

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta  
Katedra Biochemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science  
Department of Biochemistry**

Doktorský studijní program: Biochemie  
Ph.D. study program: Biochemie

Autoreferát disertační práce  
Summary of the Ph.D. Thesis



**Molekulární mechanismy regulace FcεRI signalizace žírných buněk  
Molecular mechanisms of regulation of FcεRI signaling in mast cells**

**Mgr. Monika Bambousková**

Školitel/Supervisor: RNDr. Petr Dráber, DrSc.

Praha, 2016



## SOUHRN

Žírné buňky tvoří důležitou součást imunitního systému. Při patologických situacích jsou aktivovány a jsou zodpovědné za alergické reakce. Detailní poznání molekulárních mechanismů vedoucích k jejich aktivaci je proto důležité zejména pro vývoj nových postupů v léčbě alergických reakcí. Nejdůležitějším transmembránovým receptorem žírných buněk je vysokoafinitní Fc receptor pro IgE (FcεRI). FcεRI váže IgE na plazmatické membráně. Po prokřížení polyvalentním antigenem, imunoreceptorové tyrosinové aktivační motivy (ITAM) v intracelulární části receptoru jsou fosforylovány a spouští se signální dráha vedoucí k buněčné aktivaci. Signalizace přes FcεRI po vazbě antigenu je kriticky závislá na interakci s intracelulárními protein-tyrosinkinasami, které zprostředkovávají fosforylaci ITAM motivů, a zároveň na mnoha dalších komponentách signalizační dráhy. Tato práce byla soustředěna na studium signalizačních procesů vedoucích k aktivaci žírných buněk na několika různých úrovních s důrazem na rané fáze signalizace přes FcεRI. Nejprve jsme se zaměřili na roli protein-tyrosinfosfatas (PTP) při inicializaci fosforylace FcεRI. Podařilo se nám ukázat, že aktivace FcεRI antigenem vede k oxidaci tyrosinu v aktivním místě PTP a tudíž k jejich inhibici. Topografie inaktivních PTP na plazmatické membráně ukázala jejich bezprostřední blízkost k FcεRI a aktinovému cytoskeletu. Získaná data nám umožnila formulovat nový model inicializace signalizace přes FcεRI. Rovněž jsme se věnovali studiu dalších vybraných proteinů (tetraspaninu CD9, transmembránovému adaptorovému proteinu PAG a regulátoru serinových palmitoyl transferas ORMDL3) nebo působení vybraných chemikálií jako etanol a metyl-β-cyklohextrin na funkci FcεRI signalosomu během aktivace žírných buněk.

Hlavní náplní této práce bylo nalézt nové regulátory FcεRI signalizace. Za tímto účelem byl proveden "screen" s využitím RNA interference, kde jsme identifikovali 15 regulátorů aktivace žírných buněk. Pro detailní funkční analýzu byl vybrán galectin-3 (Gal3). Žírné buňky se sníženou expresí Gal3 vykazovaly zvýšenou degranulaci, vápníkovou odpověď a fosforylaci některých signálních proteinů po aktivaci antigenem. Přestože Gal3 neovlivňoval fosforylaci FcεRI jako takového, buňky se sníženou expresí vykazovaly defektní internalizaci IgE, doprovázenou sníženou ubikvitinylací receptoru. Gal3 byl tedy identifikován jako stěžejní regulátor řídící stabilitu aktivovaného FcεRI komplexu na plazmatické membráně a následného intracelulárního transportu.

Fyziologická funkce žírných buněk záleží také na jejich migraci. Dílčím cílem této práce bylo přispět k poznání signálních drah řídících pohyb žírných buněk. Ukázali jsme, že Gal3 pozitivně reguluje adhezi a motilitu na fibronektinu, zároveň však negativně ovlivňuje chemotaxi za antigenem. Získaná data rovněž napomohla objasnit funkci dalších proteinů (CD9, PAG a ORMDL3) v migraci žírných buněk.

## ABSTRACT

Mast cells are critical component of the immune system. In pathological situations, they are activated and are responsible for allergic reaction. Therefore, detail understanding of mast cell activation at molecular level is important for design of new therapies of allergic diseases. Principal transmembrane receptor of mast cells is the high-affinity Fc receptor for IgE (FcεRI). FcεRI anchors IgE on mast cell surface and upon cross-linking with multivalent antigen it becomes phosphorylated at its intracellular immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs). This triggers signaling cascade leading to cell degranulation and cytokine production. The antigen-mediated signaling through the FcεRI is critically dependent on interplay with intracellular protein-tyrosine kinases that phosphorylate the ITAM motifs and many other components of the signaling pathway. This study was focused on better understanding of signaling events leading to mast cell activation; emphasis was put on early activation events. First, we examined the role of protein-tyrosine phosphatases (PTP) in FcεRI phosphorylation. We found that upon antigen triggering of FcεRI, PTPs undergo inhibition by oxidation of their active site located tyrosine. Studies of plasma membrane topography of inactivated PTPs showed their proximity to FcεRI receptors and actin cytoskeleton. These and other data allowed us to postulate a new model of FcεRI signal initiation. We also investigated the role of selected proteins (tetraspanin CD9, transmembrane adaptor protein PAG, serine palmitoyl transferase regulator ORMDL3) or selected chemicals as ethanol and methyl-β-cyclodextrin on FcεRI signalosome properties in the course of mast cell activation.

Major aim of this work was to identify new regulators of FcεRI signaling. For this purpose we performed high-throughput screen using RNA interference technology and identified 15 regulators of mast cell activation. We chose galectin-3 (Gal3) for detail functional analysis of its action in FcεRI signaling pathway. Mast cells with reduced Gal3 expression showed increased antigen-mediated degranulation, calcium response and phosphorylation of several signal-transduction proteins. Although phosphorylation of the FcεRI was not affected, cells with Gal3 knockdown showed impaired IgE internalization that was accompanied by decreased receptor ubiquitination. Thus, we identified Gal3 as a critical regulator controlling FcεRI plasma membrane stability and trafficking.

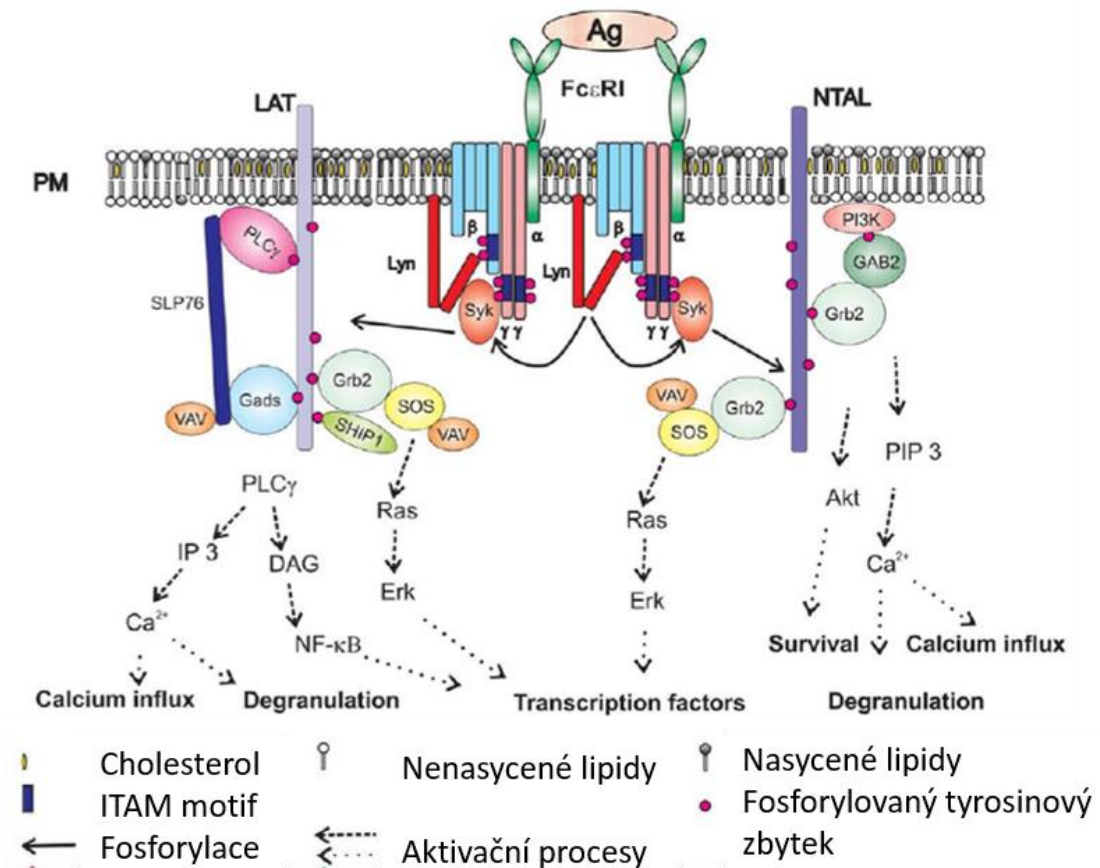
An important role of mast cells in health and disease also depends on their migration. To this end we examined signaling pathways controlling cell movement. We found that Gal3 positively regulates fibronectin-mediated mast cell adhesion and motility but negatively affects antigen-mediated cell chemotaxis. Our data also showed that antigen-mediated mast cell chemotaxis was regulated by CD9, PAG and ORMDL3 proteins.

# 1. Úvod

Žírné buňky jsou imunitní buňky odvozené z kostní dřeně, které zakončují svůj vývoj v tkáních. Nejčastěji bývají studovány ve spojení s alergickými reakcemi. Nejnovější výsledky nicméně poukazují na důležitou roli žírných buněk v nejrůznějších fyziologických procesech, které sahají daleko za hranice studia alergických reakcí. Dnes chápeme žírné buňky jako regulátory komplexních imunitních a dalších fyziologických procesů, které přímo nebo nepřímo ovlivňují funkci ostatních buněk a jejich vzájemnou komunikaci [1-3]. Nejvýznamnějším povrchovým receptorem žírných buněk je vysokoafinitní Fc receptor pro imunoglobulin (Ig) E (FcεRI) ze skupiny receptorů MIRR (z angl. „multichain immune recognition receptor“). Aktivace FcεRI spouští signální dráhu, která vede k buněčné aktivaci. Žírné buňky jsou charakteristické obsahem specializovaných granulí, které jsou při aktivaci buněk vylity do extracelulárního prostoru v procesu zvaném degranulace. Tyto váčky obsahují široké spektrum biologických mediátorů jako je histamin, serotonin, cytokiny a proteasy. Narušení delikátně regulovaného procesu degranulace žírných buněk může vést ke vzniku mnoha onemocnění. Detailní pochopení procesů vedoucích k aktivaci žírných buněk a signalizačních drah spouštějících degranulaci je proto nejen nutným předpokladem pro vývoj nových léčebných postupů, ale také důležitým aspektem pro pochopení fungování imunitního systému jako takového.

FcεRI váže IgE na povrchu žírných buněk a po vazbě polyvalentního antigenu (Ag) na IgE dochází k prokřížení IgE-FcεRI komplexů. Prvním zaznamenaným biochemickým dějem po agregaci FcεRI je fosforylace imunoreceptorových tyrosinových aktivačních motivů (ITAM), které jsou lokalizovány v intracelulární části  $\beta$  a  $\gamma$  podjednotek receptoru. Fosforylace je zprostředkována tyrosinovými kinasami z rodiny SRC (z angl. „SRC family kinases“, SFK), zejména LYN kinasou. Výsledky předešlých studií ukázaly, že plná aktivace receptoru je spojena s jeho translokací do specializovaných membránových mikrodomén, nazývaných někdy lipidové rafty [4]. Po agregaci FcεRI se tyto membránové mikrodomény shlukují do větších a stabilnějších struktur a shromažďují molekuly aktivovaného receptoru. Nicméně jak přesně agregace receptoru spouští fosforylaci ITAM LYN kinasou není dosud detailně vysvětleno.

Obrázek 1 (str. 6) znázorňuje zjednodušené schéma FcεRI signalizace vedoucí k aktivaci buněk. Fosforylované ITAM FcεRI interagují s cytoplazmatickou SYK (z angl. „spleen tyrosine kinase“) kinasou, která je následně aktivována fosforylací [5].



**Obrázek 1. Schéma FcεRI signalizace.** FcεRI je agregován Ag a celý komplex poté translokuje to mikrodomén plazmatické membrány (PM) obsahujících cholesterol. Receptorové podjednotky β a γ jsou fosforylovány LYN kinasou a následně SYK kinasou. Aktivovaná SYK kinasa dále přenáší signál na další signální molekuly jako jsou transmembránové adaptorové proteiny LAT a NTAL. Fosforylované tyrosinové zbytky LAT a NTAL pak poskytují vazebná místa pro interakci s dalšími signálními molekulami. Převzato z [6].

Aktivovaná SYK fosforyluje mnoho signálních proteinů, z nichž klíčovou roli hrají transmembránové adaptorové proteiny LAT (z angl. „linker for activated T cells“) a NTAL (z angl. „non-T cell activation linker“). LAT obsahuje několik tyrosinových zbytků v cytoplazmatické části a po jejich fosforylaci slouží jako dokovací místo pro další signální molekuly, které se tak soustřeďují v blízkosti plazmatické membrány [6]. Mezi ně patří např. cytoplazmatické adaptorové proteiny jako SLP-76 (z angl. „SH2-containing leukocyte protein of 76 kDa a GRB2 (z angl. „growth factor receptor bound protein 2“) nebo enzymy jako fosfolipasa Cγ (PLCγ). V blízkosti plazmatické membrány je PLCγ aktivována fosforylací a následně pak katalyzuje hydrolýzu membránového fosfatidylinositolu-4,5-bisfosfátu na solubilní inositol-1,4,5-trisfosfát (PIP3) a membránový diacylglycerol (DAG). Tyto molekuly pak vedou k vylití vápníkových iontů z intracelulárních zásob a k aktivaci proteinkinasy C (PKC). SLP-76 a GRB2 interagují s regulačními proteiny GEF (z angl. „guanine exchange

factors“) jako jsou SOS a VAV, které napomáhají aktivaci malých GTPas jako jsou Ras, Rac a Rho. Tyto pak dále propagují signál a regulují komplexní děje vedoucí k degranulaci buněk.

Aby nedocházelo k potenciálně nebezpečným nežádoucím imunitním reakcím, musí být signální procesy vedoucí k aktivaci buněk přísně regulovány. Fosforylační děje katalyzované protein-tyrosinkinasami (PTK) jsou balancovány aktivitou protein-tyrosinfosfatas (PTP) [5]. Jakou roli mají PTP během samotné inicializace FcεRI signalizace a fosforylace ITAM motivů receptoru nebylo dosud probádáno. Mezi další molekuly, které se uplatňují při negativní regulaci signalizace přes MIRR receptory patří např. transmembránový adaptorový protein PAG (z angl. „phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains“). Funkce PAG spočívá v mobilizaci C-SRC tyrosinové kinasy (CSK), která je zodpovědná za fosforylaci C-koncového inhibičního tyrosinu SFK a tudíž jejich deaktivaci [7]. Intenzita signalizace přes FcεRI je rovněž modulována internalizací agregovaného FcεRI, jeho transportem do lysozomu a následnou degradací [8].

Studia zaměřená na genový polymorfismus asociovaný s astmatem identifikovala asociaci 17q12-q21 lokusu se zvýšeným rizikem vzniku astmatu a dalších zánětlivých onemocnění [9]. Tato oblast kóduje gen proteinu ORMDL (z. angl. ORM-like) 3. Přestože se žírné buňky podílejí na patologii spojené s astmatickým onemocněním, role ORMDL3 v aktivaci žírných buněk nebyla zatím zkoumána.

Hlavním signálem pro usídlení žírných buněk v periferních tkáních je vazba faktoru kmenových buněk (z angl. „stem cell factor“, SCF) na povrchový receptor KIT [10]. U hlodavců je dalším nezbytným signálem interleukin (IL)-3. Progenitory žírných buněk, které doputují do periferních tkání, dozrávají pod vlivem lokálního chemického prostředí a stávají se tak terminálně diferenciovanými žírnými buňkami. Migrace žírných buněk do/v periferních tkání je dále modulována přítomností Ag a řadou dalších chemokinů a molekul které se váží na receptory na povrchu žírných buněk jako např. prostaglandín E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), který je rozeznáván E-prostanoidovými receptory [11].

## 2. Cíle práce

### 1. Charakterizovat funkci PTP při inicializaci signalizace přes FcεRI

- a. Zjistit topografii PTP negativně regulovaných oxidací (oxPTP) na plazmatické membráně buněk krysí bazofilní leukémie (RBL) nebo myších žírných buněk odvozených z kostní dřeně (BMMC).
- b. Vyhodnotit lokalizaci oxPTP vzhledem k FcεRI signalosomu.
- c. Vyhodnotit lokalizaci oxPTP vzhledem k aktinovému cytoskeletu.
- d. Zhodnotit současné modely inicializace FcεRI signalizace vzhledem k nově získaným výsledkům.

### 2. Identifikovat mechanismus aktivace žírných buněk přes tetraspanin CD9

- a. Analyzovat lokalizaci CD9 na plazmatické membráně vzhledem k dalším komponentám FcεRI signalosomu.
- b. Analyzovat roli CD9 v buněčném rozprostírání na fibronektinu.

### 3. Studovat roli PAG adaptorového proteinu v regulaci signalizace před FcεRI

- a. Připravit lentivirální vektory kódující PAG s připojenou sekvencí Myc.
- b. Určit topografii PAG na plazmatické membráně.
- c. Analyzovat buněčné rozprostírání na fibronektinu u BMMC exprimujících normální PAG protein (z angl. „wild type“, WT) a BMMC s vyřazenou expresí PAG (z angl. „knockout“, KO).
- d. Srovnat četnost žírných buněk *in vivo* u PAG KO myši a WT myši.

### 4. Charakterizovat funkci ORMDL3 v žírných buňkách

- a. Analyzovat buněčné rozprostírání na fibronektinu u BMMC se sníženou (z angl. „knockdown“, KD) a zvýšenou expresí ORMDL3.
- b. Optimalizovat obrazovou analýzu mikroskopických dat umožňující kvantifikaci translokace transkripčního faktoru NF-κB (z angl. nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells“) z jádra do cytoplazmy.



## **5. Studovat vliv etanolu na průběh aktivace myších žírných buněk**

- a. Prošetřit vliv etanolu na expresi povrchových receptorů FcεRI a KIT průtokovou cytometrií.
- b. Změřit degranulaci aktivovaných BMDC ovlivněných etanolem pomocí sledování exprese lysozomálního proteinu asociovaného s membránou 1 (LAMP1) na povrchu buněk.
- c. Analyzovat vliv etanolu na internalizaci IgE.

## **6. Identifikovat nové regulátory FcεRI signalizace s využitím RNA interference (RNAi) a „screeningu“ s vysokou výkonností**

- a. Optimalizovat funkční testy vhodné pro RNAi „screening“ v žírných buňkách.
- b. Optimalizovat lentivirální transdukcí žírných buněk vektory kódujícími krátké vlásenky RNA (shRNA) ve formátu vhodném pro RNAi „screening“ a experimenty ve velkém formátu.
- c. Vybrat a analyzovat geny s neznámou/nedostatečně prozkoumanou funkcí v signalizaci přes FcεRI, naměřit a analyzovat data z experimentů provedených ve velkém formátu a identifikovat nové regulátory FcεRI signalizace.
  - i. Analyzovat funkci galektinu-3 (Gal3) v degranulaci BMDC s Gal3 KD stanovením sekretované β-glukuronidasy a průtokovou cytometrií.
  - ii. Připravit konstrukty pro přípravu buněk se zvýšenou expresí Gal3 a analyzovat jejich degranulaci průtokovou cytometrií.
  - iii. Prošetřit roli Gal3 ve vápníkové odpovědi aktivovaných BMDC.
  - iv. Analyzovat obsah filamentárního aktinu (F-aktinu) v aktivovaných BMDC s Gal3 KD.
  - v. Analyzovat fosforylaci stěžejních signálních proteinů FcεRI dráhy u BMDC s Gal3 KD.
  - vi. Optimalizovat měření pro analýzu internalizace IgE průtokovou cytometrií s využitím odmytí povrchového IgE změnou pH prostředí a charakterizovat IgE internalizaci u BMDC s Gal3 KD.

- vii. Optimalizovat mikroskopickou metodu pro analýzu a kvantifikaci internalizace IgE a intracelulárního transportu IgE v BMMC s Gal3 KD.
- viii. Vyhodnotit funkci Gal3 ve fosforylaci a ubikvitinylaci FcεRI.
- ix. Analyzovat funkci Gal3 v adhezi a pohyblivosti BMMC.

### 3. Materiál a metodika

Všechny metody jsou detailně popsány v sekci „Materials and Methods“ v jednotlivých publikacích.

**Kultivace žírných buněk.** BMMC byly odvozeny z buněk kostní dřeně 6-8 týdnů starých myší. Buňky byly kultivovány v médiu obsahujícím myší rekombinantní SCF a IL-3. Buněčnou linii odvozenou z BMMC (BMMCL) poskytl Dr. M. Hibbs, Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Austrálie.

**Transfekce BMMC.** BMMC byly transfekovány Amaxa nukleofektorem. Funkční testy s transfekovanými buňkami byly prováděny 48 hodin po transfekci.

**Lentivirální transdukcce.** Lentivirální čátice nesoucí shRNA sekvence, nebo sekvence kódující proteiny, byly připraveny s využitím pomocné buněčné linie HEK293T. BMMC nebo BMMCL byly transdukovány virovými částicemi a následně selektovány v selekčním antibiotiku.

**Stanovení β-glukuronidasy (měření degranulace).** Degranulace byla měřena stanovením množství β-glukuronidasy uvolněné z buněk během aktivace. Degranulace byla vyjádřena jako procento uvolněné β-glukuronidasy z celkového obsahu β-glukuronidasy v buněčném lyzátu.

**Měření vylití vápníkových iontů z intracelulárních zdrojů.** IgE-senzitizované buňky byly značeny Fura-2AM v přítomnosti probenecidu. Po inkubaci byla nevstřebaná sonda odmyta a buňky byly aktivovány Ag ve spektrofotometru vybaveném automatizovaným injektorem, fluorescenční signál byl zaznamenáván po dobu 5 min.

**Elektroforetický přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu (z angl. „western blot“).** Lyzáty z celých buněk byly připraveny sonikací v redukujícím vzorkovém pufru a denurací proteinů při 95°C. Proteiny byly dále elektroforeticky separovány v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) na 10-12% polyakrylamidovém gelu a elektroforeticky

přeneseny na nitrocelulóзовou membránu. Vybrané proteiny pak byly detekovány specifickými primárními protilátkami (Ab) a sekundárními Ab konjugovanými s křenovou peroxidasou. Signál byl vyvolán standardním chemiluminiscenčním činidlem.

**Imunoprecipitace.** Buňky byly lyzovány v lyzačním pufru obsahujícím 0.2% Triton X-100 a FcεRI komplexy byly precipitovány přes vazbu s IgE, pomocí anti-IgE Ab navázané na částice pokryté proteinem A.

**Konfokální mikroskopie.** Buňky byly inkubovány na skleněných podložních sklech, poté byly aktivovány a fixovány v 3% paraformaldehydu. Buňky byly permeabilizovány v 0.1% Tritonu X-100 a poté blokovány v 1% BSA. Vzorky pak byly inkubovány se specifickými primárními Ab, nebo s faloidinem konjugovaným s fluoroforem pro detekci F-aktinu. Primární Ab byly detekovány příslušnými sekundárními Ab konjugovanými s fluorofory. Vzorky pak byly uchovány v médiu na bázi glycerolu, obsahujícím barvivo Hoechst 33258.

**Elektronová mikroskopie.** RBL nebo BMMC byly kultivovány na skleněných podložních sklech. V některých experimentech byly extracelulární Ag detekovány primárními Ab a poté sekundárními Ab konjugovanými se zlatými nanočásticemi. Niklové elektronmikroskopické sítě byly nabity ve výboji v argonové atmosféře a poté pokryty poly-L-lysinem. Podložní skla s přichycenými buňkami byly přiloženy na elektronmikroskopické sítě a po aplikaci tlaku byly buňky roztrženy tak, aby na sítkách zůstaly jednotlivé pláty plazmatických membrán buněk. Membrány pak byly promyty, fixovány a podrobeny značení primárními Ab podle typu experimentu a příslušnými sekundárními Ab konjugovanými se zlatými nanočásticemi. Vzorky byly poté znovu fixovány a obarveny v roztocích OsO<sub>4</sub>, kyseliny tříslové a uranyl acetátu. Snímky byly pořízeny v transmisním elektronovém mikroskopu FEI Morgagni při zvětšení 56000x.

**Průtoková cytometrie.** Pro analýzu povrchových Ag byly buňky značeny příslušnými Ab a uchovány na ledu po dobu značení. Pro analýzu intracelulárních Ag byly buňky fixovány v 2% paraformaldehydu a permeabilizovány v 0.1% Tritonu X-100.

**Buněčná adheze.** BMMC byly značeny kalceinem a ponechány adherovat na fibronektinem pokrytý povrch v 96-jamkových destičkách. Buňky byly aktivovány Ag a fluorescenční signál byl změřen poprvé. Neadherující buňky byly odmyty a fluorescenční signál byl měřen podruhé, po odmytí. Adheze buněk pak byla vyjádřena jako procento signálu po odmytí z celkového signálu naměřeného před odmytím.

**Izolace RNA, reverzní transkripce a kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR).** RNA byla izolována komerční soupravou a reverzní transkripce byla provedena M-MLV reverzní transkriptasou (Invitrogen). qPCR reakce probíhaly v 384-jamkových destičkách, v termocykleru LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Jako referenční geny byly použity glyceraldehyde-3-fosfát dehydrogenasa, aktin a ubikvitin. Expres mRNA byla normalizována proti kvadratickému průměru všech tří referenčních genů.

#### 4. Výsledky a diskuse

Předkládaná dizertační práce je založená na výsledcích publikovaných v šesti publikacích obsahujících originální data a jednom review obsahujícím původní data.

#### **INHIBICE PROTEIN-TYROSINFOSFATAS AKTIVUJE IMUNITNÍ RECEPTOR BEZ NUTNOSTI TRANSLOKACE DO LIPIDOVÝCH RAFTŮ**

Heneberg P., Dráberová L., **Bambousková M.**, Pompach P., Dráber P.: Down regulation of protein-tyrosine phosphatases activated an immune receptor in absence of its translocation into lipid rafts. *J. Biol. Chem.* **285**(17):12787-802, 2010.

V této práci jsme se zabývali studiem inicializace signalizace přes FcεRI po inhibici PTP pervanadátem (Pv), který způsobuje oxidaci katalytického tyrosinu v aktivním místě PTP. Zjistili jsme, že po inaktivaci PTP dochází k fosforylaci β a γ podjednotek receptoru FcεRI, přičemž jeho membránová topografie zůstává zachována a nedochází k extenzivní agregaci a translokaci receptoru do lipidových raftů tak, jako je tomu po aktivaci Ag. Tyto výsledky naznačovaly, že v neaktivovaných buňkách se FcεRI nachází v blízkosti jak PTK, tak PTP, a při narušení rovnováhy v aktivitě těchto enzymů ve prospěch PTK dochází k aktivaci receptoru. Následně jsme využili monoklonální Ab specifické pro oxidovaný stav PTP k mapování topografie inaktivních PTP na vnitřní straně plazmatické membrány a podařilo se nám dokázat proximitu inaktivních PTP k FcεRI. Pomocí této protilátky jsme rovněž potvrdili, že k inaktivaci PTP dochází nejen po inhibici Pv, ale také po aktivaci Ag a identifikovali jsem některé druhy PTP, u kterých dochází k redoxní regulaci v aktivovaných buňkách. Překvapivým výsledkem bylo zjištění, že inaktivní PTP blíže asociují s aktinovým cytoskeletem. Aktinový cytoskelet se tak pravděpodobně podílí na regulaci inicializace signalizace přes FcεRI řízením membránové lokalizace PTP. Získané výsledky nám umožnily

formulovat nový model inicializace signalizace přes FcεRI. V našem modelu je receptor udržován v klidovém stavu vyváženou aktivitou PTK a PTP v jeho blízkosti. Po aktivaci Ag dochází k narušení rovnováhy ve prospěch fosforylace, a receptorové ITAM tak mohou být fosforylovány asociovanými PTK.

## **CO PŘEDCHÁZÍ TYROSINOVÉ FOSFORYLACI VYSOKOAFINITNÍHO RECEPTORU PRO IgE V ŽÍRNÝCH BUŇKÁCH AKTIVOVANÝCH ANTIGENEM?**

Bugajev V., **Bamboušková M.**, Dráberová L., Dráber P.: What precedes the initial tyrosine phosphorylation of the high affinity IgE receptor in antigen-activated mast cells? *FEBS Lett.* **84**(24):4949-55, 2010.

V tomto review jsme se zabývali zhodnocením několika modelů inicializace fosforylace FcεRI s přihlédnutím k nově získaným výsledkům publikovaným v *Journal of Biological Chemistry*, 2010.

## **KOMUNIKACE MEZI TETRASPANINEM CD9 A TRANSMEMBRÁNOVÝM ADAPTOROVÝM PROTEINEM NTAL PŘI AKTIVACI A CHEMOTAXI ŽÍRNÝCH BUNĚK**

Hálová I., Dráberová L., **Bamboušková M.**, Machyna M., Stegurová L., Smrž D., Dráber P.: Cross-talk between tetraspanin CD9 and transmembrane adaptor protein non-T-cell activation linker (NTAL) in mast cell activation and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **288**(14):9801-14, 2013.

Pokusili jsme se identifikovat nové povrchové molekuly žírných buněk, které modulují aktivaci přes FcεRI. Vygenerovali jsme novou monoklonální Ab, která rozeznává povrchový Ag žírných buněk, identifikovaný jako tetraspanin CD9. Ovlivnění žírných buněk touto protilátkou mělo za následek spuštění některých aktivačních dějů jako je fosforylace klíčových signálních proteinů, vápníková odpověď a defosforylaci proteinů z rodiny ezrin, radixin, moesin (ERM), které hrají důležitou roli v chemotaxi [12]. Po agregaci CD9 naší Ab, jsme rovněž pozorovali zvýšenou fosforylaci tyrosinových zbytků NTAL proteinu, zatímco fosforylace proteinu LAT nevykazovala žádné změny. Ultrastrukturální analýza topografie CD9 na plazmatické membráně prokázala kolokalizaci s aktivovaným receptorem FcεRI, s NTAL, ale ne s LAT. Kombinovaná data nám pomohla identifikovat neredundantní funkce adaptorových proteinů LAT a NTAL.

## **TRANSMEMBRÁNOVÝ ADAPTOROVÝ PROTEIN PAG/CBP SE ZAPOJUJE DO POZITIVNÍ I NEGATIVNÍ REGULACE SIGNALIZACE ŽÍRNÝCH BUNĚK**

Draberová L., Bugajev V., Potůčková L., Hálová I., **Bambousková M.**, Polakovičová I., Xavier R. J., Seed B., Dráber P.: Transmembrane adaptor protein PAG/CBP is involved in both positive and negative regulation of mast cell signaling. *Mol. Cell. Biol.* **34**(23):4285-300, 2014.

Předešlé studie v naší laboratoři se zabývaly zejména funkcí adaptorových transmembránových proteinů LAT a NTAL v signalizaci žírných buněk. V této práci jsme se zaměřili na objasnění role transmembránového adaptorového proteinu PAG. Použili jsme BMMC odvozené z PAG KO myši a zároveň jsme připravili BMMC s PAG KD. Oba typy buněk s defektní expresí PAG vykazovaly sníženou aktivaci po stimulaci Ag. Naopak buňky stimulované přes KIT receptory vykazovaly aktivaci zvýšenou. Při detailní analýze aktivity SFK izolovaných z PAG KO a WT buněk jsme naměřili zvýšenou tyrosinkinasovou aktivitu SFK z PAG KO buněk. Získaná data indikují, že se PAG ovlivňuje negativní zpětnou vazbu, kterou se SFK podílejí na regulaci signalizace přes FcεRI.

## **NEGATIVNÍ REGULAČNÍ FUNKCE ORMDL3 V EXPRESI PROZÁNĚTLIVÝCH MEDIÁTORŮ A CHEMOTAXI ŽÍRNÝCH BUNĚK AKTIVOVANÝCH ANTIGENEM**

Bugajev V., Hálová I., Dráberová L., **Bambousková M.**, Potůčková L., Dráberová H., Paulenda T., Junyent S., Dráber P.: Negative regulatory roles of ORMDL3 in FcεRI-triggered expression of proinflammatory mediators and chemotactic response in murine mast cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**(6):1265-85, 2016.

Cílem této práce bylo charakterizovat roli ORMDL3 v aktivaci žírných buněk přes FcεRI. Za tímto účelem jsme připravili BMMC s ORMDL3 KD a BMMC se zvýšenou expresí ORMDL3. Tyto buňky nevykazovaly změny v degranulaci, vápníkové odpovědi, ani fosforylaci SYK kinasy. V BMMC s ORMDL3 KD jsme zaznamenali zvýšenou produkci cytokinů a chemokinů a zvýšenou chemotaxi a snížené rozprostírání na fibronektinu. Naopak, BMMC se zvýšenou expresí ORMDL3 vykazovaly opačný trend. Tyto změny korelovaly s fosforylací AKT. AKT je aktivátorem transkripčního faktor NF-κB [13], prošetřili jsme tedy translokaci p65 podjednotky NF-κB z cytoplasmy do jádra. V souladu se změnami ve fosforylaci AKT jsme pozorovali zvýšenou translokaci p65 do jádra u BMMC s ORMDL3

KD. ORMDL3 byl tedy identifikován jako důležitý regulátor AKT/NF- $\kappa$ B dráhy v žírných buňkách, a tímto se podílí na regulaci vzniku lokálního zánětu.

## **ETANOL INHIBUJE SIGNALIZACI VYSOKOAFINITNÍHO RECEPTORU PRO IMUNOGLOBULIN E (Fc $\epsilon$ RI) ŽÍRNÝCH BUNĚK NARUŠENÍM FUNKCE Fc $\epsilon$ RI SIGNALOSOMŮ NA BÁZI CHOLESTEROLU**

Dráberová L., Paulenda T., Hálová I., Potůčková L., Bugajev V., **Bambousková M.**, Tůmová M., Dráber P.: Ethanol inhibits high-affinity immunoglobulin E (Fc $\epsilon$ RI) signaling in mast cells by suppressing the function of Fc $\epsilon$ RI-cholesterol signalosomes. *PLoS One*. **10**(12):e0144596, 2015.

V této práci jsme zjistili, že krátké ovlivnění žírných buněk etanolem inhibuje degranulaci spuštěnou přes Fc $\epsilon$ RI, vápníkovou odpověď a produkci některých cytokinů. Podařilo se nám ukázat, že etanol interferuje s funkcí Fc $\epsilon$ RI signalosomu přes narušení interakce Fc $\epsilon$ RI komplexu s cholesterolem.

## **NOVÉ FUNKCE GALEKTINU-3 V REGULACI SIGNALIZACE PŘES VYSOKOAFINITNÍ RECEPTOR PRO IgE**

**Bambousková M.**, Polakovičová I., Hálová I., Goel G., Dráberová L., Bugajev V., Doan A., Utěkal P., Gardet A., Xavier R. J., Dráber P.: New regulatory roles of galectin-3 in high-affinity IgE receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* **36**(9):1366-82, 2016.

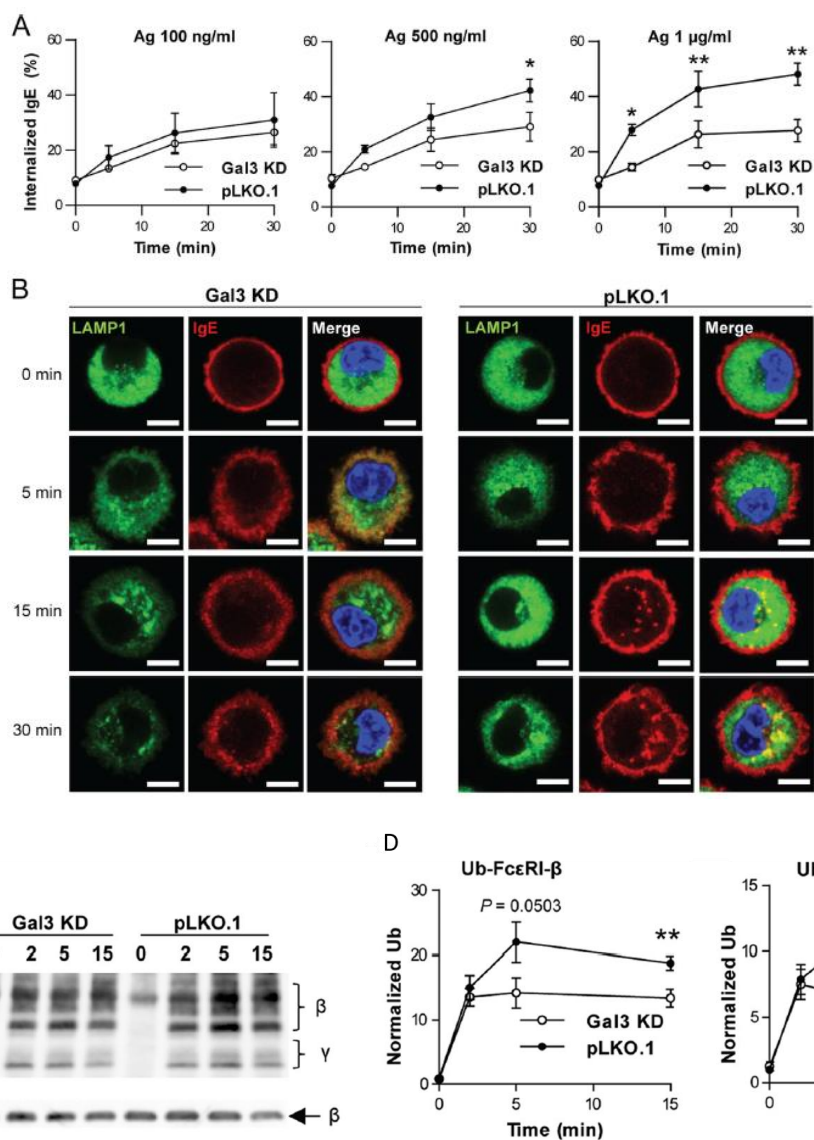
Tato práce byla hlavní náplní předkládané dizertace. Za účelem identifikace nových regulátorů Fc $\epsilon$ RI signalizace jsme provedli RNAi „screen“ 144 vybraných genů s potenciální funkcí v signalizaci přes Fc $\epsilon$ RI. Pro snížení exprese daných proteinů jsme zvolili strategii lentivirální transdukce shRNA, kdy byl každý z genů zacílen třemi rozdílnými shRNA. V počátečních fázích projektu jsme testovali několik různých funkčních testů, potenciálně vhodných pro plánované experimenty s vysokou výkonností. Nejrobustnější výsledky byly dosaženy při měření degranulace pomocí stanovení sekretované  $\beta$ -glukuronidasy. Po nashromáždění dat z několika nezávislých „screeningových“ experimentů jsme identifikovali 15 regulátorů aktivace přes Fc $\epsilon$ RI. ShRNA specifické pro gen kódující Gal3 poskytovaly reprodučibilní výsledky a buňky se sníženou expresí Gal3 vykazovaly  $1.67 \pm 0.32 \times$  zvýšenou

degranulaci oproti buňkám kontrolním. Gal3 byl v našem systému identifikován jako negativní regulátor signalizace přes FcεRI a byl vybrán pro další detailní funkční analýzu.

BMMC s Gal3 KD vykazovaly nejen zvýšenou degranulaci, ale i produkci chemokinů a cytokinů. Gal3 měl vliv na forforylaci klíčových signálních proteinů jako SYK, PLCγ, AKT a JNK (z angl. „JUN amino-terminal kinase“). Gal3 byl ukázán jako důležitý regulátor internalizace některých povrchových molekul, zejména pak receptoru T buněk [14, 15]. Kvantifikovali jsme proto expresi IgE na povrchu BMMC s Gal3 KD a kontrolních buněk během aktivace Ag pomocí průtokové cytometrie a zjistili jsme, že buňky se sníženou expresí Gal3 neinternalizují IgE tak efektivně jako buňky kontrolní (obrázek 2A, str. 17). Tyto výsledky jsme potvrdili mikroskopickou analýzou, která odhalila rovněž abnormální intracelulární lokalizaci internalizovaného IgE v BMMC s Gal3 KD (obrázek 2B, str. 17). Klíčovou podmínkou pro internalizaci a degradaci FcεRI je ubikvitinylace β a γ podjednotek [8]. Po imunoprecipitaci IgE-FcεRI komplexů z Ag-aktivovaných BMMC s Gal3 KD jsme pozorovali sníženou ubikvitinylacii podjednotek β a γ, což vysvětluje defektní internalizaci FcεRI v nepřítomnosti Gal3 (obrázky 2C a D, str. 17).

Gal3 je lektin typu S se specifitou pro β-galaktosidy [16]. Při pokusech inhibovat funkci Gal3 blokadí jeho vazby na buněčné glykoproteiny inkubací s laktosou se nám nepodařilo změnit aktivaci žírných buněk. Zároveň se nám nepodařilo zvrátit fenotyp BMMC s Gal3 KD preinkubací s rekombinantním myším Gal3. Tyto výsledky naznačují, že funkce Gal3 při aktivaci FcεRI není zprostředkována lektinovou vazbou, a nebo závisí na interakcích, které nejsou přístupné externě přidané laktose a rekombinantnímu proteinu Gal3.





**Obrázek 2. Gal3 reguluje internalizaci IgE, transport do lysozomu a ubiquitinylaci FcεRI.** (A) Internalizace IgE v BMMC s Gal3 KD a kontrolních pLKO.1 buňkách. Buňky byly senzitivovány IgE a aktivovány různými koncentracemi Ag. V různých časech po aktivaci byl povrchový IgE odmyt v kyselém pH a buňky byly fixovány a permeabilizovány. Množství IgE bylo kvantifikováno průtokovou cytometrií. (B) Lokalizace IgE a LAMP1 v BMMC s Gal3 KD (levý panel) a pLKO.1 kontrolních buňkách (pravý panel) aktivovaných Ag v různých časech. Jádra byla obarvena Hoechst 33258. Reprezentativní snímky z konfokálního mikroskopu. Měřítko 5 μm. (C) IgE-FcεRI komplexy byly imunoprecipitovány IgE-specifickou protilátkou. Imunoprecipitáty (IP) byly separovány metodou SDS-PAGE a ubiquitinylace byla detekována specifickou Ab (Ub). (D) Kvantifikace dat z C. Densitometrická data byla normalizována proti množství detekované β podjednotky a signálu v neaktivovaných pLKO.1.

## 5. Závěry

1. Na základě získaných výsledků jsme formulovali nový model inicializace signalizace přes FcεRI. Model předpokládá rovnováhu v aktivitách PTP a PTK v neaktivovaných buňkách, která udržuje receptor v klidovém stavu. Po agregaci receptoru Ag dochází ke změnám, které mají za následek posun rovnováhy ve prospěch fosforylace receptorových ITAM.
  - a. Ultrastrukturální analýza topografie oxPTP odhalila zvýšený počet oxPTP asociovaných s plazmatickou membránou po aktivaci Ag nebo inkubaci s Pv.
  - b. Dvojí značení ukázalo vzájemnou proximitu oxPTP a FcεRI. PTP podstupující regulaci oxidací tak mohou být součástí FcεRI signalosomu.
  - c. Většina oxPTP asociovaných s plazmatickou membránou byla nalezena v blízkosti aktinového cytoskeletu.
  - d. Námi navržený model inicializace signalizace přes FcεRI byl sumarizován a detailně zhodnocen vzhledem k ostatním modelům v review publikovaném ve FEBS Letters, 2010.
2. Ukázali jsme, že tetraspanin CD9 reguluje aktivaci a chemotaxi žírných buněk přes interakci s FcεRI signalosomy. Interakce CD9 s NTAL pomohla objasnit některé rozdílné funkce transmembránových adaptorových proteinů LAT a NTAL v signalizaci přes FcεRI.
  - a. Po agregaci CD9 specifickou Ab, CD9 kolokalizoval s FcεRI, s NTAL, ale ne s LAT.
  - b. Agregace CD9 specifickou Ab neměla vliv na rozprostírání buněk na fibronektinu.
3. Ukázali jsme, že v závislosti na typu stimulované signální dráhy, PAG funguje jako pozitivní i negativní regulátor aktivace žírných buněk.
  - a. Ultrastrukturální analýza lokalizace PAG v plazmatické membráně neprokázala změny po aktivaci buněk Ag.
  - b. BMMC s PAG KO nevykazovaly změny v rozprostírání na fibronektinu.
  - c. Množství žírných buněk v peritoneu PAG KO myši a kontrolních myši bylo srovnatelné.

4. BMMC se sníženou nebo zvýšenou expresí ORMDL3 nevykazovaly změny v degranulaci. Nicméně exprese ORMDL3 signifikantně ovlivňovala produkci cytokinů, chemokinů po aktivaci Ag a chemotaxi za Ag.
  - a. BMMC s ORMDL3 KD vykazovaly snížené rozprostírání na fibronektinu.
  - b. Analýza mikroskopických dat prokázala, že během aktivace buněk Ag, ORMDL3 negativně ovlivňuje translokaci p65 z cytoplazmy do jádra.
5. Inhibiční vliv etanolu na aktivaci žírných buněk je způsoben interferencí s FcεRI signalosomy na bázi cholesterolu.
  - a. Etanol, ani metyl-β-cyklodextrin neměly vliv na expresi studovaných povrchových receptorů.
  - b. Ovlivnění buněk etanolem inhibovalo expresi LAMP1 na povrchu buněk po aktivaci Ag. Tento efekt byl dále zesílen současným působením metyl-β-cyklodextrinu.
  - c. Etanol v kombinaci s metyl-β-cyklodextrinem signifikantně inhiboval internalizaci IgE po aktivaci buněk Ag.
6. Provedli jsme “screen” 144 genů s možnou funkcí v FcεRI signalizaci. Identifikovali jsme 15 potenciálních regulátorů FcεRI signalizace. Gal3 byl identifikován jako negativní regulátor aktivace FcεRI v časných fázích po stimulaci Ag a jako klíčová molekula řídící internalizaci a stabilitu FcεRI na povrchu žírných buněk.
  - a. Měření degranulace metodou stanovení sekretované β-glukuronidasy poskytovalo nejrobustnější výsledky pro plánované experimenty.
  - b. Optimalizovali jsme protokol pro lentivirální transdukcii žírných buněk pro plánované vysoce výkonné “screeningové” experimenty.
  - c. Pro “screening” jsme vybraly 144 genů ze kterých jsme následně identifikovali 15 potenciálních regulátorů FcεRI signalizace.
  - d. Pro detailní funkční analýzu jsme vybrali Gal3, který byl identifikován jako negativní regulátor degranulace.
    - i. BMMC s Gal3 KD vykazovaly zvýšenou Ag-indukovanou degranulaci jak při měření metodou stanovení sekretované β-glukuronidasy, tak i při měření povrchové exprese LAMP1.

- ii. Ag-stimulované BMMC se zvýšenou expresí Gal3 exprimovaly méně LAMP1 molekul na povrchu, než buňky kontrolní.
- iii. BMMC s Gal3 KD vykazovaly zvýšenou vápníkovou odpověď po aktivaci Ag.
- iv. Mikroskopická analýza obsahu F-aktinu potvrdila zvýšenou depolymerizaci aktinu po aktivaci Ag u buněk s Gal3 KD.
- v. Celková tyrosinová fosforylace byla zvýšená v BMMC s Gal3 KD v porovnání s kontrolními buňkami. Analýza fosforylace vybraných proteinů pak prokázala vliv Gal3 na fosforylaci SYK, PLC $\gamma$ , AKT and JNK.
- vi. Exprese Gal3 měla pozitivní vliv na internalizaci IgE po aktivaci Ag.
- vii. Gal3 reguloval intracelulární transport IgE v Ag-aktivovaných buňkách. Naše výsledky ukázaly, že Gal3 hraje důležitou roli i v regulaci intracelulárního transportu agregovaného Fc $\epsilon$ RI receptoru.
- viii. Gal3 pozitivně reguloval ubikvitinylaci receptorových podjednotek  $\beta$  a  $\gamma$ .
- ix. BMMC s Gal3 KD nebyly schopny efektivně adherovat a pohybovat se na fibronektinu, což naznačuje roli Gal3 v regulaci funkce povrchových integrinů.

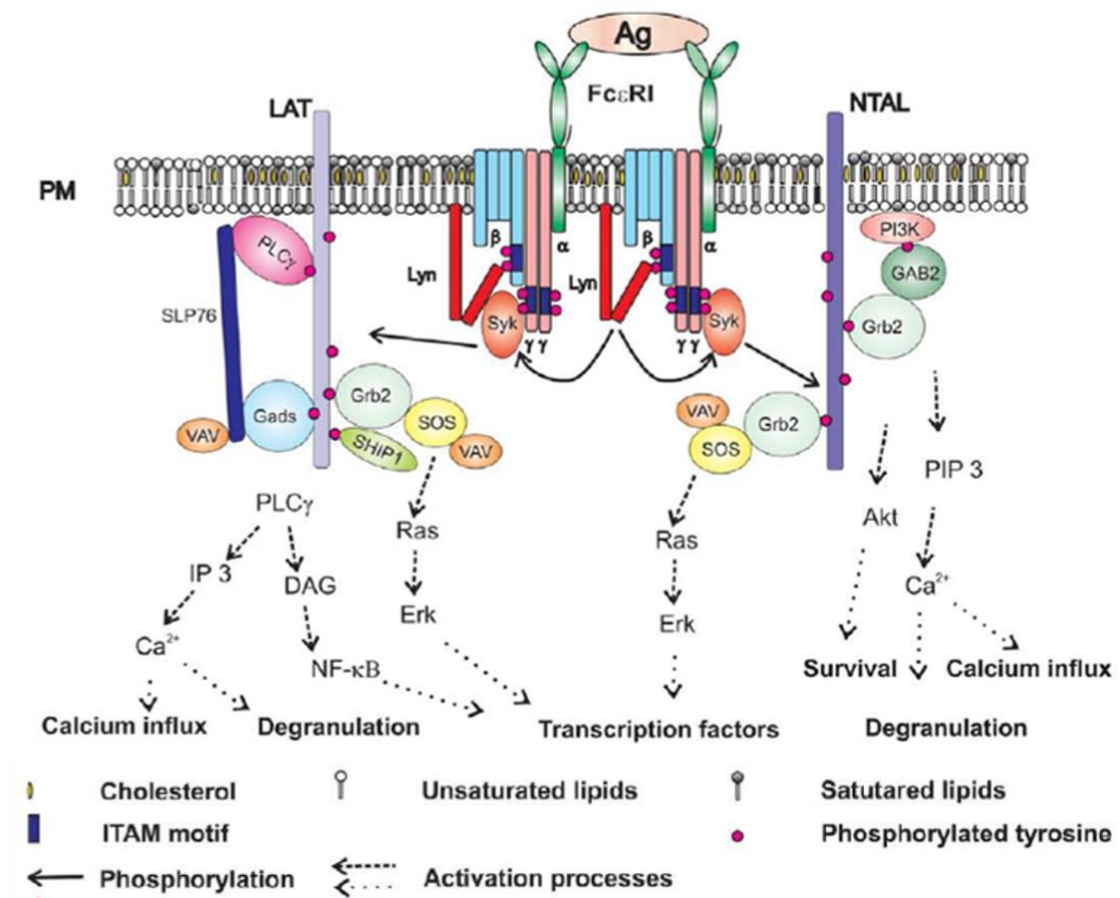
# 1. Introduction

Mast cells are bone marrow-derived tissue-homing leukocytes that have been mainly studied as central players in allergic diseases. However recently, the field of mast cell research has expanded well beyond the boundaries of studying of atopic disorders. Mast cells revealed to be versatile cells involved in a complex assortment of immunological and non-immunological functions that exert both direct and indirect effects on other cells and their functions in a variety of biological settings [1-3]. The principal mast cell immunoreceptor is high-affinity Fc receptor for immunoglobulin (Ig) E (Fc $\epsilon$ RI) that belongs to the group of multichain immune recognition receptors (MIRRs) and its engagement results in cell activation. Disruption of the fine-tuned processes of mast cell activation can lead to the onset of mast cell-driven diseases. Therefore detail comprehension of biochemical events connected to development and function of mast cells is needed for better design of a mast cell-targeted therapeutic strategies and for understanding of immune system homeostasis in general.

Fc $\epsilon$ RI binds IgE on the mast cell surface. After crosslinking of IgE-Fc $\epsilon$ RI complexes by multivalent antigen (Ag), receptor subunits  $\beta$  and  $\gamma$  are phosphorylated in their immunoreceptor tyrosine-based motifs (ITAMs) by SRC family kinases (SFKs), presumably LYN kinase. It has been shown that the full activation of Fc $\epsilon$ RI is accompanied by its translocation into specialized regions of the plasma membrane enriched in cholesterol and glycosphingolipid, contemporary called lipid rafts [4]. Upon Fc $\epsilon$ RI triggering membrane microdomains coalesce into larger and more stable structures. How exactly is the LYN-mediated phosphorylation of ITAMs initiated is still not completely understood.

As shown in figure 1 (page 22), phosphorylated ITAMs serves as a docking sites for cytoplasmic spleen tyrosine kinase (SYK) that is then activated by tyrosine phosphorylation [5]. Activated SYK mediates interaction with its many targets including the linker for activated T cells (LAT) and non-T cell activation linker (NTAL) that, once phosphorylated, recruit other molecules as SH2-containing leukocyte protein of 76 kDa (SLP-76) and growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2). Importantly, LAT recruits enzyme phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) [6]. PLC $\gamma$  undergoes activating tyrosine phosphorylation when associated with plasma membrane and then hydrolyzes membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to form soluble inositol-1,4,5-trisphosphate (PIP3) and membrane bound diacylglycerol (DAG), which are responsible for release of calcium ions from intracellular stores and protein kinase C (PKC) activation, respectively. SLP-76 and GRB2 recruit guanosine exchange factors

(GEFs) as SOS and VAV promoting the activation of the small GTPases, Ras, Rac, and Rho, that then regulate complex networks of signaling pathways leading to cell degranulation.



**Figure 1. FcεRI signaling in mast cells.** When FcεRI is aggregated with multivalent Ag whole complex translocates to cholesterol-enriched plasma membrane (PM) microdomains and β and γ subunits are phosphorylated by LYN kinase. Subsequently, SYK is recruited and activated by phosphorylation. SYK then mediates phosphorylation of transmembrane adaptor proteins LAT and NTAL. Phosphorylated tyrosine residues of LAT and NTAL further serve as docking sites for other signaling proteins. Adapted from [6].

To avoid potentially harmful overreactivity, signaling cascades leading to mast cell activation undergo tight regulation. Phosphorylation events catalyzed by protein-tyrosine kinases (PTKs) are counterbalanced by the activity of protein-tyrosine phosphatases (PTPs) [5]. However, what is the role of PTPs during the initiation of FcεRI signaling has not been yet examined. Among other molecules that participated on the downregulation of MIRR receptors is transmembrane adaptor phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG). PAG has been shown to be responsible for recruitment of C-SRC tyrosine kinase (CSK) to the plasma membrane. Active CSK then inactivates SFK by mediating phosphorylation of their C-terminal inhibitory tyrosine [6]. Upon Ag-triggering,

FcεRI signaling is also downregulated by internalization and subsequent degradation in lysosomes [8].

Single-nucleotide polymorphism association studies showed that chromosome 17q12-q21 region is connected to the risk of asthma and several other inflammatory diseases [9]. This locus contains gene encoding ORM-like (ORMDL)3. Although mast cells are known to be involved in asthmatic diseases, the role of ORMDL3 in mast cells is not known.

The key signal for mast cell homing and recruitment into peripheral tissues is provided by interaction of the stem cell factor (SCF) with its receptor, KIT [10]. In rodents another critical factor, interleukin (IL)-3, which binds to its surface receptor is involved. In peripheral tissues mast cell progenitors mature and terminally differentiate under the influence of local chemical environment. Migration of mast cell progenitors to the site of their residency is directed by various chemokines which bind to chemokine receptors as showed for prostaglandin E<sub>2</sub> that is recognized by the E-prostanoid receptors [11].

## 2. Aims of the study

### 1. To elucidate the role of PTPs in initiation of FcεRI signaling

- a. Map the plasma membrane topography of redox-regulated PTPs involved in initiation of FcεRI signaling in rat basophilic leukemia cells (RBL) or bone marrow-derived mast cells (BMMC).
- b. Analyze the spatiotemporal relationship of redox-regulated PTPs and FcεRI signalosomes.
- c. Analyze spacial relationship of oxidized PTPs (oxPTPs) and actin cytoskeleton.
- d. Evaluate current models of FcεRI signal initiation with respect to newly obtained data.

### 2. To determine the mechanism of tetraspannin CD9-mediated mast cell activation

- a. Analyze spationtemporal relationship of CD9 and components of FcεRI signalosomes.
- b. Analyse the role of CD9 in mast cell spreading on fibronectin.

### 3. To evaluate the role of PAG adaptor protein in regulation of FcεRI signaling

- a. Prepare lentiviral constructs encoding Myc-tagged PAG.
- b. Determine plasma membrane topography of PAG and its relationship to FcεRI signalosomes.
- c. Analyze spreading on fibronectin in PAG KO cells.

d. Analyze mast cell content *in vivo* in PAG KO mice.

**4. Characterize the function of ORMDL3 in mast cells**

- a. Analyze the spreading on fibronectin of the BMMC with ORMDL3 knockdown (KD) or ORMDL3 overexpressors.
- b. Set and perform image analysis of nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) translocation to nucleus in BMMC with ORMDL3 KD or ORMDL3 overexpressors.

**5. Analyze the effect of ethanol on mast cell activation**

- a. Identify the effect of ethanol treatment on expression of mast cell receptors Fc $\epsilon$ RI and KIT by flow cytometry.
- b. Analyze the degranulation of BMDCs treated by ethanol by measurement of surface lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1).
- c. Analyze the effect of ethanol on Fc $\epsilon$ RI internalization.

**6. To find new regulators of Fc $\epsilon$ RI signaling using RNAi screening**

- a. Develop and optimize high-throughput assays suitable for RNAi screening in mast cells.
- b. Optimize lentivirus short hairpin RNA (shRNA) delivery for RNAi screening in mast cells.
- c. Select and screen the genes with incompletely understood functions in mast cell activation, collect and analyze the data and identify new regulators of Fc $\epsilon$ RI signaling.
- d. Study molecular mechanism of action of newly identified regulator Gal3.
  - i. Analyze the role of Gal3 in degranulation by enzymatic assay and by flow cytometry in mast cells with Gal3 KD.
  - ii. Prepare the constructs for Gal3 overexpression and perform flow cytometry analysis with Gal3 overexpressing mast cells.
  - iii. Determine Gal3 role in calcium signaling.
  - iv. Analyze filamentous actin (F-actin) levels in BMDCs with Gal3 KD.
  - v. Determine Gal3 role in early activation events by phosphoprotein analysis (microscopy and western blot).
  - vi. Set the flow cytometry assay for analysis of IgE internalization by acid strip that would facilitate the studies of Gal3 function in Fc $\epsilon$ RI internalization.



- vii. Set the microscopy assay for analysis of IgE internalization with subsequent image analysis quantification facilitating the studies of Gal3 role in FcεRI internalization.
- viii. Analyze Gal3 function in FcεRI phosphorylation and ubiquitination.
- ix. Assess the Gal3 function in mast cell adhesion and motility on fibronectin.

### 3. Materials and methods

All methods used to solve the particular aims of this study are described in more details in the relevant publications.

**Mast cell cultures.** BMMCs were obtained from cells isolated from femurs and tibias of 6-8 weeks old mice. Cells were cultured in media containing murine recombinant SCF and IL-3. BMMC-derived mast cell line (BMMCL) was obtained from Dr. M. Hibbs from Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Australia and cultured in media supplemented with murine recombinant IL-3.

**Transient transfection.** BMMCs were transfected using Amaxa nucleofector. Functional assays were then performed usually 48h post-transfection.

**Lentiviral transduction.** Lentiviral particles containing shRNA sequences or sequences of proteins of interest were packaged using HEK293T cells. BMMCs or BMMCL were then transduced with lentiviral particles and subsequently selected with puromycin.

**Mast cell activation.** For Ag-mediated mast cell activation cells were sensitized with IgE overnight in absence of SCF and IL-3. Then, unbound IgE was washed away and cells were activated with Ag and subjected to downstream applications.

**β-glucuronidase assay (degranulation).** Mast cell degranulation was measured by enzymatic assay for detection of β-glucuronidase released from cell granules into media during activation. Degranulation was expressed as percent of β-glucuronidase released into the supernatants from total β-glucuronidase content

**Calcium measurement.** IgE-sensitized cells were loaded with Fura-2AM for 30min in presence of probenecid. After incubation excess of Fura-2AM was washed out and cells were activated in fluorimeter equipped with automated injector. Fluorescent signal was monitored for 5 min.

**Western blot.** Whole cell lysates were prepared by sonication of the cells in reducing sample buffer and denaturation at 95°C. Proteins in cell lysates were resolved at 10 – 12% sodium dodecylsulfate (SDS)-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes.

Primary antibody was detected with horse radish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody and signal was developed with chemiluminescent reagent.

**Immunoprecipitation.** FcεRI complexes were immunoprecipitated via bound IgE. Cells were lysed in lysis buffer containing 0.2% Triton-X100 and IgE-FcεRI complexes were immunoprecipitated by incubation with anti-IgE Ab bound to protein A-coated beads.

**Confocal microscopy.** Cells were attached to glass surface, then activated or not and fixed in 3% paraformaldehyde. Cells were then permeabilized in 0.1% Triton X-100. Samples were incubated with various primary Abs in 1% BSA or with fluorophore-conjugated phalloidin for detection of F-actin. Primary Abs were detected by appropriate secondary Abs conjugated to various fluorophores. Samples were mounted in glycerol-based mounting media containing Hoechst 33258 stain.

**Electron microscopy.** RBL cells were grown on glass coverslips, alternatively non-adherent BMMCs were attached to fibronectin-coated coverslips. In some experiments extracellular Ags were labeled with primary Abs followed with gold-conjugated secondary Abs. Nickel electron microscopy grids were glow discharged in argon atmosphere and coated with poly-L-lysine. Cells attached to coverslips were pressed towards the coated grid and ripped. Plasma membrane sheets were rinsed, fixed and subjected to labeling with specific primary Abs and gold-conjugated secondary Abs. Whole samples were then fixed in glutaraldehyde and stained with OsO<sub>4</sub> in cacodylate buffer, followed by tannic acid and finally with uranyl acetate. Images were acquired using FEI Morgagni at 56000x magnification.

**Flow cytometry.** For analysis of surface Ags, cells were kept on ice and labeled with appropriate fluorophore-conjugated Abs. For analysis of intracellular Ags, cells were fixed in 2% paraformaldehyde and permeabilized in 0.1% Triton X-100.

**Cell adhesion.** BMMCs were loaded with calcein dye and let to attach to fibronectin coated wells in fluorometric 96-well plate. Cells were activated with Ag and fluorescent signal was measured. Unattached cells were then washes out and cell adhesion was expressed as percent of fluorescent signal detected after washing from total signal before the wash.

**RNA isolation, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative PCR (qPCR).** RNA from cells was isolated using commercial kits and reverse transcribed using M-MVL reverse transcriptase (Invitrogen). qPCR reactions were performed in 384-well plates in a LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Genes for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, actin, and ubiquitin were used as reference genes, and expression levels of all mRNAs were normalized to the geometric mean of the expression of the reference genes.

## 4. Results and discussion

This thesis summarizes results published in following six original publications and one review with original data.

### **DOWN REGULATION OF PROTEIN-TYROSINE PHOSPHATASES ACTIVATES AN IMMUNE RECEPTOR IN ABSENCE OF ITS TRANSLOCATION INTO LIPID RAFTS**

Heneberg P., Dráberová L., **Bamboušková M.**, Pompach P., Dráber P.: Down regulation of protein-tyrosine phosphatases activated an immune receptor in absence of its translocation into lipid rafts. *J. Biol. Chem.* **285**(17):12787-802, 2010.

In this work we studied the FcεRI signaling initiation upon inhibition of PTPs by pervanadate (Pv). We found that FcεRI subunits get phosphorylated even in the absence of extensive aggregation and translocation to the lipid rafts, suggesting that balance in PTP-PTK activities is a crucial mechanism controlling FcεRI triggering. Using monoclonal Ab specific for oxPTPs we confirmed that PTPs undergo redox regulation after mast cell activation and identified several redox-regulated PTPs species. We also identified contribution of actin cytoskeleton as a potential regulator of balance in the activities of PTPs and PTKs in mast cells.

### **WHAT PRECEDES THE INITIAL TYROSINE PHOSPHORYLATION OF THE HIGH AFFINITY IGE RECEPTOR IN ANTIGEN-ACTIVATED MAST CELLS?**

Bugajev V., **Bamboušková M.**, Dráberová L., Dráber P.: What precedes the initial tyrosine phosphorylation of the high affinity IgE receptor in antigen-activated mast cells? *FEBS Lett.* **84**(24):4949-55, 2010.

In this review we evaluated current models of FcεRI signaling initiation with respect to our newly obtained data published in Journal of Biological Chemistry, 2010.

## **CROSS-TALK BETWEEN TETRASPANIN CD9 AND TRANSMEMBRANE ADAPTOR PROTEIN NON-T-CELL ACTIVATION LINKER (NTAL) IN MAST CELL ACTIVATION AND CHEMOTAXIS**

Hálová I., Dráberová L., **Bambousková M.**, Machyna M., Stegurová L., Smrž D., Dráber P.: Cross-talk between tetraspanin CD9 and transmembrane adaptor protein non-T-cell activation linker (NTAL) in mast cell activation and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **288**(14):9801-14, 2013.

In attempts to identify new plasma membrane molecules affecting mast cell activation we generated new Ab recognizing mast cell surface Ag identified as CD9. We found that pretreatment of mast cells with CD9-specific Ab triggered activation events as phosphorylation of some key signaling proteins, calcium flux and dephosphorylation of ezrin, radixin, moesin (ERM) family proteins that is important step facilitating mast cell chemotaxis [12]. After CD9 aggregation, NTAL but not LAT showed increased phosphorylation of tyrosine residues. Ultrastructural analysis of CD9 topography in plasma membrane showed that upon activation, CD9 colocalized with NTAL but not LAT. The combined data helped to identify different roles of LAT and NTAL in mast cell activation and chemotaxis.

## **TRANSMEMBRANE ADAPTOR PROTEIN PAG/CBP IS INVOLVED IN BOTH POSITIVE AND NEGATIVE REGULATION OF MAST CELL SIGNALING**

Dráberová L., Bugajev V., Potůčková L., Hálová I., **Bambousková M.**, Polakovičová I., Xavier R. J., Seed B., Dráber P.: Transmembrane adaptor protein PAG/CBP is involved in both positive and negative regulation of mast cell signaling. *Mol. Cell. Biol.* **34**(23):4285-300, 2014.

Previous studies in the laboratory investigated the role of TRAPs LAT and NTAL in mast cell signaling. Here we focused on deciphering the role of other TRAP, PAG, that has shown variable functions in immunoreceptor signaling across the literature. We used BMMCs derived from PAG KO mice and prepared also BMMCs with PAG KD. BMMCs with decreased expression of PAG showed impaired Ag-mediated activation but increased activation when stimulated via KIT receptor. Observed increased activity of SFKs in resting PAG deficient cells indicate that PAG regulates the basal activity of SFKs and increased SFK activity in PAG KO cells is involved in negative regulatory loop controlling FcεRI signaling.

## **NEGATIVE REGULATORY ROLES OF ORMDL3 IN THE FcεRI-TRIGGERED EXPRESSION OF PROINFLAMMATORY MEDIATORS AND CHEMOTACTIC RESPONSE IN MURINE MAST CELLS**

Bugajev V., Hálová I., Dráberová L., **Bambousková M.**, Potůčková L., Dráberová H., Paulenda T., Junyent S., Dráber P.: Negative regulatory roles of ORMDL3 in FcεRI-triggered expression of proinflammatory mediators and chemotactic response in murine mast cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**(6):1265-85, 2016.

In this study we provide evidence that downregulation of ORMDL3 expression in mast cells enhances cytokine and chemokine production upon Ag treatment and also chemotaxis towards Ag. Cells with decreased expression of ORMDL3 exhibited increased phosphorylation of AKT. AKT is known to be activator of transcriptional factor NF-κB [13]. We identified ORMDL3 as a key regulator of AKT/NF-κB pathway and chemotaxis in mast cells and contributes to the development of mast cell-mediated local inflammation *in vivo*.

## **ETHANOL INHIBITS HIGH-AFFINITY IMMUNOGLOBULIN E RECEPTOR (FcεRI) SIGNALING IN MAST CELLS BY SUPPRESSING THE FUNCTION OF FcεRI-CHOLESTEROL SIGNALOSOMES**

Dráberová L., Paulenda T., Hálová I., Potůčková L., Bugajev V., **Bambousková M.**, Tůmová M., Dráber P.: Ethanol inhibits high-affinity immunoglobulin E (FcεRI) signaling in mast cells by suppressing the function of FcεRI-cholesterol signalosomes. *PLoS One.* **10**(12):e0144596, 2015.

In this study we show that short-term exposure of BMDCs to nontoxic concentrations of ethanol inhibits FcεRI-mediated degranulation, calcium response, and production of several cytokines in a dose-dependent manner. We found that ethanol interferes with the function of FcεRI-cholesterol signalosomes and support the lipid-centric theory of ethanol action in this system at the early stages of cell activation.

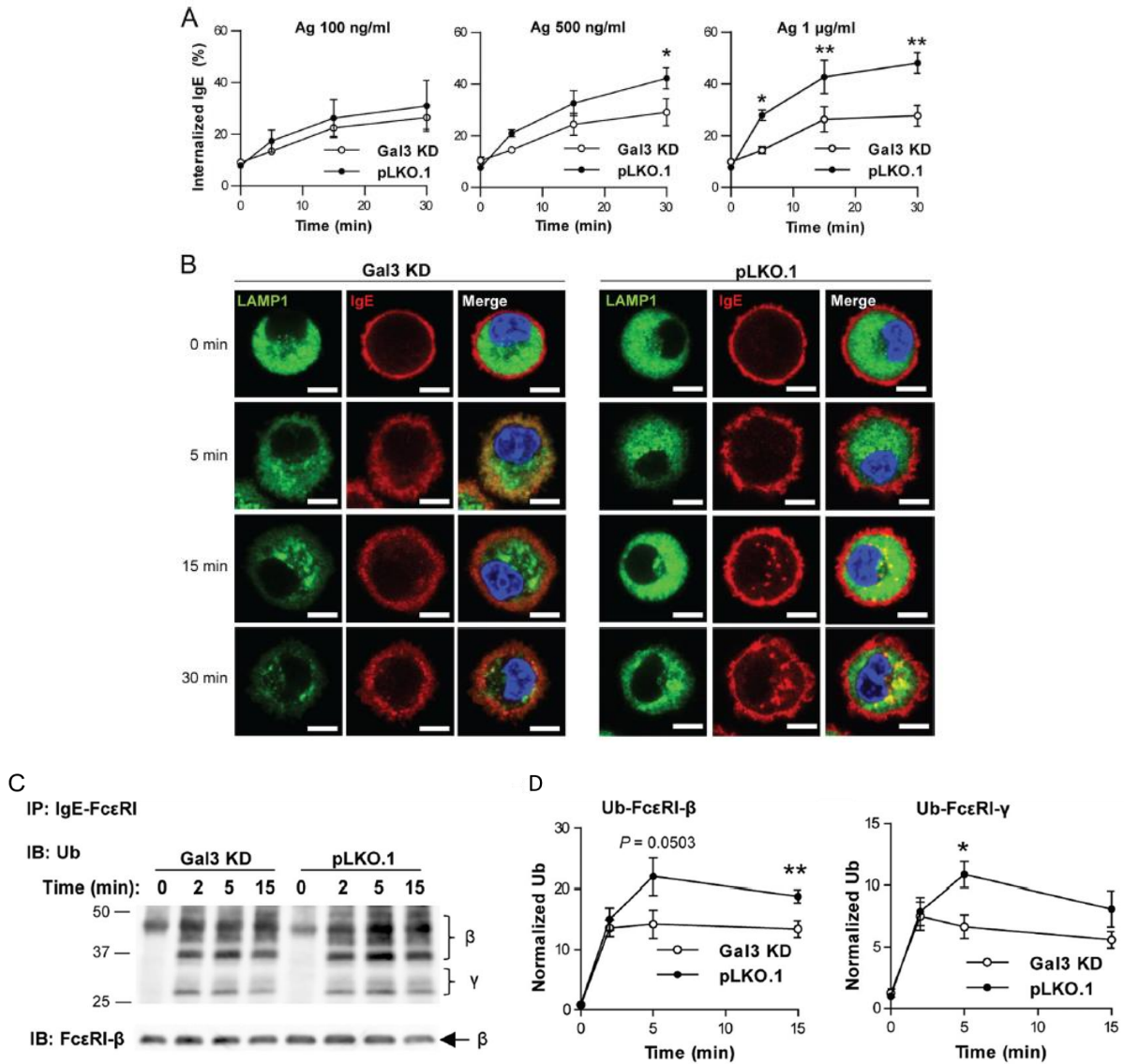
## NEW REGULATORY ROLES OF GALECTIN-3 IN HIGH-AFFINITY IgE RECEPTOR SIGNALING

**Bambousková M.**, Polakovičová I., Hálová I., Goel G., Dráberová L., Bugajev V., Doan A., Utěkal P., Gardet A., Xavier R. J., Dráber P.: New regulatory roles of galectin-3 in high-affinity IgE receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* **36**(9):1366-82, 2016.

In this study we utilized RNAi-based HTS to identify new regulators of mast cell Ag-mediated activation via FcεRI. We selected 144 genes for screen and identified 15 potential regulators of mast cell degranulation. We chose Gal3 for detail functional analysis. Gal3 negatively regulated mast cell degranulation and cytokine expression.

FcεRI signaling in cells with decreased expression of Gal3 was upregulated on the level of SYK kinase, suggesting involvement of Gal3 in early signaling upon FcεRI triggering. Gal3 has been shown to exhibit functions in regulation of endocytosis and internalization of some surface molecules, presumably T cell receptors [14, 15]. We found that in mast cells, Gal3 also participates on regulation of FcεRI ubiquitination and internalization (figure 2, page 31).

Gal3 is S-type lectin with specificity to β-galactosides [16]. In attempts to inhibit Gal3 functions by blocking its binding to glycosylated proteins by incubation with lactose we did not observed any changes in mast cell activation. Similarly, externally added murine recombinant Gal3 did not rescue the phenotype of BMMC with Gal3 KD. These data suggest that function of endogenous Gal3 is not mediated by its lectin binding to glycoproteins or these interactions are not accesible to externally added lactose and recombinant Gal3.



**Figure 2. Gal3-regulated IgE internalization, trafficking to endolysosomes and ubiquitination of FcεRI subunits.** (A) IgE internalization in BMMCs with Gal3 KD and control pLKO.1 cells. The cells were sensitized with IgE and activated with various concentrations of Ag. At various time intervals after triggering, surface IgE was removed by acid stripping, and the cells were fixed and permeabilized. IgE levels were quantified by flow cytometry. (B) Representative confocal images of IgE and LAMP1 localization in BMMCs (left, Gal3 KD; right, pLKO.1 controls). The cells were sensitized with IgE and not activated (0 min) or activated with Ag (100 ng/ml) for various times (5, 15, or 30 min), fixed, permeabilized, and stained with a specific Ab. Nuclei were stained with Hoechst 33258. Bars, 5 µm. (C) IgE-FcεRI complexes were immunoprecipitated with IgE-specific Ab. Immunoprecipitates (IPs) were size separated by SDS-PAGE, and ubiquitination was determined by western blot and detection with specific Ab (Ub). (D) Quantification of FcεRI β and γ subunit ubiquitination from data in panel C. Densitometry data from β and γ ubiquitination were normalized to the β subunit loading control and nonactivated pLKO.1 controls.

## 5. Conclusions

1. Our data showed that PTPs play important role during FcεRI initiation. Based on obtained results we formulated model of FcεRI signaling initiation that proposes equilibrium in activity of PTPs and PTKs in resting state and shift towards the activity of PTKs upon crosslinking of FcεRI with Ag.
  - a. Topography of oxPTPs was determined and analyzed before and after FcεRI aggregation and also after Pv treatment. Increased number of oxPTPs was detected upon FcεRI aggregation suggesting that PTPs vulnerable to oxidation might be pre-associated with plasma membrane.
  - b. Double labeling studies of oxPTPs and FcεRI showed proximity of these molecules in plasma membrane indicating that PTPs undergoing redox regulation are part of FcεRI signalosomes.
  - c. Most of the oxPTPs were found associated with cytoskeletal structures that were identified as actin-containing structures. Therefore, actin cytoskeleton might play important role in FcεRI signaling initiation by sequestering PTPs in plasma membrane.
  - d. The proposed model of PTK-PTP equilibrium was summarized and discussed with respect to other models in review article published in *FEBS Lett. 2010*.
  
2. Results obtained in studies of CD9 helped us to better understand signaling pathways leading to mast cell activation and chemotaxis. We showed, that CD9 can regulate mast cell activation and chemotaxis by interacting with FcεRI and FcεRI signalosomes. Moreover, study on CD9 further supported existence of non-overlapping functions of adaptor proteins LAT and NTAL.
  - a. Upon aggregation with CD9-specific Ab, CD9 in plasma membrane co-localized with FcεRI, NTAL but not with LAT. These findings contributed to understanding of some non-redundant functions of LAT and NTAL in FcεRI signaling pathway.
  - b. Aggregation of CD9 did not affect mast cells adhesion to fibronectin.
  
3. We showed, that depending on which signaling pathways are engaged, PAG can act as positive or negative regulator of mast cell signaling. Surprisingly, increased activity of SFKs in PAG KO cells upon triggering with Ag correlated with decreased cell activation.



These findings contributed to understanding of negative regulatory loops controlling mast cell activation.

- a. pCDH-based PAG-containing lentiviral construct was used for rescue studies.
  - b. pCMV-based vector containing Myc-tagged PAG was prepared and plasma membrane localization of overexpressed PAG was confirmed by confocal microscopy. However, when plasma membrane topography of PAG was analyzed by electron microscopy, no changes were found upon activation with Ag.
  - c. No differences in spreading of PAG KO and WT cells were found suggesting no direct involvement of PAG signaling in regulation of cytoskeleton.
  - d. Content of peritoneal mast cells in PAG KO was similar to content in WT mice suggesting that PAG deficiency does not affect mast cell development *in vivo*.
4. BMMCs with decreased or increased expression of ORMDL3 showed no changes in degranulation of early activation events. However, ORMDL3 had significant effect on Ag-mediated production of cytokines and chemokines by regulating AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway. Also, ORMDL3 negatively affected mast cell chemotaxis towards Ag.
- a. BMMC with ORMDL3 KD showed decreased spreading on fibronectin. On the other hand, cells with overexpression of ORMDL3 did not show significant changes in spreading.
  - b. The image analysis pipeline suitable for analysis of translocation of proteins between cytoplasm and nucleus was established and successfully used for analysis of localization of p65, a member of NF- $\kappa$ B signaling pathway. The localization of p65 upon Ag-activation BMMCs with ORMDL3 KD and control cells was compared and more p65 translocation to nucleus was detected in cells with KD. The obtained data indicate that ORMDL3 is negative regulator of NF- $\kappa$ B signaling in mast cells.
5. We found that inhibitory effect of ethanol on various mast cell activation events is induced by inhibition of function of cholesterol-dependent Fc $\epsilon$ RI signalosomes.
- a. Ethanol or methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) had no effect on expression of Fc $\epsilon$ RI and KIT on mast cells.
  - b. In agreement with defects in degranulation observed in BMMCs pretreated with ethanol, ethanol pretreatment also abolished LAMP1 surface expression. This

effect was further enhanced by simultaneous pretreatment of the cells with M $\beta$ CD suggesting that ethanol affects cholesterol-dependent Fc $\epsilon$ RI signalosomes.

- c. Ethanol significantly inhibited IgE internalization upon triggering with Ag when used in combination with M $\beta$ CD.
6. We established RNAi HTS protocol for screening in mast cells. By screening 144 genes, 11 positive and 4 negative regulators of mast cell activation were identified. Combined data indicated, that Gal3 is a negative regulator of mast cell degranulation and acts in early activation events by controlling Fc $\epsilon$ RI internalization and trafficking. We showed that Gal3 also facilitates mast cell chemotaxis on fibronectin but negatively regulates fibronectin-independent chemotaxis towards Ag or PGE<sub>2</sub>.
- a. We chose  $\beta$ -glucuronidase enzymatic assay for analysis of mast cell degranulation for its robustness and suitability for HTS measurements in BMMCL.
  - b. The highest transduction efficiency together with good viability were achieved when cells were infected with virus at multiplicity of infection (MOI) of 15 in presence of polybrene, 30 min spin and overnight incubation with virus.
  - c. 144 genes were selected based on their abundant expression in mast cells. Data were collected from two independent screen runs and statistical analysis of obtained data identified 12 positive and 4 negative regulators of mast cell activation.
  - d. We chose Gal3 for further detail functional analysis of its action in Fc $\epsilon$ RI signaling for most consistent effect of Gal3-targeted shRNAs in the screen.
    - i. Gal3 KD confirmed decreased degranulation in BMMC by enzymatic assay and also by single cell analysis of surface LAMP1 by flow cytometry.
    - ii. Construct containing Gal3 fused to EGFP was prepared and transfected into BMMCs. Cells overexpressing Gal3 showed decreased degranulation, supporting the negative regulatory role of Gal3 in mast cell activation.
    - iii. BMMCs with Gal3 KD showed increased mobilization of cytoplasmic calcium after Ag activation but no changes after thapsigargin. These results suggest that Gal3 affects Fc $\epsilon$ RI pathway upstream of calcium signaling.
    - iv. Microscopy analysis of F-actin content revealed increased depolymerization upon Ag treatment which is in agreement with increased cell activation of BMMCs with Gal3 KD.

- v. Global phosphotyrosine analysis was determined by confocal microscopy showing increased phosphorylation in BMMCs with Gal3 KD. Next, phosphorylation of individual signaling proteins was analyzed by western blotting; BMMCs with Gal3 KD showed increased phosphorylation of SYK, PLC $\gamma$ , AKT and JUN amino-terminal kinase (JNK). These results suggest that Gal3 affects early activation events dependent on SYK activation.
- vi. Gal3 stabilized IgE on the mast cell surface upon Ag activation as shown by impaired IgE internalization in BMMCs with Gal3 KD.
- vii. IgE in BMMCs with Gal3 KD did not form the intracellular patches observed in control cells, suggesting that Gal3 is important for normal IgE internalization and degradation in activated mast cells.
- viii. Gal3 was shown to positively affect Fc $\epsilon$ RI ubiquitination that might lead to observed changes in Fc $\epsilon$ RI internalization. Interestingly, Gal3 did not affect phosphorylation of Fc $\epsilon$ RI  $\beta$  and  $\gamma$  subunits, which suggest that their ubiquitination does not depend on extent of their phosphorylation.
- ix. BMMCs with Gal3 KD showed decreased ability to adhere and move on fibronectin, suggesting that beyond negative regulatory role of Gal3 in Fc $\epsilon$ RI mediated activation, Gal3 can positively regulate fibronectin-mediated ability to move in mast cells.

## 6. Literatura/References

1. Galli, S. J., Nakae, S., and Tsai, M.: Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **6**(2), 135-142, 2005.
2. Galli, S. J., and Tsai, M.: IgE and mast cells in allergic disease. *Nat. Med.* **18**(5), 693-704, 2012.
3. Bischoff, S. C., and Krämer, S.: Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity. *Immunol. Rev.* **217**(1), 329-337, 2007.
4. Dráber, P., and Dráberová, L.: Lipid rafts in mast cell signaling. *Mol. Immunol.* **38**(16-18), 1247-1252, 2002.
5. Gilfillan, A. M., and Rivera, J.: The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol. Rev.* **228**(1), 149-169, 2009.
6. Dráber, P., Hálová, I., Levi-Schaffer, F., and Dráberová, L.: Transmembrane adaptor proteins in the high-affinity IgE receptor signaling. *Front. Immunol.* **2**(95), 2012.
7. Brdička, T., Pavlišťová, D., Leo, A., Bruyins, E., Kořínek, V., Angelisová, P., Scherer, J., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Hilgert, I., Černý, J., Drbal, K., Kuramitsu, Y., Kornacker, B., Hořejší, V., and Schraven, B.: Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (Pag), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase Csk and is involved in regulation of T cell activation. *J. Exp. Med.* **191**(9), 1591-1604, 2000.
8. Molfetta, R., Quatrini, L., Gasparrini, F., Zitti, B., Santoni, A., and Paolini, R.: Regulation of Fc receptor endocytic trafficking by ubiquitination. *Front. Immunol.* **5**(449), 2014.
9. Acevedo, N., Reinius, L. E., Greco, D., Gref, A., Orsmark-Pietras, C., Persson, H., Pershagen, G., Hedlin, G., Melén, E., Scheynius, A., Kere, J., and Söderhäll, C.: Risk of childhood asthma is associated with CpG-site polymorphisms, regional DNA methylation and mRNA levels at the GSDMB/ORMDL3 locus. *Hum. Mol. Genet.* **24**(3), 875-890, 2015.
10. Ashman, L. K.: The biology of stem cell factor and its receptor c-Kit. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**(10), 1037-1051, 1999.
11. Weller, C. L., Collington, S. J., Hartnell, A., Conroy, D. M., Kaise, T., Barker, J. E., Wilson, M. S., Taylor, G. W., Jose, P. J., and Williams, T. J.: Chemotactic action of

- prostaglandin E<sub>2</sub> on mouse mast cells acting via the PGE<sub>2</sub> receptor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**(28), 11712-11717, 2007.
12. Hállová, I., Dráberová, L., and Dráber, P.: Mast cell chemotaxis – chemoattractants and signaling pathways. *Front. Immunol.* **3**(119), 2012.
  13. Tak, P. P., and Firestein, G. S.: NF-κB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* **107**(1), 7-11, 2001.
  14. Lakshminarayan, R., Wunder, C., Becken, U., Howes, M. T., Benzing, C., Arumugam, S., Sales, S., Ariotti, N., Chambon, V., Lamaze, C., Loew, D., Shevchenko, A., Gaus, K., Parton, R. G., and Johannes, L.: Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nat. Cell Biol.* **16**(6), 592-603, 2014.
  15. Chen, H.-Y., Fermin, A., Vardhana, S., Weng, I. C., Lo, K. F. R., Chang, E.-Y., Mavroukakis, E., Yang, R.-Y., Hsu, D. K., Dustin, M. L., and Liu, F.-T.: Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4<sup>+</sup> T-cell activation at the immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**(34), 14496-14501, 2009.
  16. Rabinovich, G. A., and Toscano, M. A.: Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **9**(5), 338-352, 2009.

## Curriculum vitae

### Monika Bambousková

Contact: monika.bambouskova@img.cas.cz,  
mbambouskova@path.wustl.edu

### Scientific experience

#### 2007 – Present

Institute of Molecular Genetics of the ASCR, Laboratory of Signal Transduction

Supervisor: Petr Dráber, Ph.D., D.Sc.

#### **Research focused on immunoreceptor signaling in mast cells**

- Experiences with biochemical and molecular biology tools – SDS-PAGE, western blot analysis, immunoprecipitation, DNA manipulation (mutagenesis, cloning, transfection), cell culture techniques, lentiviral transduction of mammalian cells, qPCR, RNAi gene knockdown techniques
- Protein expression in E.coli, purification, determination of enzymatic activity
- Murine bone-marrow derived mast cell isolation and cultivation, isolation of murine peritoneal mast cells
- Epifluorescent and confocal microscopy, image analysis
- Electron microscopy, isolation of plasma membrane sheets, ultrastructural analysis of topography of membrane molecules
- Methods for studying cell chemotaxis
- Flow cytometry, image-based cytometry

#### 2015 – Present

Department of Pathology and Immunology, Washington University in Saint Louis, MO, USA

Laboratory of systems immunology

Mentor: Maxim Artyomov, Ph.D.

#### **Metabolic and transcriptional profiling of activated macrophages**

- Mouse and human macrophage cultures
- Integrated metabolic and transcriptional data interpretation
- Real-time metabolic analysis by Seahorse technology
- Mitochondrial imaging techniques
- Mouse colony management
- lincRNA functional studies
- Crispr/Cas gene editing

#### January 2011 - June 2011

Center for Computational and Integrative Biology, Harvard Medical School/Massachusetts

General Hospital, Boston MA

Mentor: Ramnik Xavier, M.D., Ph.D.

#### **Identification of new regulators of mast cell activation using high-throughput RNAi screening**

- Development and optimization of high-throughput mast cell activation assays (calcium flux, degranulation, cell spreading)
- Optimization of lentivirus shRNA delivery for RNAi screening, data collection and analysis for ~500 shRNAs
- High-throughput automated microscopy + data analysis

## **Education**

### **2009-present – PhD student in Biochemistry**

Charles University in Prague, Faculty of Science

**PhD thesis:** *Molecular mechanisms of regulation of FcεRI signaling in mast cells*

**Supervisor:** Petr Dráber, Ph.D., D.Sc.

Laboratory of Signal Transduction

Institute of Molecular Genetics of the ASCR

### **2007-2009 – M.Sc. in Biochemistry**

Charles University in Prague, Faculty of Science

**Diploma thesis:** *Changes in topography of plasma membrane-associated signaling molecules during mast cell activation*

**Supervisor:** Petr Dráber, Ph.D., D.Sc.

Laboratory of Signal Transduction

Institute of Molecular Genetics of the ASCR

### **2004-2007 – B.Sc. in Biochemistry**

Charles University in Prague, Faculty of Science

**Bachelor thesis:** *Histone deacetylase inhibitors as potential drugs for cancer treatment*

**Supervisor:** Jitka Poljaková, Ph.D.

Department of Biochemistry, Faculty of Science

Charles University in Prague

## Seznam publikací/Selected publications

Publication included as a part of this doctoral thesis:

1. Heneberg P., Dráberová L., **Bamboušková M.**, Pompach P., Dráber P.: Down regulation of protein-tyrosine phosphatases activated an immune receptor in absence of its translocation into lipid rafts. *J. Biol. Chem.* **285**(17):12787-802, 2010.
2. Bugajev V., **Bamboušková M.**, Dráberová L., Dráber P.: What precedes the initial tyrosine phosphorylation of the high affinity IgE receptor in antigen-activated mast cells? *FEBS Lett.* **84**(24):4949-55, 2010.
3. Hálová I., Dráberová L., **Bamboušková M.**, Machyna M., Stegurová L., Smrž D., Dráber P.: Cross-talk between tetraspanin CD9 and transmembrane adaptor protein non-T-cell activation linker (NTAL) in mast cell activation and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **288**(14):9801-14, 2013.
4. Dráberová L., Bugajev V., Potůčková L., Hálová I., **Bamboušková M.**, Polakovičová I., Xavier R. J., Seed B., Dráber P.: Transmembrane adaptor protein PAG/CBP is involved in both positive and negative regulation of mast cell signaling. *Mol. Cell. Biol.* **34**(23):4285-300, 2014.
5. Bugajev V., Hálová I., Dráberová L., **Bamboušková M.**, Potůčková L., Dráberová H., Paulenda T., Junyent S., Dráber P.: Negative regulatory roles of ORMDL3 in FcεRI-triggered expression of proinflammatory mediators and chemotactic response in murine mast cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**(6):1265-85, 2016.
6. Dráberová L., Paulenda T., Hálová I., Potůčková L., Bugajev V., **Bamboušková M.**, Tůmová M., Dráber P.: Ethanol inhibits high-affinity immunoglobulin E (FcεRI) signaling in mast cells by suppressing the function of FcεRI-cholesterol signalosomes. *PLoS One.* **10**(12):e0144596, 2015.
7. **Bamboušková M.**, Polakovičová I., Hálová I., Goel G., Dráberová L., Bugajev V., Doan A., Utěkal P., Gardet A., Xavier R. J., Dráber P.: New regulatory roles of galectin-3 in high-affinity IgE receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* **36**(9):1366-82, 2016.

Publications not included as a part of this doctoral thesis:

8. **Bamboušková M.**, Hájková Z., Dráber P., Dráber P.: Microscopy assays for evaluation of mast cell migration and chemotaxis. *Basophils and Mast cells: Methods in molecular biology* (Gibbs, B. F., and Falcone, F. eds.), Springer New York, New York, NY. pp 161-176, 2014.
9. Potůčková L., Franko F., **Bamboušková M.**, Dráber P.: Rapid and sensitive detection of cytokines using functionalized gold nanoparticle-based immune-PCR, comparison with immuno-PCR and ELISA. *J. Immunol. Methods.* **371**(1-2):38-47, 2011.
10. Klein O., Nyekel F. N., Stefanache T., Torres R., Salomonsson M., Hallgren J., Rådinger M., **Bamboušková M.**, Campbell M., Cohen-Mor S., Dema B., Rose C. G., Abrink M.,



Charles N., Ainooson G., Paivandy A., Pavlova V. G., Serrano-Candelas E., Yu Y., Hellman L., Jensen B. M., Van Anrooij B., Grootens J., Gura H. K., Stylianos M., Tobio A., Blank U., Öhrvik H., Maurer M.,: Identification of biological and pharmaceutical mast cell and basophil related targets. *Scand. J. Immunol.* Article in press, 2016.

