

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Maged2 interagit-il avec gaq: étude par double-hybride et coimmunoprécipitation

Cordier, Lionel

Award date:
2007

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRE NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des sciences

Maged2 interagit-il avec Gαq : étude par double-hybride et coimmunoprécipitation.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de licencié en sciences biologiques

Lionel cordier

Aout 2007

Je tiens à remercier Olivier Debacker pour son aide dans la réalisation de ce mémoire.

Un grand merci à Christiane pour son aide.

Et je fais un clin d'œil à Carlos, Marie, Dominique, Poornima, Aurélie et Tuan .

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Lionel Cordier

Maged2 interagit-il avec G_{as} ? Analyse par double hybride et coimmunoprécipitation

Résumé :

Le génome humain et celui de la souris contiennent plusieurs dizaines de gènes spécifiant des protéines MAGE. Certaines de ces protéines ne sont exprimées que dans les cellules germinales et dans certaines tumeurs cancéreuses où leur présence peut conduire à l'expression d'antigènes tumoraux. D'autres protéines MAGE sont au contraire exprimées dans un grand nombre de tissus normaux chez l'embryon et chez l'adulte. La protéine Maged2 appartient à cette deuxième catégorie. La fonction de Maged2 est totalement inconnue, mais son absence entraîne des hémorragies et une létalité périnatale chez la souris. Un crible double hybride a permis d'identifier une interaction entre Maged2 et la protéine G_{α_s} . Au cours de ce mémoire, nous avons recherché une éventuelle interaction entre Maged2 et une protéine G_{α_q} , en utilisant d'une part la méthode du double hybride, et d'autre part, la méthode de la coimmunoprécipitation. Dans les deux cas, nous n'avons pas pu observer d'interaction entre Maged2 et G_{α_q} . Ceci indique que Maged2 n'interagit pas avec tous les membres de la famille G_{α} , mais bien spécifiquement avec G_{α_s} , et peut-être d'autres membres de la famille. La signification biologique de cette interaction reste à identifier.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Aout 2007

Promoteur: O. Debacker

Table des matières

1. Introduction.....	5
1.1. Les gènes MAGE : une famille multigénique.....	5
1.2. Le MHD : domaine d'homologie MAGE	7
1.3. Les gènes MAGE de type I.....	7
1.3.1. La famille MAGEA.....	7
1.3.2. La famille MAGEB.....	8
1.3.3. La famille MAGEC.....	8
1.4. Les gènes MAGE de type II.....	9
1.4.1. Le gène NECDIN.....	9
1.4.2. La famille MAGED	10
a) MAGED1.....	10
b) MAGED2.....	12
c) Interaction entre MAGED2 et Gas.....	13
d) MAGED3.....	14
1.4.3. Profil d'expression des gènes MAGE de type II.....	14
1.5. GPCR : Protéines G Couplées aux Récepteurs.....	15
1.5.1. Rôle de la structure des différentes sous-unités α	17
1.5.2. Gnaq.....	17
1.6. Double hybride.....	18

1.7. But du mémoire.....	19
2. Résultats, discussions et perspectives : Maged2 interagit-il avec <i>Gaq</i> ?	
2.1. Test d'interaction in vivo en double-hybride dans la levure.....	20
2.1.1. Construction de plasmide pACT2-Gnaq.....	20
2.1.2. Vérification de la présence de pGBT9- <i>Maged2</i> dans les levures Y190.....	23
2.1.3. Test d'interaction double-hybride dans la levure.....	24
2.2. Test d'interaction entre <i>Maged2</i> et <i>Gaq</i> par co-immunoprécipitation.....	27
2.2.1. Construction du plasmide pCMV-HA.GNAQ.....	27
2.2.2. pcDNA3/His- <i>Maged2</i>	29
2.2.3. Test d'interaction par co-immunoprécipitation entre <i>Maged2</i> et <i>Gaq</i> . ..	30
2.2.4. Discussions et perspectives.....	33
2.3. Conclusion.....	34
3. Matériel et méthodes	
3.1. Clonage GNAQ et double-hybride.....	35
3.1.1. PCR sur ADNc de cœur et d'aorte de souris.....	35
3.1.2. Purification des produits PCR par Wizard.....	35
3.1.3. Restriction des extrémités des produits PCR.....	35
3.1.4. Purification des produits PCR restreints par phénol-CIAA.....	36
3.1.5. Déphosphorylation par la CIP des vecteurs linéarisés et purification par extraction au phénol et précipitation à l'alcool.....	36
3.1.6. Ligation des inserts dans le plasmide d'intérêt.....	36
3.1.7. Transformation d'E.Coli DH11α électro-compétentes.....	37
3.1.8. Mini préparation d'ADN plasmidique par lyse alcaline.....	37
3.1.9. Criblage des clones d'intérêt.....	37

A) Par PCR

B) Par restriction	
3.2. Double-hybride.....	38
3.2.1. Transformation de la levure.....	38
3.2.2. Mise en évidence de l'activité β -galactosidase en coulant l'X-gal sur boîte.....	39
3.2.3. Extraction des protéines de levure.....	39
3.3. Transfection des cellules et co-immunoprécipitation.....	40
3.3.1. Transfection des cellules HEK 293 T	40
A) Préparation des cellules	
B) Transfection	
3.3.2. Western blot sur lysats.....	41
A) Préparation des lysats	
B) SDS-PAGE	
3.3.3. Transfert semi-dry sur membrane PVDF.....	42
3.3.4. Détection des protéines.....	42
3.3.5. Co-immunoprécipitation.....	42
3.4. Séquence des primers.....	43
3.5. Matériel.....	43
4. Bibliographie.....	45

Table des abréviations

Ac : Anticorps

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

Amp^R : Ampicilline Resistant

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

mM: milli Molaire

ON: Over Night

ORF: Open Reading Frame

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

PM : Poids Moléculaire

Pb : Paire de bases

rpm : radiant par minute

RT : Transcription Inverse

TA : Température Ambiante

Vol : Volume

1. Introduction

1.1. Les gènes *MAGE* : une famille multigénique

Le premier gène *MAGE* fut identifié en 1991 à l'Institut Ludwig de Bruxelles. Le produit de ce gène code pour un peptide antigénique qui est reconnu sur des cellules de mélanome par un clone de lymphocyte T cytotoxique (CTL), d'où le nom qui lui fut attribué : *MAGEA1*, pour Melanoma Antigène Encoding Gene A1. Par après, d'autres peptides antigéniques dérivés de différentes protéines *MAGE* furent découverts dans différentes lignées de cellules cancéreuses. En 1994, des expériences d'hybridation utilisant comme sonde *MAGEA1* montrèrent que ce gène appartenait à une famille de 12 gènes localisés sur le chromosome X, en position q28 (De Plaen et al, 1994). À la suite de cette découverte, d'autres chapelets de gènes *MAGE* furent découverts, dont le premier fut celui des *MAGEB* qui comprend 17 gènes situés en Xp21. Ensuite, les gènes *MAGEC*, situés en Xq26-27, ont été identifiés (figure1).

Tous ces gènes sont silencieux dans les tissus normaux, excepté dans les cellules de la lignée germinale mâle et, pour certains, dans le placenta. Ils sont exprimés dans des cellules tumorales de différents types histologiques où ils spécifient l'apparition d'antigènes reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Ils constituent donc des cibles intéressantes pour l'immunothérapie contre le cancer, par vaccination des patients avec l'antigène.

Les cellules de la lignée germinale mâle n'exprimant pas de molécules du MHC à leur surface, une réaction auto-immune dans les testicules paraît peu probable. Des réductions de tumeurs ont été observées chez de nombreux patients atteints d'un cancer après immunisation contre l'antigène codé par *MAGEA3* (Marchand et al, 1999).

Plus récemment, une quatrième famille de gènes *MAGE*, localisée sur le chromosome X en position p11.23 (figure 1), fut identifiée. Ils furent nommés *MAGED* et ils diffèrent des autres gènes *MAGE* par le profil spatio-temporel de leur expression. En effet, ils sont exprimés dans de nombreux tissus normaux adultes ce qui n'est pas le cas pour les gènes *MAGEA*, B et C (Chomez, De Backer et al, 2001).

Le séquençage complet du génome humain permet d'identifier un total de 55 gènes que l'on a classés en 13 sous-familles sur base de leurs homologies de séquences et de leur localisation chromosomique. Chez la souris, on compte 31 gènes *Mage* répartis en 11 sous-familles (Chomez, De Backer et al, 2001).

On distingue 2 catégories de gènes *MAGE* en fonction de leurs profils d'expressions. Les gènes *MAGE A*, *B* et *C* sont classés comme gène *MAGE* de type I car leur expression est

limitée au testicule et aux tumeurs cancéreuses. Les gènes *MAGE* de type II sont représentés par le gène *NECDIN* et par les gènes *MAGED*, *E*, *F*, *D*, *H*, *I*, *K* et *L*. Ces gènes sont exprimés dans de nombreux tissus non tumoraux chez l'adulte et au cours du développement embryonnaire.

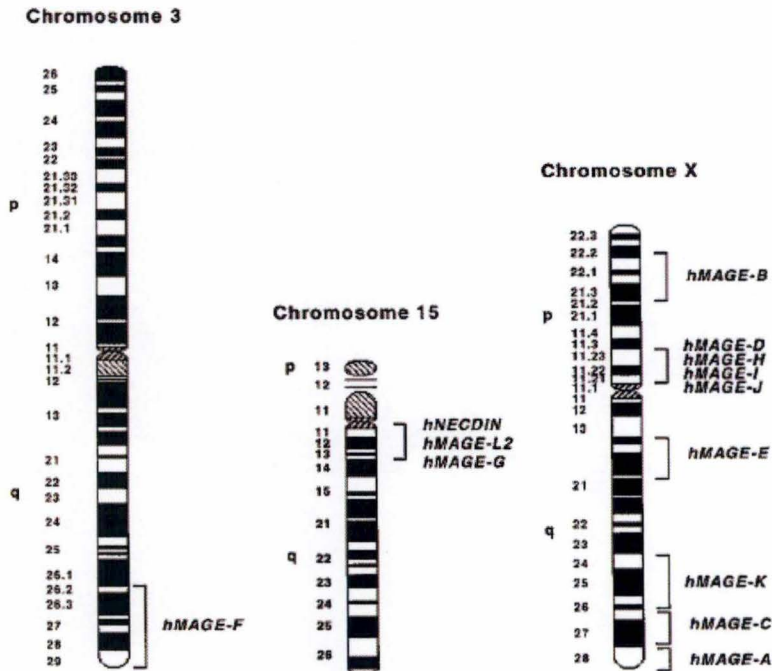


Figure 1: Localisation chromosomique des gènes *MAGE* humains.

1.2. Le MHD : domaine d'homologie MAGE

Lorsque l'on compare les séquences des différentes protéines MAGE, on constate qu'il existe un domaine partagé de 200 acides aminés nommé MHD (MAGE homology domain) (figure 2) que l'on retrouve dans toutes les protéines MAGE.

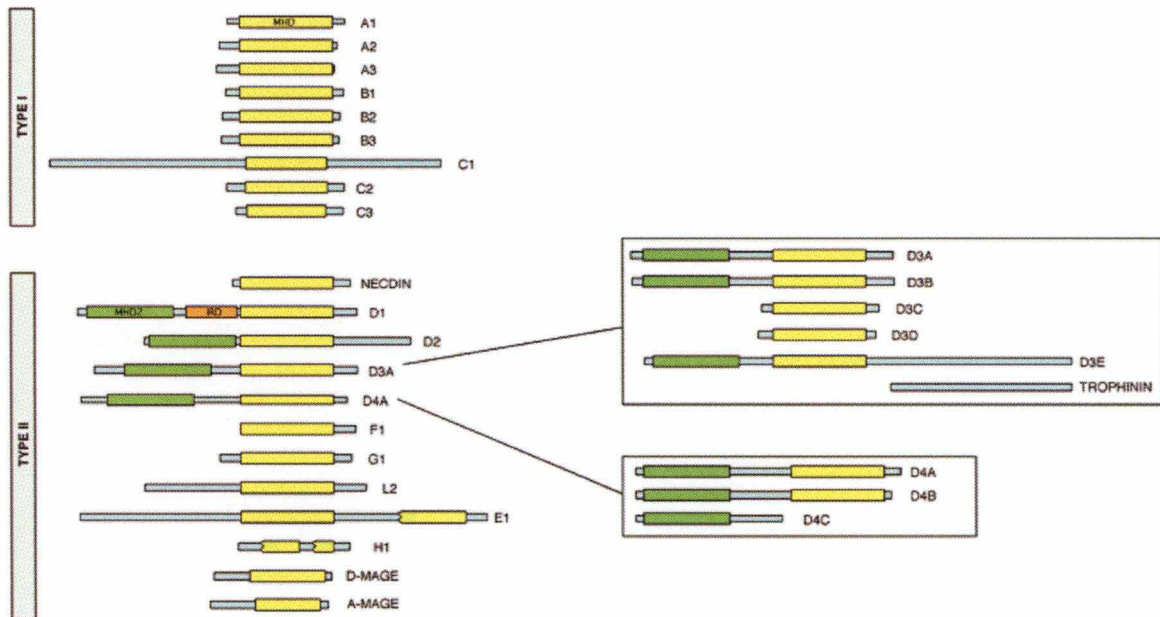


Figure 2: Représentation du MHD (en jaune) dans différentes protéines MAGE.

1.3. Les gènes Mage de type I

1.3.1. La famille MAGEA

La famille *MAGEA* comprend 12 gènes qui se trouvent sur le chromosome X en position q 28. Le promoteur des gènes *MAGEA* contient des îlots CpG qui sont méthylés dans les tissus normaux sauf dans les cellules germinales mâles (De Smet et al, 1996). Dans les tumeurs, ces îlots se déméthylent et l'expression de ces gènes est induite.

La partie codante des *MAGEA* est restreinte au dernier exon et spécifie des protéines de 314 à 429 acides aminés. *MAGEA4* et *MAGEA11* possèdent plusieurs promoteurs, ce qui permettrait une expression différente selon les tissus (tumeurs, testicules).

Plus récemment, il a été montré que *MAGEA1* pouvait interagir avec SKIP, une protéine qui fait le lien entre des protéines qui se lient à l'ADN et des protéines qui activent ou répriment la transcription. Par cette interaction, *MAGEA1* inhibe l'activation de NICD (Notch IntraCellular Domain). *MAGEA1* recrute aussi l'histone déacétylase 1 (HADC1) qui réprime l'expression génique (De Plaen et AL ; 2004) (figure3).

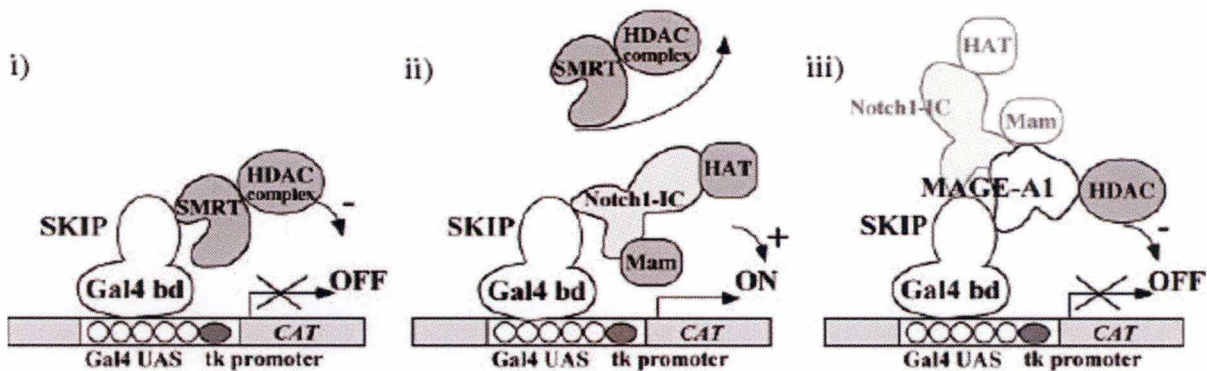


Figure 3: Fonction de MAGEA1 dans la régulation de la transcription.

Récemment, il a été montré que MAGEA4 pouvait interagir avec la Gankyrine, une oncoprotéine. Cette découverte fut réalisée lors d'un cribble double hybride. L'étude montra que lorsque MAGEA4 (par son extrémité C-terminale) interagit avec la Gankyrine il supprime l'effet oncogénique de cette protéine (Nagao et al ; 2003).

1.3.2. La famille MAGEB

Il existe 17 gènes MAGEB chez l'être humain et 10 chez la souris. Tout comme les gènes *MAGEA*, ils ne sont exprimés que dans les testicules. *MAGEB1* et *B2* sont situés sur le chromosome X en position p21.1-22.1 (entre les loci *Zfx* et *Ar* chez la souris) et ils codent pour une protéine de 330 acides aminés encodée par le dernier exon. Le gène *MAGEB3* est localisé sur un autosome et sa structure est celle d'un rétrogène. Il code pour une protéine qui ne diffère que de 11 acides aminés par rapport aux protéines *MAGEB1* et *B2* (De Backer et al, 1995).

Une caractéristique du gène *MAGEB2* est la présence de plusieurs exons 1 alternatifs, ce qui jouerait un rôle dans la régulation de son expression.

Le gène murin *MageB4* est exprimé dans les gonades, et plus précisément dans les cellules germinales. Chez le mâle adulte, l'expression de *MageB4* est limitée aux cellules au stade pré pachytène. Chez la femelle, *MageB4* est exprimé dans les cellules germinales qui ont passé la phase pachytène et sont entrées en arrêt de méiose. Ce profil d'expression particulier du gène *MageB4* durant la gamétogenèse suggère qu'il joue un rôle dans le développement des cellules germinales (Osterlund et al, 1999).

1.3.3. La famille MAGEC

Sur le chromosome X en position q27 se trouve une troisième famille de gènes *MAGE* de type I. Ce locus contient les gènes *MAGEC* qui sont exprimés uniquement dans les cellules germinales. *MAGEC1* code pour une protéine de 1142 acides aminés, ce qui

représente environ 800 acides aminés de plus que les autres protéines *MAGE*. Cette différence de taille est due à l'insertion d'un grand nombre de petites séquences répétées.

1.4. Les gènes *Mage* de type II

1.4.1. Le gène *NECDIN*

Le gène *NECDIN* est situé sur le chromosome 15 en position q11.2-q12 et il code pour une protéine de 325 acides aminés encodée par le dernier exon.

La délétion de la région du chromosome 15 paternel où se trouve *NECDIN* est souvent responsable du Syndrome de Prader-Willy. Cette région est soumise à l'empreinte et comporte aussi le gène *MAGEL2*.

Le syndrome de Prader-Willy touche 1 enfant sur 10 000 à 15 000. Ce désordre neuro-développemental présente comme signes cliniques une diminution des mouvements fœtaux et une léthargie à la naissance, qui est due à une hypotonie d'origine centrale. Il se manifeste aussi par des difficultés de succion, des organes génitaux externes hypoplasiques et de l'hypogonadisme. Avec l'âge, d'autres signes cliniques apparaissent tels que l'hyperphagie, qui s'accompagne d'obésité, et d'un retard mental. À l'adolescence, on constate une infertilité, un retard de puberté et des troubles obsessionnels compulsifs. Plusieurs souris déficientes pour *Necdin* ont été produites. Ces souris knock-out ont mis en évidence un effet important du fond génétique sur la pénétrance du phénotype. Les souris conçues par Tsai sont viables et fertiles et ne manifestent aucune anomalie majeure, tandis que les souris (souche C57/BL/6) conçues par Gérard présentent une mortalité post-natale due à l'incapacité des souriceaux à se nourrir suffisamment. Les souris déficientes en *Necdin* générées par Muscatelli et al (2000) ont montré une réduction du nombre de certains neurones de l'hypothalamus et des altérations comportementales qui rappellent celles du syndrome de Prader-Willy.

NECDIN jouerait un rôle crucial dans le développement et la survie de certaines cellules du système nerveux central. Il est surtout exprimé dans les neurones post-mitotiques de certaines régions cérébrales. Il est fortement exprimé au niveau de l'hypothalamus et la plupart des symptômes de PWS sont dus à une déficience hypothalamique.

NECDIN interagit avec E2F1, un facteur de transcription impliqué dans le cycle cellulaire. Pendant la phase G1 du cycle cellulaire, E2F1 est séquestré par la protéine RB (Lees et al, 1993). *NECDIN* aurait une fonction similaire à RB en bloquant le cycle cellulaire des neurones post-mitotiques. Il posséderait aussi une activité anti-apoptotique prévenant les neurones de la mort (Taniura et al, 1998).

NECDIN jouerait aussi un rôle dans la différenciation myogénique. *NECDIN* formerait un dimère avec *MAGED1* et ce dimère empêcherait une homéoprotéine, *Msx2*, d'exercer son effet bloqueur de différenciation (Takaaki et al, 2004). Takaaki et al (2006) ont

proposé que Necdin puisse aussi jouer un rôle dans la différenciation des neurones GABAergiques via l'homéoprotéine Dlx (Takaaki et al, 2006).

Necdin joue un rôle opposé dans le contrôle de la différenciation des préadipocytes en inhibant l'adipogenèse brune. (Tseng et al ; 2005)

1.4.2. La famille MAGED

MAGED1 est le premier d'une sous-famille de 4 gènes (D1, D2, D3 et D4) chez l'homme et de 3 gènes chez la souris. Contrairement aux gènes *MAGE* de type I, ces gènes sont fortement conservés (99% d'acides aminées en commun pour le « MCD », figure 4) entre l'homme et la souris, ce qui indique qu'ils exercent une fonction importante. Ils sont situés sur le chromosome X dans la région p11.23.

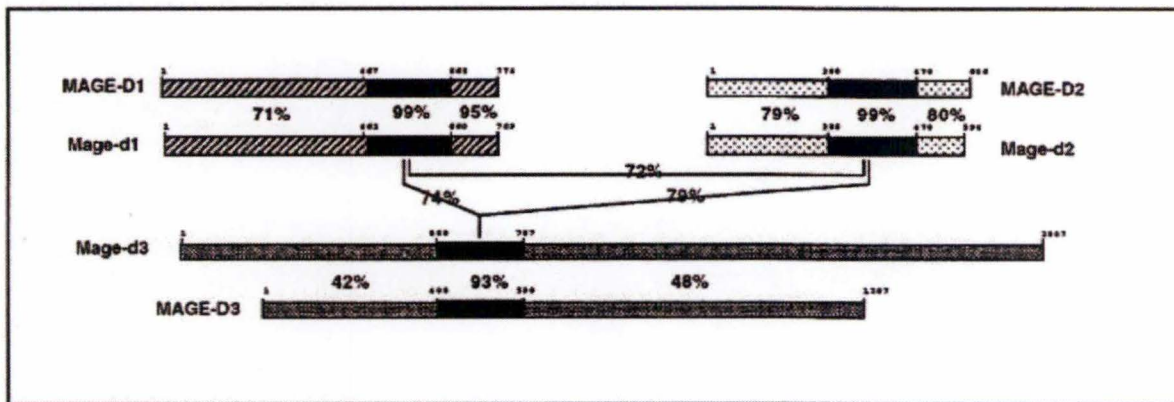


Figure 4: Conservation entre les protéines MAGED humaines et murines.

La structure génomique des gènes *MAGED* est différente de celles de tous les gènes *MAGE* : ils sont composés de 13 exons et la partie codante s'étale de l'exon 2 à l'exon 12. Le MCD s'étend de l'exon 5 à l'exon 11.

Cette constatation suggère que les *MAGED* sont les gènes originels et que tous les autres gènes *MAGE* ont été générés par des rétrotranspositions et des duplications (Chomez et al, 2001).

MAGED1

Maged1, aussi connu sous le nom de *NRAGE* ou *Dlxin-1*, est exprimé dans de nombreux tissus adultes et embryonnaires, avec des niveaux d'expression très élevés dans le système nerveux.

Il existe 2 isoformes d'ARNm *Maged1*. Dans le cerveau en maturation chez la souris, la quantité d'ARNm augmente avec l'âge alors que le niveau de protéine diminue, ce qui montre que *Maged1* est régulé post-transcriptionnellement (Bertrand et al, 2004).

MAGED1 interagit avec de nombreux partenaires dont le récepteur aux neurotrophines p75 (*p75NTR*) qui fait partie de la superfamille des récepteurs au TNF (Tumoral Necrosis Factor), le récepteur de guidance de l'axone *UNC5H1*, les inhibiteurs de l'apoptose *ITA* et *XIAP*, les homéoprotéines *Dlx5* et *Msx2*, l'ubiquitine ligase *Praja1*, le récepteur *LRP1* et le suppresseur de tumeur *BRCA2*.

P75NTR est une protéine transmembranaire de type 1 de 399 acides aminés (Salehi et al, 2000).

Les neurotrophines sont une famille de facteurs de croissance polypeptidiques qui influencent la prolifération, la différenciation, la survie et la mort de cellules neuronales et non-neuronales. Dans cette famille, on retrouve le facteur de croissance neuronal (NGF), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) et les neurotrophines-3 et 4 (NT-3 et NT-4) (Chao et Rajagopal, 2006).

Par son interaction physique avec les récepteurs tyrosine kinase aux neurotrophines (Trk), *p75NTR* module l'affinité de ces récepteurs pour leurs ligands (Trk A lie NGF, Trk B lie BDNF et NT-4/5, Trk C lie NT-3).

P75NTR peut exercer 2 rôles :

⇒ Moduler le signal des récepteurs Trk.

⇒ Initier un signal qui aboutit à l'apoptose, indépendamment des Trk.

Maged1 interagit par son « MCD » avec le domaine intracellulaire juxtamembranaire de *p75NTR* et intervient dans la cascade apoptotique initiée par ce récepteur.

Le récepteur de guidance de l'axone *UNC5H1* fait partie d'une famille de récepteurs qui jouent un rôle dans la chémo-répulsion dépendante de netrin-1 et qui peuvent induire l'apoptose indépendamment de netrin-1. *Maged1* se lie à la portion juxtamembranaire d'*UNC5H1* (sans cette portion, l'induction de l'apoptose et la liaison de *Maged1* ne peuvent se produire).

Les inhibiteurs de l'apoptose (*ITA* et *XIAP*) sont impliqués dans la régulation de l'apoptose. Ces protéines possèdent un domaine BIR du côté amino-terminal ainsi qu'un domaine RING en doigt de zinc du côté carboxy-terminal.

Les protéines à homéobox sont une famille de facteurs de transcription intervenant dans le développement. **Dlx5** et **Msx2** jouent un rôle important dans le développement des os et la réparation des fractures (Masuda et al, 2000). Par des systèmes utilisant des gènes rapporteurs, il a été montré que Maged1 activait la transcription dépendante de Dlx5 (Masuda et al, 2000).

Praja1 est une ubiquitine ligase (E3) qui a été découverte par un crible double-hybride utilisant comme appât le « MCD » de Maged1. La protéine Maged1 est reconnue et ubiquitinilée via Praja1 puis dégradée par le protéasome. De plus, Msx2, qui forme un complexe avec Praja1 et Maged1, est également ubiquitinilée par Praja 1. Il semblerait que Maged1 serve de molécule adaptatrice permettant aux protéines de la famille Dlx/Msx d'être ubiquitinilées. (Sasaki et al, 2001).

En 2005, Gao a mis en évidence que MAGED1 est impliqué dans la voie de **BRCA2** et que celui-ci stabilisait MAGED1. Leurs actions combinées suppriment la prolifération des cellules indépendamment de la voie de P53 (Gao et al, 2005).

Plus récemment, il a été montré que Maged1 pouvait interférer avec l'expression des gènes induits par **HIF-1 α** et la réorganisation du cytosquelette d'actine durant une hypoxie dans un modèle in vivo et in vitro (Wei-Gan et al, 2006).

b. MAGED2

Maged2 est exprimé principalement dans les tissus d'origine mésodermique. (Bertrand et al, 2003) Le mésoderme est à l'origine de nombreux tissus tels que les muscles, le tissu conjonctif, les os, certains composants du système vasculaire et du sang. Ce gène code pour une protéine de 616 acides aminés.

MAGED2 se situe sur le chromosome X en position p11.23 chez l'homme et sur le chromosome X en position F3 chez la souris.

Des souris déficientes en *Maged2* ont été générées au laboratoire. Ces souris meurent dans les 24-48 heures après la naissance avec une anémie importante probablement causée par des hémorragies observées au niveau abdominal (voir figure 5) (C.Dombret, résultat non publié). Ces hémorragies pourraient être provoquées par des anomalies vasculaires. En effet, malgré une structure globalement normale, les grosses artères sont dilatées de façon importante chez les souriceaux déficients en *Maged2*.

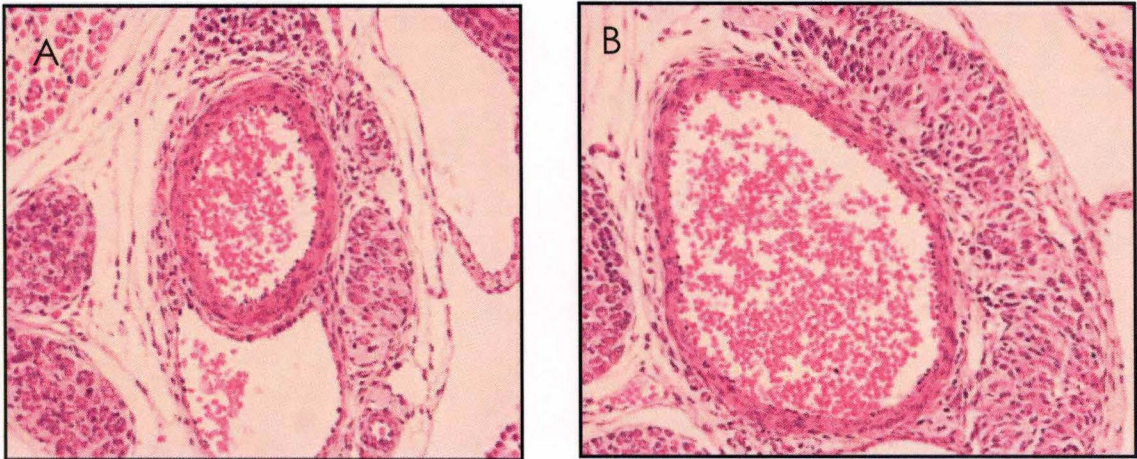


Figure 5: Coupe histologique d'aorte de souriceaux : A) Aorte de souriceau sauvage. B) Aorte de souriceau déficient en *Maged2*. On constate que la lumière de l'aorte du mutant est plus grande que celle du sauvage.

c. *Interaction entre Maged2 et Gas*

Un des buts du laboratoire est d'identifier la fonction moléculaire de *Maged2*. C'est pourquoi, un crible double-hybride a été réalisé.

L'entièreté de *Maged2* a été utilisée comme appât. La partie codante de *Maged2* a été clonée dans le plasmide pGBT9 en aval de la séquence du domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (Gal4BD).

Les ADNc utilisés pour le crible provenaient d'une banque d'ADNc d'embryon de souris de 17 jours (Clontech).

Sur les 30 colonies positives pour le test β -galactosidase isolées lors de ce crible, plusieurs contenaient des séquences de *gnas* (le gène qui spécifie la protéine Gas). Certaines de ces séquences commençaient en amont de l'ATG initiateur, d'autres en aval (voir figure 6).

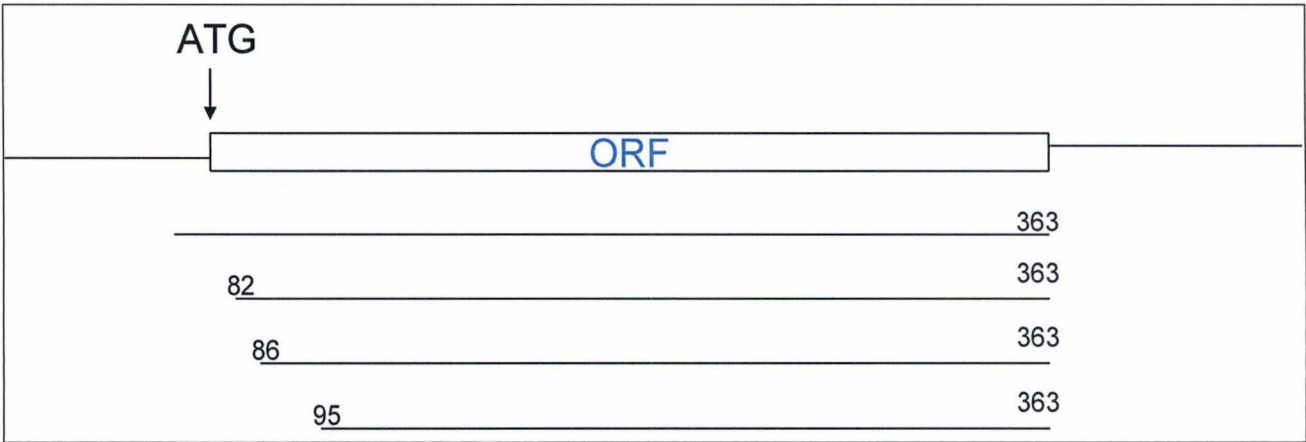


Figure 6: Représentation schématique des fragments d'ADNc de gnas fusionnés à Gal4AD contenus dans les clones identifiés lors du cribble double hybride Maged2. Les nombres représentent les positions du premier acide aminé de ces fragments par rapport au premier acide aminé de l'ORF complet de gnas.

L'interaction entre Maged2 et Gαs fut confirmée par co-immunoprécipitation à partir d'extraits de cellules HEK 293T qui surexprimaient ces 2 protéines.

MAGED3

La protéine MAGED3 est codée par un gène situé sur le chromosome X, en position p11.23 chez l'homme et en position F3 chez la souris.

Cette protéine est composée d'environ 2000 acides aminés. En effet, le domaine carboxy-terminal de *MAGED3* est beaucoup plus long que celui de ses paralogues et est principalement constitué d'une séquence répétitive de 9 acides aminés.

1.4.3. Profil d'expression des gènes *MAGE* de type II

Necdin est exprimé principalement dans les neurones post-mitotiques et dans les arcs branchiaux durant l'embryogenèse, ainsi que dans les cellules musculaires squelettiques, les adipocytes et les chondrocytes. Dans le cerveau en développement, *Necdin* est surtout exprimé par les neurones post-mitotiques dans les zones ventriculaires, site de l'activité germinative.

Maged3 est exprimé quasi uniquement dans le système nerveux central et dans le système nerveux périphérique (figure 7). Contrairement à *Maged1* et à *Necdin*, *Maged3* n'est guère exprimé dans les zones ventriculaires.

L'expression de *Maged2* augmente progressivement durant l'embryogenèse pour diminuer rapidement après la naissance. *Maged2* est exprimé principalement dans les tissus d'origine mésodermique. Pendant l'embryogenèse, une forte expression de *Maged2* est détectée dans les structures musculaires lisses comme les muscles intercostaux, le diaphragme, l'intestin, l'estomac ainsi qu'au niveau des vaisseaux ombilicaux et de l'aorte (Bertrand et al, 2005) (figure 7).

Le profil d'expression de *Maged1* couvre une large gamme de cellules nerveuses et non nerveuses durant le développement et recouvre en partie le profil d'expression de *Maged2* et de *Maged3* (figure 7).

Aucun des 3 gènes *Maged* n'est exprimé dans le foie fœtal, mais ils sont tous abondamment exprimés dans le rein.

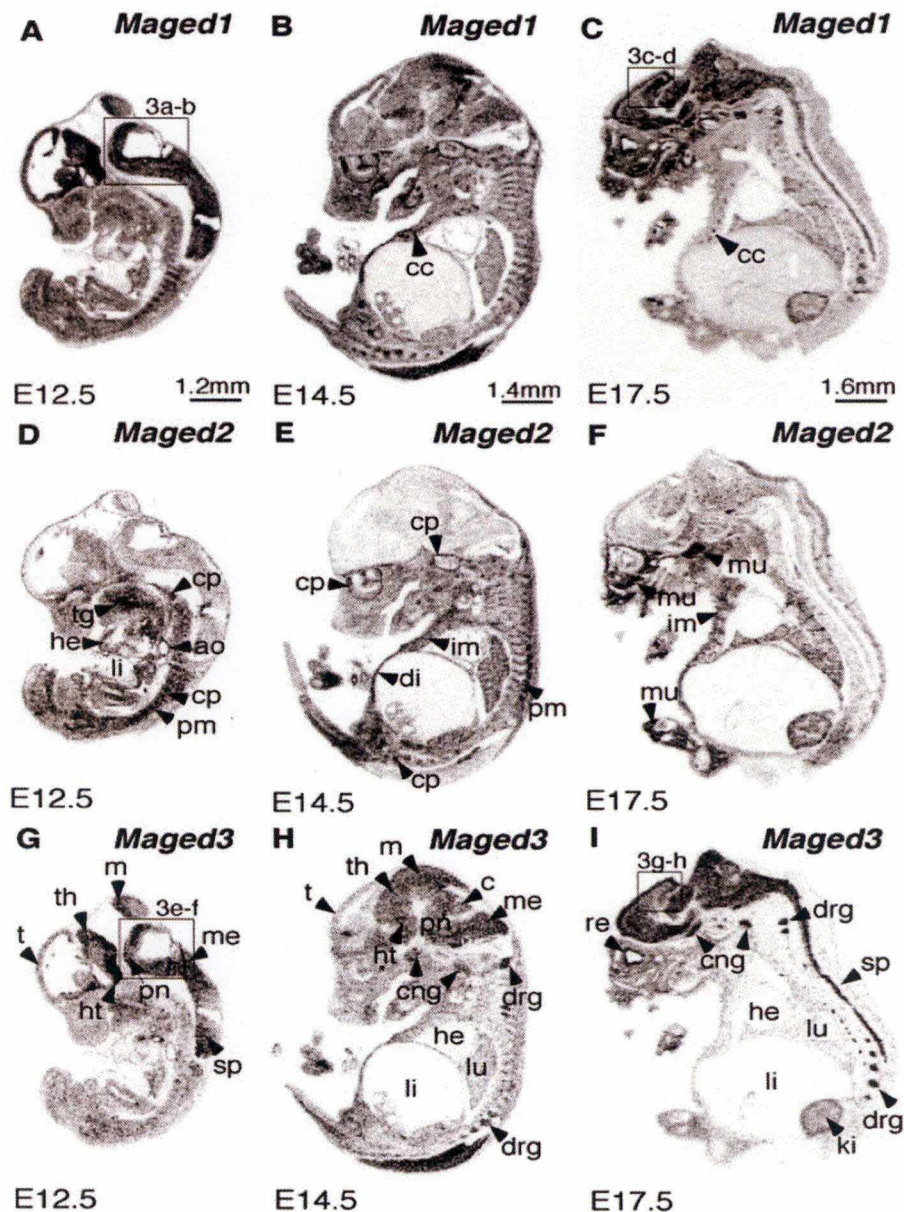


Figure 7: Localisation tissulaire de l'expression des gènes *Maged* de souris obtenus par hybridation *in situ* de coupes parasagittales d'embryons aux stades E12.5 ; E14.5 et E17.5 (Bertrand et al, 2005).

1.5. GPCR : Protéines G hétérotrimériques Couplées aux Récepteurs

Les protéines G couplées aux récepteurs sont composées de trois sous-unités, les sous-unités α , β et γ . La sous-unité α lie le GDP dans sa forme inactive et le GTP dans sa forme active. Les protéines G hétérotrimériques sont couplées à des récepteurs qui possèdent 7 domaines transmembranaires (figure 8). Les sous unités α possèdent une ancre lipidique qui permet leur ancrage dans la membrane plasmique. Le gène *GNAS1* spécifie la sous-unité αs

d'une protéine G hétérotrimériques (*Gas*). Les sous unités α sont classées en 4 sous-familles. GNAS1 fait partie de la première sous-famille, les α_s (figure 9).

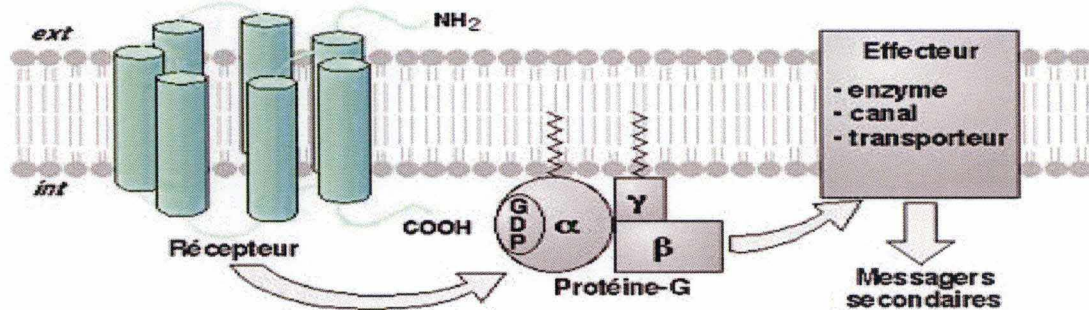


Figure 8: Représentation schématique de la signalisation par les GPCR.

Un effecteur est modulé par la sous-unité α . Cette modulation peut être activatrice ou inhibitrice.

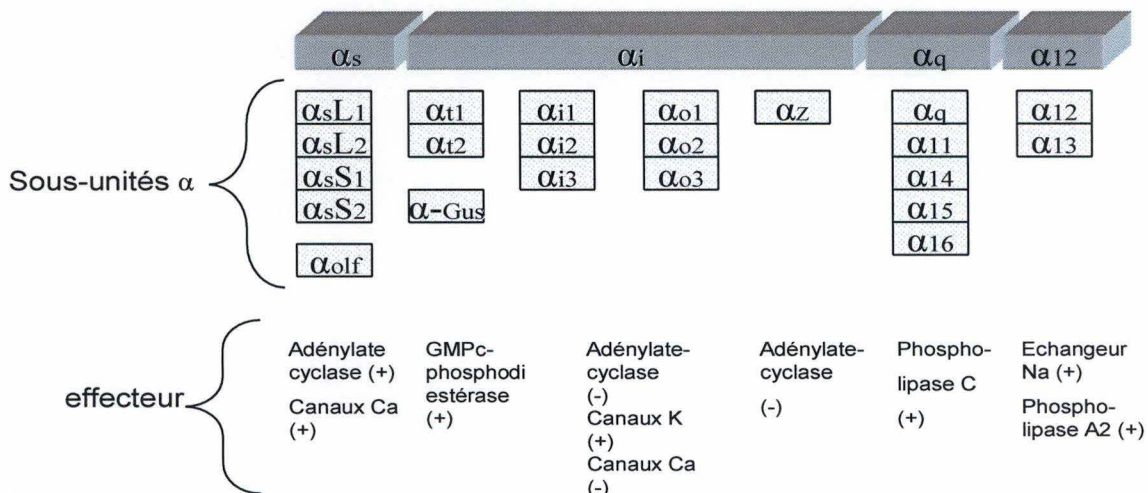


Figure 9: Les 4 sous-familles des sous-unités α des protéines G hétérotrimériques et leurs effecteurs.

Parmi ces effecteurs, on retrouve des enzymes, des canaux ioniques et des transporteurs. Donc, selon que la cellule exprime une protéine G particulière couplée à un récepteur particulier, la transduction du signal peut être différente d'un tissu à l'autre pour un même récepteur. *Gas* stimule la production d'AMPc par activation de l'adénylate cyclase qui est une enzyme catalysant la transformation de l'ATP en AMPc.

Le gène humain *GNAS1* est situé sur le chromosome 20 en position q13 et le gène de souris *gnas* est situé sur le chromosome 2. Ces gènes contiennent au moins 4 promoteurs et 4 premiers exons générant plusieurs transcrits de manière tissu-spécifique. La partie commune à toutes les variantes s'étend du deuxième exon au 13^{ième} exon.

Gnas est principalement exprimé dans des tissus neuroendocriniens, dans les tubules proximaux du rein et dans le système osseux.

1.5.1. Rôle de la structure des différentes sous-unités α

Les sous-unités α des protéines G hétérotrimériques sont composées principalement d'un domaine GTPase qui hydrolyse le GTP en GDP et d'un domaine à hélice α . Peu de choses sont connues sur les extrémités N-terminale et C-terminale. La partie N-terminale est connue pour interagir avec la sous-unité β et jouer un rôle-clé dans l'interaction entre d'autres protéines. Quant à la partie C-terminale, elle est connue pour jouer un rôle dans l'activation de la voie de signalisation (Cabrera-Vera et al, 2003).

1.5.2. Gnaq

Gnaq est le gène qui spécifie la sous-unité α de la protéine G hétérotrimérique **Gaq** (figure 9). Gnaq possède un profil d'expression différent de *gnas*.

Gnaq est exprimée dans les cellules musculaires lisses, les cardiomyocytes, les plaquettes et dans l'hypothalamus. La localisation subcellulaire de Gaq n'est pas uniquement la membrane plasmique, on la trouve aussi associée au réticulum endoplasmique. L'effecteur de Gnaq n'est pas l'adénylate cyclase mais la phospholipase C. La phospholipase C hydrolyse le phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) en inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG).

Des souris déficientes pour Gaq ont été conçues. Ces souris présentaient une hypoplasie cardiaque et des malformations cranio-faciales. Au niveau du cœur, il existe une superposition de l'expression de 2 protéines G hétérotrimériques faisant partie de la même sous-famille, celle de gnaq. L'absence de ces 2 protéines a comme conséquence la mort embryonnaire au 11^{ième} jour. De plus, la présence des 2 protéines est essentielle pour la survie extra-utérine (Offermans et al, 1998).

En 2005, dans une étude de la stabilité et de la dégradation des protéines de la famille de Gaq, il a été démontré que la durée de vie de celles-ci dépendait de leur localisation cytoplasmique ou membranaire, et de leurs interactions. De plus, il a été démontré que cette dégradation se faisait via le protéasome (Johansson et al, 2005).

Gaq médie la transduction du signal du récepteur à l'effecteur suite à son activation par liaison d'un ligand au récepteur. Parmi ces ligands, on retrouve l'angiotensine II et l'endothéline. L'angiotensine II possède deux fonctions principales, (1) c'est une hormone vasoconstrictrice qui régule la tension artérielle (système rénine-angiotensine-aldostérone) et (2) c'est un facteur trophique fabriqué in situ par les cellules musculaires lisses et cardiaques.

L'endothéline est connue comme hormone vasoconstrictrice très puissante (sa structure est apparentée à la sarafotoxine contenue dans le venin du serpent Aspic). L'angiotensine est impliquée dans l'hypertension artérielle. L'angiotensine et l'endothéline sont sécrétées par les cellules musculaires lisses sous l'effet de la tension pariétale.

1.6. Double hybride

La méthode du double hybride (Van Crielinge et al, 1999) permet d'identifier une interaction entre 2 protéines dans un modèle utilisant des levures.

Comme beaucoup d'autres facteurs de transcription eucaryotes, GAL4 possède 2 domaines : l'un liant l'ADN (DNA Binding Domain ou BD) et l'autre activant la transcription (Activation Domain ou AD). Le BD reconnaît une séquence d'ADN du promoteur du gène régulé par GAL4, appelée l'UAS. La présence de l'AD est indispensable pour le recrutement de la machinerie de transcription. Le double-hybride consiste à fusionner une protéine X (appelée « appât ») au BD et une protéine Y (appelée « proie ») à l'AD et de les introduire dans une levure. L'interaction entre les protéines X et Y conduit à la reconstruction d'un facteur GAL4 fonctionnel pouvant activer la transcription d'un gène rapporteur.

Le gène rapporteur que nous avons utilisé est Lac Z. Le gène Lac Z code pour la β -galactosidase, une enzyme dont l'activité est facilement mesurable.

Notons qu'il existe un autre système que celui basé sur GAL4, qui utilise le BD de la protéine bactérienne LexA et l'AD de VP16.

1.7. But du mémoire

Un des buts du laboratoire est d'identifier la fonction moléculaire de Maged2. Dans cet objectif, un crible double-hybride a été réalisé et une interaction entre Maged2 et la protéine Gas a été identifiée. Cette interaction a été confirmée par co-immunoprécipitation de Maged2 et de Gas dans des extraits de cellules sur-exprimant ces 2 protéines. Le but de ce travail était de savoir si Maged2 était susceptible d'interagir avec Gαq qui appartient à la famille des sous-unités α et intervient dans de nombreuses voies de signalisation importantes dans les tissus (muscle lisse, muscle cardiaque) où *Maged2* est exprimé.

2. Résultats, discussions et perspectives

Maged2 interagit-il avec Gαq ?

Cette question a été abordée par 2 méthodes : (1) une analyse par double-hybride dans la levure, (2) une analyse par co-immunoprécipitation dans des extraits de cellules transfectées.

2.1. Test d'interaction in vivo en double-hybride dans la levure

Pour réaliser un test d'interaction en double hybride entre Maged2 et Gαq, nous disposions déjà au laboratoire du plasmide pGBT9-Maged2 qui est capable de diriger l'expression d'une protéine de fusion Gal4BD-Maged2. Il nous fallait donc construire un plasmide d'expression pour l'autre partenaire : Gal4AD-Gαq.

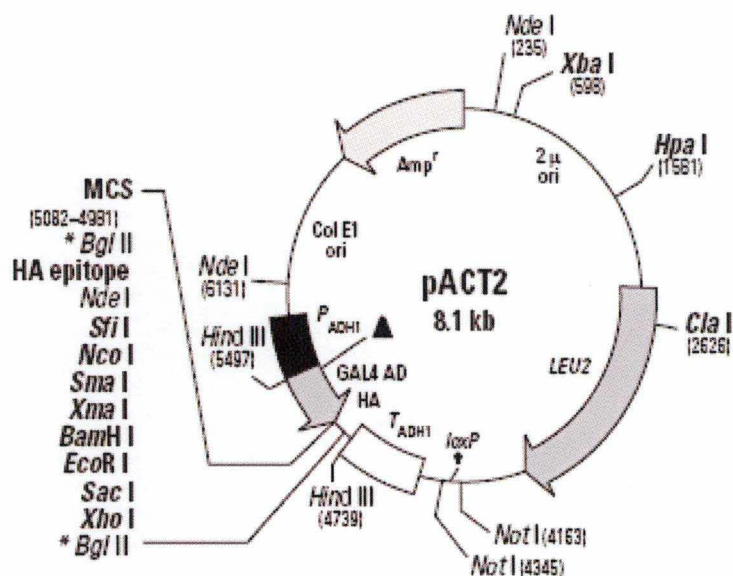


Figure 1: Carte du plasmide pACT2.

2.1.1. Construction du plasmide pACT2-Gnaq

L'ORF de gnaq a été obtenue par transcription inverse d'ARN de cœur et d'aorte de souris suivie d'une PCR. Ceci a été réalisé grâce à des amorces spécifiques qui reconnaissent le début et la fin de la séquence codante de gnaq et qui possèdent des sites de restriction BamHI (figure 2 A). Le produit PCR ainsi obtenu a été digéré par l'enzyme de restriction BamHI et cloné dans le site BamHI de pACT2 (figure 1).

A) 5'... tcc ttt acc gcg gct ccc ctg agc tcg tcc ctg acg cgc gcc cgg gcg gcg ggg ctc cgc ggc cgc cgc tgc
 ctc ggg gga gcg agg gcg gag ggc gtgt gtg cgc gcg tgt gag cag ggc gcc ggc ggg gct gc gcg agg cac ttc
 gga aga **atg** atc ctg gag tcc atc atg gcg tgc tgc ctg agc gag gag gcc aag gaa gcc cgg agg atc aac gac gag
 atc gag cgg cag ctg cgc agg gac aag cgc gac gcc cgc cgg agc tca agc tgc tgc tgc tgg gga cag...
 ...gat gga ccc cag aga gat gcc cag gca gct cga gaa ttc atc ctg aaa atg ttc gtg gac ctg aac ccc gac agt gac
 aaa atc atc tac tcc cac ttc acg tgc gcc aca gat acc gag aac atc cgc ttc gtc ttt gca gcc gtc aag gac acc atc
 ctg cag ctg aac ctg aag gag tac aat ctg gtc **taa** ccg tgc ctc cca gaa acc gtt ctt ccc tcc cct gtg ggt tgt tga
 aga taa aca aga ggg act gta ttt ctg tgg aaa aca att tgc ata ata cta att tat tgc cgt cct gga ctc tgt gag cgt gtc
 cac aga gct gta gta aat att atg att tta ttt aaa cta ttc aga gga aac agg atg ctg aag tac agt... 3'

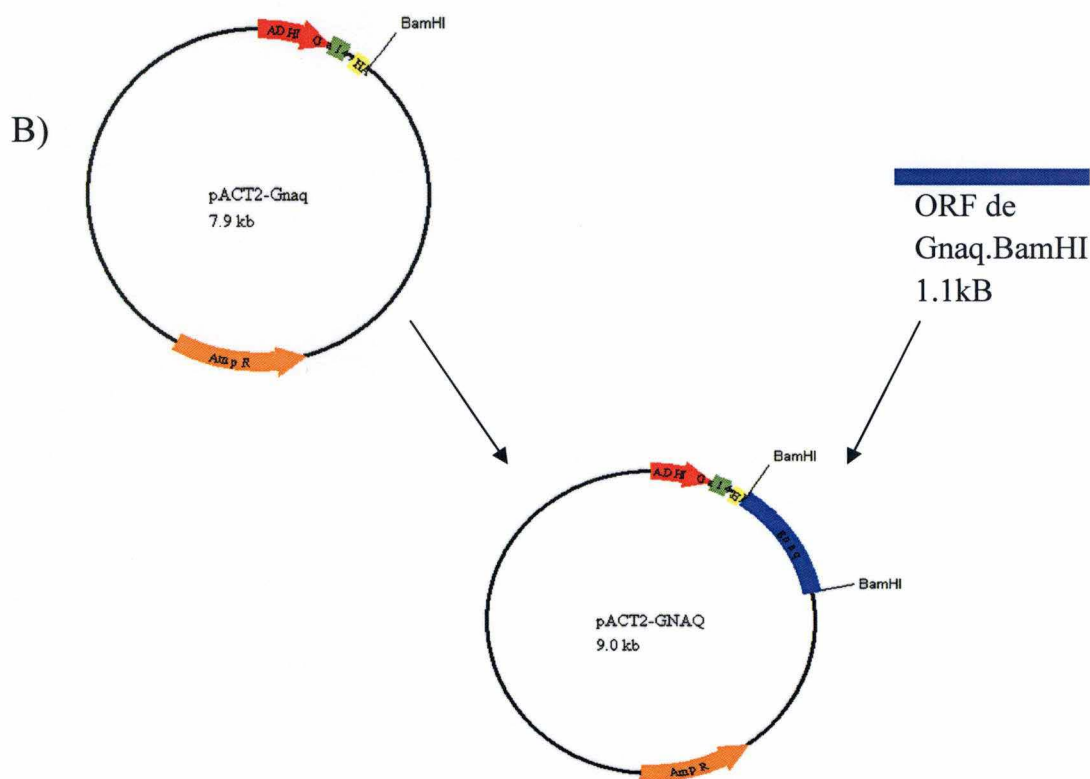


Figure 2: Clonage de Gnaq dans pACT2.

A) Séquence de l'ADNc de Gnaq montrant la position des amorces utilisées dans la PCR permettant d'amplifier la partie codante de Gnaq. En bleu sont indiqués les codons d'initiation et de terminaison de la traduction.

B) Schéma représentant le clonage de l'ORF de gnaq dans le site BamHI de pACT2.

Les produits de ligation ont servi à transformer des bactéries *E. coli* DH11α.

Les bactéries transformées ont été mises sur un milieu contenant de l'ampicilline et ont été criblées par PCR afin de sélectionner celles qui contenaient l'ORF de *gnaq*. Cette PCR a été réalisée avec l'amorce "170 antisens *Gnaq*" et l'amorce "pACT 5'" pour obtenir un fragment de 480pb (voir figure 3).

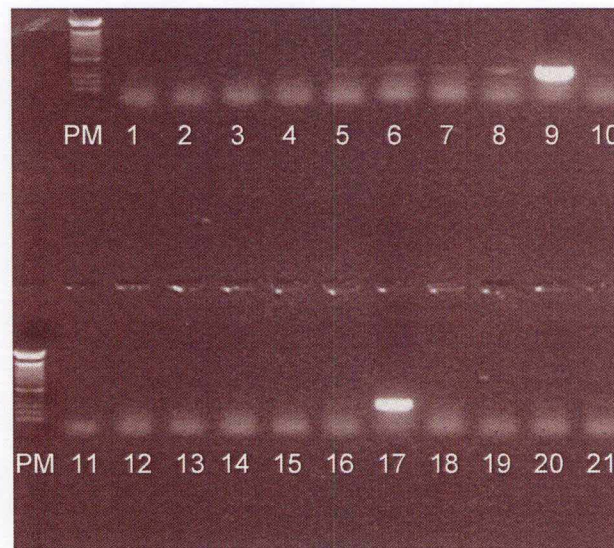


Figure 3 : Gel d'électrophorèse des produits PCR du crible des colonies d'*E Coli* DH11α transformées avec pACT2-*gnaq*.

PM : 1kpb (Invitrogen).

Quatorze clones ont ainsi été identifiés lors du crible par PCR. Une analyse de l'ADN plasmidique a été réalisée par digestion par l'enzyme de restriction Bgl II. Le profil de restriction attendu était un clivage de pACT2-*gnaq* en trois morceaux de 7985pb, 941pb et 271pb (voir figure 4). Les profils de restriction obtenus pour les 14 clones nous ont montré qu'ils contenaient bien tous l'ORF de *gnaq* orientée dans le sens de lecture (résultats non montrés).

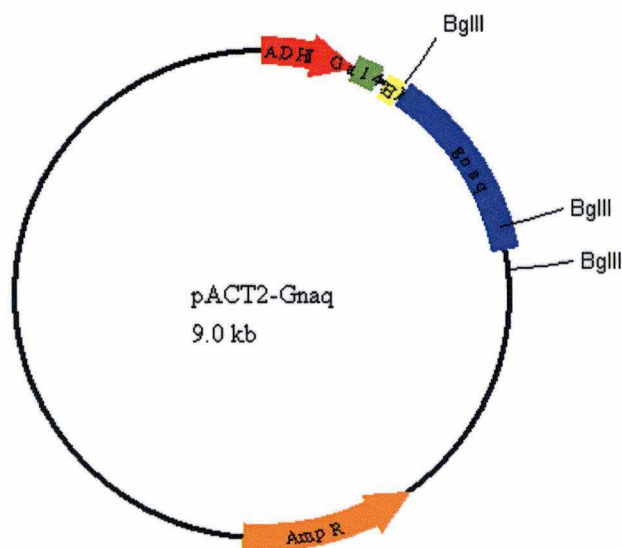


Figure 4: Position des sites de restriction de Bgl II dans pACT2-gnaq.

Les ORF de gnaq des 14 clones ont été séquencées avec les amorces pACT5' séq, Gnaq 265 sens, Gnaq 580 sens, Gnaq 860 sens. Quatre clones sur les 14 ne montraient aucune mutation dans la séquence codante de gnaq.

2.1.2. Vérification de la présence de pGBT9-Maged2 dans les levures Y190

Avant de tester l'interaction Maged2-Gaq par double hybride, nous avons vérifié par PCR, avec des amorces spécifiques de l'ORF de *Maged2* (PCHO81 et PCHO96) sur les levures Y190 précédemment transformées avec pGBT9-*Maged2* au laboratoire, qu'elles contenaient bien le plasmide pGBT9-*Maged2*.

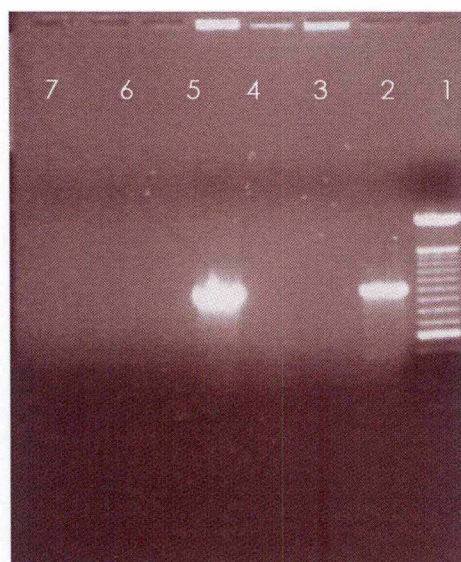


Figure 5 : Gel d'électrophorèse des produits PCR réalisée sur les levures Y190 montrant que les colonies des puits 1 et 4 contiennent le vecteur pGBT9-MAGED2. Le puits 7 est un contrôle négatif.

PM : échelle de poids moléculaire de 100pb (Invitrogen).

La PCR a été réalisée à deux reprises sur les mêmes colonies. L'analyse des produits PCR par gel d'électrophorèse nous a montré que les colonies correspondants aux pistes 1 et 4 contenaient bien le plasmide pGBT9-Maged2 (figure 5).

2.1.3. Test d'interaction double-hybride dans la levure

Nous avons transformé la levure *S.cerevisiae* (souche Y190) contenant pGBT9-Maged2 avec le plasmide pACT2-Gnaq. Les levures transformées ont été sélectionnées sur milieu -TRP-LEU.

Avant de tester une éventuelle interaction entre Maged2 et Gαq, nous avons vérifié par Western blot que le plasmide pACT2-gnaq exprimait bien la protéine de fusion Gal4AD-Gαq dans la levure.

Nous avons réalisé 2 Western blots avec le lysat d'extraits de levure. Chaque Western blot a été révélé avec un anticorps différent. Le premier était un anticorps anti-Gal4AD et le second était un anti-HA. HA est une étiquette antigénique se situant entre Gal4AD et Gαq (figure 6).



Figure 6 : Représentation schématique de la protéine de fusion Gal4AD-Gαq.

Ces deux anticorps détectent une bande d'environ 60 kD, ce qui correspond à la taille attendue pour la protéine de fusion (59,4 kD). On peut en conclure que la protéine de fusion Gal4AD-Ga α est bien exprimée dans la levure (Figure 7).

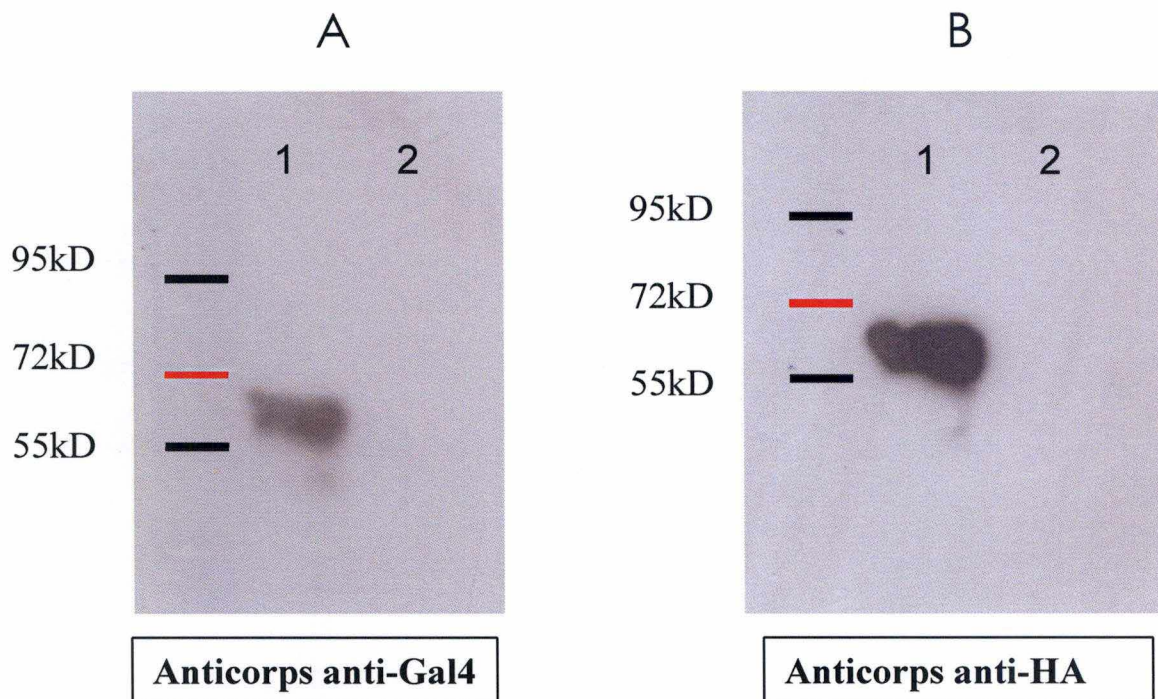


Figure 7: A. Analyse par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-Gal4 (1) levures Y190 contenant pGBT9-Maged2 et pACT2-Gnaq, (2) levures Y190 (contrôle négatif).

B. Analyse par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-HA (1) levures Y190 contenant pGBT9-Maged2 et pACT2-Gnaq, (2) levures Y190 (contrôle négatif).

Pour le test d'interaction en double-hybride, nous avons utilisé des levures Y190 [pGBT9-Maged2] transformées avec pACT2-gnaq, mais aussi avec pACT2-gnas.R23, un plasmide dirigeant l'expression d'une protéine de fusion Gal4AD-Gas (contrôle positif d'interaction). Un second contrôle positif a été inclus : une co-transformation d'Y190 avec pVA3 et pTD1. Le plasmide pTD1 encode l'antigène T du virus SV40 fusionné avec le domaine d'activation de Gal4. pVA3 dirige l'expression de la protéine murine p53 fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4. L'interaction entre la protéine T de SV40 et p53 est, en effet, bien connue.

Des colonies de levures contenant différentes combinaisons de plasmides ont été repiquées et un test d'activité β -galactosidase in situ a été réalisé par coloration au X-gal pour tester l'activation du gène rapporteur LacZ (figure 9).

Les 8 colonies qui contenaient Gal4AD-G α q et Gal4BD-Maged2 ne sont pas devenues bleues alors que les contrôles positifs étaient bien bleus (figure 9). Cette expérience montre donc une absence d'activation du gène rapporteur LacZ dans les levures exprimant les protéines hybrides Gal4AD-G α q et Gal4BD-Maged2.

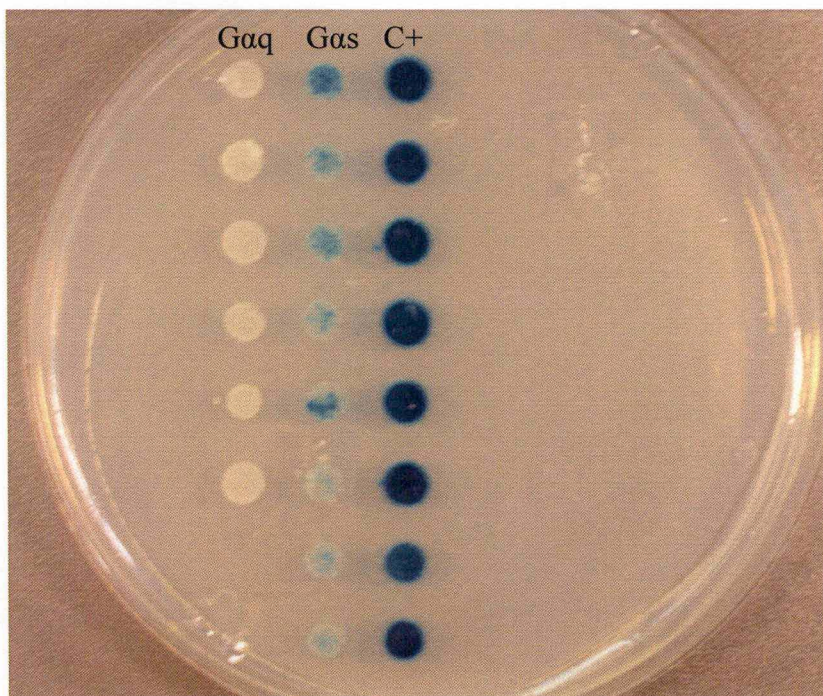


Figure 9 : Test β -galactosidase au X-gal.

A gauche, des levures Y190 [pGBT9-Maged2] transformées avec pACT2-Gnaq (G α q). Au centre, des levures Y190 [pGBT9-Maged2] transformées avec pACT2-Gnas.R23 (Gas). A droite, les levures transformées par pVA3 et pTD1 (C+).

Ce résultat négatif obtenu pourrait être dû à une absence d'interaction entre Maged2 et Gas mais aussi à un repliement anormal de la protéine hybride Gal4AD-G α q, ou à un défaut de modification post-traductionnelle ou de localisation subcellulaire des protéines exprimées dans la levure.

Pour éviter ces hypothétiques artéfacts, nous avons testé l'interaction entre Maged2 et Gαq par co-immunoprécipitation des 2 protéines dans des extraits de cellules humaines embryonnaires de rein 293 T.

2.2. Test d'interaction entre Maged2 et Gαq par co-immunoprécipitation

Pour réaliser un test d'interaction par co-immunoprécipitation, nous avons besoin d'un plasmide capable de diriger l'expression de Gαq.

2.2.1. Construction du plasmide pCMV-HA.gnaq

Le vecteur utilisé a été le pCMV-HA, qui contient un promoteur puissant, celui du cytomégalo virus. La partie codante de l'ADNc de gnaq a été amplifiée par PCR avec les amorces "Gnaq.BamHI sens" et "Gnaq.BamHI antisens" (voir plus haut, figure 2) et le produit PCR obtenu a été digéré par Bgl II pour le cloner dans le site Bgl II de pCMV-HA (figure 10).

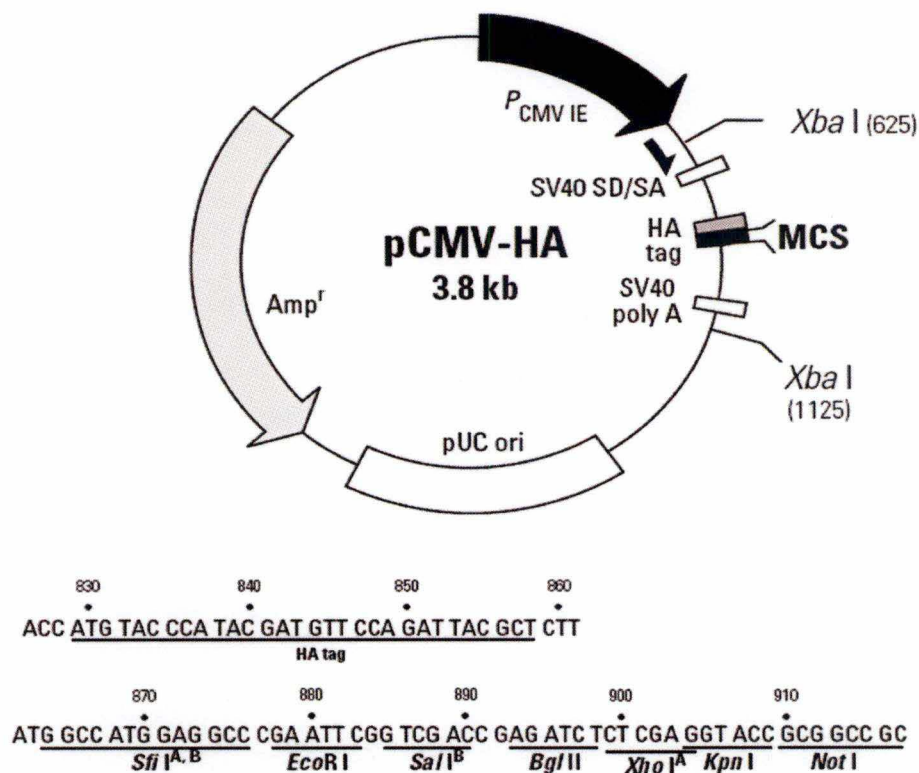


Figure 10 : Carte du plasmide de pCMV-HA.

Quarante-huit colonies bactériennes Amp^R ont été analysées par PCR pour rechercher celles qui contenaient le plasmide attendu, pCMV-HA.Gnaq (figure 11). Vingt-quatre clones

ont montré la bande attendue de 453pb lors de l'analyse des produits PCR par gel d'électrophorèse.

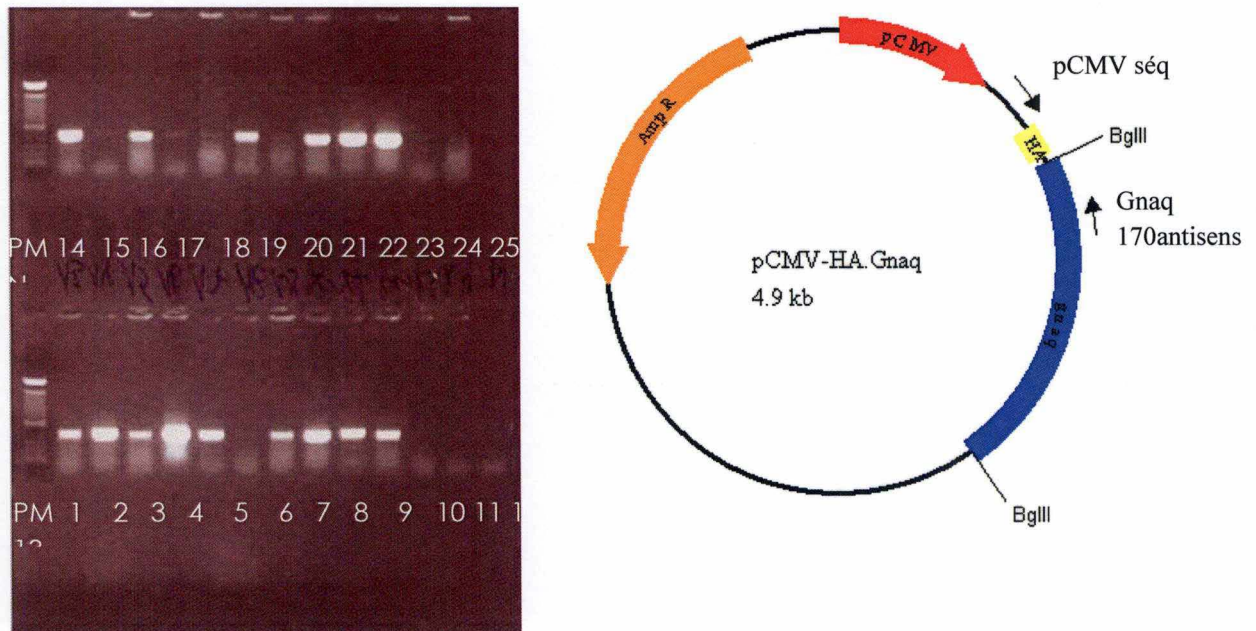


Figure 11: Analyse par PCR des colonies d'E. Coli contenant pCMV-HA.Gnaq et position des amorces utilisées pour la PCR (pCMV séq et Gnaq 170 antisens).

PM : 1kpb d'invitrogen.

Les 24 clones identifiés par PCR ont été analysés par digestion avec EcoRI, ceci pour confirmer la présence et l'orientation de l'insert (figure 12). Les tailles des fragments attendus étaient de 960 pb et 3900 pb.

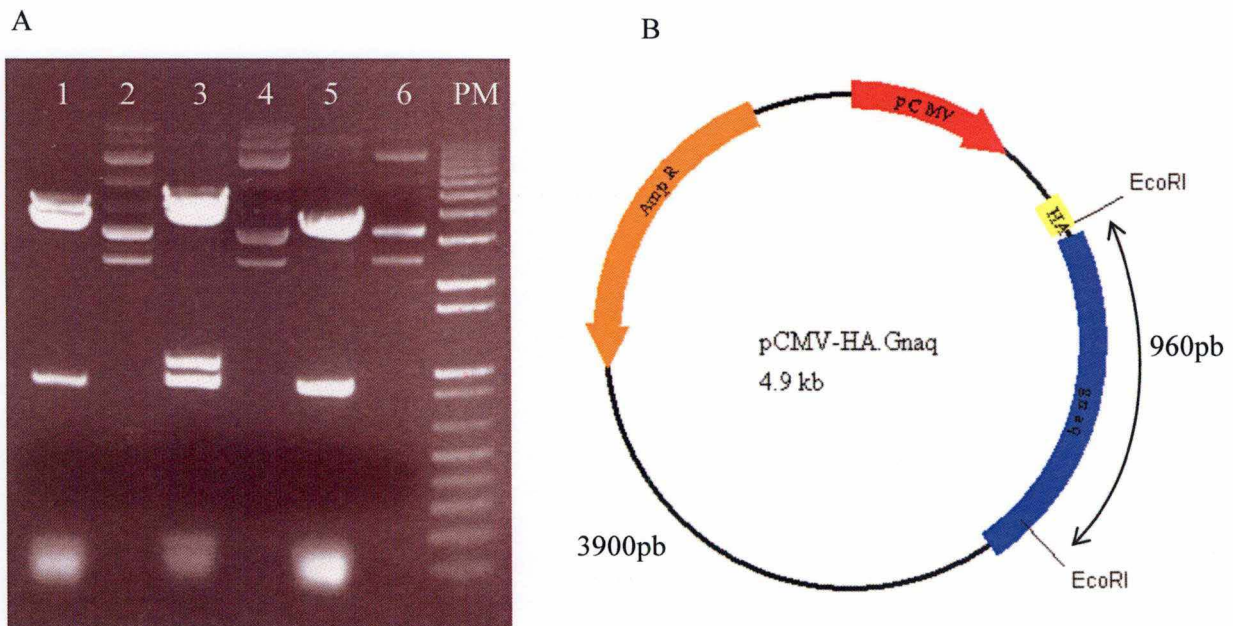


Figure 12 : A. Profils de restriction par *EcoRI* de pCMV-HA.Gnaq des clones positifs par PCR. Les pistes 1,3 et 5 sont des plasmides digérés par *EcoRI*. Les pistes 2,4 et 6 sont les mêmes plasmides non digérés. Les pistes 1 et 5 possèdent le profil de restriction attendu.

B. Schéma de pCMV-HA.Gnaq montrant les sites *EcoRI*.

Parmi les 24 clones, 10 présentaient le profil de restriction attendu. La séquence de leurs inserts (et des jonctions insert-vecteur) a été déterminée par séquençage automatique à l'aide des amorces pCMV-séq, Gnaq 265 sens, Gnaq 580 sens et Gnaq 860 sens.

Parmi les 10 clones séquencés, 3 contenaient la séquence attendue. Les 7 autres contenaient différentes mutations, probablement liées à l'amplification par PCR. L'ADN des 3 clones de séquence correcte, pCMV-HA.Gnaq.1, pCMV-HA.Gnaq.2 et pCMV-HA.Gnaq.3 a été purifié en vue d'une transfection cellulaire.

2.2.2. *pcDNA3-Maged2*

Nous disposons au laboratoire d'un vecteur capable d'induire l'expression de *Maged2* dans des cellules de mammifères. Ce vecteur, pcDNA3-Maged2 (figure 13), possède le même promoteur que celui de pCMV-HA, celui du cytomégalo virus. *Maged2* est marqué par une étiquette antigénique, nommée Xpress.

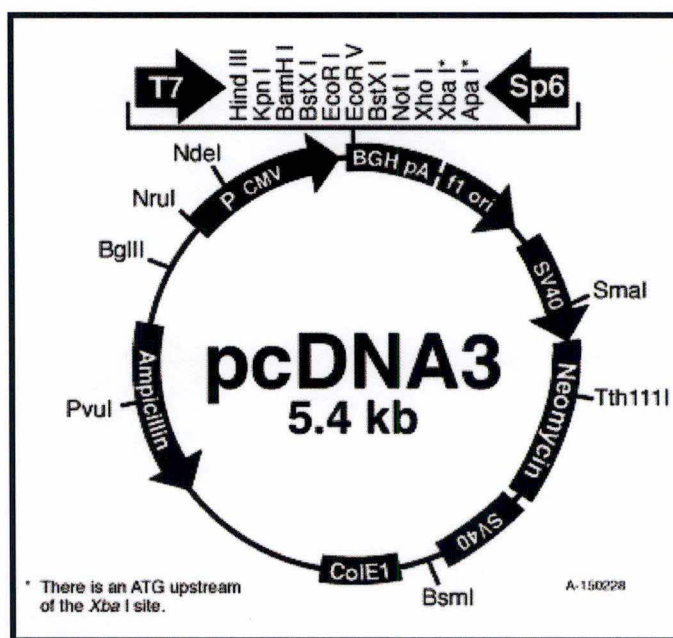


Figure 13: Carte du plasmide pcDNA3.

2.2.3. Test d'interaction par co-Immunoprécipitation entre Maged2 et Gaq

Le but de la co-immunoprécipitation est de précipiter 2 protéines, qui interagissent potentiellement ensemble, avec un anticorps pouvant reconnaître une de ces 2 protéines et de détecter par Western Blot la présence de l'autre protéine dans le précipitat.

Avant de tester l'interaction entre Maged2 et Gaq par cette méthode, nous devons d'abord vérifier que les plasmides pCMV-HA.gnaq et pcDNA3.Maged2 étaient capables d'exprimer les deux protéines dans des cellules de mammifères. Pour ce test, nous avons utilisé des cellules embryonnaires de rein humain 293 modifiées avec l'antigène T, les HEK 293 T.

Les HEK 293T ont été transfectées dans une plaque 6 puits selon le schéma de la figure 14 en suivant le protocole recommandé par le fabricant de l'agent de transfection : le EXGEN 500 (Fermentas®) (voir matériel et méthodes).

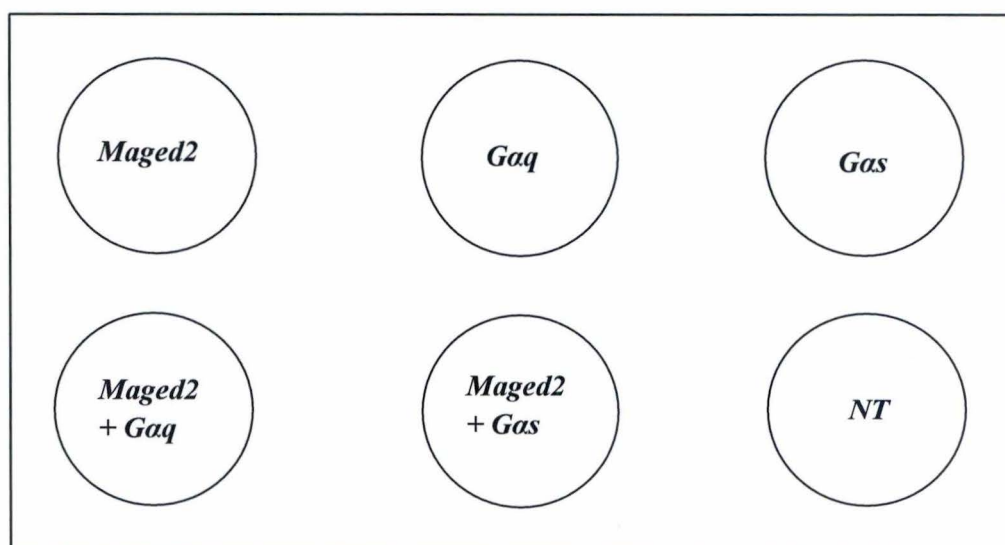


Figure 14: Schéma des transfections des cellules HEK 293 T avec pcDNA3-Maged2, pCMV-HA.Gnas (Gas) et pCMV-HA.Gnaq (Gaq).

NT: cellules HEK 293 T non transfectées

Les cellules HEK 293 T ont été lysées 24 heures après la transfection et les lysats ont été analysés par Western blot. Les tailles attendues pour ces différentes constructions étaient de 44kD pour HA-Gaq, de 50kD pour HA-Gas (figure 15 B) et de 90kD pour Maged2. Les résultats obtenus après révélation avec un anticorps anti-HA pour HA-Gaq et HA-Gas, et avec un anticorps anti-Xpress pour Maged2, nous ont montré que chaque construction était bien exprimée dans les cellules HEK 293 T (figure 15).

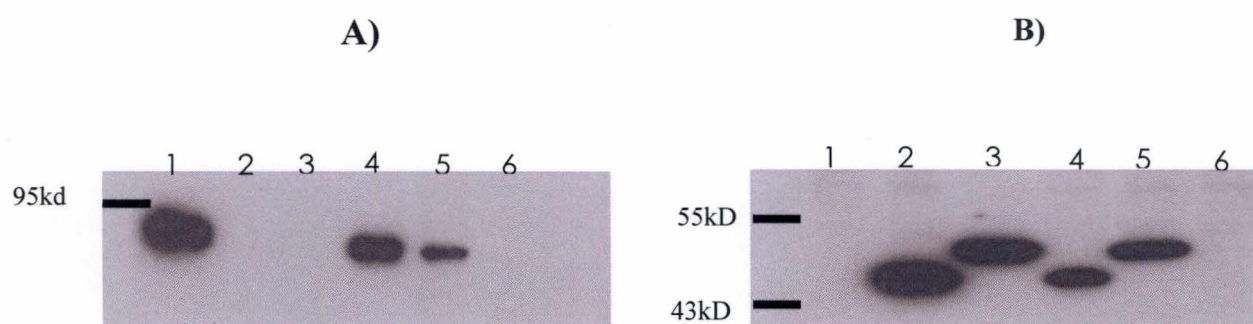


Figure 15: Analyse par Western blot de l'expression de Gas, Gaq et Maged2 dans des cellules HEK 293 T transfectées.

A : Les pistes 1, 4 et 5 montrent la présence de Maged2 révéler avec un anticorps anti-Xpress. Les pistes 4 et 5 sont des co-transfections avec Gaq (4) et Gas (5).

B : Les pistes 2 et 3 sont des transfections de Gaq (2) et de Gas (3) révélés avec un anti-HA. Les pistes 4 et 5 sont des co-transfections de Gaq et Maged2 (4), et de Gas et Maged2 (5). La piste 6 représente le contrôle négatif (cellules non transfectées).

Pour réaliser l'expérience de co-immunoprécipitation, nous avons transfecté des cellules HEK 293 T selon le schéma de la figure 14. Les cellules ont été récoltées 24 heures après la transfection et lysées.

Nous avons immunoprécipité les protéines HA-Gαq et HA-Gαs avec un anticorps anti-HA et analysé les immunoprécipitats par Western blot avec l'anticorps polyclonal anti-Maged2 obtenu au laboratoire.

Nous avons également réalisé une immunoprécipitation avec un anticorps non relevant (anti-MBP), utilisé comme contrôle de spécificité de l'anticorps anti-HA (figure 17B).

La présence dans les lysats de Maged2, de Gαs et de Gαq dans les cellules transfectées a été analysée par Western blot (Figure 16).

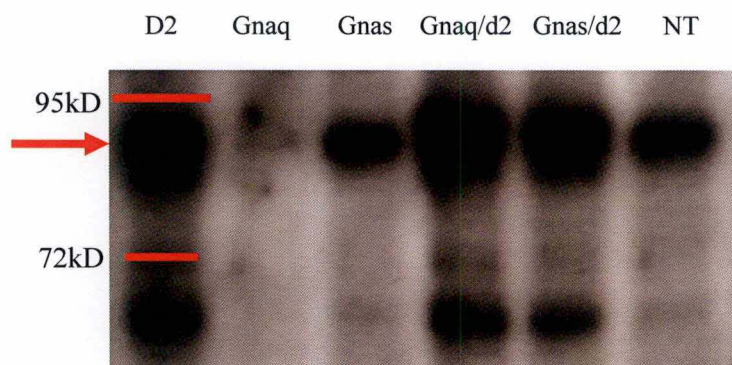


Figure 16: Western blot anti-d2, lysats de cellules HEK 293 T transfectées avec les différentes constructions. Ces lysats servent de contrôle de transfection pour la co-immunoprécipitation. La flèche rouge indique la ligne de MAGED2.

L'analyse du Western blot des immunoprécipitats nous permet de tirer les conclusions suivantes :

1. Sur la piste 5 (de la figure 17A), qui correspond à des cellules 293T cotransfectées avec Maged2 et Gαs, l'interaction entre Maged2 et Gas est confirmée.
2. Sur la piste 4 (de la figure 17A), qui correspond à des cellules 293T co-transfectées avec Maged2 et Gαq, on n'observe pas de signal, ce qui indique qu'on ne co-immunoprécipite pas Maged2 avec Gαq.

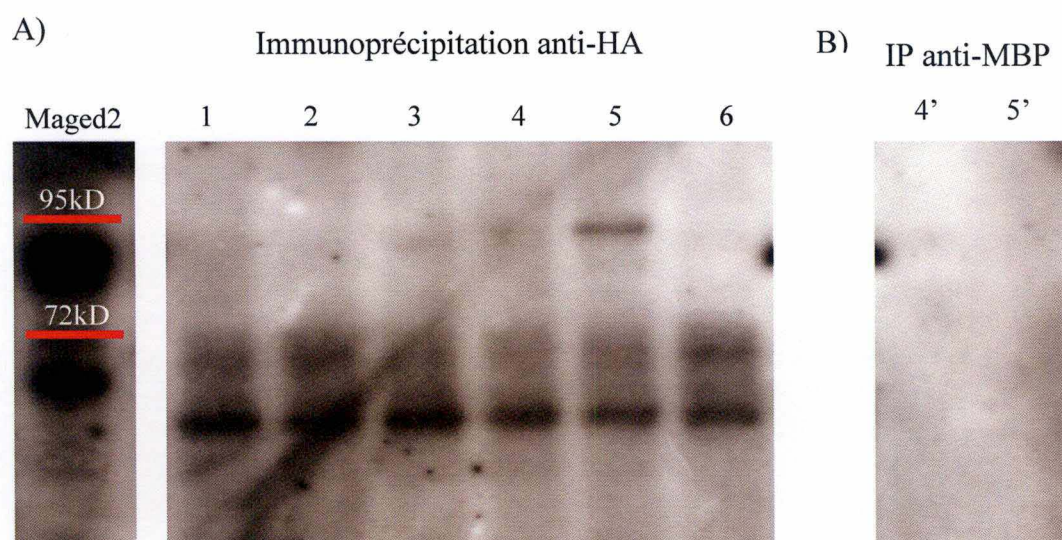


Figure 17: Western blot anti-Maged2 avec des immunoprécipitats obtenus avec l'anticorps anti-HA (A) et anti-MBP (B) à partir des lysats de cellules HEK 293 transfectées comme indiqué à la figure 14.

Une immuno-précipitation de Maged2 avec l'anti-Xpress a été réalisée sur des lysats de cellules 293 T transfectées selon le même schéma que celui de la figure 14 (voir plus haut). Les lysats immuno-précipités ont été analysés par Western blot et révélés avec un anticorps anti-HA. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une interaction entre Maged2 et Gαq, Maged2 et Gαs (résultats non montrés).

2.2.4. Discussions et perspectives

La question qui se pose maintenant est de savoir quel est le rôle cellulaire et physiologique de l'interaction entre Maged2 et Gαs. Il serait intéressant de déterminer avec quelle partie de Gαs Maged2 interagit. Pour cela, il faudrait amplifier différents fragments de Gαs pour localiser la région responsable de l'interaction avec Maged2. En comparant les séquences de différents membres de la famille de gnaq avec celles de gnas, on observe deux régions d'insertion dans la protéine de Gαs comparé à la famille de Gαq. On retrouve un fragment au début et un autre vers la fin. Ce qui pourrait être un point de départ pour la recherche de la région d'interaction avec Maged2.

Pour étudier, l'action de Maged2 sur Gαs nous pouvons utiliser de la dobutamine, un agoniste du récepteur β-adrénargique de type II. Ce récepteur est couplé à la protéine Gαs qui,

par son activation, entraîne une augmentation de l'AMPc qui peut être facilement mesurée. Ceci peut être étudié dans un système utilisant des MEFs (Mouse embryonic fibroblasts) sauvages et des MEFs déficients en *Maged2* pour évaluer le rôle de *Maged2* sur l'activité de Gas lors de son activation par la dobutamine.

2.3. Conclusion

Les résultats, obtenus par double hybride et co-immunoprécipitation ont confirmé l'interaction entre *Maged2* et Gas mais, ils n'ont pas permis de détecter une interaction potentielle entre *Maged2* et Gαq. *Maged2* interagit donc spécifiquement avec Gas (plutôt qu'avec toutes les protéines Gα). La signification biologique de cette interaction reste à être identifiée.

3. Matériel et méthodes

3.1. Clonage GNAQ et double-hybride

3.1.1. PCR sur ADNc de cœur et d'aorte de souris

MIX :

5 µl tampon2 (10x concentré)

5 µl dNTP (2mM)

5 µl amorce 1, Gnaq.BamHI sens (10µM)

5 µl amorce 2, Gnaq.BamHI antisens (10µM)

0.5 µl enzyme High Fidelity hot star (Quiagen)

29.5 µl d'eau

Ajouter au-dessus une goutte d'huile pour éviter l'évaporation

Programme PCR : Phase 1 : 5 minutes à 94°C.

Phase 2 : succession de 29 cycles : 30 secondes à 94°C

30 secondes à 57°C

90 secondes à 72°C

Phase 3 : 5 minutes à 72°C.

3.1.2. Purification des produits PCR par WIZARD®

(Protocole et solution du kit Wizard SV Gel and PCR clean up system promega)

- Prélever le produit du tube à PCR et le mettre dans tube Eppendorf.
- Ajouter 1 vol de Binding Solution au produit PCR
- Transférer dans une mini-colonne insérée dans un tube collecteur. Incuber 1 min à TA
- Centrifuger 1 min à 10.000 g, jeter le flow through.
- Laver la colonne avec 700 µl de Membrane Wash Solution
- Centrifuger 1 min à 10.000 g, jeter le flow through
- Laver la colonne avec 500 µl de Membrane Wash Solution
- Centrifuger 5 min à 10.000 g, jeter le flow through
- Placer la mini-colonne sur un Eppendorf
- Ajouter 50 µl d'eau Nuclease-freeI incuber 1 min à TA.
- Centrifuger 1 min à 10.000 g

3.1.3 Restriction des extrémités des produits PCR

Ajouter au tube 10 µl de tampon pour enzyme de restriction.

Mettre 1unité par µg d'ADN d'enzyme de restriction (0.2U/µg d'ADN).

Ajouter 38µl d'eau distillée.

Ajouter les 50 µl du produit PCR.
Incuber pendant 2 heures à 37°C

Restriction avec BglII	Insertion de GNAQ dans pCMV HA
Restriction avec BamHI	Insertion de GNAQ dans pACT2 AD

3.1.4. Purification des produits PCR restreints par phénol-CIAA

- Ajouter un volume de phénol-CIAA, vortexer.
- Centrifuger 10min 14.000 rpm, récupérer la phase aqueuse.
- Ajouter un volume de chloroforme, vortexer.
- Centrifuger 10min 14.000 rpm, récupérer la phase aqueuse.
- Ajouter ½ vol d'ammonium d'acétate 7.5M et 1,5 vol d'isopropanole.
- Mettre à -70°C pendant 1 heure.
- Centrifuger 10 min à 14.000 rpm, décanter. Ajouter 500 µl d'éthanol 70%
- Centrifuger 5min 14.000 rpm, décanter. Sécher le culot sous vide.
- Re-suspendre le culot dans 10 µl de TE.

3.1.5. Déphosphorylation par la CIP des vecteurs linéarisés et purification par extraction au phénol et précipitation à l'alcool

- Ajouter 1 µl de CIP à 100 µl de vecteur linéarisé et incuber 60 min à 37°C
- Ajouter 1 µl d'EDTA 500 mM et incuber 10 min à 65°C
- Ajouter 100 µl de phénol-CIAA, vortexer, centrifuger 15 min
- Reprendre la phase aqueuse et y ajouter : 10 µl NaAc 3M et 500 µl éthanol
- Incuber 60 min à -70°C
- Centrifuger 15 min à 14.000 rpm, décanter, rincer avec 500 µl d'éthanol 100%
- Sécher le culot et le resuspendre dans 10 µl d'eau.
-

3.1.6. Ligation des inserts dans le plasmide d'intérêt

- Ajouter au tube 2µl de tampon pour la T4DNA ligase 10X
- 6 µl de vecteur linéarisé de choix.
- 3 µl de produit PCR.
- Mettre 1µl de T4DNA ligase
- Compléter avec de l'eau
- Placer le tout à 14°C O.N

3.1.7. Transformation d'E.Coli DH11α électrocompétentes

- Ajouter 2 µl de produit de ligation à 40 µl de cellules électrocompétentes
- Transférer dans une cuvette à électroporation, préalablement refroidie sur glace
- Réaliser l'électroporation, à 2300V.
- Ajouter 450 µl de LB. Incuber 1 heure à 37°C
- Étaler sur boîte LBA. Incuber O.N. à 37°C

3.1.8. Mini préparation d'ADN plasmidique par lyse alcaline

- Inoculer une colonie dans 50ml de milieu LBA
- Incuber O.N. à 37°C.
- Centrifuger la culture 10 min à 2000 rpm à 10°C, décanter.
- Reprendre le culot dans : 3,3 ml de GTE + Rnase, vortexer, laisser 10 min à TA
- 5 ml de NaOH/SDS, mélanger, laisser 10 min à 0°C
- 4 ml de Kac/Hac, mélangé
- Centrifuger 14 min à 14.000 rpm
- Récupérer le surnageant et y ajouter un volume égale de phénol-CIAA, vortexer
- Centrifuger 14 min à 14.000 rpm, récupérer la phase aqueuse
- Ajouter 2 vol d'éthanol 100%, mélanger, laisser 5 min à TA
- Centrifuger 14 min à 14.000 rpm, décanter. Rincer avec l'éthanol 70%
- Centrifuger 6 min à 14.000 rpm, décanter. Sécher le culot sous vide.
- Resuspendre le culot dans 500 µl de TE

3.1.9. Criblage des clones d'intérêt

A) Par PCR :

Reprendre plusieurs colonies dans 50 µl d'eau chacune

Réaliser une PCR sur 2 µl de colonie en suspension avec 18 µl de mix

Mix :

2 µl tampon
2 µl dNTP
2 µl amorce 1 (amorce du vecteur)
2 µl amorce 2 (amorce de l'insert)
0.4 µl GoTaq polymérase (promega)
9.6 µl d'eau distillée

B) Par restriction :

Prendre 4µl de plasmide d'intérêt et le mettre dans un tube Eppendorf.

Ajouter 5µl de tampon EcoRI.

Ajouter 40 µl d'eau distillée.

Mettre 1 µl d'enzyme de restriction EcoRI.

Incuber à 37°C pendant 2 heures.

Profil pCMVHA-GNAQ	960pb	3900pb	
Profil pACT2 AD-GNAQ	7985pb	941pb	271pb

3.2. Double-Hybride

3.2.1. Transformation de la levure

- Inoculer quelques colonies Y190 dans 1ml d'YPD, vortexer
- Transférer dans un erlen contenant 50 ml d'YPD
- Incuber O.N. à 30°C en agitant (la DO600 doit atteindre plus de 1,5)
- Transférer 30 ml de culture dans un erlen contenant 300 ml d'YPD (la DO600 doit être de 0,2 - 0,3)
- Incuber 3 heures à 30°C en agitant (la DO600 doit être de 0,4-0,6)
- Diviser la culture dans des flacons de 50 ml et centrifuger 5 min à 1.000g
- Décanter les surnageants et re-suspendre les culots dans 5 ml d'eau chacun. Pooler les cellules en un seul tube.
- Centrifuger 5 min à 1000g, décanter le surnageant
- Re-suspendre le culot dans 1,5ml de 1x TE/ 1x LiAc fraîchement préparé
- Dans un Eppendorf mettre 0,1 µg d'ADN plasmidique et 0,1 mg de DNA carrier dénaturé.
- Ajouter 0,1 ml de suspension de levure et vortexer
- Ajouter 0,6 ml de PEG/LiAc (8 ml PEG 10%, 1 ml TE 10X, 1ml LiAc 10X) et vortexer pendant 10 secondes
- Incuber 30 min à 30°C en agitant
- Ajouter 70 µl de DMSO, mélanger par inversion (ne pas vortexer)
- Incuber 15 min à 42°C et 2 min sur glace.
- Centrifuger 5 secondes à 14.000 rpm
- Décanter le surnageant et re-suspendre le culot dans 1 ml d'eau
- Etaler 200 µl sur boîte contenant le milieu sélectif
- Incuber quelques jours à 30°C.

3.2.2. Mise en évidence de l'activité β -galactosidase en coulant l'X-gal sur boîte

a) Repiquer les colonies sur milieu sélectif

Mettre 100 μ l de milieu adéquat dans les puits d'une plaque multi-puits

Y ajouter les colonies. Incuber quelques heures à 30°C

Avec un hérissou, repiquer les colonies sur boîte avec milieu adéquat

Incuber quelques jours à 30°C.

b) Préparer le X-gal :

Dissoudre 50 mg d'agarose dans 5 ml d'eau (en chauffant)

Ajouter 5 ml NaPO₄ 0,5M pH7

0,6 ml diméthylformamide

100 μ l SDS 10%

200 μ l de X-gal 2%

c) Verser 10 ml sur chaque boîte

d) Incuber quelques heures à 30°C.

3.2.3. Extraction des protéines de levure

a) Ensemencer une grosse colonie fraîche dans 5ml de SD-TRP-LEU.

Ensemencer le contrôle négatif dans 10ml d'YPD.

Incuber le tout à 30°C avec une agitation de 200 rpm

Les colonies ne peuvent pas être plus vieilles de 4 jours et doivent avoir une taille de 1-2mm.

Incuber toute la nuit à 30°C avec une agitation de 200 rpm

b)

- vortexer les pré-cultures pendant 1 minute.
- Mettre l'entièreté de culture de la nuit dans 50ml SD-TRP-LEU pour le clone d'intérêt et dans 50ml d'YPD pour le contrôle négatif.
- Incuber à 30°C avec agitation de 200 rpm jusqu'à obtenir une D.O₆₀₀ de 0.4-0.6
- Refroidir rapidement les cultures, dans un tube à moitié rempli de glace.
- centrifuger pendant 5 minutes à 2500 rpm. à 4°C
- Décanté le surnageant et re-suspendre avec de l'eau froide.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 2500 rpm à 4°C.
- Geler immédiatement le culot sur de la carbo glace ou dans de l'azote liquide. Stocker à -70°C si cela est nécessaire.

Formule : densité optique à 600 X volume total de la culture = unités de densité optique à 600

Cette formule servira à calculer la quantité de cracking buffer nécessaire.

c)

- Calculer la quantité de cracking buffer préchauffé à 60°C : 100µl pour 7.5 unités de D.O. à 600.

Solution cracking buffer complet:

1 ml Cracking buffers
10µl β-mercaptoethanol
70 µl inhibiteur protéases
100X.

- Dégeler rapidement le culot en versant le cracking buffer complet préchauffé à 60°C.
- Transférer les cellules en suspension dans un tube Ependorf contenant 80 µl de bille de verre pour 7.5 unités de D.O₆₀₀
- Chauffer échantillon à 70°C pendant 10 minutes.
- Vortexer pendant 1 minute.
- Centrifuger à 14000 rpm à T.A pendant 5 minutes
- Transférer le surnageant dans un tube de 1.5 ml et stocker le sur glace.
- Faire chauffer le tube avec les billes à 100°C pendant 3-5 minutes.
- Vortexer pendant 1 minute.
- Centrifuger à T.A. et à 14000 rpm pendant 5 minutes
- Combiner les 2 surnageants
- Faire bouillir les échantillons et déposer directement sur le SDS-PAGE ou stocker les à -70°C.

3.3. Transfection des cellules et co-immunoprécipitation

3.3.1. Transfection des cellules HEK 293 T

A) Préparation des cellules

Un jour avant la transfection, trypsiniser une boîte T75 contenant des 293 T (aspirer le milieu, rincer 1X avec 5ml de PBS, ajouter 2ml de trypsine-EDTA, incuber 3min à 37°C ensuite ajouter 8ml de DMEM+FBS+P/S).

Compter les cellules dans hematocytomètre après avoir mélangé un échantillon avec du bleu trypan.

Ensemencer une plaque à 6 puits à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules par puits,
Incuber 24 heures à 37°C avec une atmosphère de 5% CO₂.

B) Transfection

Pour réaliser ces transfections, nous avons utilisé 3µg d'ADN plasmidique avec 200µl de NaCl 150mM, vortexer

Ajouter 9,87 µl l'agent d'ExGen 500 (Fermentas®) vortexer 10 secondes

Incuber pendant 10 minutes à TA.

L'entièreté de la solution a été mise goutte à goutte dans chaque puits.

Incuber à 37°C pendant 24h avec une atmosphère de 5% CO₂

3.3.2. *Western blot sur lysat*

A. Préparation des lysats

- Aspirer le milieu et rincer avec du PBS, ajouter 300µl de lysis buffer NP-40 + inhibiteur de protéases (Roche complete mini)
- Laisser le lysat 15 minutes.
- Récupérer dans un tube Eppendorf et centrifuger 10 minutes à 14 000 rpm
- Récupérer le surnageant. Stocker à -20°C
- 30µl de SDS loading buffer 2X 30µl de lysat. Bouillir 5 minutes.
- Déposer un échantillon sur le gel SDS-PAGE_

B. SDS-PAGE

Pour 2 gels à 10%.

Pour préparer le running.

- 2.5 ml d'acrylamide
- 4.85 ml d'eau
- 2.5 ml de Tris HCl 1.5M
- 100 µl de SDS à 10%
- 100 µl d'APS 10%
- 5 µl de Temed (BioRad)

Pour préparer le stacking.

- 300 µl d'acrylamide
- 1.9 ml d'eau
- 750 µl de Tris HCl 1.0M
- 30 µl de SDS à 10%
- 30 µl d'APS 10%
- 3 µl de Temed (BioRad)

Charger 15µl d'échantillon sur 2 gels 10% d'acrylamide et faire migrer à 100V.

3.3.3. Transfert semi-dry sur membrane PVDF

Laisser chaque gel sur une plaque de verre.

Pour chaque gel, tremper la membrane PVDF (Hybond-pd SCIENCES) dans le méthanol pendant 1 minute.

La rincer plusieurs fois à l'eau.

La mettre dans la solution PVDF pendant 1 minute puis sur la déposer sur le gel.

Tremper 3 papiers wathmans dans la solution PVDF. Les mettre sur la membrane.

Retourner le montage et retirer la plaque de verre.

Tremper 3 papiers Wathman dans la solution PVDF les mettre sur le gel.

Mettre le montage avec la membrane PVDF en dessous du gel dans l'appareil à blotting. Fermer le tout et brancher l'appareil sur 225mA pendant 1 heure.

3.3.4. Détection des protéines

Bloquer les membranes dans du lait 5% pendant 1 heure. Laver 1 fois 15 minutes dans du PBST.

Incuber ON avec 5 ml d'anticorps primaire dilué 5000X dans du lait 5%.

Laver 3 fois 15 minutes avec du PBST 0,5%.

Incuber avec l'anticorps secondaire pendant 1 heure dans 5ml de lait 5%.(1/2000 pour anti-souris, 1/5000 pour anti-rat)

Laver 3 fois 15 minutes dans du PBST 0,05%.

Révéler les membranes pendant 5 minutes avec 2ml de substrat de la HRP (supersignal west Pico chemoluminescent substrate, Pierce).

Exposer les membranes avec un film ECL.

3.3.5. Co-Immunoprécipitation

Prendre une plaque à 6 puits de cellules transfectées depuis 24-48 heures. Aspirer le milieu et rincer avec du PBS sur glace.

1. lyser les cellules avec du lysis buffer NP-40 + inhibiteur de protéase sur glace.
 - 25µl d'inhibiteur de protéases pour 1ml de lysis buffer NP-40 (minicomplete Roche)
2. incuber sur glace pendant 15 minutes et gratter la surface des puits avec un grattoir.
3. récupérer et centrifuger à 14 000 rpm pendant 10 minutes.
4. aliquoter 0,5ml et ajouter 1µg d'anticorps anti-d2 ou anti-express.
5. incuber pendant 1 heure à 4°C sur une plateforme agitatrice.
6. ajouter 50 µl de protéines A-agarose et incuber pendant 4 heures à 4°C. centrifuger pendant 30-60 secondes à 12 000 rpm.
7. laver 3X avec 0.5ml de NP-40
8. reprendre la résine dans 40µl de SDS loading buffer 2X.
9. faire bouillir pendant 2 minutes.

10. centrifuger pendant 3 minutes
11. charger directement sur gel SDS-PAGE à 10%.

3.4. Séquence des primers

Primer MAGED2

Pcho96 : 5'-cgtggtctcgactgtggtttctccta-3'

Pcho81 : 5'-acttggtgaagtacctgttggc-3'

PCMVHA-GNAQ

pCMV seq : 5'-ggatgccatgcattaagatga-3'

GNAQ BamHI sens : 5'-atgactctggagtccatcatggcg-3'

GNAQ 170 Antisens : 5'-caagcagatgaggatcatcca-3'

GNAQ 265 sens: 5'-gccatgatcagagccatggac

GNAQ 580 sens : 5'-ctttgacttacaagtgtcatt-3'

GNAQ 860 sens: 5'-acctagtcgactactcccag-3'

GNAQ BamHI antisens : 5'-ctgaaggagtacaatctggtctaa-3'

pACT2 AD-GNAQ

pACT2 5' : 5'-ggactgaggtcgtagta-3'

GNAQ BamHI sens: 5'-atgactctggagtccatcatggcg-3'

GNAQ 170 Antisens : 5'-caagcagatgaggatcatcca-3'

GNAQ 265 sens: 5'-gccatgatcagagccatggac

GNAQ 580 sens : 5'-ctttgacttacaagtgtcatt-3'

GNAQ 860 sens: 5'-acctagtcgactactcccag-3'

GNAQ BamHI antisens : 5'-ctgaaggagtacaatctggtctaa-3'

3.5. Matériel

GTE : 50mM glucose, 25mM Tris HCl pH8, 10mM EDTA.

NaOH/SDS : 200µl NaOH 10N, 1ml SDS 10%, eau jusqu'à 10ml.

KAc/Hac : 6ml KAc 5M, 1,15ml HA, 2,25ml eau.

PBST : 100ml PBS 10X, 500µl tween20, porter à 1l avec de l'eau.

YPD: 20g/l bactone, 10g/l yeast extract, 20g/l glucose, 20g/l agar (pour les boîtes).

Inhibiteur de protéases 50X: 1 pastille de minicomplete (Roche®) dissoute dans 1,5ml d'eau.

Lysis buffer NP40 : 50mM TrisHCl PH7.5, 150mM NaCl, 1% NP40

Cracking buffer stock : urée 8M, SDS 5%, Tris HCl PH 6.8 40mM, EDTA 0.1mM, Bromophenol bleu 0.4 mg/ml.

SDS loading buffer 2X: 100mM TrisHCl PH 6,8, 200mM DTT, 4%SDS, 0,2% bromophénol bleu, 20% glycérol

D.O 16,6X (-trp-leu-his-ade) 1L : 500mg Isoleucine, 2500mg L-Valine; 333.33mg L-Arginine; 500mg L-Lysine; 333.33mg L-Méthionine; 833.33mg L-Phénylalanine; 333.33mg L-Thréonine; 500mg L-Tyrosine; 333.33mg L-Uracile.

LiAc : acétate de lithium 1M

PEG : 50% PEG 3350

BIBLIOGRAPHIE

1. E. De Plaen, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Brasseur F, van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C, et al.
Structural, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. Immunogenetics. 1994.
2. De Backer, O., A.M. Verheyden, B. Martin, D. Godelaine, E. De Plaen, R. Brasseur, P. Avner, and T. Boon
Structure, chromosomal location and expression pattern of three mouse genes homologous to the human MAGE genes. Genomics. 1995
3. De Smet, C., De Backer, I. Faraoni, C. Lurquin, F. Brasseur, and T. Boon
The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996
4. E. De Plaen E. O. De Backer, D. Arnaud; B. Bonjean, P. Chomez, V. Martelange, P. Avner, P. Baldacci, C. Babinet, S.Y. Hwang, B. Knowles, T. Boon
A new family of mouse genes homologous to the human MAGE genes. Genomics. 1998
5. S. Lucas, F. Brasseur and T. Boon
A new MAGE gene with ubiquitous expression does not code for known MAGE antigens recognized by T Cells. Cancer Research. 1999
6. C. Österlund, V. Töthönen, K. Öhman Forslund; K. Nordqvist
MAGE B4, a Novel Melanoma Antigen (MAGE) Gene Specifically Expressed during Germ Cell Differentiation. Cancer Research. 1999
7. S. Lucas, E. De Plaen and T. Boon
MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3, four new members of the MAGE family with tumor-specific expression. Int J Cancer. 2000
8. Chomez P., O. De Backer, M. Bertrand, E. De Plaen, T. Boon and S. Lucas
An overview of the MAGE family with the identification of new human members of the family. Cancer Res. 2001
9. Barker, P.A. and A. Salehi
The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. J Neurosci Res. 2002
10. M. Bertrand, I. Huijbers, P. Chomez and O. De Backer
Comparative expression analysis of the MAGE genes during embryogenesis and brain development. 2004
11. Muscatelli, F., D.N. Arous, A. Massacrier, I. Boccaccio, M. Le Moal, P. Cau and H. Cremer
Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioural

alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. Hum Mol Genet. 2000

12. Tcherpakov, M., F.C. Bronfman, S.G. Conticello, A. Vaskovsky, Z. Levy, M. Niinobe, K. Yoshikawa, E. Arenas, and M. Fainzilber
The p75 neurotrophin receptor interacts with multiple MAGE proteins. J Biol Chem 2002.

13. D. Andrieu, F. Watrin, M. Niinobe, K. Yoshikawa, F. Muscatelli and P.A. Fernandez
Expression of the Prader-Willi gene Necdin during mouse nervous system development correlates with neuronal differentiation and P75NTR expression. Gene Expression Patterns. 2003

14. K.I. Kuwako, H. Taniura, K. Yoshikawa
Necdin-related MAGE Proteins Differentially Interact with the E2F1 Transcription Factor and the p75 Neurotrophin Receptor. The Journal of Biological Chemistry. 2003

15. Jordan, B.W., D. Dinev, V. LeMellay, J. Troppmair, R. Gotz, L. Wixler, M. Sendtner, S. Ludwig, and U.R. Rapp
Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inducible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death. J Biol Chem. 2001

16. W. Van Crielinge and R. Beyaert
Yeast Two-Hybrid. State of the Art. 1999

17. X. Wang, J.H. Bauer, Y. Li, Z. Shao, F.S. Zetoune, E. Cattaneo, C. Vincenz
Characterization of a p75(NTR) apoptotic signalling pathway using a novel cellular model. J Biol Chem. 2001

18. Salehi, A.H., P.P. Roux, C.J. Kubu, C. Zeindler, A. Bhakar, L.L. Tannis, J.M. Verdi, and P.A. Barker
NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. Neuron. 2000

19. Salehi, A.H., S. Xanthoudakis and P.A. Barker
NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. J Biol Chem. 2002

20. P.P. Roux and P.A. Barker
Neurotrophin signalling through the p75 neurotrophin receptor. Progress in Neurobiology. 2002.

21. G. Dechant , YA. Barde
The neurotrophin receptor p75(NTR):novelfunctions and implications for diseases ofthe nervous system. Nat Neurosci. 2002
22. Masuda, Y., A. Sasaki, H. Shibuya, N. Ueno, K. Ikeda and K. Watanabe *Dlxin-1, a nove! protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptiona! function.* J Biol Chem. 2001
23. A. Sasaki, Y. Masuda, K. Iwai, K. Ikeda and Ken Watanabe
A ring finger protein prajal regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MA GE/Necdin Family protein, Dlxin-1. J Biol Chem. 2002
24. Matsuda, T., H. Suzuki, I. Oishi, S. Kani, Y. Kuroda, T. Komori, A. Sasaki, K. Watanabe, and Y. Minami
The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with the MAGE-family protein Dlxin-1 and regulates its intracellular distribution. J Biol Chem. 2003
25. Williams, M.E., P. Strickiand, K. Watanabe and L. Hinck
UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE. J Biol Chem. 2003
26. C.J. Wen, B. Xue, W.X. Qin, M. Yu, M.Y Zhang, D.H. Zhao, X. Gao, J.R. Gu, C.J. Li
HNRAGE a human neurotrophin receptor interacting MAGE homologue, regulates p53 transcriptional activity and inhibits ce!! pro!zferation. FEBS letters. 2004
27. M. Gothardt, M. Trommsdorff, MF Nevitt, J. Shelton, JA Richardson, W. Stockinger, J. Nimpf, J. Herz
Interactions ofthe !ow density lipoprotein receptor genefamily with cytosolic adaptor and scaffo!dproteins suggest diverse bi!ologica!functions in ce!!uiar communication and signal transduction. J Biol Chem.2000
28. L. Smeijers, S. Willems, A. Lauwers, E. Thiry, F. van Leuven, AI Roebroek
Functiona! expression of murine LRP1 requires correction ofLrpl cDNA sequences. Biochim Biophys Acta. 2002
29. P. van der Geer
Phosphory!ation of LRP1 : regulation of transport and signa! transduction. Trends Cardiovasc Med. 2002
30. J. Liu, S. Yu, D. Litman, W. Chen and L. S. Weinstein
IdentJication ofa methylation imprint mark within the mouse Gnas !ocus. Molecular and Cellular Biology. 2000
31. J. Peeters, SF Wroe, CA Wells, HI Miller, D. Bodie, CV Beechey, CM Williamson, G. Kelsey

A cluster of oppositely imprinted transcripts at the Gnas locus in the distal imprinting region of mouse chromosome 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999

32. L. S. Weinstein, S. Yu, D.R. Warner and J. Liu
Endocrine manifestations of stimulatory G protein- α -subunit mutations and the role of genomic imprinting. Endocrine Reviews. 2001

33. S.F. Wroe, G. Kelsey, J.A. Skinner, D. Bodle, S.T. Bail, C.V. Beechey, J. Peters and C.M. Williamson
An imprinted transcript, antisense to Nesp, adds complexity to the cluster of imprinted genes at the mouse Gnas locus. Genetics. 2000

34. L. S. Weinstein, S. Yu, C.A. Ecelbarger
Variable imprinting of the heterotrimeric G protein G α -subunit within different segments of the nephron. Am J Physiol Renal Physiol. 2000

35. Offermanns S, Zhao LP, Gohia A, Sarosi I, Simon MI, Wilkie TM.
Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G α q/G α 11-mutant mice. F EMBIO J. 1998 Aug 3;17(15):4304-12.

36. Johansson BB, Minsas L, Aragay AM.,
Proteasome involvement in the degradation of the G(q) family of G α subunits. F FEBSJ. 2005 Oct 272 (20):5365-77

37. Tseng YH, Butte AJ, Kokkotou E, Yechoor VK, Taniguchi CM, Kriauciunas KM, Cypess AM, Niinobe M, Yoshikawa K, Patti ME, Kahn CR.
Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and necln. Nature cell biology 2005 Jun;7(6):601-11. 2005 May 15