humans.* J Biol Chem, 1998. **273**(3): p. 1393-1402.
83. Tomsig, J.L., H. Sohma, and C.E. Creutz, *Calcium-dependent regulation of tumour necrosis factor-alpha receptor signalling by copine.* Biochem J, 2004. **378**(Pt 3): p. 1089-1094.
84. Tai, G., Lu, L., Wang, T. L., Tang, B. L., Goud, B., Johannes, L., Hong, W., *Participation of the syntaxin 5/Ykt6/GS28/GS15 SNARE complex in transport from the early/recycling endosome to the trans-Golgi network.* Mol Biol Cell, 2004. **15**(9): p. 4011-4022.
85. Vervoort, V.S., Holden, K. R., Ukadike, K. C., Collins, J. S., Saul, R. A., Srivastava, A.K., *POMGnT1 gene alterations in a family with neurological abnormalities.* Ann Neurol, 2004. **56**(1): p. 143-148.
86. Tomsig, J.L. and C.E. Creutz, *Copines: a ubiquitous family of Ca(2+)-dependent phospholipid-binding proteins.* Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(9): p. 1467-1477.
87. Savino, M., d'Apolito, M., Centra, M., van Beerendonk, H. M., Cleton-Jansen, A. M., Whitmore, S. A., Crawford, J., Callen, D. F., Zelante, L., Savoia, A., *Characterization of copine VII, a new member of the copine family, and its exclusion as a candidate in sporadic breast cancers with loss of heterozygosity at 16q24.3.* Genomics, 1999. **61**(2): p. 219-226.

