

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



Změny v topografii signálních molekul při aktivaci žírných buněk

Diplomová práce

Monika Bambousková

Školitel: RNDr. Petr Dráber, DrSc.
Laboratoř signální transdukce
Ústav molekulární genetiky AV ČR

Garant: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha, květen 2009

Přírodovědecká fakulta UK

KNIHOVNA CHEMIE



3233145482

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Petra Drábera, DrSc. a že jsem veškerou použitou literaturu řádně citovala.

V Praze dne 4.5.2009



Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala zejména svému školiteli RNDr. Petrovi Dráberovi, DrSc. za možnost pracovat v jeho laboratoři, za odborné vedení a laskavý přístup. Dále bych chtěla poděkovat všem členům Laboratoře signální transdukce za přátelské prostředí a ochotnou pomoc při práci. Poděkování patří také Ing. Janu Korbovi, DrSc. za cenné rady a spolupráci. Rovněž děkuji Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za ochotu být garantem této práce. V neposlední řadě pak děkuji svým rodičům a přátelům za podporu během celého studia.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	6
1 TEORETICKÝ ÚVOD.....	- 9 -9
1.1 STRUKTURA A ORGANIZACE PLASMATICKÉ MEMBRÁNY.....	- 9
-	
1.1.1 Laterální heterogenita membrán	- 9 -9
1.1.2 Membránové proteiny a jejich asociace s lipidovou dvojvrstvou	11
1.1.3 Dynamika membránových mikrodomén.....	13
1.1.4 Interakce s cytoskeletem.....	14
1.2 METODY STUDIA MEMBRÁNOVÝCH MIKRODOMÉN.....	14
1.2.1 Chemické metody	14
1.2.2 Fluorescenční mikroskopické metody	16
1.2.3 Ultrastrukturální analýza transmisí elektronovou mikroskopií	16
1.3 ŽÍRNÉ BUNĚKY	17
1.4 SIGNÁLNÍ DRÁHY ŽÍRNÝCH BUNĚK	19
1.4.1 Membránové receptory.....	19
1.4.2 Proteinové rekogniční kódy v signalizaci	20
1.4.3 Signalizace fosforylací.....	21
1.4.4 Adaptorové molekuly	24
1.4.5 Signalizace FcεRI	25
1.4.6 Signalizace Kit.....	28
2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	30
3 MATERIÁL A PŘÍSTROJE	31
3.1 MATERIÁL.....	31
3.2 PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ.....	36
4 METODY.....	39
4.1 PRÁCE S TKÁŇOVÝMI KULTURAMI.....	39
4.1.1 RBL-2H3	39
4.1.2 BMBC.....	39
4.1.3 HEK293	40
4.1.4 Senzitizace buněk	40
4.1.5 Aktivace buněk	40
4.1.6 Příprava lyzátů z tkáňových kultur	40
4.2 STANOVENÍ β-D-GLUKURONIDASY	41
4.3 IMUNOPRECIPITACE FcεRI	41
4.4 SDS-PAGE.....	42
4.5 WESTERN BLOT	42
4.6 FRAKČNÍ CENTRIFUGACE V SACHAROSOVÉM GRADIENTU.....	43
4.7 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE.....	44
4.8 ULTRASTRUKTURÁLNÍ ANALÝZA.....	44
4.8.1 Příprava elektronmikroskopických sítěk.....	44
4.8.2 Příprava a pokrytí ultračistých skel fibronectinem	44
4.8.3 Příprava buněk	45

4.8.4	Izolace plasmatických membrán.....	45
4.8.5	Imunochemické značení a kontrastování izolovaných plasmatických membrán.....	46
4.8.6	Transmisní elektronová mikroskopie.....	47
4.8.7	Statistické vyhodnocení.....	47
4.9	KONJUGACE ZLATÝCH ČÁSTIC SE STREPTAVIDINEM.....	49
4.10	PRÁCE S DNA.....	50
4.10.1	Transformace <i>E. coli</i>	50
4.10.2	Izolace plasmidové DNA – Minipreparace.....	50
4.10.3	Zamrazování bakteriálních kultur.....	51
4.10.4	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	51
4.10.5	Agarosová elektroforéza.....	51
4.10.6	Izolace DNA z gelu.....	51
4.10.7	Restrikční štěpení.....	52
4.10.8	PCR.....	52
4.10.9	Ligace DNA insertu do vektorové DNA.....	53
4.10.10	Transfekce polyethyleniminem.....	53
5	VÝSLEDKY.....	54
5.1	AKTIVACE BUNĚK.....	54
5.2	TYROSINOVÁ FOSFORYLACE PO AKTIVACI BUNĚK.....	55
5.3	TRANSLOKACE FcεRI DO DETERGENT-RESISTENTNÍCH MEMBRÁN.....	57
5.4	ULTRAŠTRUKTURÁLNÍ ANALÝZA TOPOGRAFIE FcεRI.....	59
5.4.1	Intracelulární detekce FcεRI.....	59
5.4.2	Topografie FcεRI během aktivace.....	60
5.5	TOPOGRAFIE RECEPTORU Kit.....	65
5.5.1	Testování protilátek pro detekci Kit v TEM.....	65
5.5.2	Topografie Kit a vztah Kit k LAT a NTAL.....	66
5.6	TESTOVÁNÍ SYNTETIZOVANÝCH KONJUGÁTŮ ZLATÝCH ČÁSTIC SE STREPTAVIDINEM.....	72
5.7	PŘÍPRAVA KONSTRUKTU PRO EXPRESI PROTEINŮ S PŘIPOJENÝM c-Myc EPITOPEM.....	74
6	DISKUSE.....	77
6.1	METODICKÉ ASPEKTY APLIKACE TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE PŘI STUDIU TOPOGRAFIE MOLEKUL PLASMATICKÉ MEMBRÁNY.....	77
6.2	TOPOGRAFIE RECEPTORU Kit.....	79
6.3	TOPOGRAFIE FcεRI A NOVÝ MODEL BUNĚČNÉ AKTIVACE.....	80
7	ZÁVĚRY.....	84
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	85

SEZNAM ZKRATEK

Aminokyseliny jsou označeny standardními tří- či jednopísmennými zkratkami dle IUPAC.

2B8	protilátka anti-Kit
2-ME	2-merkaptoetanol
ab5506	protilátka anti-Kit
ACK-2	protilátka anti-Kit
AFM	z angl. „atomic force microscopy“
Ag	antigen
APS	amonium persulfát
Amp	ampicilin
BMMC	z angl. "bone marrow mast cells"
bp	páry bází; z angl. "base pair"
BSA	boviní sérový albumin
BSS	balancovaný solný roztok; z angl. "balanced salt solution"
dH ₂ O	destilovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina; z angl. "deoxyribonucleic acid"
DNP	2,4-dinitrofenol
DRM	detergent-resistentní membrány
ECL	zvýšená chemiluminiscence; z angl. "enhanced chemiluminiscence"
EDAX	z angl. „energy dispersive X-ray spectroscopy“
EDTA	kys. etylendiamintetraoctová
EM	elektronmikroskopický
EtBr	ethidium bromid
F-aktin	filamentární aktin
FC	fosfatidylcholin
FcεRI	vysokoafinitní Fc receptor pro IgE typu I
FCS	fetální telecí sérum; z angl. „foetal calf serum“
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
FITC	fluorescein-isothiokyanát
FRAP	z angl. "fluorescent recovery after photobleaching"
FRET	z angl. "Förster resonance energy transfer"
GFP	z angl. "green fluorescent protein"
GPI	glykosylfosfatidylinositol
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonová kyselina
HRP	křenová peroxidasa; z angl. "horseradish peroxidase"
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
ITAM	z angl. „immunoreceptor tyrosin-based activation motifs“
JKR	protilátka anti-β-FcεRI

kb	kilobáze; z angl. "kilobase"
kDa	kilodalton
KM	kompletní médium
LAT	z angl. "linker for activated T-cells"
LB	Luria-Bertani médium
LD	z angl. "liquid disorder"
Lo	z angl. "liquid order"
mAb	monoklonální protilátka
MBCD	methyl- β -cyklodextrin
MCS	mnohočetné klonovací místo; z angl. "multi cloning site"
MEM	roztok esenciálních aminokyselin
MIRR	víceřetězcové imunoreceptory z angl. „multi-chain recognition receptors“
MUG	4-methylumbelliferyl- β -D-glukuronid
NC	nitrocelulosa
NP-40	nonidet P-40
NTAL	z angl. "non-T-cell activator linker"
pAb	polyklonální protilátky
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBS	fosfátový tlumivý roztok; z angl. "phosphate buffered saline"
PCCF	z angl. "pair cross-correlation function"
PCF	z angl. "pair correlation function"
PEI	polyethylenimin
pfa	paraformaldehyd
PH	z angl. "plecstrin homology"
PI	propidium iodid
PLCy	fosfolipasa γ
PLL	polylysin
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PTB	z angl. "protein tyrosin binding"
PTF	protein-tyrosinfosfatasa
PTK	protein-tyrosinkinasa
Pv	pervanadičnan sodný; pervanadát
PY-20	fosfotyrosin-specifická protilátka
RBL	potkaní bazofilní leukemie; z angl. "rat basophilic leukemia"
ROS	z angl. "reactive oxygen species"
S.D.	směrodatná odchylka
SCF	faktor kmenových buněk; z angl. "stem cell factor"
SDS	dodecylsulfát sodný
SF	sfingomyelin
SH1, SH2, SH3,	Src-homologní domény 1, 2, 3
SPT	z angl. "single particle tracking"
Str-Au	konjugáty zlatých částic se streptavidinem
Syk	z angl. "spleen tyrosin kinase"

TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TIFF	z angl. "Trion insoluble floating fractions"
TM	transmembránový
TNP	2,4,6-trinitrofenol
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 STRUKTURA A ORGANIZACE PLASMATICKÉ MEMBRÁNY

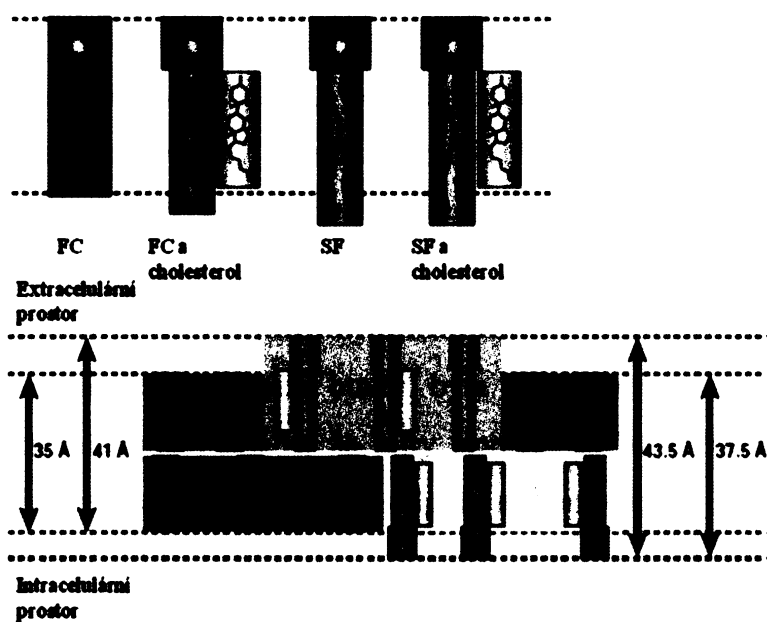
Základní funkcí biomembrán je oddělení a organizace jednotlivých biologických procesů. Buňka je ohraničena plasmatickou membránou, která reguluje složení vnitrobuněčného prostředí a zároveň slouží jako rozhraní zprostředkovávající komunikaci mezi buňkou a jejím okolím. Obrovská dynamika a variabilita ve složení rozličných biologických membrán odráží množství funkcí a biochemických procesů, které se na membránových strukturách nebo přímo v membránách odehrávají.

1.1.1 Laterální heterogenita membrán

Základním stavebním prvkem biologických membrán je selektivně permeabilní lipidová dvojvrstva, silná kolem 40 Å. Mezi hlavní lipidové složky živočišných biomembrán patří glycerofosfolipidy, sfingolipidy a cholesterol. Glycerofosfolipidy i sfingolipidy se liší strukturou polárních skupin molekuly a také délkou a saturací vázaných acylových zbytků. Sfingolipidy obsahují dlouhý nasycený alifatický řetězec pocházející ze sfingosinu. Cholesterol sám není schopen tvořit dvojvrstvy. Jeho struktura je díky sterolovému jádru planární a relativně rigidní a interkaluje mezi dlouhé acylové řetězce lipidů, které tak omezuje v pohybu a ovlivňuje fluiditu membrán. Zároveň zvyšuje rozsah teplot přechodu z uspořádané do neuspořádané fáze a zabraňuje krystalizaci acylových řetězců [1].

Dalším aspektem struktury lipidové dvojvrstvy je asymetrie. Vnější lipidová vrstva je bohatší na sfingomyeliny a glykosfingolipidy, zatímco cytoplasmatická vrstva sestává z větší míry z glycerofosfolipidů a cholesterol je přítomen v obou membránových vrstvách. Lipidové molekuly mohou být vyměňovány v rámci dvojvrstvy pomocí aktivity několika enzymů [2]. Lokální změny fyzikálních vlastností dvojvrstvy participují na fyziologických dějích – způsobují např. její deformaci, která napomáhá pučení a fúzi vezikul [3]. Zastoupení lipidových složek tak do značné míry určuje charakteristiky a chování membránových struktur a koresponduje s jejich specializací a funkcí. Některé lipidové molekuly interagují s cytosolárními proteiny a mají tak složitější strukturální roli nebo se uplatňují při signální transdukcii (např. fosfatidylinositol, fosfatidylserin) [4].

Velký pokrok v pochopení struktury a funkce biologických membrán byla práce Singera a Nicholsona, kteří navrhli teorii známou jako model tekuté mozaiky [5]. Model popisuje biomembrány jako lipidovou matrix, ve které jsou náhodně distribuovány membránové proteiny a klade důraz na laterální mobilitu všech komponent. Výsledky studií z oblasti modelových membrán pak přinesly nové poznatky o fyzikálněchemických vlastnostech komplexních lipidových směsí, dokumentující laterální organizaci a segregaci molekul – možnost vzniku lipidové fáze s vyšší uspořádaností (L_O), obklopené fází „volněji“ uspořádaných molekul (L_D) v závislosti na složení směsi a obsahu cholesterolu. Díky fyzikálně-chemickým vlastnostem mají glycerofosfolipidy tendenci tvořit mobilní tekutou fázi, zatímco sfingolipidy vykazují „těsnější“ uspořádání a vytváří tak separované domény [6-8]. Představa o prostorovém uspořádání a laterální segregaci různých lipidů v membráně je ilustrována na obr. 1.1.



Obr. 1.1: Laterální segregace lipidů. Příklad uvádí segregaci fosfatidylcholinu (FC) a sfingomyelinu (SF) do mikrodomén stabilizovaných cholesterolem s ohledem na membránovou asymetrii. Převzato z [2].

Existence těchto jevů v biomembránách však zůstávala kontroverzní. Biologické membrány se v mnoha ohledech velmi liší od membrán modelových – vykazují velkou různorodost v molekulárním složení, vysokou koncentraci proteinů, asymetrii dvou vrstev a lokální nerovnovážné děje (enzymatické aktivity, recyklace membrán, signalizační děje atd.) [9]. Klíčovými se staly experimenty, kdy byly izolovány membránové frakce odolávající solubilizaci v neiontových detergentech, které jsou obohacené o (glyko)sfingolipidy, cholesterol a proteiny kotvené do membrány pomocí lipidové kotvy,

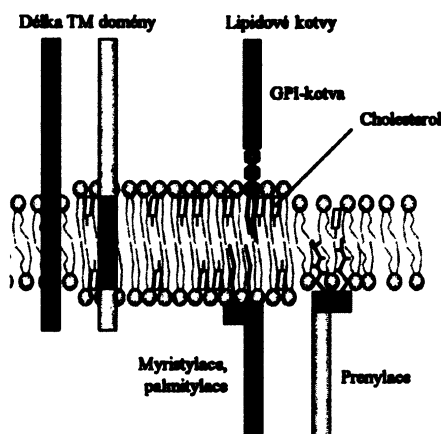
například glykosylfosfatidylinositolové (GPI-kotvené proteiny) [10]. Tyto frakce označované jako detergent-resistantní membrány (DRM) přispěly k představě laterální heterogenity v biomembránách. Další nezávislé pozorování specifických biologických dějů z oblasti buněčného transportu, signalizace a identifikace důležitých funkčních proteinů v DRM podnítily výzkum organizace buněčných membrán a vyústily v přehodnocení pohledu na komplexitu membránové dynamiky [11-14]. Na základě uvedených poznatků byla formována hypotéza tzv. lipidových raftů. Podle ní jsou lipidové rafty laterální lipidové klastry obohacené o sfingolipidy a cholesterol, které se vyčleňují z okolního prostředí nenasycených glycerofosfolipidů a mají schopnost laterálně segregovat specifické druhy membránových proteinů [15]. Původní představa o lipidových raftech byla zaměřena především na jejich resistenci vůči detergentové solubilizaci a pojednávala o relativně velkých a stabilních strukturách (100 – 500 nm), udržovaných hlavně mezilipidovými interakcemi. Předpokládalo se, že proteiny lokalizují do lipidových raftů, pokud vykazují dostatečnou afinitu k charakteristickému lipidovému prostředí. Membrány živých buněk však nejsou nikterak homogenní, jsou dějištěm mnoha procesů majících za následek komplexní interakce mezi proteiny a lipidy vedoucích ke vzniku lokálních změn prostředí. Nové poznatky demonstrují, že lipidové rafty představují spíše skupinu heterogenních domén, které vykazují rozdíly jak v lipidovém a proteinovém složení, tak i v časové stabilitě [16, 17]. Lipidové rafty svými vlastnostmi nejlépe odpovídají fázi označované L_0 , jejíž existence v membránách živých buněk byla nedávno potvrzena [18]. Současný koncept lipidových raftů předpokládá, že rafty jsou malé (10 – 200 nm), heterogenní, vysoce dynamické domény, obohacené sfingolipidy a steroly, které jsou dějištěm různých membránových procesů. Malé raftové domény mohou být stabilizovány za vzniku větších struktur díky protein – proteinovým nebo protein – lipidovým interakcím [19]. V současnosti se lze setkat i s výstižnějšími označeními jako membránové rafty a membránové mikrodomény [16, 20].

1.1.2 Membránové proteiny a jejich asociace s lipidovou dvojvrstvou

Většina dynamických procesů odehrávajících se na membránách je zprostředkována integrálními nebo periferními proteiny asociovanými s lipidovou dvojvrstvou. Periferní proteiny asociují s dvojvrstvou díky elektrostatickým interakcím a vodíkovým vazbám nebo pomocí kovalentně připojené lipidové kotvy. Integrální proteiny

pevně asociují s membránou díky hydrofobním interakcím mezi nepolárními aminokyselinovými řetězci a nepolárním prostředím uvnitř lipidové dvojvrstvy. Obsah proteinů v membránách se značně liší podle funkce membrány a organismu z něhož membrány pochází.

Objev selektivní lokalizace GPI-kotvených proteinů v DRM byl následován identifikací celé řady membránových proteinů residujících v podobně izolovaných frakcích [12, 21]. Asociace proteinů s lipidovými rafty je zprostředkována plejádou různých mechanismů, od posttranslačních modifikací k asociacím integrálních proteinů. Na obr. 1.2 je zobrazeno schéma některých způsobů zacílení proteinů do lipidových raftů.

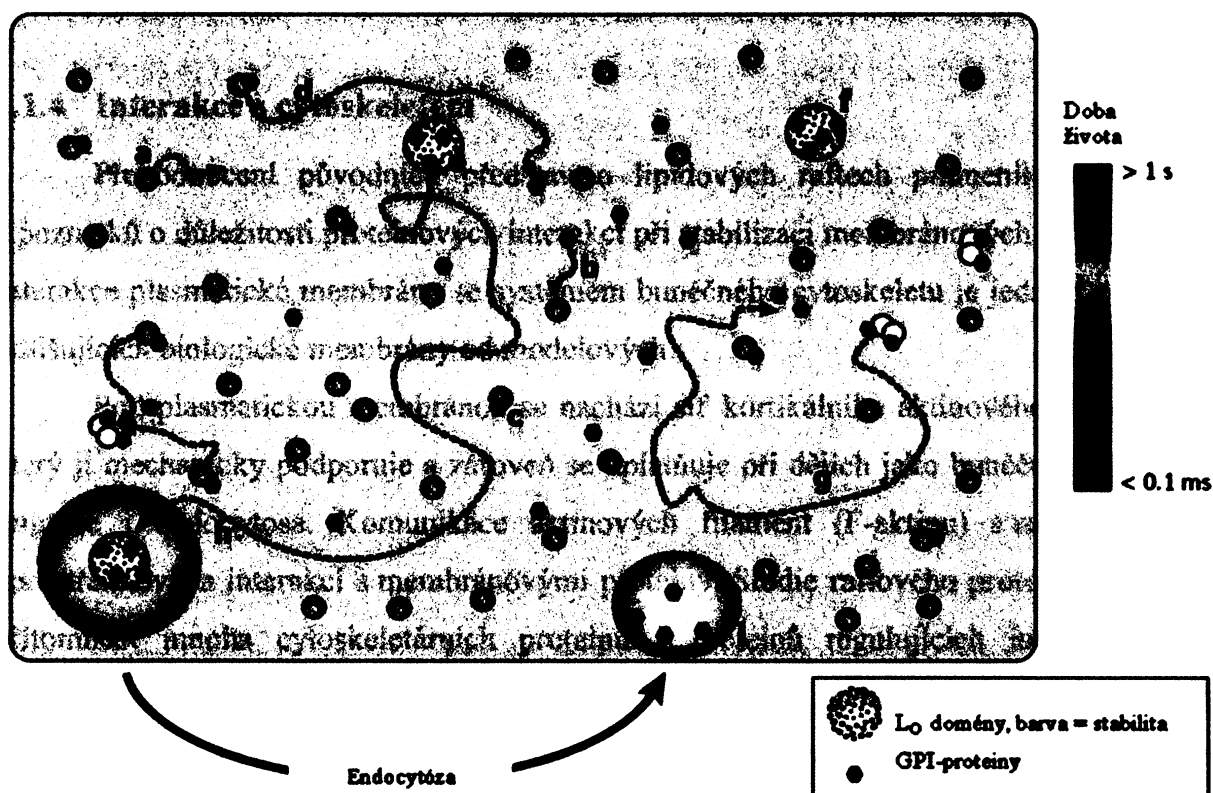


Obr. 1.2: Příklad zakotvení proteinů do lipidových raftů. Při směřování proteinů do prostředí bohatého na sfingolipidy a cholesterol hraje roli povaha transmembránové domény (TM), nebo lipidová modifikace. GPI-zakotvené proteiny asociují s membránou extracelulárně, acylované proteiny intracelulárně. Dvojitě acylované (myristylace a palmitylace) proteiny asociují s rafty, prenylované proteiny nikoliv. Převzato z [2].

Častým způsobem lokalizace proteinů do raftů je acylace, především palmitylace a myristylace [22]. U transmembránových proteinů hraje důležitou roli např. délka segmentu procházejícího membránou [23]. Lokalizace do raftů nemusí záviset jen na struktuře transmembránové části - proteiny mohou být zacíleny do raftů skrze aminokyselinové složení extracelulární [24], transmembránové [25] i intracelulární domény [26]. Některé raftové transmembránové proteiny obsahují navíc motivy pro acylaci v blízkosti membrány [27]. Aminokyselinové sekvence vedoucí k asociaci s určitým lipidovým prostředím jsou však obtížně predikovatelné. Různé způsoby zacílení proteinů do lipidových raftů mohou směřovat proteiny do distinktních mikrodomén, přestože po izolaci DRM jsou detekovány ve stejných frakcích [28, 29]. Detailní aspekty povahy lokalizace proteinů do lipidových raftů jsou stále předmětem výzkumu.

1.1.3 Dynamika membránových mikrodomén

Dnešní pohled na dynamiku plasmatické membrány klade důraz na velikost a časovou stabilitu membránových mikrodomén. Stabilita L_0 domén je funkcí doménové velikosti, doby života a spolupráce se stabilizujícími nebo destabilizujícími proteiny a vzájemné proteinové interakce mezi nimi. Dynamický model na obr. 1.3 uvádí malé



Obr. 1.3: Současný model dynamiky membránových mikrodomén. Mikrodomény jsou tvořeny uspořádanou lipidovou fází L_0 . Stabilita domén a životnost (znázorněna barevně) v membráně je funkcí jejich rozměrů a složení a závisí rovněž na asociaci s proteiny, které mohou mít stabilizující vliv. Pravděpodobnost střetu domén závisí na čase, po který se pohybují membránou (trajektorie = přerušované čáry). Malé nestabilní L_0 domény vznikají spontánně, difundují membránou a mají limitovanou dobu života (a). V případě, že dojde k asociaci s GPI-proteiny nebo jinými stabilizujícími proteiny (b) vznikají stabilnější komplexy (c), které se buď po čase rozpadají (d) nebo dojde ke střetu s dalším L_0 -proteinovým komplexem a vznikají proteinové klastry (e). Další kolize generují větší a stabilnější komplexy (f), které zprostředkovávají protein-proteinové interakce nebo bez střetu s dalšími komplexy v čase zanikají (g). Velké stabilní komplexy podléhají endocytóze (h) při níž jsou rozkládány na proteinové a lipidové složky a navraceny zpět na plasmatickou membránu (i). Je možné, že na regulaci růstu a životnosti všech velkých a stabilních raftových komplexů se podílí endocytické procesy. Velké a stabilní komplexy pak mohou fungovat dle klasického modelu lipidových raftů (f). Převzato z [16].

nestabilní L_0 domény, které spontánně vznikají, laterálně difundují membránou a poté se rozpadají. Po střetu se stabilizujícími proteiny vznikají komplexy a jejich osud je buď další difúze v membráně a následný rozpad nebo srážka s jinou stabilizovanou doménou a vznik proteinových klastrů. Další srážky pak mohou vést ke vzniku větších L_0 – proteinových komplexů, stabilizovaných protein-proteinovými interakcemi. Velké komplexy jsou podrobeny endocytickým procesům, které limitují velikost mikrodomén [16].

1.1.4 Interakce s cytoskeletem

Přehodnocení původních představ o lipidových raftech pramenilo mimo jiné z poznatků o důležitosti proteinových interakcí při stabilizaci membránových mikrodomén. Interakce plasmatické membrány se systémem buněčného cytoskeletu je jedním z aspektů odlišujících biologické membrány od modelových.

Pod plasmatickou membránou se nachází síť kortikálního aktinového cytoskeletu, který ji mechanicky podporuje a zároveň se uplatňuje při dějích jako buněčná polarizace, migrace i endocytosa. Komunikace aktinových filament (F-aktinu) s membránou je zprostředkována interakcí s membránovými proteiny. Studie raftového proteomu odhalily přítomnost mnoha cytoskeletárních proteinů a proteinů regulujících interakce mezi membránou a cytoskeletem. Jedná se např. o aktin, tubulin, myosin, actinin a ezrin [30]. Předpokládá se, že síť F-aktinu asociovaná s transmembránovými proteiny reguluje volnou difúzi lipidových i proteinových molekul a podílí se tak na mikrodoménové organizaci. V četných studiích pak bylo ukázáno, že rozrušení cytoskeletární sítě (např. inhibitory polymerizace aktinu) zásadním způsobem ovlivňuje distribuci raftových molekul a má dopad na průběh fyziologických dějů spjatých s rafty [31]. Funkce F-aktinu při regulaci membránových mikrodomén je dokumentována při aktivaci T-buněk, B-buněk, žírných buněk a migraci lymfocytů [20, 32]. Detailní mechanismy ovlivňování raftové dynamiky cytoskeletálním systémem však nejsou zatím zcela probádány.

1.2 METODY STUDIA MEMBRÁNOVÝCH MIKRODOMÉN

1.2.1 Chemické metody

Většina biochemických metod využívaných při studiu membránových mikrodomén je založena na izolaci detergent-resistentních membrán. Typickým postupem je extrakce

membrán lyzačním roztokem s 1 % Tritonem X-100 při 4 °C a následná frakční ultracentrifugace v sacharosovém gradientu (5 – 40 %), kdy jsou nesolubilizované membránové fragmenty lokalizovány do nízkohustotních frakcí. Takto získané membránové frakce jsou někdy nazývány TIFF (z angl. „triton-insoluble floating fractions“) [33]. K izolaci detergent-resistantních membrán je využíváno i množství dalších detergentů jako Lubrol WX, Lubrol PX, Brij 78, Brij 96, Brij 98, NP-40, CHAPS atd. Výsledky izolace DRM jsou kriticky závislé na experimentálních podmínkách - na to je třeba brát ohled při jejich interpretaci. Získané DRM jsou výsledkem více nebo méně drastického zásahu do struktury plasmatické membrány a nemusí odpovídat struktuře nativní [34, 35]. Molekuly asociované s DRM se označují někdy jako raftové markery. Izolace za použití detergentů je stále nejčastějším postupem při studiu membránových mikrodomén. Přestože z DRM nelze získat informace o nativní struktuře raftů, lze v některých případech pozorovat redistribuci proteinů mezi nízkohustotními a vysokohustotními frakcemi sacharosového gradientu, např. v důsledku specifické fyziologické stimulace buněk [36, 37]. V takovém případě je izolace DRM užitečným vodítkem při identifikaci proteinů spolupracujících s membránovými mikrodomény.

Důležitost cholesterolu pro formování L_0 fáze a membránových mikrodomén je často využívána při studiích, kdy je cholesterol vyčerpán nebo jinak odstraňován. Rozrušení buněčného cholesterolu se provádí jeho chemickým vyvázáním např. pomocí methyl- β -cyklodextrinu (MBCD) nebo inhibicí některé z reakcí jeho biosyntézy. Výsledkem často bývá ovlivnění membránové distribuce proteinů [38, 39]. Nicméně rozrušení membránového cholesterolu mění membránový potenciál [40], ovlivňuje endocytózu [41] a laterální mobilitu proteinů [42], proto ani tyto metodické postupy nedávají přímou představu o situaci v nativní membráně.

Další přístupy využívají např. imunoafinitní metody, kdy jsou membránové vezikuly asociované s různými proteiny izolovány pomocí specifických protilátek [43]. K proteomické i lipidomické analýze membránových mikrodomén je často využívána hmotnostní spektrometrie, využívající jako výchozí materiál izolované DRM nebo izolované vezikuly [44, 45]. Zajímavou metodou aplikovanou na výzkum plasmatické membrány živých buněk je například i elektronová spinová rezonance [18].

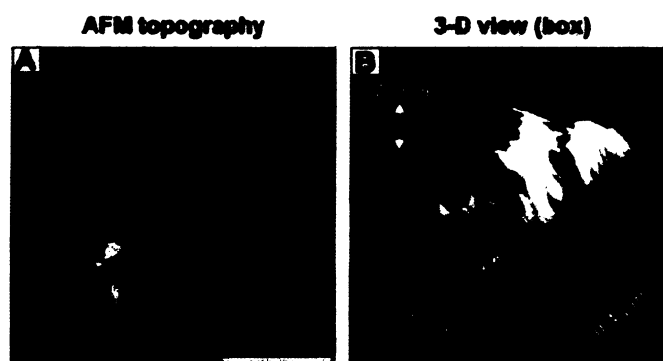
1.2.2 Fluorescenční mikroskopické metody

Přímé studium lipidových raftů na živých buňkách je problematické vzhledem k jejich malým rozměrům, které sahají hluboko pod rozlišovací schopnost konvenční fluorescenční mikroskopie (difrakční limit ~ 200 nm). Moderní biofyzikální metody studia membránové dynamiky jsou zaměřeny na monitorování událostí s vysokým prostorovým i časovým rozlišením bez narušení membránové integrity [46]. Fluorescenční značení živých buněk je v současné době zpravidla prováděno přípravou fúzních proteinů se širokým spektrem dostupných fluorescenčních proteinů připravených metodami genového inženýrství [47]. FRAP (z angl. „fluorescence recovery after photobleaching“) se často využívá k měření koeficientů laterální difúze membránových komponent [48]. FRET (z angl. „Förster resonance energy transfer“) je významnou metodou při zkoumání intermolekulárních interakcí [49]. Mezi další významné moderní metody aplikované na výzkum membránových mikrodomén živých buněk patří i fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) [50] a sledování pohybu jedné částice (SPT) [48].

1.2.3 Ultrastrukturální analýza transmisní elektronovou mikroskopií

Tato metoda je modifikací práce Sanana a Andersona [51] a k její aplikaci na studium lokalizace molekul plasmatické membrány vedly výsledky poukazující na malé rozměry membránových mikrodomén [52]. Využití transmisní elektronové mikroskopie (TEM) umožňuje vizualizaci a kvantitativní analýzu membránových mikrodomén na ultrastrukturální úrovni. V porovnání se současnou světelnou mikroskopií je TEM omezena jen na vzorky fixované a je tedy schopna vytvořit záběr jen jednoho konkrétního momentu. Poskytuje však nesrovnatelně vyšší rozlišení. Komplikovanější a časově náročnější příprava vzorků je vyvážena získáním detailního pohledu na strukturu plasmatické membrány a dovoluje identifikaci jednotlivých molekul s rozlišením v řádu nm. Příprava vzorků zahrnuje izolaci plasmatických membrán ze živých buněk, které je možné před samotnou izolací stimulovat. K detekci konkrétních molekul se využívá imunochemického značení pomocí konjugátů protilátek s elektrondenzními zlatými nanočásticemi, které jsou v TEM díky absorbnímu a částečně i difrakčnímu kontrastu snadno identifikovatelné. Zlaté částice dvou velikostí (obvykle 5 a 10 nm) dovolují současnou detekci dvou různých antigenů. Izolace plasmatických membrán dovoluje detekci molekul z extracelulární i intracelulární části plasmatické membrány. Z charakteru

provedení detekce molekul plyne absolutní závislost metody na dostupnosti kvalitních vysoce specifických sond, obvykle protilátek. Ke kontrastování izolovaných membrán se používá barvení osmiem. Bylo prokázáno, že tmavé oblasti izolovaných membrán sdružující komplexy signálních molekul obsahují zvýšené množství uhlíku a osmia. OsO₄ se údajně váže na dvojnou vazbu 5,6 cholesterolu a na trans-dvojnou vazbu sfingomyelinu. Zvýšené zastoupení uhlíku pak odpovídá nejspíše agregaci proteinů a lipidů. Tyto oblasti byly označeny jako „osmiofilní“ [28]. Mikrofotografie topografie membránových molekul je třeba podrobit statistickému zpracování, které dává analýze kvantitativní rozměr. Zajímavých výsledků bylo dosaženo při studiu distribuce membránových proteinů imunoreceptorové signalizace [52-54] a signalizace Ras [46, 55, 56]. Izolované plasmatické membrány byly mimo jiné podrobeny analýze EDAX (z angl. „energy dispersive X-ray spectroscopy“) [28] a mikroskopii atomárních sil rastrovací sondou (AFM, z angl. „atomic force microscopy“) na obr. 1.4 [28, 57].



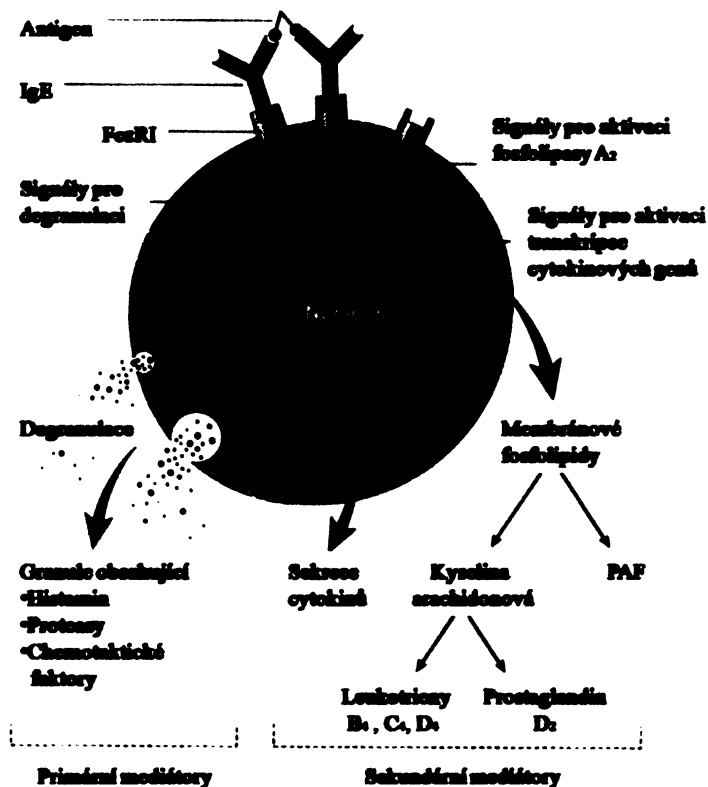
Obr. 1.4: AFM obraz membránových mikrodomén. Vizualizace mikrodomén a 3D rekonstrukce intracelulární struktury plasmatické membrány izolované z buněk RBL. Převzato z [57].

1.3 ŽÍRNÉ BUŇKY

Žírné buňky (mastocyty) jsou buňky imunitního systému. Tak jako ostatní leukocyty jsou odvozeny z hematopoetických progenitorových buněk v kostní dřeni. Vyuvíjí se z buněk myeloidní linie a patří mezi granulocyty. Diferenciaci dokončují až po migraci do tkání, pod vlivem specifického mikroprostředí. Dle působících faktorů se pak dělí na dva subtypy – pojivové a slizniční. Jejich tkáňová lokalizace je závislá na adhezivních molekulách (β 1 a β 7 integriny a L-selektin). Klíčovými růstovými faktory žírných buněk jsou IL-3, IL-4 a faktor kmenových buněk (SCF, z angl. stem cell factor“). Žírné buňky jsou složkou nespecifické imunity a fungují jako efekторы při reakcích zprostředkovaných

imunoglobulinem E (IgE). Uplatňují se hlavně v boji proti parazitálním infekcím, při regulaci imunitní odpovědi a v komunikaci mezi imunitním a nervovým systémem [58]. Za patologických okolností zodpovídají za raný typ přecitlivělosti – alergické reakce a v této spojitosti jsou nejčastěji studovány [59]. Jejich aberantní chování způsobuje mastocytózu [60] a dosud nezcela probádanou roli hrají rovněž při nádorových onemocněních [61].

Žírné buňky obsahují v cytoplasmě velké množství granul (specializovaných lyzosomů) a proto jsou řazeny mezi granulocyty. Specifickými povrchovými receptory žírných buněk jsou vysokoafinitní receptory pro IgE (FcεRI). Proces navázání antigen-specifických IgE na receptory se nazývá senzitivace. Po setkání senzitivovaných buněk s polyvalentním antigenem jsou buňky aktivovány a zahajují proces zvaný degranulace, při němž granula fúzíjí s cytoplasmatickou membránou a jejich obsah je uvolněn do okolí. Látky sekretované při aktivaci lze rozdělit do tří hlavních skupin. První z nich jsou předpřipraveny v cytoplasmatických granulech a jsou uvolňovány při degranulaci jako biologicky aktivní aminy (histamin a serotonin), proteasy a proteoglykany (heparin, chondroitinsulfát) [62, 63]. Dále je aktivován metabolismus kyseliny arachidonové a jsou



Obr. 1.5: Aktivace žírných buněk. Upraveno podle z <http://www.opt.indiana.edu/>.

sekretovány nově vznikající látky především leukotrien C_4 a prostaglandin PGD_2 , které tvoří skupinu druhou. Třetí skupinou jsou pak sekretované cytokiny, chemokiny a růstové faktory [63]. Aktivace žírných buněk a následné procesy jsou schematicky znázorněny na obr. 1.5 (str. 18). Je známo, že aktivace žírných buněk je ovlivněna celou řadou faktorů. Žírné buňky mohou být aktivovány a vybuzeny k sekreci některých mediátorů i mechanismy nezávislymi na IgE. Aktivace buněk probíhá na specifickém fyziologickém pozadí, které moduluje práh citlivost spuštění buněčné reakce. Důležitou roli při správné funkci žírných buněk hrají samozřejmě i genetické faktory jako polymorfismus, mutace v genech a alternativní sestřih receptorů a signálních proteinů [64]. Stimulace různými podněty má za následek reakce charakterizované různou kinetikou, množstvím a spektrem uvolněných mediátorů. V podobě sekretovaných látek lze měřit sledovanou reakci na definovaný podnět (např. známý antigen). Toho se s výhodou využívá při studiu mechanismů buněčné a imunoreceptorové signalizace, kdy žírné buňky slouží jako modelové buněčné typy.

1.4 SIGNÁLNÍ DRÁHY ŽÍRNÝCH BUNĚK

Buňky reagují na množství signálů z jejich okolí. Rozpoznání signálu vede k aktivaci mechanismů zprostředkávajících transdukcí signálu na cílové efektorové funkce. Signální mechanismy poskytují specifickou, řízenou a koordinovanou buněčnou odpověď na podmínky prostředí. Buněčná signalizace tak uplatňuje plejádu různých mechanismů založených na specifitě vazeb, konformačních změnách, prostorové distribuci, mobilizaci iontů a enzymové aktivitě. Tyto mechanismy jsou zprostředkovány různými typy signálních molekul.

1.4.1 Membránové receptory

Receptory na plasmatické membráně jsou membránové proteinové struktury, jejichž úkolem je přenést extracelulární signál dovnitř buňky. Receptory jsou klíčovými molekulami v buněčné signalizaci. Vazba ligandu na receptor zahajuje konformační změny anebo prokřížení receptorových molekul. Membránové receptory žírných buněk se dělí na několik skupin - několikařetězcové imunitní rozpoznávací receptory (MIRR; z angl.

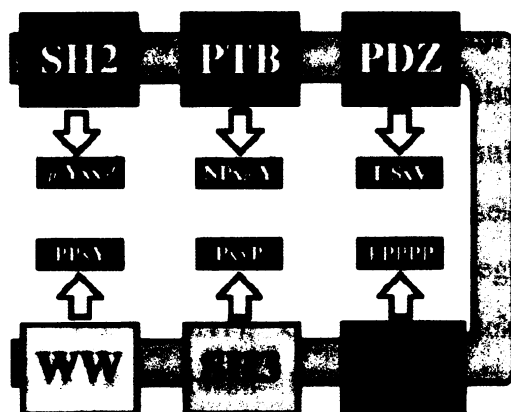
„multi-chain recognition receptors“), receptory spřažené s G-proteiny, integrinové receptory, cytokinové receptory, GPI zakotvené receptory a další [64].

Struktura receptorů MIRR je tvořena několika podjednotkami; některé jsou podobné imunoglobulinům a zprostředkovávají rozpoznávací funkce, a další jsou transdukční, které umožňují propagaci signálu. Na různých buňkách imunitního systému jsou exprimovány různé receptory [65].

Skupina cytokinových receptorů zahrnuje několik rodin a tyto receptory ovlivňují regulaci buněčné proliferace a diferenciaci. Významná je např. cytokinová regulace funkcí hematopoetických buněk v různých stádiích vývoje [66].

1.4.2 Proteinové rekogniční kódy v signalizaci

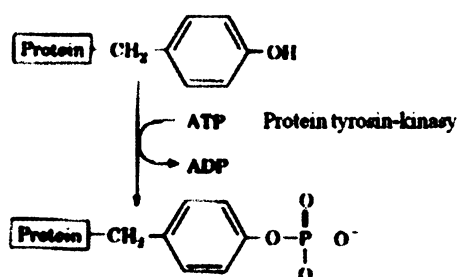
Přenos signálu při buněčné signalizaci je založen mimo jiné na různých protein-proteinových interakcích. Tyto interakce jsou velice často zprostředkovány univerzálními proteinovými sekvencemi, které obecně fungují v membránových, cytoplasmatických i jaderných procesech. Tyto domény představují unikátní trojrozměrné struktury, které mají schopnost nezávisle se sbalovat a jsou komplementární ke specifickým sekvencím motivům. Na základě analogie s univerzalitou genetického kódu byly tyto domény označeny jako „proteinové rekogniční kódy“. Vybrané domény spolu se specifickými ligandovými sekvencemi jsou vyobrazeny na obr. 1.6. Mezi další domény patří například PH doména (z angl. „plecstrin homology“), která váže fosfatidylinositoly [67].



Obr. 1.6: Schematický přehled vybraných proteinových domén zprostředkovávajících vazbu na unikátní sekvence cílových proteinů. Sekvence cílových proteinů (v malých rámečcích) obsahují fosfotyrosin (p-Y) nebo jsou bohaté na prolin. x představuje jakoukoliv aminokyselinu, Ψ hydrofobní aminokyselinu. Převzato z [67].

1.4.3 Signalizace fosforylací

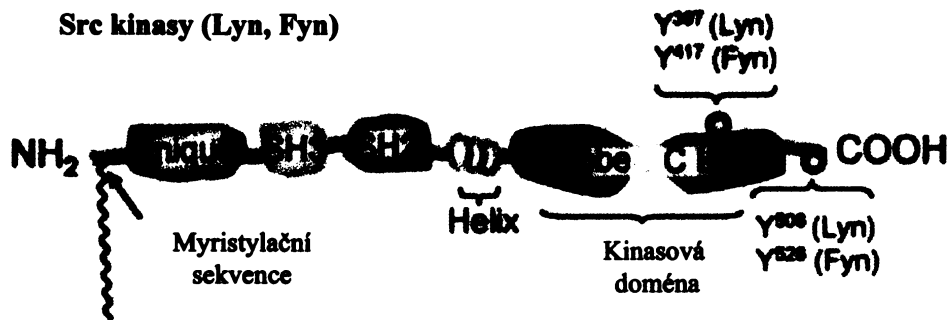
Kovalentní modifikace signálních molekul je významným signálním mechanismem. Modifikací může docházet ke změnám enzymové aktivity a ke konformačním změnám, které modulují vazebné vlastnosti molekul. Široce uplatňovanou kovalentní modifikací je transfer fosfátové skupiny především na serinové, threoninové a tyrosinové zbytky v polypeptidových řetězcích proteinů nebo na některé membránové lipidy [1]. Fosforylací je zprostředkována pozitivní i negativní regulace signálních drah. Tyrosinová fosforylace je primárně uplatňována v raných fázích receptorové signalizace a je katalyzována enzymy s fosforylační aktivitou – **protein-tyrosinkinasami** (PTK, reakce na obr. 1.7) a aktivitou defosforylační, které hydrolyticky odštěpují fosfát – **protein-tyrosinfosfatasami** (PTP) [68].



Obr. 1.7: Schéma fosforylace tyrosinových zbytků v proteinu katalyzované protein-tyrosinkinasami. Převzato z [1].

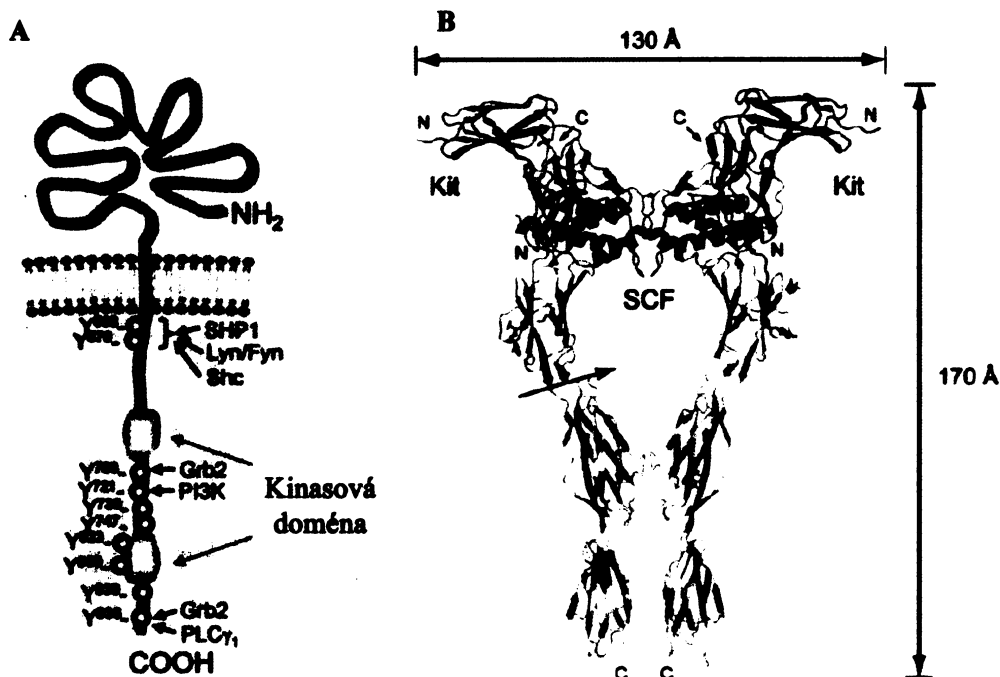
Jednou z významných skupin PTK uplatňujících se při imunoreceptorové signalizaci je rodina Src (z angl. „Sarcoma“). Src kinasy mají pozitivní i negativní regulační funkci při aktivaci žírných buněk a spolupracují s mnohými povrchovými receptory. Src kinasy mají společné strukturální znaky (viz obr. 1.8 str. 22): myristylační (někdy i palmitylační) sekvenční motiv na N-konci, díky němuž jsou Src kinasy zakotveny do membrány; unikátní doménu, jediný nekonzervovaný úsek v rámci rodiny Src kinas (50-80 aminokyselin); SH3 doménu a SH2 doménu; regulační helix; katalytickou kinasovou doménu (jinak zvanou SH1); C-koncový úsek pro negativní regulaci. Fosforylace v C-koncové regulační oblasti dovoluje intramolekulární interakci s SH2 doménou a udržuje kinasu v neaktivním stavu. Kinasová doména sestává ze dvou smyček a obsahuje tyrosin, jehož autofosforylace je klíčová pro aktivitu Src kinas [69]. Významnou kinasou žírných buněk je Lyn (56 kDa), která ve své sekvenci nese jak myristylační, tak

palmitylační motiv, který navíc umožňuje její asociaci s L_0 doménami v intracelulárním listu plasmatické membrány [70].



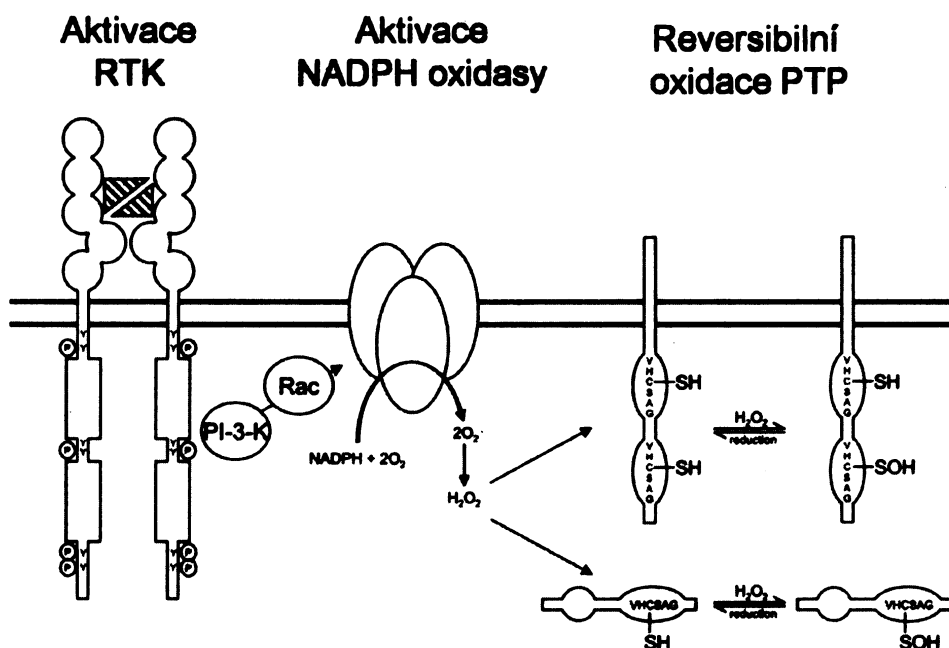
Obr. 1.8: Schematická struktura PTK rodiny Src (např. Lyn a Fyn). Na N-konci proteinu je lokalizována myristylační sekvence, směřující protein do membrány. Lyn kinasa obsahuje rovněž palmitylační sekvenci (nezobrazeno), která umožňuje lokalizaci do L_0 domén. Následuje unikátní doména („unique“), která je jedinou nekonzervovanou sekvencí v rodině Src kinas. Další jsou funkční domény SH2 a SH3. Mezi nimi a kinasovou doménou je spojovací helix. Kinasová doména obsahuje N a C smyčky („lobe“). Tyrosin (Y) v C smyčce je tzv. aktivační tyrosin. Krátká C-koncová oblast obsahuje tzv. C-terminální regulační tyrosin. Převzato z [68].

Kit (CD117, 145 kDa) je jednořetězcová receptorová tyrosin-kinasa typu III. Extracelulární ligand-vázající část se skládá z pěti imunoglobulinu-podobných domén, kdy za vazbu SCF odpovídají domény 2 a 3 (znázorněny zeleně na obr. 1.9, str. 23). Doména 4 hraje roli při dimerizaci receptorů [71]. Dimerizace receptorů je iniciována vazbou dimerní struktury SCF. Dále je ve struktuře přítomen transmembránový segment a cytoplasmatická kinasová doména. Dimerizace vede k aktivaci intracelulární kinasové aktivity, dochází k autofosforylaci vlastních tyrosinových zbytků a ty slouží jako vazebná místa pro signální molekuly obsahující fosfo-tyrosin vazebné domény. Aktivovaný receptor pak katalyzuje fosforylaci i jiných substrátových proteinů [72].



Obr. 1.9: Schematická struktura receptorové PTK Kit (A) a krystalová struktura extracelulární části Kit v komplexu s ligandem SCF (B). Významné tyrosinové zbytky (Y) v intracelulární části jsou znázorněny (A). Po fosforylaci se stávají vazebným místem pro příslušné fosfotyrosin-vazebné domény signálních molekul (označeny šipkou). Krystalová struktura komplexu odhaluje orientaci vazby SCF a dimerizaci receptoru. Převzato z [68] a [71].

PTP katalyzují hydrolytické odštěpení fosfátových zbytků z tyrosinů v proteinové sekvenci [73]. PTP žírných buněk jsou jak membránové (receptorové), tak cytoplasmatické proteiny [68]. Většina PTP obsahuje charakteristickou katalytickou sekvenci (I/V)HCXAGXXR(S/T/G) s cysteinovým zbytkem v aktivním místě. Katalytický cysteinový zbytek má vlivem mikroprostředí aktivního místa nízkou hodnotu pK_a a při neutrálním pH existuje jako thiolátový anion. Tímto způsobem je umožněn nukleofilní atak fosfátové skupiny substrátů a při defosforylační reakci vzniká thiol-fosfatový intermediát [74]. Nízké pK_a thiolové skupiny aktivního cysteinu ho také činí náchylným k oxidaci. Reaktivní sloučeniny kyslíku (ROS) mají inhibiční aktivitu k PTP, oxidují katalytický cystein do formy $-S-OH$ [75]. Některé extracelulární podněty jako např. stimulace růstovými faktory (mechanismus na obr. 1.10, str. 24) a UV záření vedou ke zvýšené koncentraci ROS a tedy následné oxidaci a inhibici PTP. Inhibice enzymové aktivity zprostředkovaná např. H_2O_2 při oxidativním stresu je studována jako důležitý mechanismus regulace PTP. Tímto způsobem mohou PTP fungovat mimo jiné jako senzory redox-stavů uvnitř buňky [76].



Obr. 1.10: Mechanismus oxidační inhibice fosfatas. Aktivované receptorové tyrosin-kinasy (RTK) pomocí efektorových signálních molekul aktivují membránovou NADPH oxidasu, která generuje H₂O₂. Ten pak reversibilně oxiduje membránové i cytoplasmatické PTP. Převzato z [77].

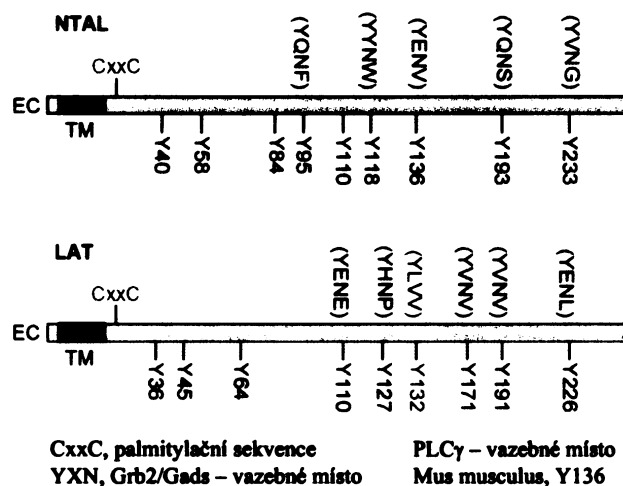
Ionty kovů jako vanad a molybden fungují jako inhibitory PTP mechanismem kdy napodobují transitní katalytický stav. Při reakci iontů vanadičných s H₂O₂ vznikají reaktivní sloučeniny - pervanadát (Pv) a ty způsobují ireversibilní oxidaci PTP do stavů -S-O₃H a inhibují tak aktivitu PTP [78, 79]. Je známo, že po expozici žírných buněk pervanadátem dochází ke zvýšené tyrosinové fosforylaci mnoha substrátů, která je následována zvýšenou mobilizací Ca²⁺ a degranulací buněk [80].

1.4.4 Adaptorové molekuly

Adaptorové molekuly zprostředkovávají intermolekulární interakce signálních drah a podílí se na integraci a výstavbě signálních komplexů, označovaných signalosomy. Rozeznáváme dva druhy adaptorových molekul: transmembránové a cytoplasmatické. Interakce adaptorových molekul s jinými molekulami je umožněna skrze proteinové rekogniční kódy - fosfotyrosin-vázebné domény (SH2, PTB), PH domény atd. [81].

Významné transmembránové adaptorové proteiny žírných buněk jsou LAT (z angl. „linker for activation of T-cells“) a NTAL (z angl. „non-T-cell activation linker“) (obr. 1.11, str. 25) [82, 83]. Obsahují velmi krátký extracelulární úsek (6 aminokyselin), transmembránovou část, dvě palmitylační sekvence a intracelulární řetězec obsahující

signalizačně důležité tyrosinové zbytky. Díky palmitylačním sekvencím jsou oba proteiny asociovány s DRM a často jsou považovány za markery lipidových raftů [82, 84]. Přes vysokou sekvenční homologii obou molekul bylo zjištěno, že rezidují v odlišných membránových mikrodoménách a mohou tak tvořit separované signální komplexy [54].



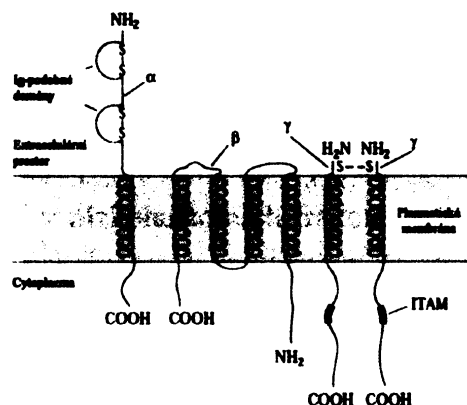
Obr. 1.11: Schematická struktura adaptorových proteinů LAT a NTAL. Zleva: N-koncová krátká extracelulární část (EC), transmembránová část (TM), dále AK vazebné motivy obsahující tyrosin, po jehož fosforylaci dochází k vazbě specifických signálních molkul (Grb2, Gads). Na rozdíl od NTAL, LAT obsahuje vazebný motiv pro fosfolipasu $\text{C}\gamma$ (PLC γ). Převzato z [84].

1.4.5 Signalizace Fc ϵ RI

Hlavním receptorem odpovědným za aktivaci žírných buněk po vazbě antigenu je vysokoafinotní receptor pro IgE (Fc ϵ RI) ze skupiny MIRR. Fc ϵ RI je komplex čtyř podjednotek (viz obr. 1.12, str. 26). Komplex obsahuje 1x transmembránovou α -podjednotku, která v extracelulární části váže konstantní řetězec IgE. Další součástí komplexu je β -řetězec, který prochází plasmatickou membránou 4x a nese v C-terminální části charakteristické aminokyselinové motivy ITAM (z angl. „immunoreceptor tyrosin-based activation motifs“). Důležitou součástí Fc ϵ RI jsou dvě transmembránové podjednotky γ , které tvoří disulfidicky propojený homodimer a obsahující rovněž ITAM [85]. Fosforylované tyrosiny v ITAM vytvářejí vazebná místa pro SH2 domény signálních proteinů, které poté zprostředkovávají další přenos signálu [86].

Signalizace je započata vazbou antigenu na komplex IgE-Fc ϵ RI a následným prokřížením receptorů. Fc ϵ RI nemá vlastní kinasovou aktivitu a je tedy závislý na

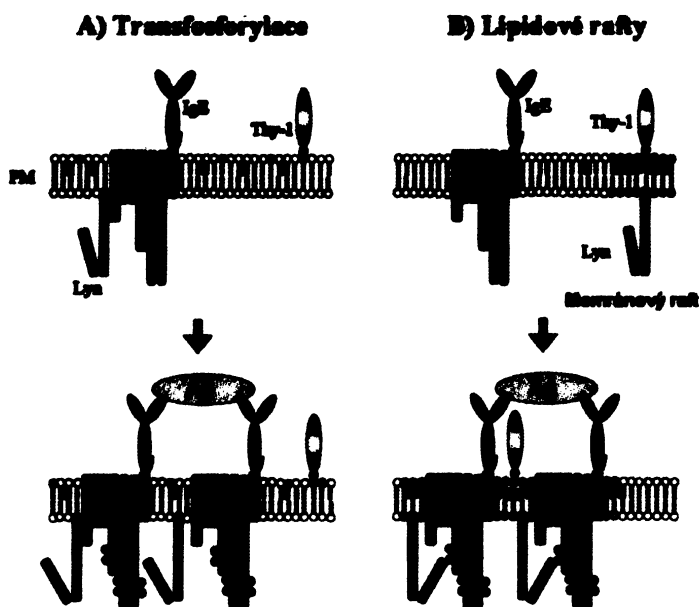
účasti PTK rodiny Src. Fosforylaci ITAM po agregaci receptorů katalyzuje Src kinasa Lyn [87]. Detailní molekulární mechanismus, kterým dochází k přenosu signálu přes plasmatickou membránu není dosud zcela objasněn. V současné době existují dva modely



Obr. 1.12: Struktura vysokoafinitního receptoru pro IgE (FcεRI). α podjednotka s doménami podobnými imunoglobulinům zodpovídá za vazbu IgE; nekovalentní asociace s β podjednotkou a disulfidicky propojeným homodimerem 2 podjednotek γ; ITAM motivy jsou sekvence obsahující tyrosin fosforylovaný po aktivaci receptoru. Upraveno podle [88].

iniciace fosforylace podjednotek receptoru. První model popisuje transfosforylaci receptoru po agregaci antigenem (obr. 1.13A, str. 28). Lyn kinasa asociovaná s intracelulární částí receptoru, se po jeho agregaci dostává do fyzické blízkosti dalších receptorů a fosforyluje dostupné ITAM motivy sousedních receptorových molekul [89]. Tento model je podporován studiemi, které ukazují, že malá frakce Lyn konstitutivně asociuje s β podjednotkou FcεRI receptoru skrze unikátní doménu. γ podjednotka je esenciální pro další přenos signálu a jeho amplifikaci [90]. Po transfekci buněk cDNA kodující pouze unikátní doménu Lyn dochází k inhibici iniciační fosforylace β i γ podjednotek, což je pravděpodobně způsobeno kompeticí při asociaci endogenní Lyn a exogenní unikátní domény s receptorem [91]. V další nedávné studii je podporován transfosforylační model díky experimentům, při kterých byly sestrojeny trojvazné ligandy. Antigeny byly propojeny molekulárními spojnicí z DNA různých délek. Intenzita fosforylace receptorových podjednotek a následné aktivační děje pak závisely na vzdálenosti agregovaných receptorů, což zdůrazňuje důležitost vzájemné prostorové orientace agregovaných receptorů [92]. Ultrastrukturální analýza odhalila kolokalizaci Lyn kinasy s ~25 % klastry FcεRI u neaktivovaných buněk [52].

Druhý model iniciace signalizace přes FcεRI vychází z teorie lipidových raftů (obr. 1.13B, str. 28). Dle něj Lyn kinasa není přímo asociovaná s receptorem, ale naopak je vyčleněna do lipidových raftů, které neobsahují FcεRI. Teprve po agregaci receptoru dochází k jeho translokaci do prostředí lipidových raftů a jen u této populace receptoru dochází k fosforylaci ITAM aktivní kinasou Lyn. Tato teorie je podporována experimenty, které ukazují, že FcεRI u klidových buněk solubilizovaných neiontovými detergenty se nachází ve vysokohustotních frakcích sacharosového gradientu, zatímco u antigenem aktivovaných buněk je převážně v nízkohustotních frakcích o kterých se předpokládá, že obsahují lipidové rafty [36, 93]. Význam laterální heterogenity plasmatické membrány v případě signalizace FcεRI je dále podporován zjištěním, že Lyn kinasa v prostředí DRM má až 17 x vyšší aktivitu než Lyn kinasa izolovatelná z vysokohustotních frakcí sacharosového gradientu [94]. K tomu dochází díky separaci specifických fosfatas z prostředí DRM. Nicméně tento model signalizace neumožňuje jednoduché vysvětlení některých poznatků. V experimentech ve kterých byl geneticky odstraněn palmitylační motiv ze sekvence Lyn kinasu, Lyn neasociovala s DRM, ale přesto docházelo k normální tyrosinové fosforylaci FcεRI [70]. Tyto výsledky zpochybňují předpoklad, že k fosforylaci FcεRI dochází pouze v prostředí lipidových raftů. Navíc, po aktivaci FcεRI antigenem dochází ke vzniku relativně velkých agregátů, pozorovatelných v TEM. Tyto tzv. primární signalizační domény kumulují molekuly potřebné pro další přenos signálu [52]. Další experimenty vedly k zjištění, že dimerizace receptorů vede k přechodu části receptorů do DRM frakcí bez vzniku velkých agregátů. I při dimerizaci FcεRI však vznikají signální komplexy schopné vyvolat buněčnou odpověď srovnatelnou s extenzivní agregací FcεRI [95]. Studie využívající detergentovou solubilizaci mohou být limitovány možnostmi těchto metod a ztotožňování DRM s nativními membránovými mikrodomény (lipidovými rafty) může být nekorektní (viz kap. 1.2.1). Problematika iniciace signalizace FcεRI tak vyžaduje další vysvětlení, než je v možnostech obou zmíněných modelů. Nabízí se hypotéza, ve které je fosforylace FcεRI podjednotek umožněna změnami v aktivitě PTP. PTP zastávají regulační funkci během signalizace jiných MIRR receptorů. Zahrnutí PTP do modelu iniciace fosforylace FcεRI by mohlo být východiskem mezi oběma výše zmíněnými teoriemi. Tato hypotéza je podporována zjištěním, že za určitých podmínek *in vivo* dochází k redoxní regulaci PTP (viz kap. 1.4.3). Fosforylace receptoru může být regulována citlivě udržovanou rovnováhou mezi aktivitou PTK a PTP [96].



Obr. 1.13: Současné modely iniciace fosforylace FcεRI receptoru Lyn kinasou. Schéma dvou současných modelů vysvětlující iniciační stadia FcεRI signalizace. Thy-1 je příkladem „raftového markeru“. V transfosforylačním modelu (A) dochází po agregaci receptorů antigenem k fosforylaci receptorů Lyn kinasou, která je konstitutivně asociována se sousedním receptorem. Model založený na lipidových raftech (B) předpokládá separaci Lyn kinasu do raftů. Agregace receptorů antigenem vede k translokaci receptorů do prostředí raftů, kde jsou fosforylovány.

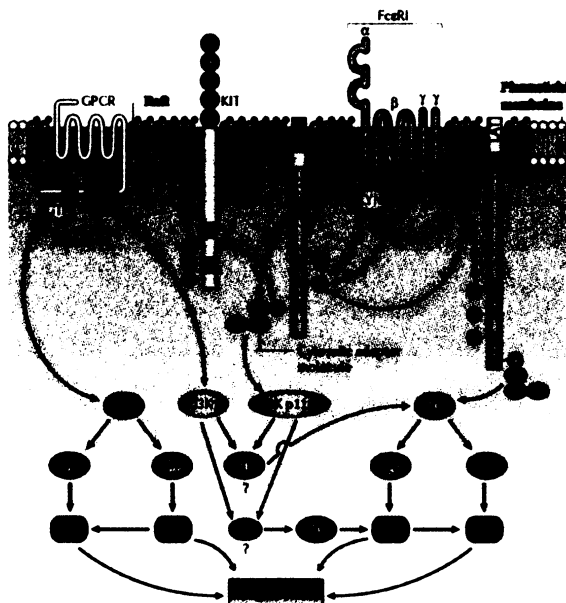
1.4.6 Signalizace Kit

Kit (viz kap. 1.4.3) je receptor pro růstový faktor SCF. Signalizace SCF se uplatňuje při hematopoezi, gametopoezi, melanogenezi a vývoji a správné funkci žírných buněk. Žírné buňky bez přístupu SCF podléhají po určitém čase apoptóze. U hematopoetických kmenových buněk je Kit exprimován do doby jejich diferenciaci a poté mizí, je tedy povrchovým markerem těchto progenitorových buněk. Je to protoonkogen, jeho aberantní aktivita způsobuje některá nádorová onemocnění [97].

Po aktivaci receptorem ligandem dochází k jeho přesunu do specializovaných membránových mikrodoménách, podobně jako v případě FcεRI. Na vzniku signalizačních komplexů Kit receptoru se tak pravděpodobně podílí membránová kompartmentalizace, jak bylo demonstrováno u hematopoetických buněčných linií [98]. Na lidských žírných buňkách bylo ukázáno, že k fosforylaci receptoru po vazbě ligandu dochází rychle během 1-2 min, fosforylace poté podstatně klesá a zcela mizí po 5-10 min. Po aktivaci Kit je pozorována fosforylace substrátových molekul. K té může docházet přímo buď kinasovou

aktivitou Kit nebo zprostředkovaně dalšími členy signálních kaskád. Mezi fosforylovanými substráty se nachází i NTAL adaptorový protein [68].

Stimulace žírných buněk SCF obvykle nevyvolává degranulaci buněk. Významný způsobem však dochází ke zvýšení degranulace buněk při současné stimulaci antigenem i SCF [99]. Jak se tento efekt uplatňuje v podmínkách *in vivo*, není zatím známo. Některé práce podporují význam vzájemné interakce drah FcεRI a Kit které mají dopad na celkovou homeostázu žírných buněk [100]. Spojovacím článkem mezi oběma signálními drahami by mohl být právě adaptorový protein NTAL. Při současné aktivaci FcεRI i Kit je pozorována zvýšená tyrosinová fosforylace NTAL [101]. Studia z laboratoře A. M. Gilfillana poukazují na možnost přímé fosforylace specifických tyrosinových zbytků NTAL proteinu kinasovou aktivitou Kit receptoru (obr. 1.14) [102]. Skutečnost, že NTAL je proteinem lokalizovaný do DRM a že Kit signalizace je spjata se specifickou membránovou lokalizací nabízí otázku, zda může docházet ke vzniku signalizačních komplexů obou molekul. Topografický vztah těchto membránových molekul však zatím nebyl studován.



Obr. 1.14: Signální dráhy vedoucí k degranulaci žírných buněk. Schéma zobrazuje možnou spolupráci signálních molekul po aktivaci receptorů FcεRI a Kit. Převzato z [103].

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- Studium metodických aspektů aplikace transmisní elektronové mikroskopie (TEM) při analýze topografie membránových molekul se zaměřením na zavedení metody přípravy konjugátů koloidního zlata a protilátek pro účely ultrastrukturální analýzy a optimalizace ověřování kvality připravených konjugátů. Dále se zaměřit na přípravu plasmidových konstruktů, které by umožňovaly ultrastrukturální analýzu topografie vybraných proteinů pomocí TEM a tím eliminovat závislost na dostupných kvalitních protilátkách použitelných pro TEM.
- Zmapovat topografii receptorové protein-tyrosinkinasy Kit během aktivace ligandem SCF. Dále pak zjistit topografický vztah Kit k membránovým adaptorovým proteinům LAT, NTAL a k receptoru FcεRI a na základě získaných poznatků přispět k pochopení vztahu mezi těmito molekulami.
- Zjistit topografii receptorů FcεRI v rané fázi signalizace a ověřit pracovní hypotézu, že iniciace fosforylace FcεRI může být výsledkem narušení rovnováhy mezi enzymovou aktivitou protein-tyrosinkinasy a protein-tyrosinfosfatas.

3 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

3.1 MATERIÁL

CHEMIKÁLIE

2-merkaptoethanol	Merck (Německo)
Agar	TopBio (ČR)
Akrylamid	Sigma (USA)
Ampicilin	Fluka (Švýcarsko)
Aprotinin	Carl Roth GmbH (Německo)
APS	Sigma (USA)
Azid sodný	Sigma (USA)
Bacto-tryptone	Oxoid Ltd. (UK)
Bacto-yeast extract	Oxoid Ltd. (UK)
Bromfenolová modř	Serva (Německo)
BSA	Sigma (USA)
DMSO	Merck (Německo)
DNP-BSA	Molecular Probes (USA)
ECL	Pierce Biotechnology (Uk)
EDTA	Sigma (USA)
Ethanol	Lachema (ČR)
Ethidium bromid	Sigma (USA)
Fibronektin	Sigma (USA)
Fosforečnan sodný	Sigma (USA)
D-glukosa	Sigma (USA)
Glutaraldehyd	Fluka (Švýcarsko)
HEPES; N-(2-hydroxyethyl)	Sigma (USA)
Piperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina	Carl Roth GmbH (Německo)
Chlorid draselný	Fluka (Švýcarsko)
Chlorid hořečnatý	Sigma (USA)
Chlorid sodný	Sigma (USA)
Chlorid vápenatý	Sigma (USA)
IL-3	PeptoTech (UK)

Koloidní roztok 5 nm zlatých částic	SPI (USA)
Kakodylát sodný	Sigma (USA)
Kyselina octová	Lachema (ČR)
Kyselina p-kumarová	Sigma (USA)
Leupeptin	Sigma (USA)
Luminol; 5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalazindion	Sigma (USA)
MEM	Sigma (USA)
N,N'-methylen-bis-akrylamid	Sigma (USA)
MUG	Invitrogen (USA)
NP-40	Sigma (USA)
Octan hořečnatý	Sigma (USA)
Oxid osmičelý	Christine Gropl EM (Rakousko)
Peroxid vodíku 30 %	Sigma (USA)
Propidium iodid	Sigma (USA)
Pioloform (polyvinylbutyral)	Christine Gropl EM (Rakousko)
PLL (MW>300,000)	Sigma (USA)
PMSF	Sigma (USA)
Ponceau S	Sigma (USA)
RNAasa A	TopBio (ČR)
SCF	PeptoTech (UK)
SDS	Carl Roth GmbH (Německo)
Tanin	Sigma (USA)
TEMED	Serva (USA)
TNP-BSA	Molecular Probes (USA)
Tris-báze	Sigma (USA)
Triton X-100	Amersham (USA)
Tween-20	Amersham (USA)
UltraLink-immobilizovaný Protein A	Pierce Chemical Co. (USA)
Vkládací pufr „Yellow“	TopBio (ČR)

STANDARDY MOLEKULOVÝCH HMOTNOSTÍ

SM0441 (Fermentas, USA)

SDS6H2 (Sigma, USA)

Plus DNA Ladder (Gibco, USA)

PROTILÁTKY

C-2; myší mAb anti-Aktin (Santa Cruz, USA)

D-18; koží pAb anti-Dok-3 (Santa Cruz, USA)

PY-20; mAb anti-fosfotyrosin, konjugovaná s HRP (BD Biosciences, USA)

Králičí pAb anti-potkaní IgG, konjugovaná s FITC (Jackson ImmunoResearch, USA)

JKR; myší mAb anti- β -řetězec Fc ϵ RI, poskytnuta Dr. J. Riverou [113]

Myší (DNP)-specifický IgE poskytnut Dr. B. Wilson [114]

Myší (TNP)-specifický IgE připravován v laboratoři

2B8 potkaní mAb anti-Kit (Bd Pharminogen, USA)

ACK-2 potkaní mAb anti-Kit (eBiosciences, USA)

Ab5506 králičí pAb anti-Kit (Abcam, USA)

ROZTOKY

Acetátový pufr: 0,11 M kyselina octová; pH 4,4

Akrylamidový mix: 30 % akrylamid, 1 % N,N'-metylen-bis-akrylamid

BSS: 135 mM NaCl; 5 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂ x 2H₂O; 5,6 mM glukosa;
20 mM HEPES; pH 7,4

BSSA: PBS s přidavkem do konečné konc. 1 mg/ml BSA a 1 mM MgCl₂

Centrifugační roztok pro Str-Au: glycerol 10 %; BSA 1 %; Tween-20 0,05 %; v PBS

Glycinový pufr: 0,35 M glycin; 0,44 M Na₂CO₃; pH 10,0

Elektrodový pufr: 0,25 M Tris; 0,25 M glycin; SDS 0,1 %; pH 8,3

HEPES pufr: 25 mM HEPES (pH 7,0); 25 mM KCl; 2,5 mM octan hořečnatý

Kakodylátový pufr: 0,2 M kakodylát sodný; 10 mM HCl; pH 7,4

Lyzační roztok 1: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mM Na₃VO₄,
1 mM PMSF; aprotinin 1 μ g/ml; NP-40 1 % (v/v)

Lyzační roztok 2: 25 mM Tris-HCl (pH 8); 140 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 mM Na₃VO₄;
1 mM PMSF; aprotinin 0,5 μ g/ml; leupeptin 0,5 μ g/ml; Triton X-100 0,2 % (v/v)

Lyzační roztok 3: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mM
Na₃VO₄; 1 mM PMSF; aprotinin 0,5 μ g/ml; leupeptin 0,5 μ g/ml;
Triton X-100 0,5 % (v/v)

Paraformaldehyd: rozpouští se při ohřevu na 60 °C v dH₂O, do konečné konc. 20 %. pH se upraví na 7,4 pomocí NaOH. Pro fixační účely se roztok dále ředí na požadovanou konc. v odpovídajícím pufru. Takto připravené roztoky lze skladovat ve 4°C nanejvýš týden.

Pervanadát: připraví se 10 mM Na₃VO₄ v dH₂O a 10 mM H₂O₂. Roztok se řádně promíchá a ponechá se 15 min v temnu při laboratorní teplotě. Dále je ředěn na 0,2 mM v používaných pufracích roztocích.

Ponceau S barvicí roztok: Ponceau S 1 % (w/v) v 5 % kys. octové

PBS pufr: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄; pH 7,4

Pro práci s buněčnými kulturami byl PBS odebírán z přípravných médií (ÚMG).

PBS/BSA: 0,1 % BSA (w/v) v PBS

Roztok pro ECL: 100 mM Tris-HCl (pH 8,8); 1,25 mM luminol; 0,2 mM kys. p-kumarová;

4 µl roztoku H₂O₂ (30 %) do 20 ml; roztoky byly smíchány těsně před použitím

TNT pufr: 0,01 M Tris; 0,1 M NaCl; Tween-20 0,1 % (v/v); pH 7,5

Transferový pufr: 27 mM Tris; 0,19 M glycin, methanol 10 % (v/v); pH 8,3

TAE pufr: 40 mM Tris, 20 mM kys. octová, 1 mM EDTA, pH=8,0

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující: 50 mM Tris-Cl (pH=6,8); 2 % SDS;

0,01 % bromfenolová modř; glycerol 10 % (v/v)

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující: 50 mM Tris-Cl (pH=6,8); 2 % SDS;

0,01 % bromfenolová modř; glycerol 10 % (v/v), 2-ME 10 % (v/v)

Uchovávací roztok pro Str-Au: 20 mM Tris; BSA 1 %; glycerol 20 %; 20 mM azid sodný, pH 7,5; sterilizace přes 22 µm filtr

5 % gel pro SDS/LDS elektroforézu (zaostřovací): 3,05 ml dH₂O; 1,25 ml 0,5M Tris pH

6,8; 0,65 ml akrylamidový mix; 50 µl 10 % SDS, 25 µl APS, 5 µl TEMED

10 % gel pro SDS/LDS elektroforézu (separační): 8,1 ml dH₂O; 5 ml 1,5M Tris pH 8,8; 6,6

ml akrylamidový mix; 200 µl 10 % SDS, 100 µl APS, 10 µl TEMED

RESTRIKČNÍ ENZYMY A REAGENCIE

EcoRI, XbaI, XhoI, NotI + pufrы dodávané spolu s enzymy (Fermentas, USA)

REAKČNÍ SOUPRAVY

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Finsko)

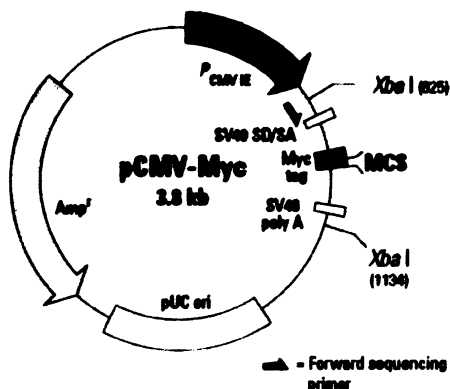
LegoKit (TopBio, ČR)

Zymoclean (Zymo Research, USA)

Silver Enhancer Kit (Sigma, USA)

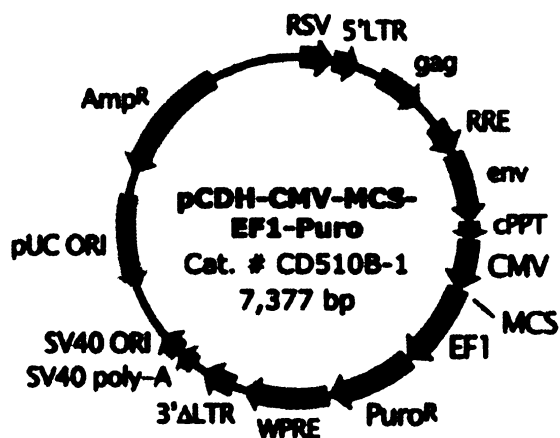
PLASMIDY

pCMV-Myc (Clontech Laboratories, USA)



Obr. 3.1: Savčí expresní vektor pro produkci proteinů s připojeným c-Myc epitopem na N-konci. Exprese v savčích buňkách je řízena cytomegalovirovým promotorem a enhancerem ($P_{CMV IE}$). Vektor obsahuje intron (sestříhový donor a akceptor); sekvenci pro c-Myc; mnohočetné klonovací místo (MCS); polyadenylační signál viru SV40 (poly A); ampicilinovou resistenci (Amp^r) pro selekci v *E. coli* a replikační počátek pUC pro *E. coli*.

pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (System Biosciences, USA)



Obr. 3.2: Expresní lentivirový vektor s puromycinovou resistencí. Vektor obsahuje mimo jiné: MCS; polyadenylační signál a replikační počátek viru SV40; hybridní promotor RSV/5LTR; genetické jednotky (cPPT, gag, env, LTR), replikační počátek pUC pro expresi v *E. coli*, ampicilinovou resistenci pro selekci v *E. coli*; puromycinovou resistenci; elongační faktor 1 (EF1).

DNA

Dok-3 cDNA; GeneBank: BC116922; klon: 40126241 (OpenBiosystems, USA)

Primery (Generi Biotech, ČR)

MÉDIA

LB médium: Bacto-tryptone 1 % (w/v); Bacto-yeast extract 0,5 % (w/v); 86 mM NaCl;
1 mM NaOH

SOC médium: Bacto-tryptone 2 % (w/v), Bacto-yeast extract 0,5 % (w/v); 10 mM NaCl;
2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM glukosa

Opti-MEM (Invitrogen, USA)

Výchozí média a roztoky pro přípravu kompletních médií pocházely z přípravy médií ÚMG.

Kompletní médium pro RBL: směs 1:1 RPMI-1640 a MEM; doplněné na konečnou konc.:

3 mM L-glutamin; 1mM pyruvát sodný; 100 U/ml penicilin; 100 mg/ml streptomycin; 2,5 mg/ml glukosy; 10 % (v/v) inaktivované fetální telecí sérum (FCS)

Kompletní médium pro BMBC: Iscove médium doplněné na konečnou konc. 50 μM 2-

ME; 100 U/ml penicilin; 100 mg/ml streptomycin; 36 μg/ml SCF; 36 μg/ml IL-3;
10 % (v/v) inaktivované FCS

Kompletní médium pro HEK293: D-MEM 1x doplněné o 10 % (v/v) inaktivované FCS; 3

mM L-glutamin; 1mM pyruvát sodný; 100 U/ml penicilin; 100 mg/ml streptomycin
a 1 % (v/v) MEM

3.2 PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ

Analytické váhy GR-202	AND (USA)
Analyzátor buněk a částic Z ₂	Beckman (USA)
Aparatura Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	BioRad (USA)
Aparatura Mini-PROTEAN	BioRad (USA)
Aparatura Mini-Sub Cell GT	BioRad (USA)
Automatické pipety	Gilson (USA)

Centrifuga 5415R	Eppendorf (Německo)
Centrifuga 5810R	Eppendorf (Německo)
Centrifuga Avanti J-25I	Beckman (USA)
Cytometr FACSCalibur	BD Biosciences (USA)
Digitální analyzátor MiniBis	MicroPhotonics (USA)
Digitální analyzátor LAS 3000	FujiFilm (Japonsko)
Elektronový mikroskop Morgagni 268	FEI (ČR)
Fluorimetr Tecan Infinite M200	Schoeller (Švicarsko)
Chladicí podložka CoolRack	Biocision (USA)
Inkubátor HERAcell 240 CO ₂	Thermo Scientific (USA)
Inkubátor TCH 100	Laboratorní přístroje Praha (ČR)
Inkubátor-třepačka Innova 4000	New Brunswick Scientific Co. (USA)
Laminární box BioUltra	Telstar (USA)
γ-čítač Multilabel Tester Triathler	Hidex (Finsko)
Magnetická míchačka	VELP Scientifica (Itálie)
Naprašovací vakuové zařízení	Edwards (UK)
pH metr	WTW (USA)
Pipetovací nástavec Pipetus	Hirschmann Laborgerate (Německo)
Předvážky RD-603D	Denver Instruments Company (USA)
Rotátor LR-2	Labor Servis (ČR)
Rotor SW55 Ti	Beckman (USA)
Spektrofotometr NanoDrop ND1000	Thermo Scientific (USA)
Světelný mikroskop CK40	Olympus (USA)
Termocyklér DYAD Peltier Thermal Cycler	MJ Research (USA)
Termomixer Comfort	Eppendorf (Německo)
UV-transluminátor	Bioblock Scientific (UK)
Vodní lázeň	Memmert (Německo)
Vortexový mixér	VELP Scientifica (Itálie)
Vyvolávač rentgenových filmů X-OMAT 1000	Kodak (USA)
Zdroj deionizované vody MilliQ	Millipore (Francie)
Zdroj napětí PowerPac Universal	Bio-Rad (USA)

SOFTWARE

ImageJ v. 1.40g

MatLab v. 7.0

GOLD v. 1.0

FlowJo v. 7.5

DNASTar v. 4.03

NIH (USA)

The Math Works, Inc. (USA)

viz [104]

Tree Star (USA)

Lasergene (USA)

4 METODY

4.1 PRÁCE S TKÁŇOVÝMI KULTURAMI

Všechny roztoky pro práci s živými buňkami byly ohřáty na 37 °C. Veškeré centrifugace živých buněk byly prováděny rychlostí 290 x g v nechlazených centrifugách. K určování koncentrace buněk byl použit průtokový analyzátor buněk.

4.1.1 RBL-2H3

Buněčné linie RBL (subklon 2H3) byly kultivovány v kompletním médiu (KM) složeným ze RPMI 1640 a MEM v poměru 1:1 a doplněným dalšími doplňky (viz materiál). Buňky byly pěstovány na kultivačních miskách (d = 6 cm) v inkubátorech při 37 °C s 5 % atmosférou CO₂ a pasážovány 2x týdně. Před prací, při které bylo třeba buňky uvolnit z kultivačních misek, bylo použito asi 2 ml roztoku 0,02 % EDTA v PBS po dobu 5 min. Poté byly buňky staženy z plastového povrchu resuspendováním v kultivačním mediu.

4.1.2 BMMC

Prekurzory BMMC (z angl. „bone-marrow mast cells) byly izolovány z holenních a stehenních kostí 6-10 týdnů starých myší kmene Black6. 4-8 týdnů byly buňky kostní dřevě inkubovány v suspenzní kultuře v kompletním Iscove mediu doplněným rekombinantními proteiny IL-3 (36 ng/ml) a SCF (36 ng/ml). Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích v inkubátorech při 37 °C s atmosférou 10 % CO₂ a byly pasážovány 1x týdně. Pro experimenty vyžadující aktivaci byly buňky přibližně 16 hod. předem přeneseny do média bez IL-3 a SCF. Pro některé experimenty byly buňky senzitivizovány a senzitivizace (viz kap. 4.1.4) byla provedena během kultivace v médiu bez IL-3 a SCF minimálně 3 hod.

4.1.3 HEK293

Buňky linie HEK293 byly kultivovány v kompletním médiu D-MEM (složení viz materiál). Kultivace probíhala při 37 °C v atmosféře 5 % CO₂. Obvykle byly pasážovány v době, kdy konfluence činila 60-70 % povrchu kultivační nádoby. Pasážování buněk probíhalo stejným způsobem jako RBL, 2x týdně.

4.1.4 Senzitizace buněk

Buněčné kultury RBL byly senzitivizovány v koncentraci 10⁷/ml přidáním specifického myšního IgE (anti-TNP-BSA nebo anti-DNP-BSA) do kultivačního media do konečné koncentrace 1 µg/ml. Senzitizace probíhala minimálně 30 min, za občasného resuspendování v inkubátoru při 37 °C. Senzitizace linií BMHC probíhala v KM bez IL-3 a bez SCF. IgE bylo přidáváno stejným způsobem jako u RBL a senzitivizace probíhala minimálně 3 hod.

4.1.5 Aktivace buněk

K aktivaci byly použity buňky minimálně 48 hod. po pasáži. Buňky byly senzitivizovány anti-DNP-BSA IgE nebo anti-TNP-BSA IgE. Nenavázané IgE bylo odstraněno 2x promytím v BSSA vyhřátým na 37 °C a buňky byly resuspendovány v BSSA do konečné koncentrace 10⁷/ml a rozděleny do mikrozkušavek po 100 µl. Aktivace byla provedena v termomixeru při 37 °C a při třepání 400 rpm. K buňkám pak bylo přidáno 100 µl 2x koncentrovaných aktivátorů (DNP-BSA, TNP-BSA nebo pervanadátu v BSSA). Do negativní kontroly bylo přidáno 100 µl BSSA bez aktivátoru. Jako pozitivní kontroly sloužily buňky lyzované v 0,5 % Tritonu X-100. Doba aktivace a koncentrace aktivátorů závisela na charakteru experimentu. Aktivace byla ukončena uložením mikrozkušavek na led a okamžitou centrifugací 16 000 x g, 30 sec, 4 °C.

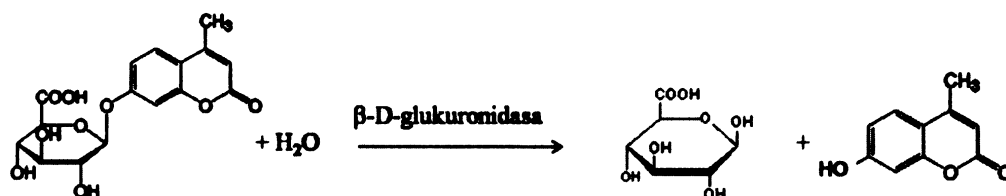
4.1.6 Příprava lyzátů z tkáňových kultur

Buňky byly resuspendovány v PBS v koncentraci 10⁶/ml, rozplněny do mikrozkušavek po 1 ml a centrifugovány 16 000 x g, 30 sec, 4 °C. Supernatant byl odstraněn, pelety uloženy na led a obvykle resuspendovány v 30 µl lyzačního roztoku (viz

materiál). Případně byly použity buněčné pelety po ukončení aktivace buněk (viz kap. 4.1.4). Za občasného mixování byly pelety lyzovány 20 – 30 min na ledu. Lyzát byl centrifugován 16 000 x g, 5 min, 4 °C.

4.2 STANOVENÍ β -D-GLUKURONIDASY

Sekretovaná β -D-glukuronidasa byla stanovena v supernatantu po aktivaci buněk. Pro testy byly použity bílé 96-jamkové destičky „FluoroNUNC Maxisorp“ (Nalge Nunc International). K 20 μ l testovaného supernatantu bylo přidáno 60 μ l roztoku substrátu 4-methylumbelliferyl- β -D-glukuronidu 40 μ M (MUG) v acetátovém pufru pH 4; průběh reakce je uveden na obr. 4.1. Reakce probíhala 1 hod. při 37 °C a poté byla ukončena změnou pH přidavkem glycinového pufru o teplotě 4 °C a pH 10. Vzorky byly měřeny na fluorimetru „Tecan Infinite M200“. Excitační filtr byl nastaven na 355 nm a emisním na 460 nm. Jako kontrola (100 %) byly stanoveny buňky lyzované v Tritonu X-100 a hodnoty ostatních vzorků byly přepočteny na % z maximální sekrece. K porovnání statisticky významné rozdílnosti dvou získaných hodnot byl použit Studentův t-test. Jako významné hladiny testu byly zvoleny hodnoty $P \leq 0,01$.



Obr. 4.1: Hydrolyza 4-methylumbelliferyl- β -D-glukuronidu na kys. glukuronovou a 4-methylumbelliferyl katalyzovaná β -D-glukuronidasou.

4.3 IMUNOPRECIPITACE Fc ϵ RI

10^7 buněk aktivovaných nebo kontrolních buněk bylo lyzováno v 500 μ l lyzačního roztoku 2. Postnukleární supernatanty byly imunoprecipitovány s králičí anti-IgE protilátkou navázanou na částice s „UltraLink-imobilizovaným Proteinem A“. Navázání protilátky na částice proběhlo následujícím způsobem: k 15 μ l roztoku částic bylo přidáno 5 μ g protilátky a směs byla inkubována 1,5 hod. při 4 °C. Poté byla 3 x promyta lyzačním roztokem 2. Částice byly smísány s 500 μ l připraveného lyzátu. Po 2 hod. inkubaci při 4

°C na rotátoru při pomalém otáčení byly částice s proteinem 3 x promyty lyzačním roztokem 2 a komplexy IgE-FcεRI byly z částic uvolněny považením částic se vzorkovým pufrům bez 2-merkapt ethanolu (2-ME) po dobu asi 6 min. Proteiny ve vzorcích byly separovány na elektroforéze v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE).

4.4 SDS-PAGE

Při SDS-PAGE byl použit 10 % separační gel a 5 % zaostřovací gel. Ke vzorkům byl přidáván 2x koncentrovaný vzorkový pufr v poměru 1:1. Ke vzorkům s objemem větším než 30 µl byl přidáván 4x koncentrovaný vzorkový pufr v příslušném poměru. Některé vzorky vyžadovaly vzorkový pufr bez obsahu 2-ME. Mezi dráhami se vzorky obsahujícími 2-ME a vzorky bez 2-ME byla vždy jedna dráha obsazena jen vzorkovým pufrům bez 2-ME. Vzorky byly asi 6 min považeny při 96 °C a naneseny na gel. Hmotnostní standard SDS6H2 (+ 2-ME) obsahoval proteiny myosin (200 kDa), β-galaktosidasu (116 kDa), fosforylasu B (97,4 kDa), hovězí sérový albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa) a karbonovou anhydru (29 kDa). Nebo byl použit předznačený standard SM0441 obsahující β-galaktosidasu, sérový albumin, ovalbumin, karbonovou anhydru, β-laktoglobulin (25 kDa) a lysozym (19 kDa). SDS-PAGE byla provedena v aparatuře „Mini-PROTEAN“. Hodnota napětí byla nastavena na 110 V a po fokusaci probíhalo elektroforetické dělení při konstantním napětí 130 V, za laboratorní teploty.

4.5 WESTERN BLOT

Western blot je metoda přenosu proteinů z gelu na nitrocelulosovou (NC) membránu. Gel z SDS-PAGE a NC-membrána „PROTRAN“ s velikostí pórů 0,45 µm byly ekvilibrovány v transferovém pufru. Proteiny z gelu byly přeneseny na membránu v prostředí transferového pufru za stálého chlazení v aparatuře „Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“. Přenos probíhal 14 - 16 hod. při konstantním proudu 35 mA nebo 1,5 - 2 hod. při 200 mA. Po ukončení přenosu byly membrány obarveny roztokem Ponceau S, při detekci fosforylovaných proteinů protilátkou PY-20 bylo barvení membrán vynecháno. Hmotnostní standard byl označen a barvivo bylo vymyto v TNT. Následovala 1 hod. blokace v 3 % BSA v TNT. Poté byly membrány inkubovány

v primárních protilátkách, ředěných 2 % BSA v TNT po dobu 1 hod. při pomalém kývání s následným promýváním 3x 10 min. v TNT za intenzivního třepání. Sekundární protilátky byly ředěny obvykle v 5 % roztoku sušeného odtučněného mléka a inkubace v nich probíhala rovněž 1 hod., následovalo promytí 3x 10 min. v TNT. V práci byly použity sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou (HRP), nebo se zlatými částicemi. Při použití HRP byly membrány vyvolány chemiluminiscenčně – 1 min. inkubací v detekčním roztoku pro ECL (z angl. „enhanced chemiluminiscence“) v temnu a vzniklý signál byl exponován na rentgenový film nebo snímán digitálně na analyzátoru LAS 3000. Alternativně při použití zlatem značených protilátek (10 nebo 12 nm) byly NC-membrány prefixovány 10 min. ve 2 % paraformaldehydu v TNT a 3x 10 min. promyty v miliQ H₂O pro odstranění iontů solí a pak vizualizovány srážením stříbra na povrchu zlatých částic pomocí reakční soupravy „Silver Enhancer Kit“. Doba vyvolání závisela na podmínkách experimentu, všechny NC-membrány v jednom experimentu byly vyvolávány stejně dlouhou dobu. Reakce byla ukončena vymytím činidel miliQ H₂O.

4.6 FRAKČNÍ CENTRIFUGACE V SACHAROSOVÉM GRADIENTU

2 x 10⁷ buněk bylo senzitivováno anti-TNP-BSA IgE, radioaktivně značeným ¹²⁵I (poskytnutým Dr. Dráberovou, ÚMG AVČR). FcεRI buněk byly agregovány anti-IgE polyklonální protilátkou po dobu 5 min nebo byly buňky inkubovány 5 min s 0,2 mM pervanadátem. Po ukončení inkubace byly buňky lyzovány v lyzačním roztoku 3. Po 15 min. lyze při 4 °C byl lyzát homogenizován inzulinovou injekční stříkačkou a smísen s 80 % (w/v) roztokem sacharosy v poměru 1:1 (výsledná koncentrace sacharosy byla 40 %). Sacharosový gradient byl připraven následujícím způsobem: na dno polyalomalové kyvety (13 x 51 mm) bylo nanášeno 0,5 ml 80 % sacharosy, poté bylo nanášeno 1,5 ml lyzátu v 40 % sacharose, 2 ml 30 % sacharosy a 1 ml 5 % sacharosy. Centrifugace proběhla v rotoru „SW55 Ti“ 210 000 x g, 5 hod. při 4 °C. Po ukončení centrifugace bylo z vrchních frakcí odebíráno po 0,2 ml a v každé z odebraných alikvot byla měřena radioaktivita v přístroji „Triathler Multilabel tester“ a naměřené hodnoty byly normalizovány na hodnoty celkové naměřené radioaktivity všech frakcí. Koncentrace sacharosy v každé z frakcí byla měřena pomocí Abbého refraktometru.

4.7 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Buňky byly resuspendovány ve směsi KM + PBS (1:4) tak aby v jednom vzorku bylo přibližně 200 000 buněk. Pro BMBC bylo při přípravě KM + PBS použito médium bez IL-3 a bez SCF. K suspenzím bylo přidáno 20 μ l primární protilátky ředěné v KM + PBS, do negativních kontrol byl přidán samotný roztok KM + PBS a proběhla 30 min. inkubace na ledu. Nenavázaná protilátka byla odstraněna 3x promytím v 200 μ l KM + PBS (centrifugace 4 °C, 2 min., 290 x g). Sekundární protilátka konjugovaná s fluorescein-izothiokyanátem (FITC) 100x ředěná v KM + PBS byla přidána v množství 80 μ l k buněčným suspenzím. Inkubace probíhala v temnu 30 min. na ledu. Po skončení inkubace bylo přidáno 200 μ l KM + PBS a suspenze byly centrifugovány 290 x g, 2 min., 4 °C. Pelety byly resuspendovány ve 150 μ l KM + PBS, přeneseny do zkumavek pro průtokovou cytometrii a ty byly uchovány v temnu na ledu. Těsně před měřením byl k suspenzím přidán propidium jodid do finální koncentrace 1 μ g/ml a vzorky byly proměřeny na průtokovém cytometru FACSCalibur a naměřená data byla zpracována pomocí programu FlowJo.

4.8 ULTRASTRUKTURÁLNÍ ANALÝZA

4.8.1 Příprava elektronmikroskopických sítěk

Niklové elektronmikroskopické (EM) sítěky byly pokryty pioloformovou blankou a pouhlikovány v naprašovací aparatuře. Těsně před experimenty byly takto upravené sítěky vystaveny účinku doutnavého výboje v argonové atmosféře pro zvýšení hydrofility povrchu. Poté byly inkubovány po dobu 30 min. na 20 μ l kapkách polylysinu (PLL; 0,8 mg/ml v miliQ H₂O) a následně promyty 10 s na 20 μ l kapkách v miliQ H₂O. Sítěky vybavené PLL byly vysušeny na vzduchu a do 30 min. použity.

4.8.2 Příprava a pokrytí ultračistých skel fibronectinem

15-mm kruhová skla pro mikroskopii byla promyta v kuchyňském detergentu, ten byl odstraněn promýváním v miliQ H₂O a skla byla postupně vysušena v 96 % ethanolu. Skla byla 14 - 16 hod. ponechána v 35 % HCl. Poté byla skla přenesena do miliQ H₂O na 30 min. a až do doby použití uchována v 96 % ethanolu. Pro experimenty s buňkami

BMMC byla ultračistá skla den před experimentem inkubována s roztokem fibronektinu (50 µg/ml) ve 24-jamkové destičce za teploty 4 °C a před použitím byla 1x promyta miliQ H₂O.

4.8.3 Příprava buněk

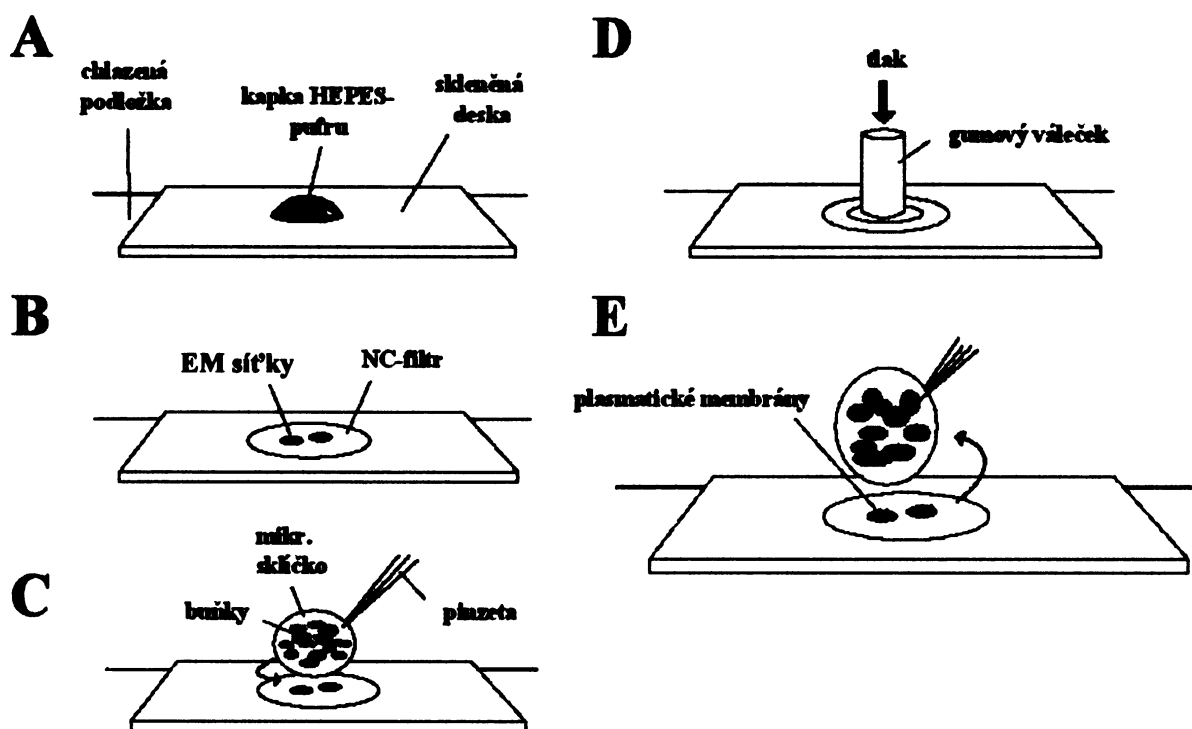
Buňky linie RBL byly ponechány adherovat na ultračistá skla ve 24-jamkových destičkách, 14 – 16 hod. v inkubátoru. Případně byly za těchto podmínek senzitivizovány anti-DNP-BSA IgE. BMMC byly 14-16 hod. před experimentem přeneseny do media bez SCF, případně s přidavkem anti-DNP-BSA IgE. Hodinu před experimentem byly resuspendovány KM + PBS (1:4), nanесeny na ultračistá skla pokrytá fibronektinem a inkubovány 1 hod. v inkubátoru při 37 °C.

Buňky na sklech byly před aktivací 5x promyty 37 °C KM + PBS, teprve poté byl přidán aktivátor (DNP-BSA nebo pervanadát v KM + PBS) a aktivace probíhala po dobu specifikovanou ve výsledcích v termomixeru při 37 °C. Aktivace byla zastavena okamžitým přidáním 1 ml 4 °C HEPES pufru do jamky a přendáním sklíčka do Petriho misky s HEPES puftrem na ledu. Po cca 10 s byly z buněk izolovány plasmatické membrány. Neaktivované buňky byly 5x promyty PBS, schlazeny v HEPES pufru a podrobeny izolaci plasmatických membrán. V případě extracelulárního značení byly buňky nejprve prefixovány 7 min. 2 % paraformaldehydem v PBS s pak inkubovány s primární protilátkou po dobu 10 min. Pak byly buňky 5x promyty PBS a inkubovány se sekundární protilátkou po dobu 10 min. konjugovanou se zlatými částicemi, ředěnou v poměru 1:5 v PBS/BSA. Po 5x promytí PBS byly schlazeny v ledovém HEPES pufru a podrobeny izolaci membrán. Jako kontrola specifity vazby sekundární protilátky za daných experimentálních podmínek byl vždy zhotoven vzorek izolovaných membrán, které byly inkubovány s PBS/BSA namísto primární protilátky.

4.8.4 Izolace plasmatických membrán

Na skleněnou plochu umístěnou na kovové chladicí podložce „CoolRack“ na ledu byla nanесena 100 µl kapka ledového HEPES pufru. Na ní byl umístěn nitrocelulosový filtr s velikostí pórů 0,45 µm. Na filtr pak byly vloženy dvě nebo tři EM síťky, stranou pokrytou PLL směřující nahoru. Skla s adherovanými buňkami, zchlazenými v ledovém

HEPES pufru byly stranou s buňkami obráceny na síťky. Přebytečná kapalina byla odsáta a na sklo byl aplikován tlak gumovým válečkem po dobu cca 15 s. Poté bylo sklo rychlým pohybem odňato. Síťky přichycené na filtru byly přeneseny na hladinu ledového HEPES pufru, síťky přichycené na sklo byly uvolněny povrchovým napětím kapky HEPES pufru umístěné vedle síťky. Poté byly síťky přeneseny na hladinu fixačního roztoku - 2 % paraformaldehydu v HEPES pufru na ledu a fixovány přesně 10 min. Po ukončení fixace byly síťky uchovány na kapkách PBS již bez chlazení.



Obr. 4.2: Schematický postup izolace plasmatických membrán pro TEM. Pracovní plocha sestává ze skleněné destky na chladicí podložce. Na skleněnou podložku se nanese kapka HEPES pufru 100 μ l (A) a následně se na kapku položí NC-filtr, který se nechá nasáknout. Přebytek pufru se odsaje a na filtr se umístí 2-3 EM síťky pokrytou PLL vzhůru (B). Na síťky se pak pomocí pinzety opatrně položí kruhové mikroskopické sklíčko s přichycenými buňkami směrem k síťkám (C). Na sklo se poté vyvine tlak; k tomu je použit gumový váleček, na který je zatlačeno prstem po dobu asi 15 s (D). Poté se sklo rychle odejme a následkem toho dojde k odtržení plasmatických membrán buněk přichycených k PLL na síťkách (E). Na filtru zůstanou EM síťky s izolovanými membránami. Dále viz text.

4.8.5 Imunochemické značení a kontrastování izolovaných plasmatických membrán

Síťky s izolovanými membránami byly přeneseny na blokační roztok 1 % BSA a 10 % kozího séra v PBS a blokovány 30 – 60 min. Inkubace na primárních protilátkách v

PBS/BSA pak proběhla 30 min. Následovalo promytí 4x 5 min PBS a inkubace se sekundární protilátkou v PBS/BSA, konjugovanou k zlatým částicím, která proběhla rovněž 30 min. Konjugáty firmy Jackson Immunoresearch byly ředěny v poměru 1:10 v PBS/BSA, konjugáty firmy Amersham v poměru 1:20. Pokud byly sledovány dva intracelulární antigeny, byl celý postup imunochemického značení opakován s dalšími protilátkami. Pro kontrolu specifity vazby konjugovaných sekundárních protilátek byl vždy zhotoven vzorek s PBS/BSA místo primární protilátky. Po ukončení imunochemického značení byly membrány na sítkách postfixovány v 2,5 % glutaraldehydu v PBS přesně 10 min a uchovány na PBS. Po uběhnutí 30 min bylo provedeno kontrastování pro TEM. Nejprve byly sítky inkubovány 10 min na 1 % OsO₄ v kakodylátovém pufru s následným promytím 3x 5 min v miliQ H₂O. Dalším krokem byla inkubace na 1 % taninu v miliQ H₂O s promytím 3x 5 min v miliQ H₂O. Na závěr byly sítky inkubovány na 1 % roztoku acetátu uranylu a promyty 2x 5 min v miliQ H₂O. Sítky byly vysušeny na vzduchu a uloženy.

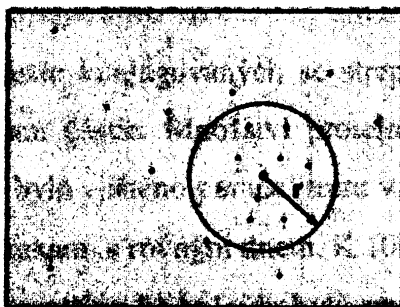
4.8.6 Transmisní elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie byla provedena na přístroji „Morgagni 268“, pracujícím při napětí 80 kV. Použité zvětšení bylo většinou 56 000x a mikrofotografie byly pořizovány digitální kamerou „MegaView CCD“. Z jednoho vzorku bylo pořizováno obvykle 10-20 záběrů pocházejících z různých membrán zachycených na EM sítkách.

4.8.7 Statistické vyhodnocení

V programu ImageJ byly vytvořeny 2D souřadnicové mapy prostorového uspořádání zlatých částic z pořizovaných mikrofotografií. Typicky tak byla analyzována distribuce částic na celkové ploše 22,19 μm² z každého vzorku. Získané mikrofotografie s použitým zvětšením 56 000x mají originálně rozlišení 1032 x 1320 pixelů, kdy 1 nm pixel odpovídá 1,25 nm. Pro zjištění vzájemných vztahů mezi částicemi detekujícími membránové antigeny bylo hledáno klastrování nebo kolokalizace částic. Klastrování znamená významnou agregaci částic v prostoru, kolokalizace je nenáhodný výskyt dvou typů částic pohromadě. Ze souřadnicových souborů byla vytvořena kvantitativní statistická analýza v programu Gold [104]. Prostorová statistika využívá Ripleyho funkci *K* [105]. Na

obr. 4.3 je graficky znázorněn význam funkce K , která popisuje klastrování částic. K vyjadřuje počet částic ve vzdálenosti kratší než je zadaná vzdálenost r od typické částice (částice v centru kruhu) stejného druhu dělený celkovou hustotou stejných částic (počet částic na plochu). „Cross- K “ funkce dovoluje zhodnotit kolokalizaci dvou typů částic.



Obr. 4.3: Grafické znázornění vyhodnocení K resp. „cross- K “ funkce. Funkce určují klastrování resp. kolokalizaci částic. K vyjadřuje počet částic ve vzdálenosti kratší než je zadaná vzdálenost r od typické částice (částice v centru kruhu) dělený celkovou hustotou stejných částic (počet částic na plochu). „cross- K “ je počet částic jednoho druhu ve vzdálenosti kratší než je zadaná vzdálenost r od typické částice (částice v centru kruhu) druhého druhu dělený celkovou hustotou částic prvního druhu. Převzato z [104].

Funkce PCF vyjadřuje poměr hustoty částic v zadané vzdálenosti r od typické částice ku celkové hustotě stejných částic. V principu lze vyjádřit PCF pomocí K :

$$PCF(r) = \frac{dK(r)}{2\pi r dr}$$

Klastrování částic způsobuje zvýšení hustoty částic v okolí typické částice a dochází ke zvýšení K a tím pádem i PCF. Podobným způsobem je pak získána funkce PCCF, která je poměrem hustoty částic jednoho druhu v dané vzdálenosti od typické částice druhého druhu ku celkové hustotě částic prvního druhu. PCF a PCCF poskytují informaci o tom, zda dochází ke statisticky významnému klastrování nebo kolokalizaci částic a pokud ano, pak při jaké vzdálenosti. Výstupem z programu Gold jsou histogramy, na kterých je vidět průběh PCF nebo PCCF v závislosti na vzdálenosti částic. Funkce PCF a PCCF při náhodném prostorovém uspořádání částic mají hodnotu 1 (v histogramech v práci zvýrazněná černá linie). Ke klastrování nebo kolokalizaci částic dochází v případech, kdy hodnoty PCF nebo PCCF rostou nad 1. Hodnoty náhodného uspořádání částic se mohou pohybovat v pravděpodobnostních intervalech, které program počítá pomocí Monte Carlo simulací. K signifikantnímu klastrování nebo kolokalizaci dochází, pokud PCF nebo PCCF

rostou nad tyto intervaly. Intervaly jsou v této práci zobrazovány jen v některých případech, které vyžadují detailnější znázornění.

Viz také: <http://hsc.unm.edu/SOM/pathology/cellpath/stmc/index.html>.

4.9 KONJUGACE ZLATÝCH ČÁSTIC SE STREPTAVIDINEM

Pro syntézu zlatých částic konjugovaných se streptavidinem (Str-Au) byl použit komerční koloidní roztok 5 nm částic. Množství proteinu, potřebné k optimální vazbě streptavidinu na povrch částic bylo zjištěno pomocí testu v 96-jamkové průhledné destičce „FluoroNUNC Maxisorp“ s jamkami s rovným dnem. K 100 μ l koloidu bylo přidáno různé množství proteinu. Po přidání proteinu ke koloidu byla směs inkubována asi 5 min a poté bylo přidáno 20 μ l 2 M NaCl. Po zasolení proběhla inkubace při laboratorní teplotě 1 hod., během které došlo k vysrážení koloidního zlata v roztocích, kde nebyl povrch částic pokryt proteinem. Změna stability zlatých částic v roztoku a jejich srážení se vizuálně projevila jako zmodrání jinak dočervena zbarveného koloidního roztoku. Směs koloidu s proteinem, u které nedošlo k vysrážení částic, zůstala růžově zbarvená. Toto množství přidaného proteinu odpovídalo minimální koncentraci proteinu potřebné k optimální vazbě na povrch zlatých částic. V případě přidávaného roztoku streptavidinu o konc. 2 mg/ml v PBS bylo k pokrytí povrchu zlatých částic dostačující množství 5 μ g/100 μ l. V přípravě konjugátů bylo přidáno k 0,5 ml koloidu nadbytečné množství 25 μ l roztoku proteinu. Roztok byl inkubován 0,5 hod. na rotátoru za konstantního otáčení v 2 ml zkumavkách a poté byl přidán roztok BSA (10 mg/ml v PBS) do finální koncentrace 200 μ g/ml. Po 2 min byl roztok zasolen přidáním 1/10 objemu roztoku 10x koncentrovaného PBS. Roztok byl ponechán asi 48 hod. při 4 °C za občasného promíchání. Poté byla provedena centrifugace v glycerolu k oddělení volného proteinu od vázaného. Do zkumavek bylo přeneseno 0,8 ml 10 % centrifugačního roztoku, na něj bylo nanášeno 0,5 ml roztoku Str-Au a centrifugace proběhla při 20 000 x g 1 hod. Peleta byla resuspendována v 0,8 ml PBS a postup byl opakován 3x. Nakonec byly Str-Au konjugáty resuspendovány v uchovávacím roztoku. Testování specifity vazby Str-Au na biotin bylo prováděno na NC-membránách „PROTRAN“ s velikostí pórů 0,45 μ m používaných pro western blot. Membrány byly předem namočený v TNT a udržovány na vlhkém podkladu. Na označená místa na membránách bylo nanášeno různé množství biotinylované protilátky 2B8 (zásobní 0,5 mg/ml; 200x ředěná v TNT). Na označené místo kontroly nebyla nanášena protilátka.

Membrány s protilátkami pak byly blokovány 1 hod. v 3 % BSA v TNT. Poté byly membrány opláchnuty v TNT uloženy na filtrační papír nasáklý v TNT a na označená místa bylo nanášeno 5 μ l roztoku Str-Au. Inkubace proběhla asi 1 min, dokud se roztok konjugátů nevsákl do membrány. Membrány byly promyty 3 x 10 min v TNT a poté v proudu destilované H₂O a dalších 10 min inkubovány v miliQ H₂O. Vizualizace zachycených Str-Au na membráně byla provedena pomocí reakční soupravy „Silver Enhancer Kit“.

4.10 PRÁCE S DNA

4.10.1 Transformace *E. coli*

Expresní plasmidy byly elektroporovány do kompetentních buněk JM109. 1 μ l plasmidové DNA (0,26 mg/ml) smíchán se 40 μ l suspenze buněk a směs byla přenesena do elektroporační kyvety. Elektroporace proběhla v elektroporátoru „*E. coli Pulser*“ s nastavením: 2,5 kV, 25 μ F, 400 Ω /s. Po elektrickém impulzu byla suspenze z kyvety vypláchnuta 1 ml předehřátého SOC a ve zkumavkách byla ponechána 1 hod. na třepačce při 37 °C. Poté bylo 200 μ l suspenze rozprostřeno na agarovou plotnu se selekčním agens – v této práci vždy ampicilin (Amp, 100 μ g/ml). Na kontrolní plotnu byly nanášeny netransformované bakterie. Misky byly inkubovány minimálně 14 hod. v inkubátoru při 37 °C dnem vzhůru. Manipulace s bakteriemi během celého procesu probíhala v laminárním boxu.

4.10.2 Izolace plasmidové DNA – Minipreparace

Z narostlých transformovanými bakteriích na plotnách byly vypíchnuty kolonie a inokulovány do 3 ml LB média s Amp (100 μ g/ml). Bakterie byly kultivovány 14 -16 hod. na třepačce při 37 °C. Z narostlých kultur poté bylo odebráno 1,5 ml pro izolaci plasmidové DNA. K izolaci byla použita izolační souprava „LegoKit“, která pracuje na principu vazby DNA na křemičité mikropartikelky v přítomnosti chaotropních látek. Byl dodržen postup doporučený výrobcem s rozdílem, že při promývání partikulí nebylo využito vakuového odsávání, ale centrifugace 1 min 1800 x g. Finální eluce plasmidové DNA pak byla provedena 50 μ l miliQ H₂O, ohřáté na 55 °C.

4.10.3 Zamražování bakteriálních kultur

Kultury *E. coli* byly zamražovány v -20 °C s přidavkem 80 % (v/v) vodného roztoku glycerolu do konečné koncentrace 15 %.

4.10.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Ke stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA byl použit spektrofotometr „NanoDrop ND-1000“. Absorbance roztoků byla měřena při 260 nm. Pro stanovení čistoty DNA přístroj vypočítal poměr absorbancí 260/280 nm a 260/230 nm.

4.10.5 Agarosová elektroforéza

Agarosová elektroforéza byla využívána k separaci DNA plasmidů a fragmentů a v některých případech k izolaci DNA z gelu. Agarosový gel byl připraven v TEA pufru (koncentrace agarosy dle tab. 4.1) a byl přidán EtBr do koncentrace 0,5 µg/ml. Pro elektroforézu byla použita aparatura „Mini-Sub Cell GT“. Nanáška vzorků byla uzpůsobena jejich koncentraci tak, aby bylo nanášeno přibližně 1 µg DNA. Ke vzorkům byl přidán vzorkový pufr „Yellow“ v poměru asi 1:5. Jako velikostní standard pak byl použit 1 Kb „Plus DNA Ladder“. Elektroforéza probíhala při napětí 90 V a byla zastavena dle polohy čela v gelu. Separované fragmenty nebo plasmidy v gelu poté byly vizualizovány na UV-transluminátoru a fotografovány digitální kamerou „MiniBis“.

Tab. 4.1: Závislost hustoty připraveného agarosového gelu na velikosti separovaných fragmentů.

podíl agarózy (% w/v)	rozmezí velikostí fragmentů (kb)
0,8	0,8-10
1	0,5-7
1,2	0,3-6
1,5	0,2-4
2	0,1-2

4.10.6 Izolace DNA z gelu

Oblasti gelu obsahující požadované fragmenty DNA byly z gelu vyříznuty skalpelem na UV-transluminátoru. Izolace DNA byla provedena pomocí reakční soupravy „ZymoClean“. Byl dodržen postup doporučený výrobcem. Finální eluce DNA byla provedena 20 µl miliQ H₂O 50 °C.

4.10.7 Restrikční štěpení

Restrikční štěpení bylo prováděno ve 20 μl reakcích. Reakční směs obsahovala DNA, příslušný restrikční enzym a odpovídající pufr. Reakční podmínky a reagenty byly přizpůsobeny dle doporučení výrobce používaných restrikčních endonukleas. Při dvojitém štěpení byly podmínky vyhledávány v databázích výrobců a byly použity neoptimálnější podmínky průběhu štěpení oběma enzymy. Přitom bylo zohledňováno složení reakčních pufrů a potřebné množství enzymů (3-5 U/ μg DNA). Štěpení probíhalo 1 hod. při teplotním optimu enzymu (zde ve všech případech 37 °C). Poté byly reakce inaktivovány rovněž dle doporučení výrobce enzymů nebo byly produkty reakce rovnou použity jako vzorky pro agarosovou elektroforézu.

4.10.8 PCR

Pro amplifikaci cDNA byly použity primery se zavedenými restrikčními místy:

horní primer GAATTCggccatggagtctgtggagcccccg; (EcoRI)

dolní primer CTCGAGgccttcagggccggtcacagggggc; (XhoI)

PCR byla provedena v 50 μl reakcích o složení dle tab. 4.2. Použita byla reakční souprava „Phusion High-Fidelity DNA Polymerase“.

Tab. 4.2: Složení 50 μl PCR reakce.

5x reakční pufr	10 μl
horní primer 25 μM	1 μl
dolní primer 25 μM	1 μl
polymerasa	0,5 μl (1 U)
miliQ H ₂ O	34,5 μl
Templátová DNA	2 μl (~300 ng)*
dNTP 10 mM	1 μl

*Templátová DNA měla koncentraci 1,784 mg/ml, byla 10x zředěna v miliQ H₂O

Reakční cyklus byl nastaven dle tab. 4.3 (str. 52) v termomixeru „DYAD Peltier Thermal Cycler“. Po doběhnutí reakce byl produkt nanesen na agarosovou elektroforézu a fragment odpovídající velikosti byl vyříznut z gelu a DNA byla přečištěna podle postupu, uvedeném v kapitole 4.10.6.

Tab. 4.3: Program PCR.

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)
1.	98	30
2.	98	10
3.	60	20
4.	72	30
5.	35 x opakování kroků 2. – 4.	
6.	72	30
7.	14	∞

4.10.9 Ligace DNA insertu do vektorové DNA

Ligační reakce probíhaly ve 20 µl reakce. V této práci byly ligovány jen fragmenty s kohezními konci. Složení reakční směsi je uvedeno v **tab. 4.4**:

Tab. 4.4: Složení 20 µl ligační směsi.

Linearizovaný vektor	100 µg
DNA insert v molárním poměru (insert:vektor)	3:1, 10:1
10x ligační pufr pro T4 DNA ligasu	2 µl
miliQ H ₂ O	do 20 µl
T4 DNA Ligasa	0,5 µl (2,5 U)

Potřebné množství insertu bylo vypočteno z předepsaného molárního poměru pomocí známé koncentrace DNA vektoru i insertu a velikostí obou fragmentů. Reakce probíhala za laboratorní teploty 2 hod. Produkty ligační reakce pak byly rovnou použity k transformaci kompetentních buněk *E. coli* JM109.

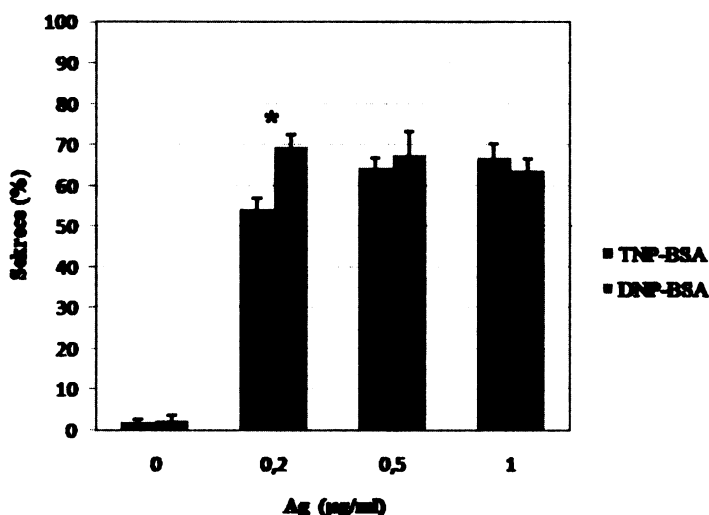
4.10.10 Transfekce polyethyleniminem

Nejdříve byly buňky HEK293 přeneseny do média bez antibiotik. Přibližně půl hodiny před transfekcí byla připravena reakční směs 1,5 ml Opti-MEM (37 °C), 105 µl vodného roztoku PEI (1 mg/ml) a 14 µg vektoru. Směs byla ihned promíchána a inkubována při laboratorní teplotě 15 min. Poté byla směs přidána k buňkám do média bez antibiotik. Transfekované buňky byly kultivovány v inkubátoru s atmosférou 5 % CO₂ při 37 °C. Expres vložných plasmidů byla detekována přibližně 3 dny po transfekci. Z buněk byly připraveny lyzáty v lyzačním roztoku 1, proteiny byly separovány na SDS-PAGE a analyzovány pomocí western blotu.

5 VÝSLEDKY

5.1 AKTIVACE BUNĚK

V první serii experimentů byla testována sekreční odpověď použitých žírných buněk na 2 antigeny. Po navázání antigenu na komplex IgE-FcεRI dochází k agregaci receptorů a ke spuštění signální dráhy vedoucí k degranulaci žírných buněk. Reakce buněk na setkání s antigenem byla sledována měřením degranulace. Buňky RBL byly senzitivovány IgE (1 μg/ml) specifickým pro antigeny TNP-BSA nebo DNP-BSA. Aktivace probíhala 30 min při různých koncentracích antigenu (0,2; 0,5; 1 μg/ml). Degranulace buněk byla měřena pomocí stanovení sekretované β-D-glukuronidasy. Maximální uvolnění bylo měřeno po lýze buněk 0,5 % Tritonem X-100. V grafu 5.1 je uvedena závislost sekrece β-D-glukuronidasy na koncentraci antigenu. Oba použité antigeny úspěšně aktivovaly buňky RBL.

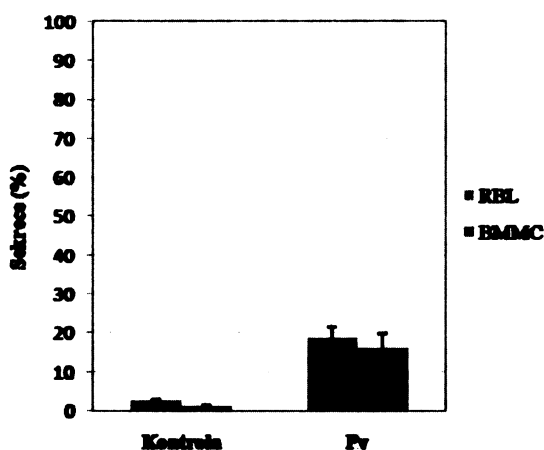


Graf 5.1: Degranulace buněk RBL po aktivaci antigenem (Ag). Degranulace byla měřena pomocí stanovení sekretované β-D-glukuronidasy. Použity byly dva druhy antigenů TNP-BSA a DNP-BSA a aktivace probíhala 30 min. Hodnoty sekrece jsou normalizovány na maximální uvolnění. Výsledky pochází z duplikátů ve dvou nezávislých experimentech. Jsou uvedeny průměry a S.D. Statisticky významný rozdíl mezi buňkami aktivovanými TNP-BSA a DNP-BSA je vyznačen: *, ($P < 0.01$).

Při aktivaci antigenem TNP-BSA docházelo při zvyšování koncentrace antigenu k nárůstu sekrece buněk. Sekrece při TNP-BSA 1 μg/ml dosahovala hodnot kolem 65 % z maximálního uvolnění. Při aktivaci DNP-BSA docházelo k maximálnímu uvolnění již při koncentraci 0,2 μg/ml. S použitím Studentova t-testu bylo potvrzeno, že k signifikantnímu

rozdílu v degranulaci buněk po aktivaci dvěma antigeny dochází jen v případě aktivace antigeny o koncentraci 0,2 $\mu\text{g/ml}$.

Dále byla studována degranulace buněk po inkubaci s pervanadátem (0,2 mM), který proniká přes membránu do buněk a inhibuje enzymovou aktivitu fosfatas. Degranulace buněk RBL po aktivaci pervanadátem dosahovala zhruba 20 % hodnot maximálního uvolnění, tedy asi polovičních hodnot uvolnění po aktivaci buněk antigenem. Podobný stupeň degranulace po působení pervanadátu byl pozorován také u BMDC (graf 5.2).

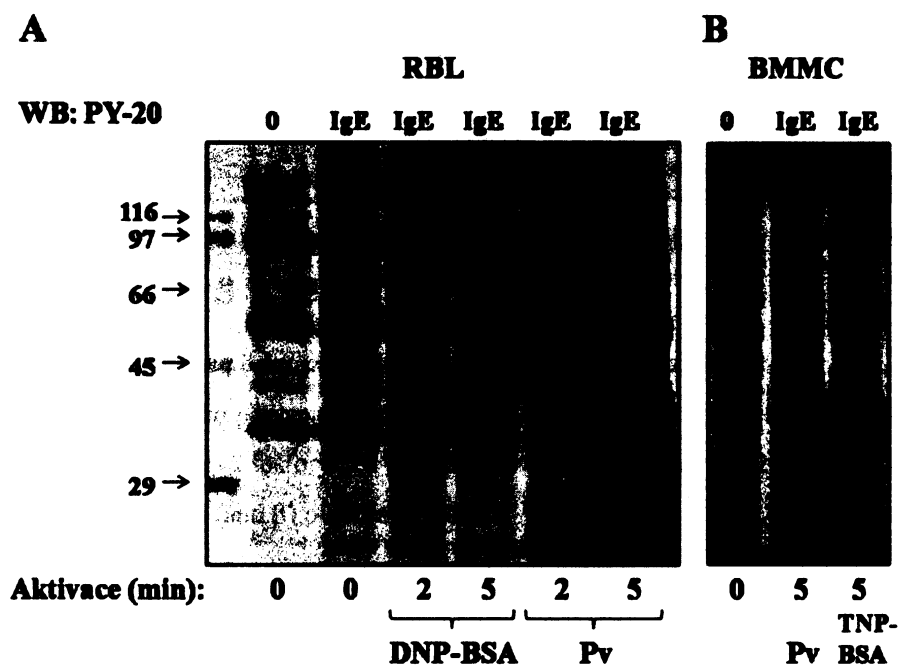


Graf 5.2: Degranulace buněk RBL a BMDC po aktivaci pervanadátem (Pp). Buňky byly vystaveny působení 0,2 mM Pp nebo pouze rozpouštědla (Kontrola). Jsou uvedeny průměry a S.D. ze dvou nezávislých experimentů provedených v duplikátech. Pomocí Studentova testu byl mezi degranulací kontrolních buněk a buněk aktivovaných Pp určen statisticky významný rozdíl ($P < 0.01$).

5.2 TYROSINOVÁ FOSFORYLACE PO AKTIVACI BUNĚK

Pervanadát ireversibilně inhibuje aktivitu cysteinových fosfatas. Po expozici buněk pervanadátem dochází k tyrosinové fosforylaci mnohých substrátů. Obdobně dochází ke zvýšené fosforylaci řady substrátů po aktivaci buněk antigenem. Následující experimenty byly cíleny na srovnání tyrosinové fosforylace proteinů po aktivaci antigenem a pervanadátem. Senzitizované buňky RBL i BMDC byly aktivovány antigenem (DNP-BSA, 1 $\mu\text{g/ml}$) nebo pervanadátem (0,2 mM) po dobu 2 a 5 min. Nesenzitizované buňky posloužily jako kontrola pro určení bazální fosforylace proteinů. Z buněk byly připraveny lyzáty a proteiny v celkových lyzátech byly separovány pomocí SDS-PAGE. Po přenosu na nitrocelulosovou membránu byly fosforylované proteiny detekovány pomocí konjugátu HRP s monoklonální protilátkou PY-20, která je specifická pro fosfotyrosin. Samotná

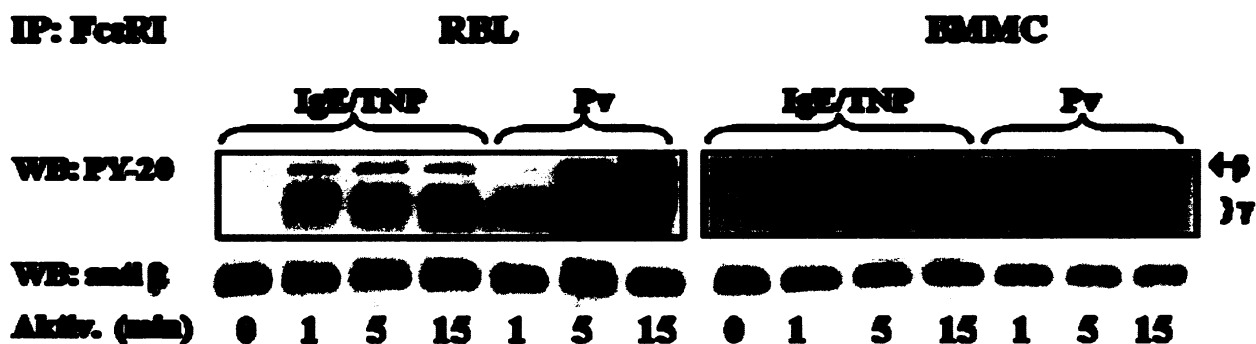
senzitivace buněk RBL způsobovala slabou tyrosinovou fosforylací některých proteinů v lyzátu oproti nesenzitivovaným buňkám v kontrole (obr. 5.1). Po 2 min aktivace antigenem byla detekována fosforylace dalších proteinů. Mezi ně patřily proteiny odpovídající molekulové hmotnosti přibližně 70 kDa, 40 kDa a 55 kDa. Tyto hmotnosti odpovídají zhruba signální proteinům Syk (z angl. „spleen tyrosin kinase“), LAT a Lyn, které patří mezi molekuly důležité pro průběh signalizace FcεRI. Po 5 min aktivaci již nebyl detekován další nárůst fosforylace. Po aktivaci buněk pervanadátem byly fosforylovány proteiny, které v mnoha případech velikostně odpovídaly proteinům fosforylovaným při aktivaci antigenem. Tyrosinová fosforylace proteinů po aktivaci pervanadátem v čase 2 min byla intenzivnější než po stejně dlouhé aktivaci antigenem. Aktivace pervanadátem dále způsobovala výrazný nárůst fosforylace proteinů v čase 5 min.



Obr. 5.1: Tyrosinová fosforylace proteinů žírných buněk stimulovaných antigenem nebo pervanadátem. Buňky RBL (A) a BMMC (B) byly senzitivovány specifickým IgE (IgE), kontrolní buňky byly bez IgE (0). Tyrosinová fosforylace proteinů byla detekována konjugátem fosfotyrosin-specifické protilátky PY-20 s HRP. Buňky byly aktivovány DNP-BSA, TNP-BSA nebo Pv po indikované dobu (2 nebo 5 min).

V dalších experimentech bylo zjišťováno, zda po aktivaci buněk pervanadátem dochází přímo k fosforylaci tyrosinů podjednotek β a γ receptoru FcεRI. Aktivace buněk RBL i BMMC probíhala po různou dobu (1, 5, 15 min). Z buněčných lyzáátů aktivovaných

antigenem (TNP-BSA, 1 $\mu\text{g/ml}$) nebo pervanadátem (0,2 mM) byl imunoprecipitován komplex Fc ϵ RI a byla provedena detekce tyrosinové fosforylace. Proteinová nanáška na SDS-PAGE byla prověřena detekcí β -podjednotky Fc ϵ RI, která je rozpoznávána protilátkou JKR. Po aktivaci antigenem byla detekována zvýšená fosforylace β i γ podjednotek Fc ϵ RI oproti kontrole (obr. 5.2) a vykazovala stejnou dynamiku u obou buněčných linií. Podjednotky receptoru byly po aktivaci pervanadátem výrazně silněji fosforylovány než po aktivaci antigenem. Pozorovaná tyrosinová fosforylace Fc ϵ RI po aktivaci buněk pervanadátem naznačovala možnou existenci preformovaných signálních komplexů Fc ϵ RI s PTK a PTP, kdy po inhibici PTP pervanadátem dochází k porušení rovnováhy ve spolupráci PTK a PTP.

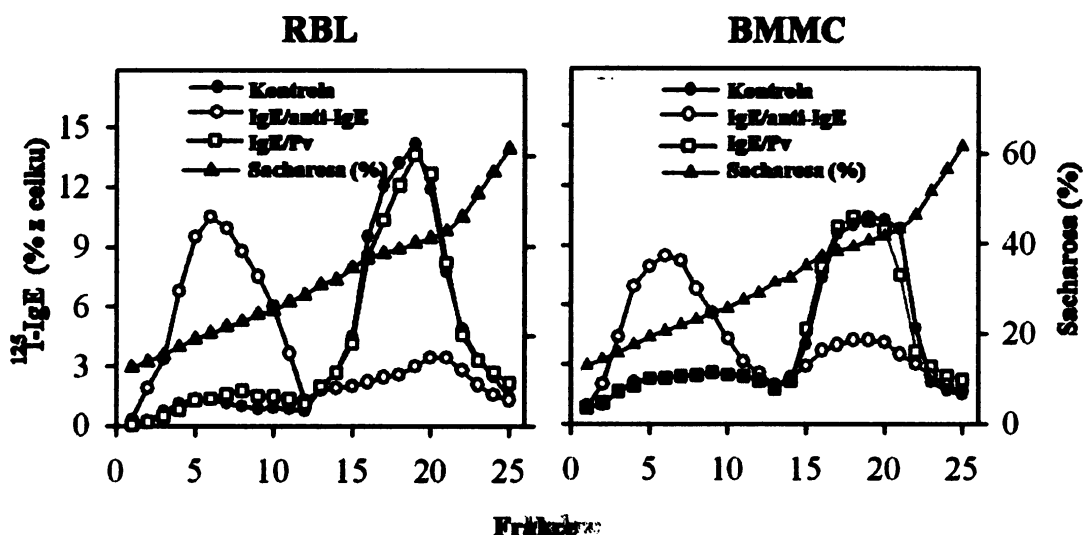


Obr. 5.2: Tyrosinová fosforylace β i γ podjednotek Fc ϵ RI. IgE senzitizedované buňky RBL i BMMC byly aktivovány antigenem (TNP) nebo pervanadátem po dobu 1, 5 a 15 min (0 min = kontrola). Komplex Fc ϵ RI byl imunoprecipitován a tyrosinová fosforylace byla detekována protilátkou PY-20. Jednotlivé podjednotky jsou označeny a detekce β -Fc ϵ RI (anti β) ověřuje nanášku.

5.3 TRANSLOKACE Fc ϵ RI DO DETERGENT-RESISTENTNÍCH MEMBRÁN

Jedna z teorií o iniciaci fosforylace Fc ϵ RI předpokládá, že k fosforylaci receptorových podjednotek dochází až po přesunu agregovaných receptorů do lipidových raftů (viz obr. 1.13B, str. 28). Přesun agregovaných komplexů IgE–Fc ϵ RI do nízkohustotních frakcí sacharosového gradientu, které odpovídají DRM, je dáván do spojitosti s přesunem receptorů do lipidových raftů. Protože po aktivaci buněk pervanadátem dochází k silné fosforylaci receptoru, nabízela se otázka, zda dochází ke změnám distribuce receptoru v sacharosovém gradientu i po aktivaci pervanadátem. Z toho

důvodu byla analyzována lokalizace FcεRI v sacharosovém gradientu po agregaci receptorů anti-IgE protilátkou nebo inkubaci s pervanadátem. Aktivované buňky RBL i BMBC byly lyzovány v 0,06 % Tritonu X-100 a lyzáty byly podrobeny frakční centrifugaci v sacharosovém gradientu. Výsledky jsou uvedeny v grafu 5.3. Data potvrzují, že před aktivací a agregací receptoru se většina receptorových molekul nachází ve frakcích s vysokou hustotou (frakce 14-25). Po agregaci receptorů pak většina přechází do nízkohustotních frakcí (frakce 0-13), které odpovídají DRM. Po inkubaci buněk s pervanadátem nedocházelo ke změnám v distribuci FcεRI v gradientu. Obsah FcεRI v jednotlivých frakcích po inkubaci s pervanadátem byl srovnatelný s obsahem u kontrolních buněk. Získané výsledky ukazují, že fosforylace FcεRI není závislá na asociaci FcεRI s DRM.

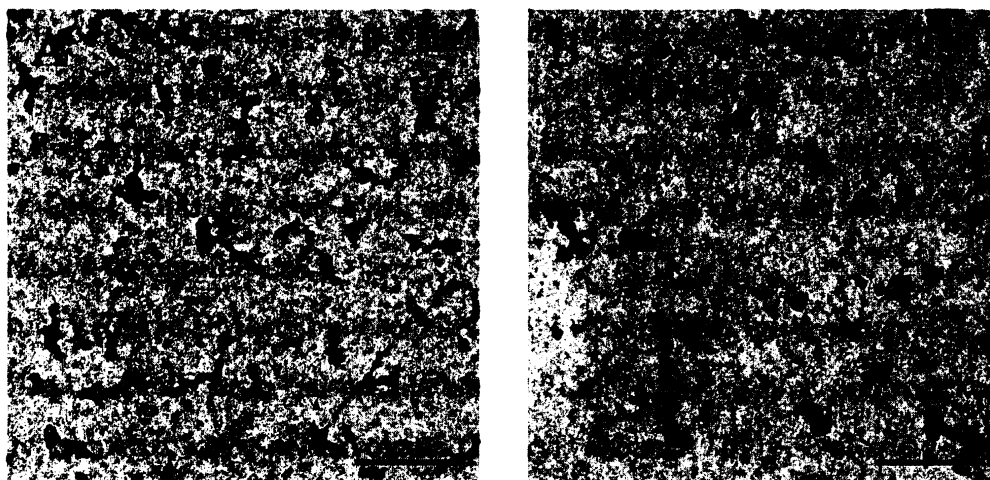


Graf 5.3: Distribuce FcεRI v hustotním sacharosovém gradientu. Receptory senzitivovaných buněk RBL a BMBC byly agregovány protilátkou anti-IgE nebo byly buňky aktivovány pervanadátem (Pv; 0,2 mM) 5 min. Kontrolní buňky nebyly aktivovány. Buňky byly lyzovány v 0,06 % Tritonu X-100 a centrifugovány v hustotním sacharosovém gradientu. Na ose x je znázorněno číslování frakcí, na ose y vpravo je znázorněna hustota sacharosy (%). Na ose y vlevo jsou uvedeny normalizované hodnoty naměřené radioaktivity v daných frakcích (% z celkové radioaktivity ve všech frakcích).

5.4 ULTRASTRUKTURÁLNÍ ANALÝZA TOPOGRAFIE FcεRI

5.4.1 Intracelulární detekce FcεRI

Pro detailnější studium signalizace FcεRI na membráně byla vyšetřena membránová topografie tohoto receptoru. Před vlastním studiem topografie receptoru při aktivaci buněk, byla nejdříve charakterizována metoda detekce FcεRI. K vizualizaci FcεRI v TEM byla použita detekce intracelulární β-podjednotky (β-FcεRI) z cytoplasmatické části izolovaných membrán protilátkou JKR. V pilotním experimentu byly pro sekundární značení aplikovány 5 nm a 10 nm zlaté částice konjugované k sekundární protilátce. Topografie receptoru byla vyšetřena u neaktivovaných buněk RBL i BMMC. Reprezentativní výřezy z mikrofotografií pořízených na membránách izolovaných z RBL buněk jsou uvedeny na obr 5.3. V souladu s předchozími výsledky [52, 95, 106] 5 nm částice nacházely v klastrech obsahujících v průměru 3-5 částic, ale i jednotlivě. Distribuce klastrů na izolovaných membránách byla homogení. Při použití 10 nm částic bylo detekováno částic méně a téměř netvořily klastry. Klastrování částic bylo vajířeno pomocí funkce PCF. Porovnání výsledných hodnot PCF a počtu částic detekovaných na standardní ploše je shrnuto v tab. 5.1 (str. 60).



Obr. 5.3: Membránová topografie podjednotky β-FcεRI detekovaná pomocí 5 nm (A) a 10 nm (B) zlatých částic na membránách izolovaných z buněk RBL. Měřitko představuje 200 nm.

Na membránách buněk RBL bylo detekováno větší množství β-FcεRI než v případě BMMC. Při detekci β-FcεRI pomocí 10 nm částic bylo u obou typů buněk zaznamenáno ~ 4x méně částic než při detekci pomocí 5 nm. 10 nm částice nebyly pravděpodobně ze

sterických důvodů schopny rozeznat vzdálenostně blízké antigeny (netvořily klastry). Aplikace 5 nm částic byla při detekci malých klastrů účinnější, a proto bylo pro další postup využito přednostně 5 nm částic.

Tab. 5.1: Účinnost detekce β -Fc ϵ RI pomocí sekundárních protilátek značených 5 nm a 10 nm částicemi zlata. Detekce β -Fc ϵ RI u klidových buněk RBL i BMMC byla provedena s použitím 5 nm a 10 nm částic zlata. Tabulka poskytuje srovnání počtu částic na ploše (částice/ μm^2) a míru agregace částic vyjádřenou funkcí PCF.

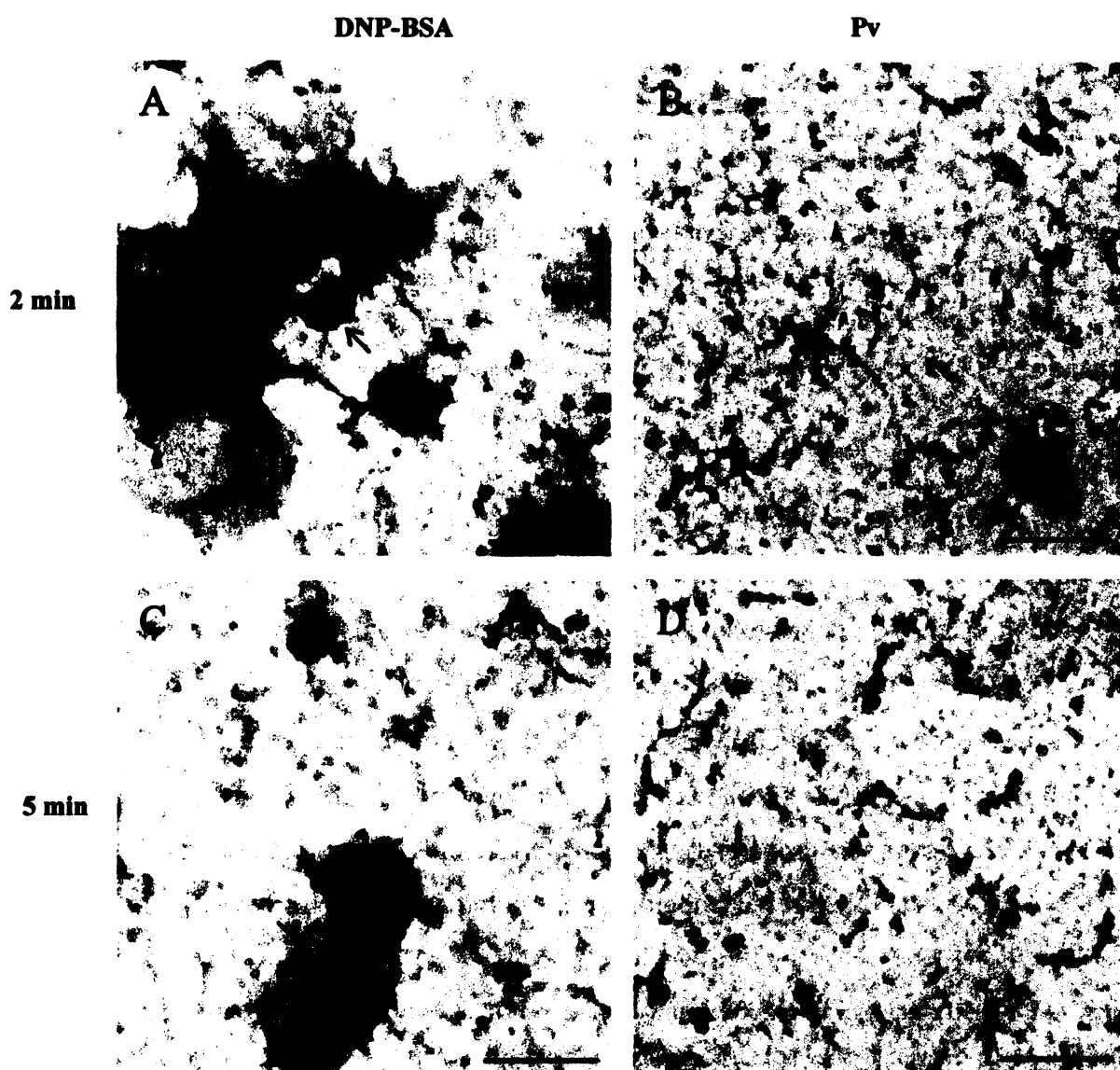
5 nm	97,3	10,18	43	15,22
10 nm	20,4	4,11	10,3	12,36

5.4.2 Topografie Fc ϵ RI během aktivace

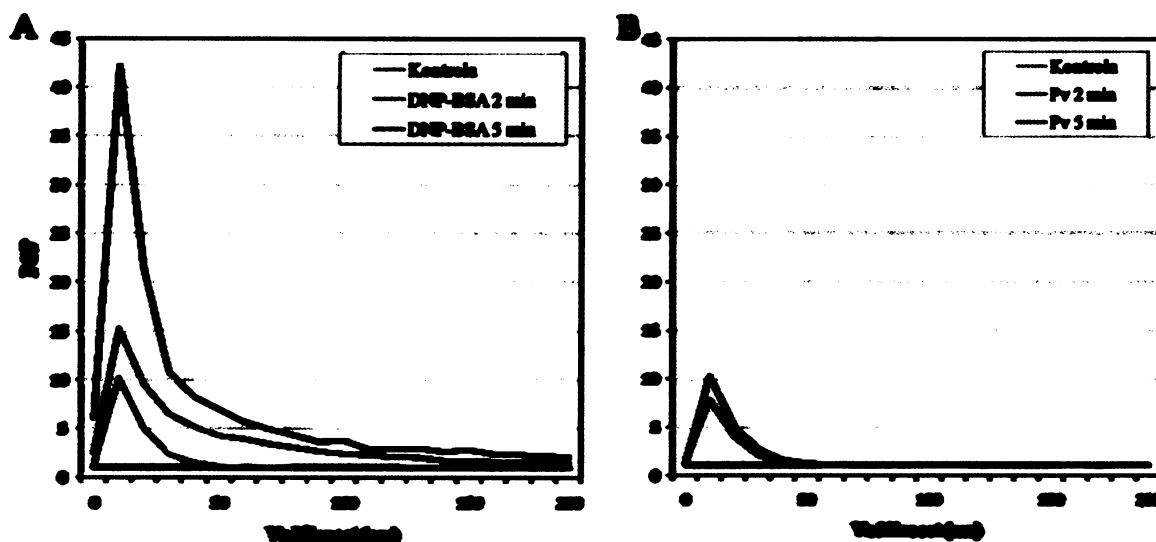
V dřívějších pracích zabývajících se membránovou topografií Fc ϵ RI bylo ukázáno, že při aktivaci Fc ϵ RI polyvalentním antigenem dochází k agregaci receptorů v „osmiofilních“ oblastech [52]. Rovněž je známo, že agregované receptory Fc ϵ RI přechází do frakcí DRM a v důsledku aktivace antigenem dochází k jejich tyrosinové fosforylaci. Aktivace buněk pervanadátem vedla rovněž k výrazné fosforylaci receptorů, ale přitom receptory nepřecházely do frakcí DRM. Tyto výsledky naznačovaly, že existuje mechanismus, pomocí něhož může docházet k fosforylaci receptorů, aniž dochází k jejich asociaci s DRM. Otázkou však bylo, zda po aktivaci pervanadátem dochází ke změnám v membránové topografii Fc ϵ RI.

Buňky RBL a BMMC byly senzitivizovány specifickým IgE a aktivovány antigenem (DNP-BSA, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nebo pervanadátem (0,2 mM) po různou dobu. Jako kontrola posloužily senzitivizované neaktivované buňky. Z buněk byly izolovány plasmatické membrány a β -Fc ϵ RI byly značeny pomocí 5 nm zlatých částic. Nejprve byly analyzovány změny v topografii po aktivaci buněk 2 min a 5 min. Reprezentativní výřezy z pořízených mikrofotografií jsou uvedeny na obr. 5.4 (str. 61). V souladu s předešlými výsledky [106] docházelo po 2 min aktivaci antigenem ke klastrování 5 nm částic v osmiofilních oblastech izolovaných membrán (tmavá oblast). Po 5 min byla velikost klastrů redukována a došlo k poklesu počtu detekovaných částic. Spolu s receptorovými klastry byly lokalizovány i

klathrinové váčky. Přítomnost klathrinových struktur v primárních signalizačních doménách naznačuje možný průběh endocytózy. Pokles počtu částic během aktivace pak nasvědčuje o internalizaci receptorů. Po aktivaci pervanadátem v časech 2 min a 5 min nebyly patrné změny v membránové topografii ani změny v počtu detekovaných částic. Statistická analýza topografie v čase 2 min a 5 min po aktivaci je znázorněna v grafu 5.4 (str. 62).



Obr. 5.4: Membránová topografie β -Fc ϵ RI po aktivaci v časech 2 a 5 min. Detekce β -Fc ϵ RI na membránách izolovaných z buněk RBL byla provedena pomocí 5 nm zlatých částic. Po aktivaci antigenem (DNP-BSA) dochází v čase 2 min (A) k agregaci 5 nm částic v „osmiofilních“ oblastech a sdružování s klathrinovými váčky. V čase 5 min dochází k redukcii velikosti agregátů (C). Po aktivaci pervanadátem nedochází k patrným změnám v topografii po aktivaci 2 min ani 5 min (B, D). Šipky označují struktury klathrinových váček. Úsečka představuje 200 nm.

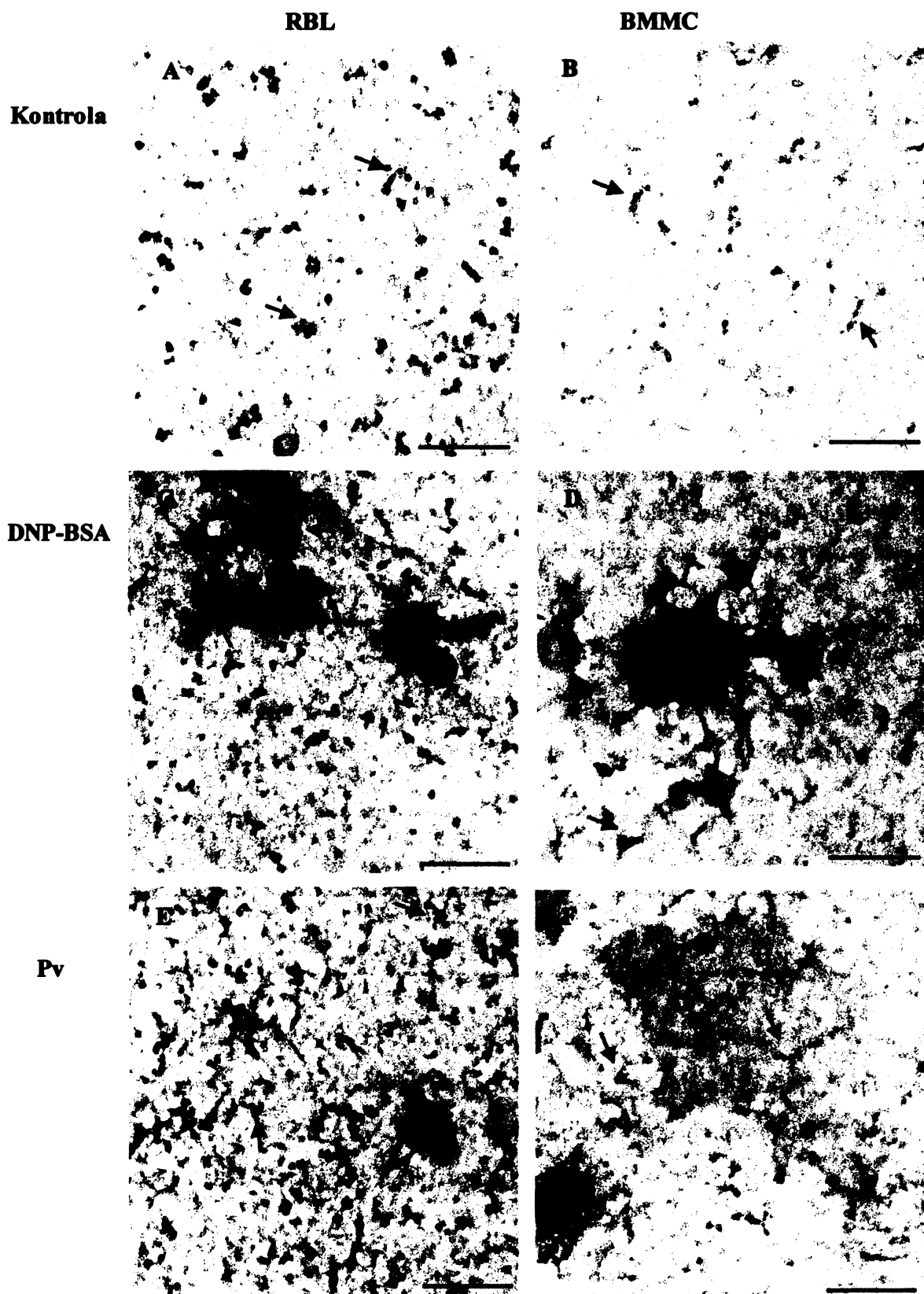


Graf. 5.4: Klastrování β -Fc ϵ RI (detekce 5 nm částicemi) po aktivaci v časech 2 a 5 min. Zvýšení hodnot PCF nad 1 představuje statisticky významné klastrování částic. Při 2 min aktivaci antigenem DNP-BSA (A) dochází ke klastrování částic v oblasti 20 nm (modrá) oproti neaktivovaným buňkám v kontrole (zelená), po 5 min je detekováno silnější klastrování (červená). Při aktivaci pervanadátem (Pv) nedochází k významným změnám v klastrování oproti kontrole po 2 ani po 5 min (B).

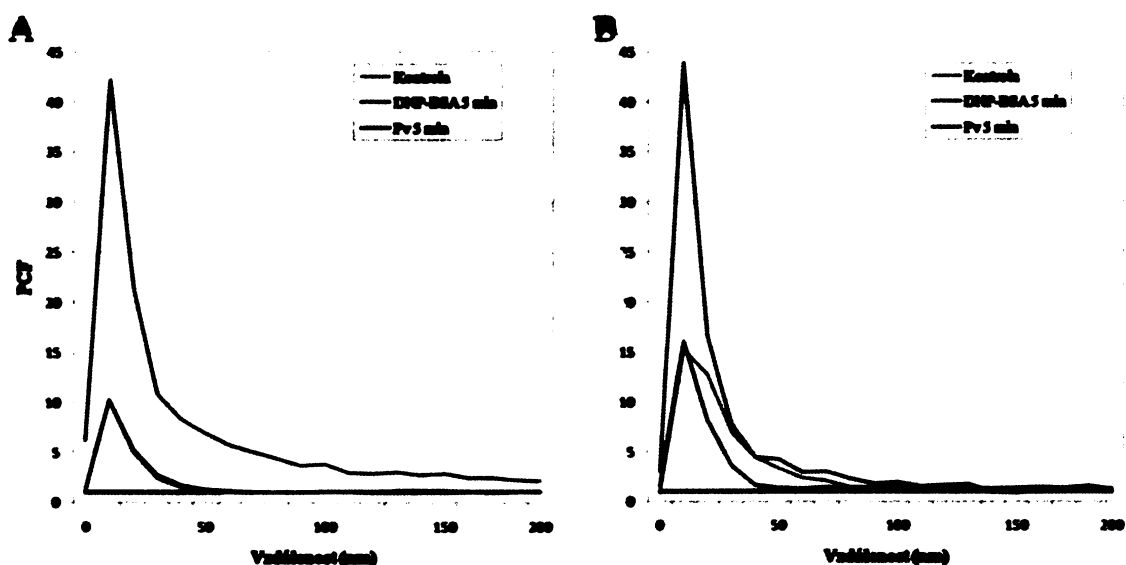
Dále byla porovnána topografie β -Fc ϵ RI buněčných linií RBL a BMBC po aktivaci buněk antigenem a pervanadátem. Aktivace probíhala po dobu 5 min. Po aktivaci buněk BMBC antigenem docházelo k poklesu počtu detekovaných β -Fc ϵ RI podobným způsobem jako u RBL. Změny v počtu detekovaných částic jsou zřehledněny v tab. 5.2 Stejně jako u RBL buněk topografie β -Fc ϵ RI u BMBC po aktivaci pervanadátem nevykazovala změny oproti neaktivovaným buňkám v kontrole. Výřezy z mikrofotografií jsou uvedeny na obr. 5.5 (str. 63) a statistická analýza je znázorněna v grafu 5.5 (str. 64). Statistická analýza ze tří nezávislých pokusů je zřehledněna v tab. 5.3 (str. 64).

Tab. 5.2: Počet 5 nm částic detekujících β -Fc ϵ RI po 5 min aktivaci antigenem (DNP-BSA) nebo pervanadátem (Pv) buněk RBL a BMBC. Kontrola představuje neaktivované buňky. Uvedené hodnoty jsou průměrem naměřených hodnot PCF ze tří nezávislých pokusů (\pm S.D.).

	5 nm částicemi	
	RBL	BMBC
Kontrola	74 \pm 16	50,77 \pm 17,8
DNP-BSA	18,4 \pm 2,26	17,8 \pm 0,42
Pv	73 \pm 19,8	54,65 \pm 15



Obr. 5.5: Membránová topografie β -FcsRI po aktivaci buněk RBL aBMBC. Detekce β -FcsRI byla provedena pomocí 5 nm zlatých částic. Po aktivaci antigenem (DNP-BSA) agregaci 5 nm částic v „osmiofilních“ oblastech a sdružování s klathrinovými váčky (C, D). Po aktivaci pervadátém (E, F) nejsou u buněk RBL ani BMBC patrné změny v topografii receptoru oproti neaktivovaným buňkám (A, B). Měřítko představuje 200 nm.



Graf. 5.5: Klastrování β -Fc ϵ RI po 5 min aktivaci na membránách buněk RBL a BMDC. Zvýšení hodnot PCF nad 1 představuje statisticky významné klastrování částic. Po aktivaci RBL (A) i BMDC (B) antigenem (DNP-BSA) bylo zaznamenáno signifikantní zvýšení v klastrování částic oproti kontrole. Po aktivaci pervanadátem (Pv) nedocházelo oproti kontrole ke změnám v klastrování částic.

Tab. 5.3: Statistická analýza topografie β -Fc ϵ RI po aktivaci antigenem (DNP-BSA) nebo pervanadátem (Pv) buněk RBL a BMDC. Uvedené hodnoty představují průměr naměřených hodnot PCF ze tří nezávislých pokusů (\pm S.D.).

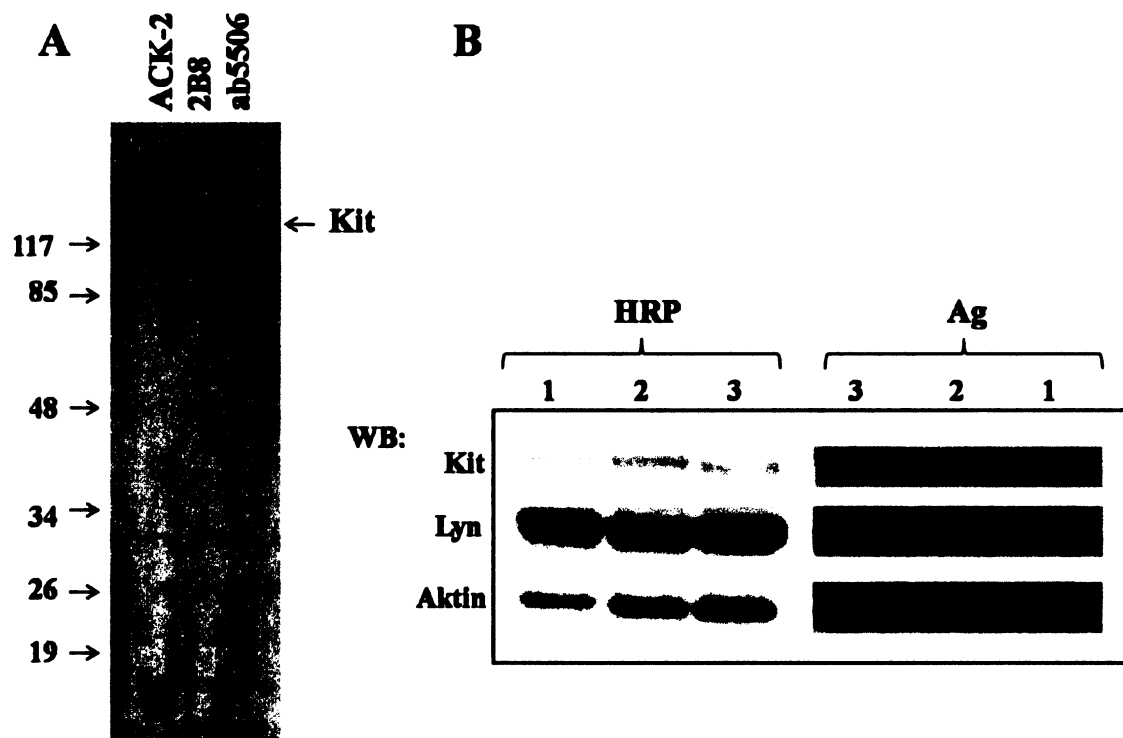
RBL	42,63 \pm 0,58	12,59 \pm 2,49
BMDC	44,19 \pm 0,08	13,9 \pm 2,15

Získané výsledky ukazují, že po aktivaci buněk RBL i BMDC pervanadátem nedochází k tvorbě agregátů Fc ϵ RI. K fosforylaci receptoru způsobené inhibicí fosfatas po inkubaci buněk s pervanadátem tedy dochází za podmínek, kdy membránová topografie receptoru zůstává shodná s topografií neaktivovaných buněk.

5.5 TOPOGRAGIE RECEPTORU Kit

5.5.1 Testování protilátek pro detekci Kit v TEM

Při studiu membránové topografie receptoru Kit byly používány jen BMMC, jelikož RBL-2H3 jsou odvozeny z leukemických buněk a exprimovaný Kit nese bodovou mutaci (Tyr⁸¹⁷ je zaměněn za Asp), která je odpovědná za jeho konstitutivní aktivaci a nekontrolovaný růst RBL-2H3 [107]. Protilátka JRK pro detekci β -Fc ϵ RI na izolovaných membránových plátech pomocí TEM byla již dříve prověřena a pro účely ultrastrukturální analýzy je vhodná. Na rozdíl od Fc ϵ RI, receptor Kit nebyl prozatím touto metodou studován. Z tohoto důvodu byly dostupné 3 protilátky pro detekci Kit testovány. Specifita všech protilátek byla ověřena na western blotu chemiluminiscenční detekcí (obr. 5.6A).

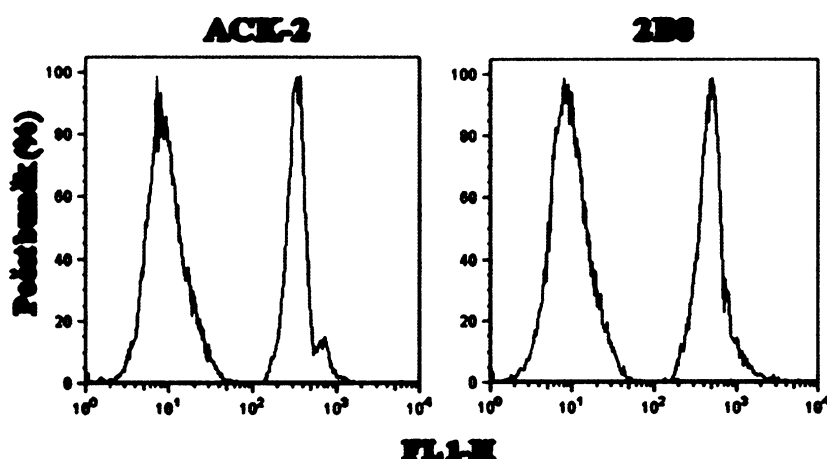


Obr. 5.6: Analýza primárních protilátek proti Kit. A - western blot analýza specifity protilátek ACK-2, 2B8 a ab5506. B - detekce proteinů na western blotu (WB) chemiluminiscenčně (HRP) a pomocí srážení stříbra na povrch zlatých částic (Ag). K detekci proteinů oběma způsoby byly použity stejné primární protilátky. Pro detekci Kit byla použita protilátka ACK-2. Jsou uvedeny výsledky z různých nanášek ekvivalentů počtu buněk v lyzátu 1 = 1×10^6 buněk, 2 = 2×10^6 buněk a 3 = 3×10^6 buněk.

Dále byla optimalizována metoda detekce proteinů na western blotu pomocí sekundárních protilátek značených zlatými částicemi a následného srážení stříbra na povrchu navázaných

částic. Takový způsob detekce proteinů může napomoci charakterizaci specifity zvolené kombinace protilátek (primární specifická a sekundární značená zlatem) pro účely značení v TEM, před samotným provedením izolace plasmatických membrán. Výsledky detekce proteinů pomocí zlatých částic vykazovaly specifitu shodnou s konvenční chemiluminiscenční metodou. Byla zaznamenána i přibližně stejná citlivost vůči různému množství proteinů. Na obr. 5.6B (str. 65) jsou uvedeny výsledky detekce Kit a dalších proteinů – aktinu a PTK Lyn.

Pro účely TEM je třeba, aby specifické protilátky rozeznávaly nativní strukturu proteinu. Z toho důvodu byly protilátky proti extracelulárním epitopům Kit (ACK-2, 2B8) testovány průtokovou cytometrií na živých buňkách. V případě obou protilátek byla zaznamenána populace buněk s vyšší detekovanou fluorescence, než buňky kontrolní, které nebyly inkubovány s primárními protilátkami (graf 5.6). Tím způsobem byla rovněž ověřena exprese Kit v BMMC.



Graf 5.6: Test protilátek ACK-2 a 2B8 pro extracelulární detekci nativní struktury Kit průtokovou cytometrií. Kit na povrchu buněk BMMC byl značen 200x ředěnými potkaními monoklonálními protilátkami ACK-2 a 2B8 rozeznávající epitopy extracelulární domény Kit. Pro detekci primární protilátky byla použita sekundární protilátka konjugovaná s FITC. Červeně znázorněné křivky histogramů představují kontrolní populace buněk, které nebyly inkubovány s primární protilátkou. Modré křivky označují populaci buněk vykazující fluorescenci v kanále FL1-H (osa x). Na ose y je počet zaznamenaných buněk normalizovaný na % z celkového počtu.

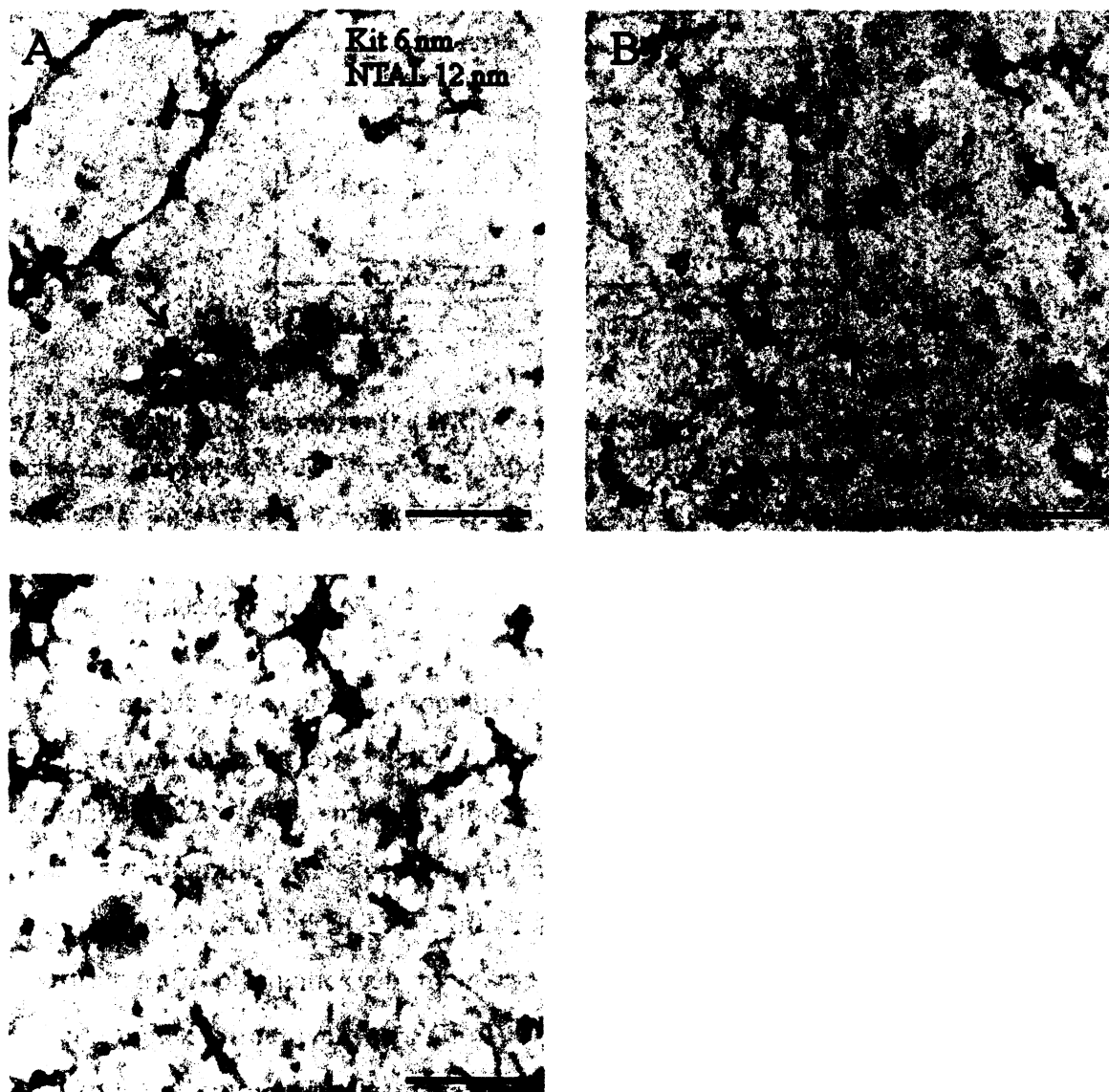
5.5.2 Topografie Kit a vztah Kit k LAT a NTAL

Po současné aktivaci buněk antigenem a SCF dochází ke zvýšené sekreční odpovědi. Jakým molekulárním mechanismem a na jaké úrovni k tomuto efektu dochází, není přesně známo. Po aktivaci FcεRI a Kit je pozorována zvýšená fosforylace

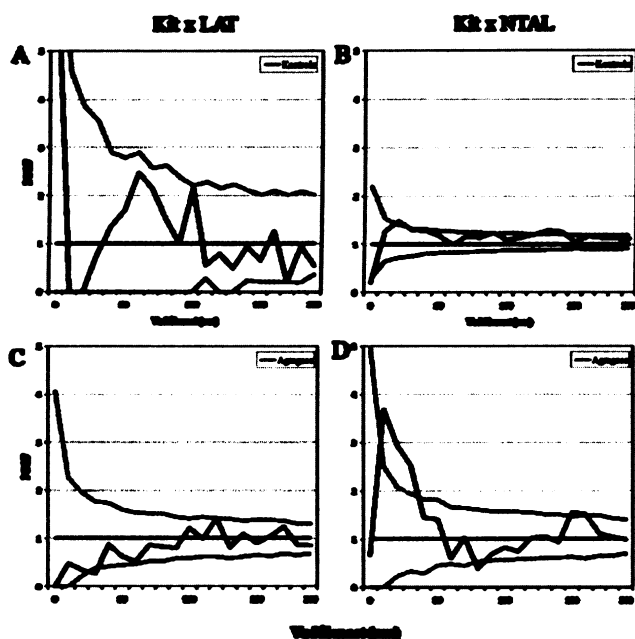
tyrosinových motivů adaptorového proteinu NTAL. Naopak žádné změny nejsou pozorovány ve fosforylaci příbuzného proteinu LAT. Právě NTAL by mohl být spojovacím článkem v komunikaci obou signálních drah. Některé výsledky naznačují, že by mohlo docházet k tyrosinové fosforylaci NTAL přímo kinasovou aktivitou Kit [102]. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli prozkoumat topografii receptoru Kit ve vztahu s topografií LAT a NTAL po aktivaci buněk.

Nejdříve používanou protilátkou pro extracelulární detekci Kit v TEM byla ACK-2. ACK-2 je blokující protilátka, to znamená, že po navázání na epitop znemožňuje vazbu ligandu na receptor. To nemusí nutně platit i obráceně. V případě detekce v TEM se však ukázalo, že po aktivaci SCF nebylo možné receptor detekovat, což mohlo být způsobeno jak znemožněním vazby protilátky na receptor, tak i např. rychlou internalizací receptoru. Protože se Kit po aktivaci nachází v DRM, je možné, že se aktivovaný receptor v nativních membránách přesouvá do oblastí se specifickým membránovým prostředím [98]. Byl tedy vyzkoušen postup, kdy byly receptory agregovány dvojicí protilátek ACK-2 a sekundární protilátky značené 6 nebo 12 nm zlatými částicemi (10 min inkubace). Kit je aktivován dimerizací po navázání ligandu. Agregace Kit pomocí protilátek samozřejmě nemusí způsobovat jeho aktivaci, ale mohlo by docházet ke stabilizaci membránových struktur, do kterých by mohly být lokalizovány efektorové molekuly jako např. NTAL [102]. Na obr. 5.7 (str. 68) jsou výsledky z experimentu dvojitého značení Kit značeného 6 nm částicemi a NTAL 12 nm. Obr. 5.7A dokumentuje agregaci Kit a začlenění NTAL do receptorového agregátu. Na obr. 5.7B byly izolované membrány před imunochemickým značením prefixovány a nedošlo tedy k agregaci receptorů a ty jsou tak distribuovány jednotlivě nebo v malých klastrech. Po agregaci Kit receptory vytvářely velké (až 300 nm) klastry, před agregací byly receptory distribuovány většinou jednotlivě nebo v malých klastrech (2–5 6 nm částic). Na obr. 5.7C po aktivaci SCF (100 ng/ml, 2 min) nebyl receptor dostatečně detekován. Výsledky tohoto experimentu poukazovali na to, že za určitých podmínek se mohou molekuly Kit a NTAL vyskytovat ve stejném membránovém prostředí. Nepředpokládá se, že Kit interaguje s adaptorem LAT [101]. LAT a NTAL jsou lokalizovány do odlišných membránových mikrodomén i po aktivaci buněk antigenem [54]. Topografický vztah s LAT byl tedy prošetřen jako kontrola, že po agregaci receptoru nedochází k nespecifické kolokalizaci s membránovými molekulami. Statistická analýza kolokalizace z experimentu je znázorněna na grafech 5.7 (str. 69). Před agregací receptor Kit nekolokalizoval ani s jedním z adaptorových proteinů. Po agregaci Kit docházelo ke

kolokalizaci s NTAL, nikoliv však s LAT. Tyto výsledky ukazovaly, že po agregaci receptoru pomocí protilátek receptoru nedochází k nespecifickému začlenění molekul do receptorových agregátů.

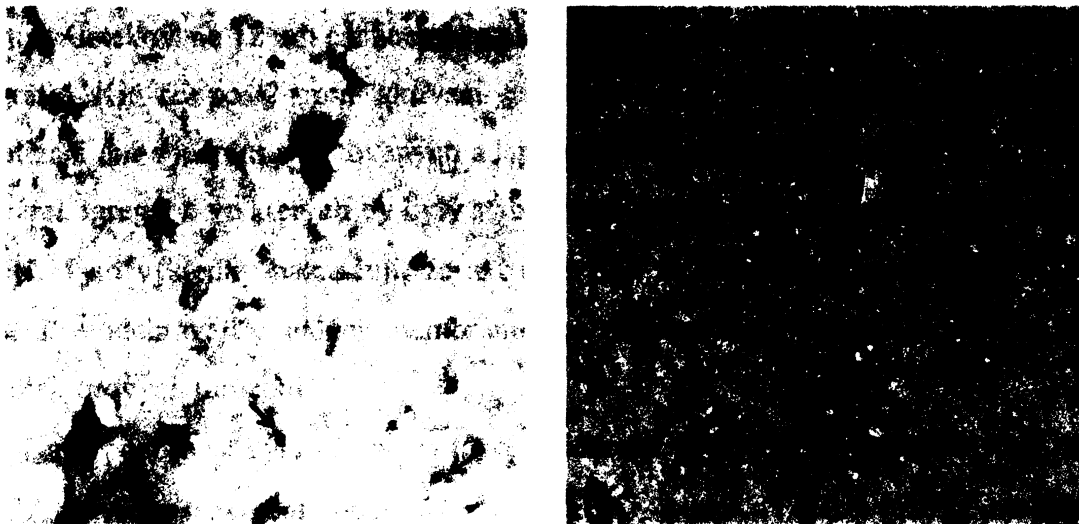


Obr. 5.7: Topografie Kit a NTAL. Detekce Kit provedena extracelulárně protilátkou ACK-2 a sekundárními protilátkami konjugovanými k 6 nm zlatým částicím. NTAL byl detekován intracelulárně pomocí 12 nm částic. Agregace Kit byla provedena 10 min inkubací s primární protilátkou, promytím a následnou inkubací 10 min se sekundární protilátkou baz fixačního kroku (A). Kontrolní buňky byly před imunochemickým značením Kit a izolací membrán prefixovány (B). V případě aktivace SCF (2 min) byly buňky po aktivaci fixovány a poté byla provedena imunochemická detekce (C). Úsečka představuje 200 nm.



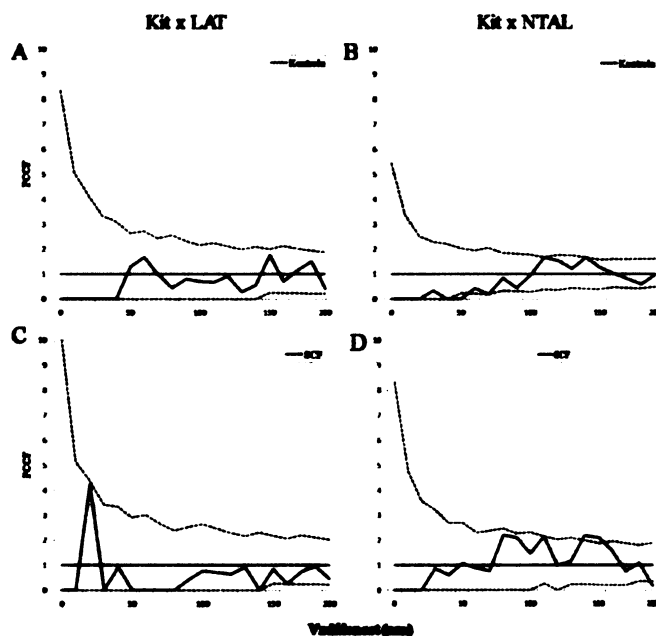
Graf 5.7: Kolokalizace agregovaného Kit s LAT nebo NTAL. Zvýšení hodnot PCCF mimo intervaly (přerušované čáry) představuje statisticky významnou kolokalizaci dvou typů částic. Detekce Kit byla provedena 12 nm částicemi a detekce LAT a NTAL 6 nm částicemi. Před agregací nedocházelo ke kolokalizaci Kit s LAT (A), ani NTAL (B). Po agregaci Kit byla detekována kolokalizace v oblasti 20 – 40 nm s NTAL (D), nikoliv však s LAT (C).

Aby mohla být studována topografie receptoru po aktivaci vlastním ligandem, byl zvolen postup intracelulární detekce Kit protilátkou ab5506, která rozeznává epitop odpovídající 927 - 942 aminokyselinám v sekvenci intracelulární části. Nejprve byla prošetřena topografie Kit receptoru po intracelulární detekci a především postrádaná topografie Kit po aktivaci SCF. Na obr. 5.8 (str. 70) jsou uvedeny reprezentativní výřezy z mikrofotografií plasmatických membrán izolovaných z nestimulovaných buněk (obr. 5.8A) a z buněk stimulovaných SCF 100 ng/ml po dobu 2 min (obr. 5.8B). Topografie aktivovaných receptorů nevykazovala změny oproti topografii neaktivovaných.



Obr. 5.8: Topografie Kit receptoru detekovaná intracelulárně. Receptory byly detekovány po izolaci plasmatických membrán protilátkou ab5506 a následně sekundární protilátkou značenou 6 nm zlatými částicemi. Topografie neaktivovaných SCF receptorů (A) nevykazovala změny oproti topografii aktivovaných receptorů (B). 6 nm částice byly počítačově zvýrazněny.

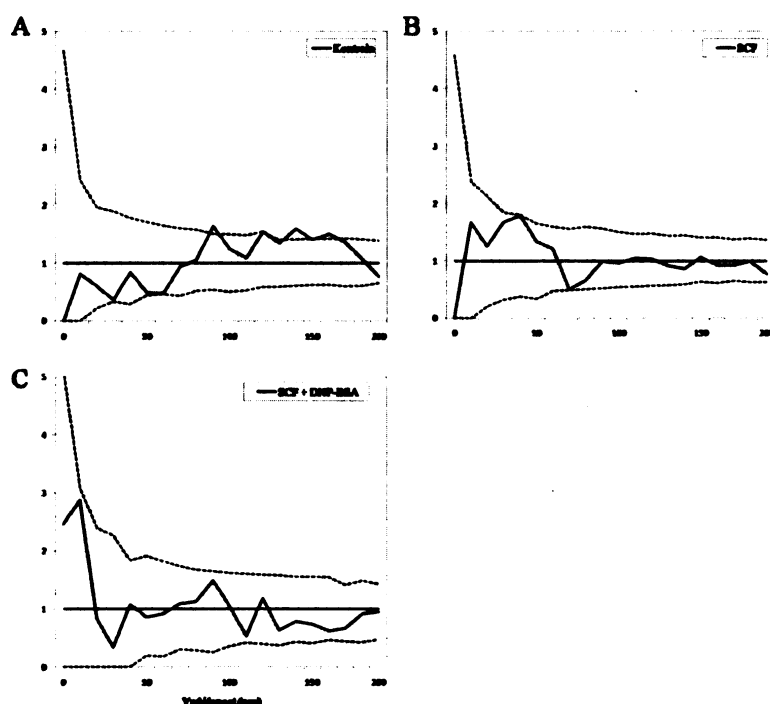
Dále byly za podmínek intracelulárního značení zopakovány experimenty prošetřující kolokalizaci s LAT nebo NTAL. Buňky byly aktivovány SCF (100 ng/ml) po dobu 2 min. Výsledky statistické analýzy jsou uvedeny v grafu 5.8.



Graf. 5.8: Kolokalizace Kit po aktivaci SCF s LAT nebo NTAL. Zvýšení hodnot PCCF mimo intervaly (přerušované čáry) představuje statisticky významnou kolokalizaci dvou typů částic. Detekce Kit byla provedena 12 nm částicemi a detekce LAT a NTAL 6 nm částicemi. Před aktivací nedocházelo ke kolokalizaci Kit s LAT (A), ani NTAL (B). Po aktivaci SCF (2 min) rovněž nabyla detekována kolokalizace s LAT (C) ani NTAL (D).

Receptory detekované 12 nm částicemi se před aktivací opět nacházely v malých klastrech. Topografie Kit se po 2 min aktivaci SCF neměnila a nedocházelo k signifikantní kolokalizaci ani s jedním z testovaných adaporových proteinů. Kit po aktivaci SCF, tedy nevytvářel agregáty, ve kterých by byly stabilizovány signalizační komplexy, jako je tomu u FcεRI. Tyto výsledky naznačují, že aktivace SCF a následné děje vedoucí k buněčné odpovědi se odehrávají v malých membránových doménách, ve kterých je zajištěn přístup všech efektorových molekul.

Další pozornost byla věnována topografickému vztahu Kit a FcεRI. Je totiž známo, že SCF zvyšuje sekreční odpověď po aktivaci buněk FcεRI [101]; molekulární mechanismus tohoto zvýšení však není znám. V dalších experimentech bylo zjišťováno zda, po společné aktivaci FcεRI a Kit dochází ke vzniku společných signálních domén, které by bylo možné detekovat jako jejich kolokalizaci. Buňky byly stimulovány



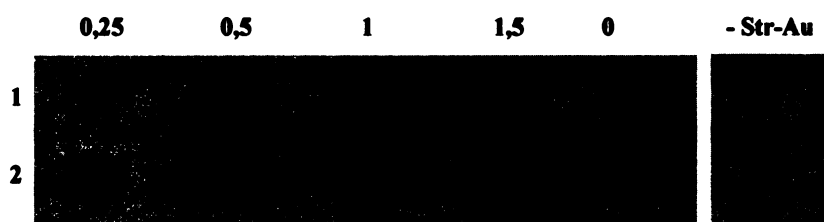
Graf 5.9: Kolokalizace Kit a FcεRI po aktivaci BMMC SCF a antigenem (DNP-BSA). Zvýšení hodnot PCCF mimo intervaly (přerušované čáry) představuje statisticky významnou kolokalizaci dvou typů částic. Detekce Kit byla provedena 12 nm částicemi a detekce β-FcεRI 5 nm částicemi. U neaktivovaných buněk (A), u aktivovaných 2 min SCF (B), ani u aktivovaných 2 min SCF + DNP (C) nedocházelo k signifikantní kolokalizaci.

antigenem (DNP-BSA 1 μg/ml), SCF (100 ng/ml) nebo oběma ligandy zároveň po dobu 2 min. Pro intracelulární detekci Kit byla použita protilátka ab5506 a JKR protilátka, která je

specifická pro FcεRI β-řetězec. Výsledky statistické analýzy jsou uvedeny v grafu. 5.9 (str. 71). V žádném ze způsobů aktivace DNP-BSA i SCF nedocházelo k významné kolokalizaci detekujících částic. Tyto výsledky tak naznačují, že membránová signalizace Kit i FcεRI probíhá v odlišných membránových mikrodoménách (lipidových raftech).

5.6 TESTOVÁNÍ SYNTETIZOVANÝCH KONJUGÁTŮ ZLATÝCH ČÁSTIC SE STREPTAVIDINEM

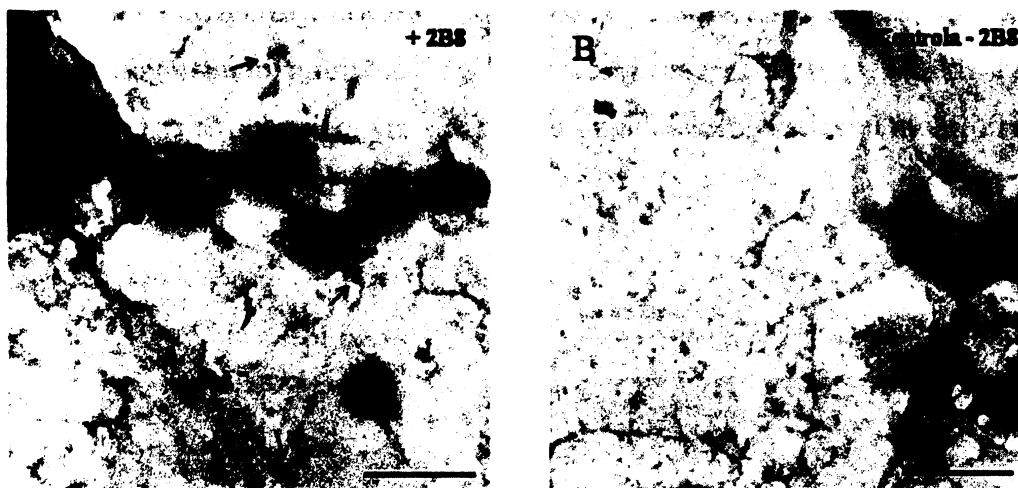
Prvním krokem v testování nově syntetizovaných konjugátů 5 nm zlatých částic se streptavidinem (Str-Au) bylo prověření jejich schopnosti specificky vázat biotin. Str-Au byly testovány při vazbě na biotinylovanou protilátku na nitrocelulosoých membránách. Na NC-membrány byla nanášena protilátka 2B8 (anti-Kit) v různém množství a následně volná vazebná místa na NC-membráně byla zablokována BSA. Na protilátku byl poté nanášen roztok konjugátů a po několikanásobném propláchnutí byly navázané zlaté částice vizualizovány pomocí srážení stříbra na jejich povrchu. Do kontrolních bodů byl místo protilátky nanášen roztok BSA nebo bylo vynecháno nanášení roztoku Str-Au na protilátku. Výsledky testu jsou zobrazeny na obr. 5.9. V místech, kde došlo k vazbě zlatých částic na protilátku, je patrné tmavě šedé zabarvení odpovídající vysrážení stříbra.



Obr. 5.9: Test specifické vazby konjugátů 5 nm zlatých částic se streptavidinem (Str-Au) na biotinylovanou protilátku 2B8. 2B8 byla nanášena v uvedeném množství 0,25 – 1,5 µg. V kontrolních bodech 0 resp. – Str-Au nebyla nanášena 2B8 resp. Str-Au. Byly provedeny duplikáty 1 a 2.

Oblast nanášení Str-Au je velmi slabě zabarvena a představuje charakteristické pozadí způsobené nespecifickou vazbou Str-Au na NC-membránu. V kontrolách bez 2B8 nebo bez Str-Au vysrážení stříbra neprobíhalo. Detekce vykazovala i rozlišovací schopnost v zaznamenání různého množství biotinylované protilátky. Kontrola s vynecháním protilátky 2B8 ukázala, že vizualizace zlatých částic není následkem nespecifické vazby částic na NC-membránu. Kontrola s vynecháním nanášky zlatých částic pak ukázala, že nedochází k nespecifickému srážení stříbra na proteinových nanáškách.

Dále byly syntetizované Str-Au testovány při detekci Kit receptoru na izolovaných plasmatických membránách z BMMC, prefixovaných 2 % paraformaldehydem. Jako primární protilátka byla použita biotinylovaná 2B8. Reprezentativní výřezy z mikrofotografií jsou zobrazeny na obr. 5.10.



Obr. 5.10: Detekce Kit pomocí syntetizovaných konjugátů 5 nm zlatých částic se streptavidinem (Str-Au). K detekci byla použita biotinylovaná primární protilátka 2B8 (A). Kontrola byla připravena s vynecháním 2B8 (B).

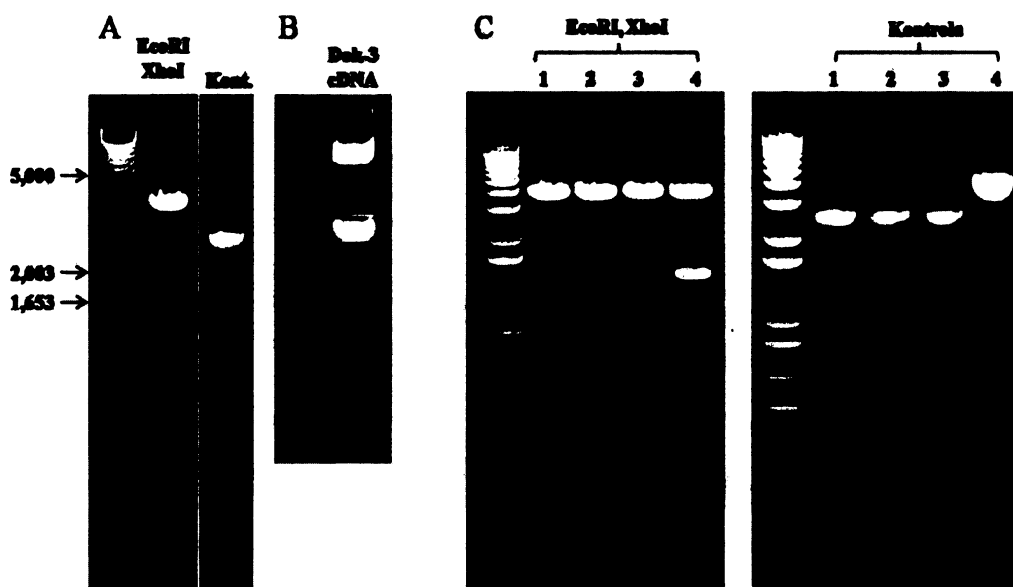
Syntetizované konjugáty se vážaly na izolované membrány a nevytvářely přitom žádné pozadí vazbou na povrch EM sítěk mimo membrány. Zároveň po vynechání primární protilátky 2B8 v kontrole nebyly částice na membránách vůbec zaznamenány, což znamená, že nedocházelo k nespecifické vazbě. Částice ale detekovaly antigen (Kit) v klastrech, které obsahovaly větší počet částic než při detekci Kit pomocí komerčních protilátek. Z charakteru detekce Kit pomocí Str-Au bylo ve srovnání s předešlými výsledky detekce Kit patrné, že během přípravy Str-Au nejspíš nedošlo k oddělení agregátů zlatých částic z roztoku.

5.7 PŘÍPRAVA KONSTRUKTU PRO EXPRESI PROTEINŮ S PŘIPOJENÝM c-Myc EPITOPEM

Pro účely ultrastrukturální analýzy byl připravován konstrukt pro trvalou transfekci žírných buněk BMMC. Konstrukt měl být použitelný pro expresi fúzních proteinů a měl být připraven tak, aby byl univerzálně použitelný pro vkládání genů různých proteinů.

Konstrukt měl připojit vysoce imunoreaktivní a dobře charakterizovaný c-Myc epitop na konec vkládaného proteinu. Pro experiment byl zvolen adaptorový protein Dok-3, protože pro jeho detekci nejsou dostupné dostatečně kvalitní specifické protilátky.

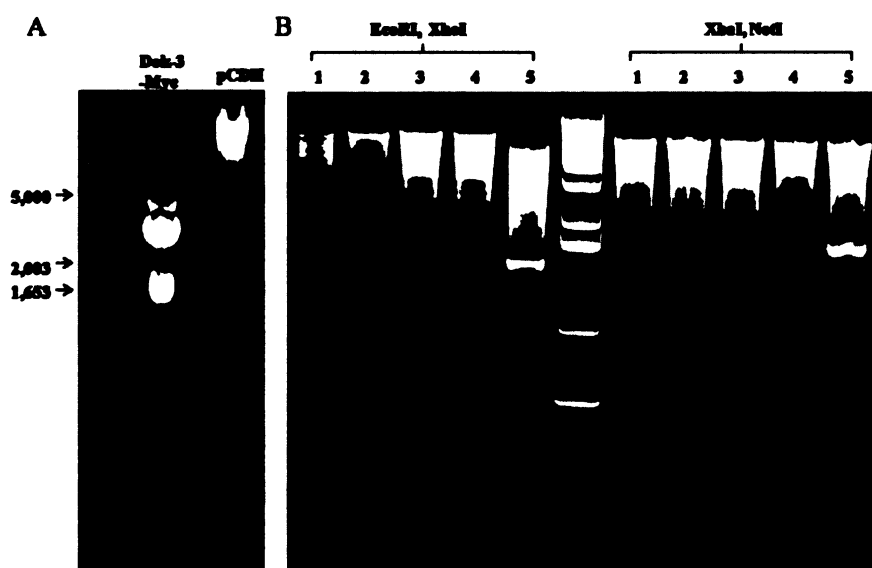
Použitý vektor pCMV-Myc připojuje c-Myc epitop na N-konec proteinů. Vektor byl štěpen enzymy EcoRI a XhoI. Výsledky štěpení a porovnání velikosti s neštěpeným vektorem na agarosové elektroforéze jsou uvedeny na obr. 5.11A. Linearizovaný vektor s vyštěpeným fragmentem přibližně odpovídal očekávané velikosti 3,778 kb. Neštěpený plasmid měl díky nadšroubovicovým strukturám jinou elektroforetickou mobilitu a putoval gelem rychleji.



Obr. 5.11: Klonování cDNA pro Dok-3 do plasmidu pCMV-Myc. Štěpení plasmidu (A) restričními enzymy EcoRI a XhoI, jako kontrola byl použit neštěpený plasmid. Produkty PCR reakce cDNA DOK-3 (B). Restriční analýza cDNA klonované do pCMV-Myc (C). Inzert Dok-3-Myc byl vyštěpen EcoRI a XhoI. Testovány byly transformované klony 1 – 4.

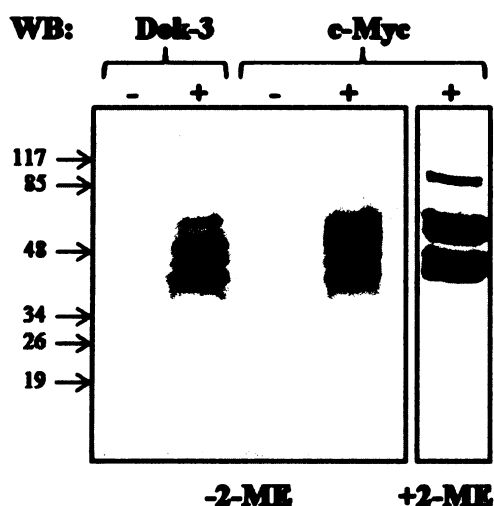
cDNA proteinu DOK-3 byla amplifikována PCR reakcí a produkt reakce je znázorněn na obr. 5.11B. Použité primery byly navrženy tak, aby do sekvence Dok-3 byla zavedena restriční místa pro EcoRI a XhoI. Produkt PCR byl štěpen enzymy EcoRI a XhoI a izolovaný fragment odpovídající velikosti 1350 kb byl ligován do štěpeného vektoru pCMV-Myc. Ligační směs byla transformována do *E. coli*. Ligovaný konstrukt z vybraných narostlých kolonií byl ověřen restriční analýzou (viz obr. 5.11C), kde byla prokázána přítomnost fragmentu odpovídajícího přibližně očekávaným 1350 bp v klonu 4. Zároveň velikosti nadšroubovicových konformací cirkulárního neštěpeného vektoru v klonu

4 odpovídaly jiným velikostem nežli u ostatních klonů. Tímto způsobem byl zaveden na N-konec sekvence Dok-3 c-Myc epitop. Kazeta byla poté z vektoru vyštěpena enzymy NotI a XbaI. Inzert o velikosti 1714 bp (obr. 5.12A) byl ligován do lentivirálního vektoru pCDH-VMV-MCS-EF1-Puro (pCDH, 7377 bp) s puromycinovou rezistencí, který byl štěpen stejnými enzymy. Ligovaná směs byla transformována do *E. coli* a izolovaná plasmidová DNA z vybraných klonů byla podrobena restriční analýze (obr. 5.12B). Restriční analýza prokázala přítomnost fragmentů přibližně odpovídajících velikosti očekávaných produktů štěpení v případě klonu 5 (1350 po štěpení EcoRI/XhoI a 1714 po štěpení XbaI/NotI).



Obr. 5.12: Klonování inzertu Dok-3-Myc do vektoru pCDH. Vyštěpením inzertu Dok-3-Myc z pCMV-Myc (A) byl izolován fragment o velikosti asi 1,7 kb. Inzert Dok-3-Myc byl ligován do vektoru pCDH. Ligační směs byla transformována do *E. coli* a plasmidová DNA izolovaná z testovaných klonů (1 – 5) byla podrobena restriční analýze dvojicemi enzymů EcoRI/XhoI a XbaI/NotI (B). Pouze klon 5 byl transformován správně ligovaným vektorem.

Připravený konstrukt byl transfekován do savčích buněk HEK293 pomocí PEI. Kontrolní buňky byly transfekovány plasmidem pCDH bez vloženého inzertu. Třetí den po transfekci byly z buněk připraveny lyzáty a pomocí analýzy western blotem byl detekován jak c-Myc epitop anti-c-Myc protilátkou, tak vložený protein Dok-3 specifickou protilátkou D-18. Výsledky analýzy exprese jsou uvedeny na obr. 5.13 (str. 76). Po transfekci buněk vektorem bez zaklonovaného inzertu ani jedna z použitých protilátek nedetekovala žádné proteiny (kromě velice slabého proužku v oblasti 85 kDa v případě protilátky anti-c-Myc). Po transfekci připraveným vektorem pCDH-Myc-N-Dok-3 bylo oběma protilátkami (anti-Dok-3 i anti-c-Myc) detekováno několik proužků



Obr. 5.13: Expres fúzního proteinu Dok-3 s připojeným c-Myc epitopem na N-konci. Transfekce připraveného kontruktu pCDH-Myc-N-Dok-3 byla provedena pomocí PEI do buněk HEK239 (+). Jako kontrola byly použity buňky transfekovány prázdným vektorem bez inzertu (-). Na obr. vlevo byly lyzáty nanášeny na SDS-PAGE ve vzorkovém pufru bez 2-ME a byla provedena detekce anti-Dok-3 protilátkou a vpravo anti-c-Myc protilátkou. Ve vzorku +2ME byla provedena detekce anti-c-Myc, kdy byl vzorek lyzátu nanášen na SDS-ELFO ve vzorkovém pufru obsahujícím 2-ME.

odpovídajících stejným molekulovým hmotnostem. Protein Dok-3 je obvykle detekován pomocí western blotu jako trojitý elektroforetický proužek v oblasti 50 kDa (předchozí výsledky v laboratoři). V prostředí vzorkového pufru obsahujícího 2-ME byly detekovány tři elektroforetické proužky pomocí anti-c-Myc ve dvou hmotnostních variantách. Dvě varianty mohly vzniknout díky různým postranlačním modifikacím. Proužek v oblasti 85 kDa vzniká nejspíše nespecifickou vazbou anti-c-Myc protilátky, jelikož je detekován i u buněk transfekovaných vektorem bez inzertu Dok-3-Myc.

6 DISKUSE

6.1 METODICKÉ ASPEKTY APLIKACE TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE PŘI STUDIU TOPOGRAFIE MOLEKUL PLASMATICKÉ MEMBRÁNY

Vhodná metoda pro studium membránových mikrodomén by měla poskytnout informace o jejich velikosti, výskytu a dynamice, včetně mobility a časových parametrů chování studovaných proteinů. V současné době neexistuje technika, která by dovolovala sledovat současně všechny tyto parametry. Utrastrukturální analýza pomocí TEM v kombinaci s možností pracovat s izolovanými pláty plasmatické membrány a vhodnými dalšími experimentálními přístupy poskytuje komplexnější pohled na studovanou problematiku. V této práci byla metoda aplikována k objasnění detailní membránové topografie FcεRI a Kit. Hned úvodem je vhodné říci, že tato metoda sebou nese i rizika vzniků možných artefaktů a interpretační problémy, ostatně jako v řadě dalších experimentálních metod. V průběhu přípravy jsou vzorky ve dvou nebo třech krocích fixovány aldehydickými sloučeninami. Chemická fixace je obecně v mikroskopii možným zdrojem artefaktů. Této problematice byla věnována značná pozornost a možnost vzniku arteficiálních struktur je do značné míry odstraněna [31]. Dalším problémem může být slabá účinnost značení membránových struktur konjugáty koloidního zlata. Pro studium metodiky analýzy topografie FcεRI byly provedeny experimenty se značením β-FcεRI oběma běžně používanými velikostmi zlatých částic (5 a 10 nm). Již dříve bylo poukazováno na skutečnost, že detekce antigenů částicemi o velikostech >5 nm není pravděpodobně ze sterických důvodů dostatečně citlivá pro analýzu malých klastrů [55].

Výsledky z laboratoře B. Wilsonové poukazují na to, že většina proteinů asociovaných s plasmatickou membránou je lokalizována do malých mikrodomén, bohatých na cholesterol a spojených s cytoskeletem. Tyto mikrodomény jsou pak dále děleny na ty, které obsahují raftové markery a ty které jsou osazeny neraftovými molekulami. Jiné práce podpořené výsledky FRET dokumentují raftové molekuly, které v membráně existují jako jednotlivé proteiny s lipidovým pláštěm a současně jako několik nm velké klastry v závislosti na druhu studovaných proteinů [108]. Ani jeden z námi studovaných transmembránových receptorů (FcεRI a Kit) nepatří mezi raftové markery, ale pro oba platí, že po vazbě ligandu dochází k jejich translokaci do DRM [36, 98].

Pomocí 5 nm zlatých částic byly oba nestimulované receptory vizualizovány převážně v malých klastrech spolu s částí jednotlivých molekul.

Předcházející práce ukázaly, že síť F-aktinu participuje i na doménové organizaci FcεRI. Receptory pravděpodobně difundují v membránových doménách s rozměrem v řádu mikronů, ohraničenými F-aktinovými strukturami. Metodou SPT bylo ukázáno, že klastry klidových receptorů FcεRI jsou vysoce dynamickými strukturami [109]. Zjištěná membránová distribuce námi studovaných receptorů je v souladu s moderním pojetím membránové organizace, ve kterém proteiny plasmatické membrány vytvářejí následkem stabilizujících a destabilizujících vlivů vysoce dynamické doménové struktury, které kontinuálně vznikají a zároveň se rozpadají [16, 110].

Procedura izolace plasmatických membrán, následné imunochemické značení a analýza v TEM je časově náročný postup. Imunochemické značení si navíc často vyžaduje pro každý studovaný antigen optimalizaci vhodných experimentálních podmínek. Při používání nových protilátek je tedy vhodné protilátky nejdříve otestovat pomocí jiných, méně náročných experimentálních přístupů. Topografie Kit receptoru dosud nebyla metodou ultrastrukturální analýzy zkoumána. Specifita vazby tří dostupných protilátek byla otestována analýzou na western blotu. Pro testování specifity detekčního systému přímo používaných primárních a sekundárních protilátek v TEM byla zavedena alternativa detekce proteinových antigenů na western blotu pomocí zlatem značených sekundárních protilátek. Při využití tohoto alternativního způsobu detekce bylo dosaženo specifity srovnatelné s chemiluminiscenční detekcí. Některé dostupné protilátky nejsou schopny reagovat s nativní strukturou proteinu, která je přítomná na izolovaných plasmatických membránách. V takovém případě není analýza na western blotu postačujícím způsobem, jak ověřit funkčnost protilátky při detekci antigenů na izolovaných membránách. Vazbu na nativní strukturu extracelulární domény receptoru bylo možné ověřit pomocí průtokové cytometrie.

Optimalizace přípravy vlastních konjugátů zlatých nanočástic a specifických protilátek nebo jiných sond by ulehčila přípravu vzorků pro ultrastrukturální analýzu. Eliminovaly by se tak obtíže vznikající při volbě protilátek detekujících antigeny např. při dvojitém značení, kdy protilátky nemohou pocházet ze stejného zdroje. Rovněž by došlo k urychlení procedury přípravy vzorků. V prvním kroku jsme se věnovali přípravě konjugátů se streptavidinem, které by mohly posloužit jako univerzální sondy pro detekci biotinylovaných specifických protilátek. Pokud by se podařilo postup přípravy

optimalizovat, dále by bylo možné provádět konjugaci přímo ke specifickým protilátkám a tak by se předešlo jinak nezbytnému dvoukrokovému značení spojenému s nárůstem nezbytných kontrol na nespecifické vazby. Konjugace streptavidinu k částicím proběhla správným způsobem, jak bylo ukázáno pomocí testu na nitrocelulosové membráně. Částice vlastní výroby vykazovaly specifitu při vazbě na izolované plasmatické membrány a nevznikalo nežádoucí pozadí. Použitým postupem se však nepodařilo oddělit agregované 5 nm částice, které mohou být přítomny již ve výchozím koloidním roztoku nebo mohou vznikat následkem změny stability částic v roztoku po přidavku iontů solí. V dalším postupu bude nutno protokol přípravy opatřit o další kroky, kdy budou tyto agregáty z roztoku vyděleny např. na základě vyšší hmotnosti utracentrifugací v hustotním gradientu.

Pro připravované experimenty zaměřené na analýzu topografie proteinů, pro které neexistují vhodné protilátky, byl připraven transfekční plasmidový konstrukt umožňující expresi proteinů označených c-Myc epitopen na N-konci. Konstrukt byl připraven s vnesenou skvencí proteinu adaptorového proteinu žírných buněk Dok-3 do lentivirálního vektoru. Lentivirální infekční systém je účinným nástrojem přenosu genetické informace i do velmi těžko transfekovatelných buněčných linií, jako jsou BMMC. Vnášená sekvence je integrována do genomové DNA a jsou tak vytvořeny stabilní transfektanty. Charakterizace a optimalizace univerzálního detekčního systému pomocí c-Myc epitopu v TEM by omezila závislost metody na dostupnosti specifických protilátek. V této práci byl konstrukt ověřen restriční analýzou a transfekován do snadno transfekovatelných buněčných linií HEK293, kde byla potvrzena exprese vneseného fúzního proteinu Dok-3 s připojeným c-Myc epitopem. V další práci bude třeba otestovat detekční systém pro c-Myc v TEM.

6.2 TOPOGRAFIE RECEPTORU Kit

Pomocí extracelulární detekce Kit protilátkou ACK-2 se nedařilo Kit po aktivaci SCF detekovat. Agregace receptoru pomocí protilátek odhalila receptorové struktury, které kolokalizovaly s adaptorovým proteinem NTAL, ne však s LAT. To znamená, že za určitých podmínek mohou molekuly Kit a NTAL lokalizovat do společných membránových mikrodomén. To že ke vzniku podobných struktur nedocházelo s LAT je v souladu s výsledky, kdy aktivace Kit nemá vliv na fosforylaci tyrosinových motivů LAT. Nicméně jednalo se o arteficiální struktury, které nevznikají v nativních podmínkách. Po

aktivaci Kit vlastním ligandem může docházet ke specifickým změnám, které umožňují adekvátní membránovou lokalizaci Kit po aktivaci. Dalším krokem tedy bylo zavedení intracelulární detekce Kit pomocí králičí polyklonální protilátky ab5506. Za překvapivé lze považovat nález, že intracelulární detekce neukázala změny v topografii po aktivaci SCF oproti neaktivovaným receptorům a nebyla pozorována žádná signifikantní kolokalizace s NTAL ani s LAT. Po aktivaci receptoru tedy nejspíš nedochází ke vzniku velkých signálních membránových domén jak je tomu u FcεRI. Interakce Kit s NTAL tak nebyla přímo dokázána. Nebyla však ani vyvrácena, protože i u malých signálních domén aktivovaných Kit receptorů musí být přítomny všechny potřebné efektorové molekuly pro přenos signálu. Podobným případem byla i dimerizace receptoru FcεRI, kdy byly přítomny malé komplexy receptorů srovnatelné se stavem u klidových buněk a přitom docházelo k normální buněčné odpovědi. Pomocí TEM však přesto nebyla zachycena signifikantní kolokalizace s efektorovými molekulami, které se však jistě na přenosu signálu podílely. Alternativně, interakce Kit s NTAL může mít vysoce dynamický charakter, kdy nejsou vytvářeny stabilní signální komplexy. V další studium topografie Kit bude zohledněna kinetika fosforylace NTAL po aktivaci Kit dokumentovaná v práci [101] a bude studován vztah Kit a NTAL v různých aktivačních časech.

6.3 TOPOGRAFIE FcεRI A NOVÝ MODEL BUNĚČNÉ AKTIVACE

Vazba polyvalentního antigenu na komplex IgE-FcεRI indukuje tyrosinovou fosforylaci receptorových podjednotek. Nicméně mechanismus jakým dochází po vazbě ligandu k přenosu signálu přes plasmatickou membránu do vnitrobuněčného prostředí, není jasný. Dva modely signalizace uvedené v kap. 1.4.5 neposkytují vysvětlení všech poznatků. Ani jeden z uvedených modelů signalizace FcεRI nebere v potaz možnost, že při iniciaci fosforylace FcεRI mohou mít důležitou úlohu i PTP. Pomocí pervanadátu – inhibitoru cysteinových PTP, bylo v této práci zjištěno, že k tyrosinové fosforylaci při iniciaci signalizace může docházet mechanismem, který nevyžaduje translokaci FcεRI do DRM. Několik dokladů svědčí pro skutečnost, že pervanadát iniciuje fosforylaci FcεRI mechanismem, který je odlišný od dříve postulovaných modelů FcεRI signalizace.

Zaprvé, expozice buněk pervanadátem způsobovala přímo tyrosinovou fosforylaci β a γ podjednotek receptoru FcεRI. Pomocí TEM na izolovaných plasmatických

membránách bylo zjištěno, že k receptorové fosforylaci dochází v absenci receptorové agregace, ke které dochází po aktivaci polyvalentním antigenem. Tím je vyloučeno, že by pervanadát mohl nějakým způsobem indukovat agregaci receptorů a tak by mohlo docházet k receptorové fosforylaci v lipidových raftech ve kterých je podle raftového modelu separována Lyn kináza. Analýza topografie receptoru poskytla výsledky, které jsou v souladu s předchozími studiemi, ve kterých byla pozorována fosforylace dimerizovaných receptorů FcεRI rovněž při absenci tvorby receptorových agregátů [95]. Zdá se tedy, že vznik velkých agregátů komplexů antigen-IgE-FcεRI v membránových „osmiofilních“ oblastech, které sdružují ostatní signalizační molekuly má význam spíše regulační, nežli přímo pro samotnou iniciaci signalizace. Membránové mikrodomény se podílí hlavně na regulaci rychlého seskupení signálních komplexů a jejich potřebné degradaci, napomáhají vzniku adekvátní buněčné odpovědi díky rychlé mobilizaci signálních molekul a stabilizaci signálních komplexů.

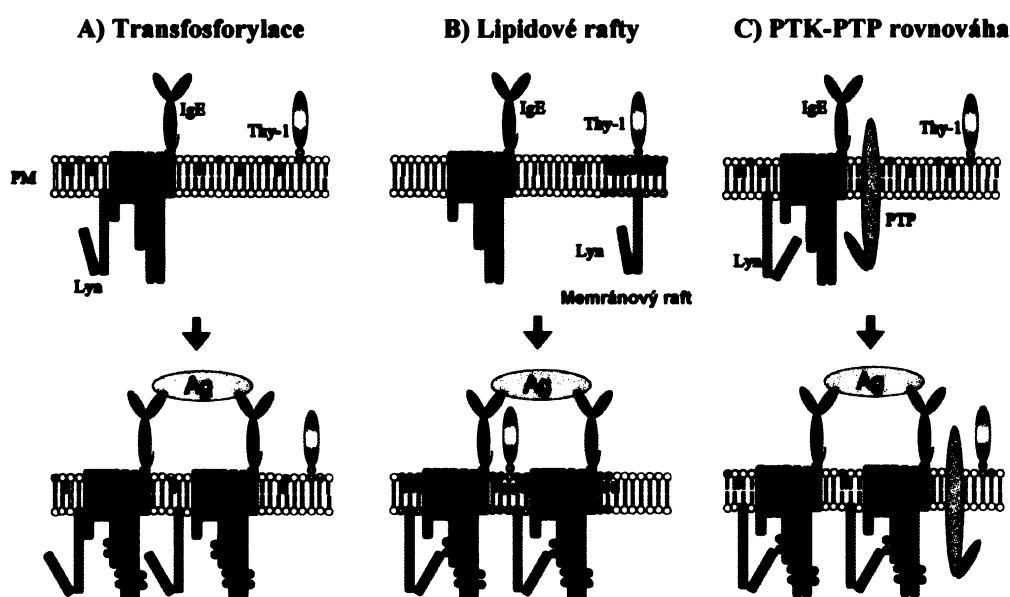
Zadruhé, většina nestimulovaných receptorů FcεRI je po detergentové solubilizaci v Tritonu X-100 lokalizována do vysokohustotních frakcí sacharosového gradientu. Po agregaci komplexů IgE-FcεRI polyvalentním antigenem dochází k přesunu receptorů z vysokehustotních do nízkohustotních frakcí (DRM). Ve stejných frakcích se nachází kinasa Lyn a další signalizační molekuly jako LAT a NTAL [54, 83, 94]. Model lipidových raftů předpokládá, že přesun receptorů do lipidových raftů je klíčovým mechanismem v iniciaci fosforylace. Po inkubaci buněk s pervanadátem dochází k fosforylaci FcεRI bez jeho translokace do DRM obsahujících molekuly Lyn. Protože pervanadát je známým inhibitorem PTP [78] tato data napovídají, že v membránách neaktivovaných buněk existuje regulovaná rovnováha mezi enzymatickou aktivitou PTK a PTP a receptory FcεRI jsou udržovány v nefosforylovaném stavu. Po inhibici PTP např. pervanadátem dochází k narušení této rovnováhy, která se přesune na stranu receptorové fosforylace. Za zmínku stojí, že regulační role PTP a ROS byla popsána během aktivace i jiných MIRR receptorů [111]. Tato studie však poprvé ukazuje, že po inkubaci buněk s pervanadátem nedochází k agregaci FcεRI, ani asociaci s DRM obsahujícími Lyn.

Zatřetí, transfosforylační model předpokládá preasociaci FcεRI a Lyn u nestimulovaných buněk. Po detergentové solubilizaci se však téměř veškerá Lyn kinasa nachází ve frakcích DRM, zatímco molekuly FcεRI lokalizují do frakcí, které neodpovídají DRM [94]. Tyto poznatky vylučují možnou asociaci Lyn s FcεRI u klidových buněk. Jsou

však v kontrastu s ultrastrukturální analýzou Lyn kinasou a FcεRI, kdy byla nalezena frakce Lyn preasociovaná s FcεRI [52]. Takové nesrovnalosti by mohly být následkem detergentového rozrušení komplexů Lyn a FcεRI při izolaci DRM. Získaná data naznačují, že k aktivaci receptorů způsobené pervanadátem dochází odlišným mechanismem a model iniciace signalizace by měl zohledňovat roli PTP.

Výsledky nasvědčují tomu, že v plasmatické membráně se nachází předpřipravené komplexy FcεRI, Lyn a PTP. Před aktivací je udržována jen minimální fosforylace receptoru v důsledku rovnováhy mezi Lyn a PTP. Při vystavení buněk působení pervanadátu je inhibována enzymová aktivita PTP a dochází k porušení fosforylační rovnováhy. Receptory jsou pak fosforylovány Lyn kinasou asociovanou s FcεRI.

Nový model FcεRI signalizace (viz obr. 6.1C) zohledňuje roli PTP. Prvním krokem v signalizace FcεRI je podle tohoto modelu inaktivace PTP. K inaktivaci PTP v blízkosti FcεRI by mohlo docházet působením ROS, ale důležitou roli může mít i faktor dostupnosti substrátu pro PTP a PTK.



Obr. 6.1: Modely iniciace tyrosinové fosforylace receptorů FcεRI. Dva modely iniciace signalizace FcεRI (transfosforylační – A a model lipidových raftů - B) byly popsány v kap. 1.4.5. Nový model iniciace signalizace (C) popisuje mechanismus, kdy jsou receptory FcεRI v klidovém stavu asociovány jak s malou frakcí membránové PTK Lyn, která je odpovědná za iniciační fosforylaci podjednotek β a γ receptoru FcεRI, tak s PTP. Mezi enzymovou aktivitou PTK a PTP existuje rovnováha a klidové receptory jsou udržovány v nefosforylovaném stavu. Po aktivaci receptorů dochází k narušení rovnováhy ve prospěch receptorové fosforylace a tím je iniciována signální dráha FcεRI.

V tuto chvíli není známo, které konkrétní druhy PTP jsou v rovnováze s Lyn kinasou odpovědnou za iniciační fosforylaci FcεRI.

Nedávno publikovaná data indikují, že ROS nemají vliv na signalizaci žírných buněk, protože genetická nebo farmakologická inhibice produkce ROS neinhibuje signalizaci přes FcεRI [112]. Tyto poznatky však nevylučují možnou roli PTP jako molekul nastavujících úroveň iniciační fosforylace podjednotek receptorů FcεRI. Regulační role PTP při iniciaci fosforylace může mít i takový charakter, kdy po dimerizaci nebo oligomerizaci receptorů může docházet ke změnám v orientaci receptorových ITAM a tyto změny mohou umožňovat nebo znesnadňovat přístup PTK nebo PTP k ITAM receptoru. Zbývající otázkou je, jakým přesným mechanismem dochází k inaktivaci PTP. Tento model je přístupný dalšímu ověřování v experimentech, které jsou připravovány v laboratoři.

7 ZÁVĚRY

- Při studiu metodických aspektů aplikace transmisní elektronové mikroskopie (TEM) při analýze topografie membránových molekul byla věnována pozornost přípravě konjugátů 5 nm koloidního zlata se streptavidinem. Bylo zjištěno, že tyto konjugáty se specificky vážaly na biotinylovanou protilátku, ale tvořily agregáty. Další optimalizace postupu přípravy bude zaměřena na odstranění těchto agregátů. Pro účely studia topografie membránových molekul byl také připraven konstrukt pro stabilní lentivirální expresi fúzních proteinů s připojeným c-Myc epitopem na N-konci. V dalším postupu bude optimalizován tento detekční systém, který je nezávislý na kvalitních protilátkách proti studovaným proteinům.
- Byla poprvé určena topografie receptoru Kit, který je na membráně žírných buněk distribuován v malých klastrech. Po aktivaci ligandem pro Kit (SCF) nedochází ke vzniku větších signalizačních domén a nebyla zjištěna kolokalizace receptoru Kit s adaptorovými proteiny LAT nebo NTAL. Rovněž kolokalizace Kit s receptory FcεRI nebyla zjištěna. Výsledky naznačují, že membránová signalizace receptoru Kit probíhá v malých membránových mikrodoménách. Tyto výsledky nevylučují přímou nebo nepřímou interakci s NTAL; je možné, že se jedná o vysoce dynamický děj, kdy interakce obou molekul nemusí být zachytitelná pomocí TEM.
- Na základě dat získaných při studiu topografie receptorů FcεRI v rané fázi buněčné aktivace byl navržen nový model iniciace tyrosinové fosforylace receptorů. Tento model zohledňuje významnou roli protein-tyrosinfosfatas (PTP) při iniciaci fosforylace, která je následkem změn v rovnováze enzymatických aktivit PTP a protein-tyrosinkinas (PTK) asociovaných s FcεRI; rovnováha mezi enzymovými aktivitami PTK a PTP odpovídá za stupeň tyrosinové fosforylace receptoru. Úloha lipidových raftů v novém modelu je omezena na jejich potenciální uplatnění při rychlém seskupování a stabilizaci signalizačních komplexů a jejich následné degradaci.

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. Voet, D., Voet, J.: *Biochemistry*. Wiley, New York (2004)
2. Sprong, H., van der Sluijs, P., van Meer, G., *How proteins move lipids and lipids move proteins*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 504-513 (2001)
3. Martens, S., McMahon, H. T., *Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 543-556 (2008)
4. Skwarek, L. C., Boulianne, G. L., *Great Expectations for PIP: Phosphoinositides as Regulators of Signaling During Development and Disease*. *Dev. Cell* **16**: 12-20 (2009)
5. Singer, S. J., Nicolson, G. L., *The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes*. *Science* **175**: 720-731 (1972)
6. Lee, A. G., Birdsall, N. J. M., Metcalfe, J. C., Toon, P. A., Warren, G. B., *Clusters in lipid bilayers and the interpretation of thermal effects in biological membranes*. *Biochemistry* **13**: 3699-3705 (1974)
7. Karnovsky, M. J., Kleinfeld, A. M., Hoover, R. L., Klausner, R. D., *The concept of lipid domains in membranes*. *J. Cell Biol.* **94**: 1-6 (1982)
8. Rietveld, A., Simons, K., *The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts*. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1376**: 467-479 (1998)
9. Marguet, D., Lenne, P.-F., Rigneault, H., He, H.-T., *Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order*. *EMBO J.* **25**: 3446-3457 (2006)
10. Brown, D. A., Rose, J. K., *Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface*. *Cell* **68**: 533-544 (1992)
11. Simons, K., Toomre, D., *Lipid rafts and signal transduction*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**: 31-39 (2000)
12. Cinek, T., Hořejší, V., *The nature of large noncovalent complexes containing glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases*. *J. Immunol.* **149**: 2262-2270 (1992)
13. Dráberová, L., Dráber, P., *Thy-1 glycoprotein and src-like protein-tyrosine kinase p53/p56lyn are associated in large detergent-resistant complexes in rat basophilic leukemia cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 3611-3615 (1993)

14. Cerneus, D. P., Ueffing, E., Posthuma, G., Strous, G. J., van der Ende, A., *Detergent insolubility of alkaline phosphatase during biosynthetic transport and endocytosis. Role of cholesterol.* J. Biol. Chem. **268**: 3150-3155 (1993)
15. Simons, K., Ikonen, E., *Functional rafts in cell membranes.* Nature **387**: 569-572 (1997)
16. Hancock, J. F., *Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **7**: 456-462 (2006)
17. Pike, L. J., *The challenge of lipid rafts.* J. Lipid Res. **50**: 323-328 (2008)
18. Swamy, M. J., Ciani, L., Ge, M., Smith, A. K., Holowka, D., Baird, B., Freed, J. H., *Coexisting domains in the plasma membranes of live cells characterized by spin-label ESR spectroscopy.* Biophys. J. **90**: 4452-4465 (2006)
19. Pike, L. J., *Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function.* J. Lipid Res. **47**: 1597-1598 (2006)
20. Viola, A., Gupta, N., *Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins.* Nat. Rev. Immunol. **7**: 889-896 (2007)
21. Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z., Lisanti, M. P., *Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells.* J. Cell Biol. **122**: 789-807 (1993)
22. Smotryz, J. E., Linder, M. E., *Palmitoylation of intracellular signaling proteins: Regulation and Function.* Annu. Rev. Biochem. **73**: 559-587 (2004)
23. Munro, S., *An investigation of the role of transmembrane domains in golgi protein retention.* EMBO J. **14**: 4695-4704 (1995)
24. Yamabhai, M., Anderson, R. G. W., *Second cysteine-rich region of epidermal growth factor receptor contains targeting information for caveolae/rafts.* J. Biol. Chem. **277**: 24843-24846 (2002)
25. Scheiffele, P., Roth, M. G., Simons, K., *Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain.* EMBO J. **16**: 5501-5508 (1997)
26. Crossthwaite, A. J., Seebacher, T., Masada, N., Ciruela, A., Dufraux, K., Schultz, J. E., Cooper, D. M. F., *The cytosolic domains of Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclases dictate their targeting to plasma membrane lipid rafts.* J. Biol. Chem. **280**: 6380-6391 (2004)

27. Tanimura, N., Saitoh, S.-i., Kawano, S., Kosugi, A., Miyake, K., *Palmitoylation of LAT contributes to its subcellular localization and stability*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**: 1177-1183 (2006)
28. Wilson, B. S., Steinberg, S. L., Liederman, K., Pfeiffer, J. R., Surviladze, Z., Zhang, J., Samelson, L. E., Yang, L.-H., Kotula, P. G., Oliver, J. M., *Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes*. *Mol. Biol. Cell* **15**: 2580-2592 (2004)
29. Prior, I. A., Hancock, J. F., *Compartmentalization of Ras proteins*. *J. Cell Sci.* **114**: 1603-1608 (2001)
30. Chichili, G., Rodgers, W., *Cytoskeleton–membrane interactions in membrane raft structure*. *Cell. Mol. Life Sci.* DOI 10.1007/s00018-009-0022-6 (2009)
31. Lillemeier, B. r. F., Pfeiffer, J. R., Surviladze, Z., Wilson, B. S., Davis, M. M., *Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 18992-18997 (2006)
32. Holowka, D., Gosse, J. A., Hammond, A. T., Han, X., Sengupta, P., Smith, N. L., Wagenknecht-Wiesner, A., Wu, M., Young, R. M., Baird, B., *Lipid segregation and IgE receptor signaling: A decade of progress*. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **1746**: 252-259 (2005)
33. Pike, L. J., *Lipid rafts: heterogeneity on the high seas*. *Biochem. J.* **378**: 281-292 (2004)
34. Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., Simons, K., *Resistance of cell membranes to different detergents*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 5795-5800 (2003)
35. Lichtenberg, D., Goni, F. M., Heerklotz, H., *Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts*. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 430-436 (2005)
36. Field, K. A., Holowka, D., Baird, B., *Structural aspects of the association of FcεRI with detergent-resistant membranes*. *J. Biol. Chem.* **274**: 1753-1758 (1999)
37. Lingwood, D., Simons, K., *Detergent resistance as a tool in membrane research*. *Nat. Protoc.* **2**: 2159-2165 (2007)
38. Surviladze, Z., Dráberová, L., Kovářová, M., Boubelík, M., Dráber, P., *Differential sensitivity to acute cholesterol lowering of activation mediated via the high-affinity IgE receptor and Thy-1 glycoprotein*. *Eur. J. Immunol.* **31**: 1-10 (2001)

39. Mahammad, S., Parmryd, I., *Cholesterol homeostasis in T cells. Methyl- β -cyclodextrin treatment results in equal loss of cholesterol from Triton X-100 soluble and insoluble fractions.* Biochim. Biophys. Acta, Biomembr. **1778**: 1251-1258 (2008)
40. Pizzo, P., Giurisato, E., Tassi, M., Benedetti, A., Pozzan, T., Viola, A., *Lipid rafts and T cell receptor signaling: a critical re-evaluation.* Eur. J. Immunol. **32**: 3082-3091 (2002)
41. Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C., Jahn, R., *SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis.* EMBO J. **20**: 2202-2213 (2001)
42. Kwik, J., Boyle, S., Fooksman, D., Margolis, L., Sheetz, M. P., Edidin, M., *Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **100**: 13964-13969 (2003)
43. Oh, P., Schnitzer, J. E., *Immunoisolation of caveolae with high affinity antibody binding to the oligomeric caveolin cage.* J. Biol. Chem. **274**: 23144-23154 (1999)
44. Surviladze, Z., Harrison, K. A., Murphy, R. C., Wilson, B. S., *Fc ϵ RI and Thy-1 domains have unique protein and lipid compositions.* J. Lipid Res. **48**: 1325-1335 (2007)
45. Nebl, T., Pestonjamas, K. N., Leszyk, J. D., Crowley, J. L., Oh, S. W., Luna, E. J., *Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes.* J. Biol. Chem. **277**: 43399-43409 (2002)
46. Parton, R. G., Hancock, J. F., *Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras.* Trends in Cell Biology **14**: 141-147 (2004)
47. Miyawaki, A., *Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling.* Dev. Cell **4**: 295-305 (2003)
48. Reits, E. A. J., Neefjes, J. J., *From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells.* Nat. Cell Biol. **3**: 145-147 (2001)
49. Rao, M., Mayor, S., *Use of Förster's resonance energy transfer microscopy to study lipid rafts.* Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res. **1746**: 221-233 (2005)
50. Chiantia, S., Ries, J., Schwille, P., *Fluorescence correlation spectroscopy in membrane structure elucidation.* Biochim. Biophys. Acta, Biomembr. **1788**: 225-233 (2009)

51. Sanan, D. A., Anderson, R. G. W., *Simultaneous visualization of LDL receptor distribution and clathrin lattices on membranes torn from the upper surface of cultured cells*. *J. Histochem. Cytochem.* **39**: 1017–1024 (1991)
52. Wilson, B. S., Pfeiffer, J. R., Oliver, J. M., *Observing FcεRI signaling from the inside of the mast cell membrane*. *J. Cell Biol.* **149**: 1131-1142 (2000)
53. Heneberg, P., Lebduška, P., Dráberová, L., Korb, J., Dráber, P., *Topography of plasma membrane microdomains and its consequences for mast cell signaling*. *Eur. J. Immunol.* **36**: 2795-2806 (2006)
54. Volná, P., Lebduška, P., Dráberová, L., Šímová, Š., Heneberg, P., Boubelík, M., Bugajev, V., Malissen, B., Wilson, B. S., Hořejší, V., Malissen, M., Dráber, P., *Negative regulation of mast cell signaling and function by the adaptor LAB/NTAL*. *J. Exp. Med.* **200**: 1001-1013 (2004)
55. Hancock, J. F., Prior, I. A., *Electron microscopic imaging of Ras signaling domains*. *Methods* **37**: 165-172 (2005)
56. Prior, I. A., Muncke, C., Parton, R. G., Hancock, J. F., *Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains*. *J. Cell Biol.* **160**: 165-170 (2003)
57. Frankel, D. J., Pfeiffer, J. R., Surviladze, Z., Johnson, A. E., Oliver, J. M., Wilson, B. S., Burns, A. R., *Revealing the topography of cellular membrane domains by combined atomic force microscopy/fluorescence imaging*. *Biophys. J.* **90**: 2404-2413 (2006)
58. Hořejší, V., Bartůňková, J. T.: *Základy imunologie*. Triton, Praha (2005)
59. Galli, S. J., Tsai, M., Piliponsky, A. M., *The development of allergic inflammation*. *Nature* **454**: 445–454 (2008)
60. Metcalfe, D. D., *Mast cells and mastocytosis*. *Blood* **112**: 946-956 (2008)
61. Galinsky, D. S. T., Nechushtan, H., *Mast cells and cancer - no longer just basic science*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **68**: 115-130 (2008)
62. Pejler, G., Abrink, M., Ringvall, M., Wernersson, S., *Mast cell proteases*. *Adv. Immunol.* **95**: 167-255 (2007)
63. Kalesnikoff, J., Galli, S. J., *New developments in mast cell biology*. *Nat. Immunol.* **9**: 1215-1223 (2008)

64. Gilfillan, A., Peavy, R., Metcalfe, D., *Amplification mechanisms for the enhancement of antigen-mediated mast cell activation*. Immunologic Research 43: 15-24 (2009)
65. Sigalov, A., *Multi-chain immune recognition receptors: spatial organization and signal transduction*. Seminars in Immunology 17: 51-64 (2005)
66. Haddad, J. J., *Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 297: 700-713 (2002)
67. Sudol, M., *From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the protein recognition code*. Nat. Oncogene 17: 1469-1474 (1998)
68. Gilfillan, M. A., Rivera, J., *The tyrosine kinase network regulating mast cell activation*. J. Immunol. 228: 149-169 (2009)
69. Engen, J., Wales, T., Hochrein, J., Meyn, M., Banu Ozkan, S., Bahar, I., Smithgall, T., *Structure and dynamic regulation of Src-family kinases*. Cell. Mol. Life Sci. 65: 3058-3073 (2008)
70. Kovářova, M., Tolar, P., Arudchandran, R., Dráberová, L., Rivera, J., Dráber, P., *Structure-function analysis of lyn kinase association with lipid rafts and initiation of early signaling events after FcεRI aggregation*. Mol. Cell. Biol. 21: 8318-8328 (2001)
71. Yuzawa, S., Opatowsky, Y., Zhang, Z., Mandiyan, V., Lax, I., Schlessinger, J., *Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor*. Cell 130: 323-334 (2007)
72. Roskoski, R., *Signaling by Kit protein-tyrosine kinase - The stem cell factor receptor*. Biochem. Biophys. Res. Commun 337: 1-13 (2005)
73. Sun, H., Tonks, N. K., *The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling*. Trends Biochem. Sci. 19: 480-485 (1994)
74. Andersen, J. N., Mortensen, O. H., Peters, G. H., Drake, P. G., Iversen, L. F., Olsen, O. H., Jansen, P. G., Andersen, H. S., Tonks, N. K., Moller, N. P. H., *Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains*. Mol. Cell. Biol. 21: 7117-7136 (2001)
75. van der Wijk, T., Overvoorde, J., den Hertog, J., *H₂O₂-induced intermolecular disulfide bond formation between receptor protein-tyrosine phosphatases*. J. Biol. Chem. 279: 44355-44361 (2004)

76. Denu, J. M., Tanner, K. G., *Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide; evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation.* *Biochemistry* **37**: 5633-5642 (1998)
77. Persson, C., Kappert, K., Engström, U., Östman, A., Sjöblom, T., *An antibody-based method for monitoring in vivo oxidation of protein tyrosine phosphatases.* *Methods* **35**: 37-43 (2005)
78. Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsaprailis, G., Gresser, M. J., Ramachandran, C., *Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate.* *J. Biol. Chem.* **272**: 843-851 (1997)
79. Mikalsen, S. O., Kaalhus, O., *Properties of pervanadate and permolybdate. connexin43, phosphatase inhibition, and thiol reactivity as model systems.* *J. Biol. Chem.* **273**: 10036-10045 (1998)
80. Teshima, R., Ikebuchi, H., Nakanishi, M., Sawada, J., *Stimulatory effect of pervanadate on calcium signals and histamine secretion of RBL-2H3 cells.* *Biochem. J.* **302**: 867-874 (1994)
81. Myung, P. S., Boerthe, N. J., Koretzky, G. A., *Adapter proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling.* *Curr. Opin. Immunol.* **12**: 256-266 (2000)
82. Rivera, J., *Molecular adapters in FcεRI signaling and the allergic response.* *Curr. Opin. Immunol.* **14**: 688-693 (2002)
83. Brdička, T., Imrich, M., Angelisová, P., Brdičková, N., Horváth, O., Špička, J., Hilgert, I., Lusková, P., Dráber, P., Novák, P., Engels, N., Wienands, J., Simeoni, L., Osterreicher, J., Aguado, E., Malissen, M., Schraven, B., Hofejši, V., *Non-T Cell Activation Linker (NTAL): A transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling.* *J. Exp. Med.* **196**: 1617-1626 (2002)
84. Iwaki, S., Jensen, B. M., Gilfillan, A. M., *NTAL/LAB/LAT2.* *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**: 868-873 (2007)
85. Perez-Montfort, R., Kinet, J. P., Metzger, H., *A previously unrecognized subunit of the receptor for immunoglobulin.* *Biochemistry* **22**: 5722-5728 (1983)
86. Kinet, J.-P., *The high-affinity IgE receptor (FcεRI): From physiology to pathology.* *Annu. Rev. Immunol.* **17**: 931-972 (1999)
87. Kihara, H., Siraganian, R. P., *Src homology 2 domains of Syk and Lyn bind to tyrosine-phosphorylated subunits of the high affinity IgE receptor.* *J. Biol. Chem.* **269**: 22427-22432 (1994)

88. Goldsby, A. R., Kindt, J. T., Osborne, A. B.: *Immunology*. W. H. Freeman, New York (2004)
89. Pribluda, S. V., Pribluda, C., Metzger, H., *Transphosphorylation as the mechanism by which the high-affinity receptor for IgE is phosphorylated upon aggregation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **91**: 11246-11250 (1994)
90. Vonakis, B. M., Chen, H., Haleem-Smith, H., Metzger, H., *The unique domain as the site on Lyn kinase for its constitutive association with the high affinity receptor for IgE*. J. Biol. Chem. **272**: 24072-24080 (1997)
91. Vonakis, B. M., Gibbons, S. P., Rotte, M. J., Brothers, E. A., Kim, S. C., Chichester, K., MacDonald, S. M., *Regulation of rat basophilic leukemia-2H3 mast cell secretion by a constitutive Lyn kinase interaction with the high affinity IgE receptor (FcεRI)*. J. Immunol. **175**: 4543-4554 (2005)
92. Sil, D., Lee, J. B., Luo, D., Holowka, D., Baird, B., *Trivalent ligands with rigid DNA spacers reveal structural requirements for IgE receptor signaling in RBL mast cells*. ACS Chem. Biol. **2**: 674-684 (2007)
93. Field, K. A., Holowka, D., Baird, B., *FcεRI-mediated recruitment of p53/56lyn to detergent-resistant membrane domains accompanies cellular signaling*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **92**: 9201-1205 (1995)
94. Sheets, E. D., Holowka, D., Baird, B., *Critical role for cholesterol in Lyn-mediated tyrosine phosphorylation of FcεRI and their association with detergent-resistant membranes*. J. Cell Biol. **145**: 877-887 (1999)
95. Dráberová, L., Lebduška, P., Hálová, I., Tolar, P., Scarontokrová, J., Tolarová, H., Korb, J., Dráber, P., *Signaling assemblies formed in mast cells activated via FcεRI dimers*. Eur. J. Immunol. **34**: 2209-2219 (2004)
96. Weibrecht, I., Bohmer, S. A., Dagnell, M., Kapert, K., Ostman, A., Bohmer, F. D., *Oxidation sensitivity of the catalytic cysteine of the protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2*. Free Radic. Biol. Med. **43**: 100-110 (2007)
97. Ashman, L. K., *The biology of stem cell factor and its receptor c-Kit*. Int. J. Biochem. Cell Biol. **31**: 1037-1051 (1999)
98. Jahn, T., Leifheit, E., Gooch, S., Sindhu, S., Weinberg, K., *Lipid rafts are required for Kit survival and proliferation signals*. Blood **110**: 1739-1747 (2007)

99. Hundley, T. R., Gilfillan, A. M., Tkaczyk, C., Andrade, M. V., Metcalfe, D. D., Beaven, M. A., *Kit and FcεRI mediate unique and convergent signals for release of inflammatory mediators from human mast cells.* *Blood* **104**: 2410-2417 (2004)
100. Jensen, B. M., Beaven, M. A., Iwaki, S., Metcalfe, D. D., Gilfillan, A. M., *Concurrent inhibition of Kit- and FcεRI-mediated signaling: Coordinated suppression of mast cell activation.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **324**: 128-138 (2008)
101. Tkaczyk, C., Hořejší, V., Iwaki, S., Dráber, P., Samelson, L. E., Satterthwaite, A. B., Nahm, D.-H., Metcalfe, D. D., Gilfillan, A. M., *NTAL phosphorylation is a pivotal link between the signaling cascades leading to human mast cell degranulation following Kit activation and FcεRI aggregation.* *Blood* **104**: 207-214 (2004)
102. Iwaki, S., Špička, J., Tkaczyk, C., Jensen, B. M., Furumoto, Y., Charles, N., Kovářova, M., Rivera, J., Hořejší, V., Metcalfe, D. D., Gilfillan, A. M., *Kit- and FcεRI-induced differential phosphorylation of the transmembrane adaptor molecule NTAL/LAB/LAT2 allows flexibility in its scaffolding function in mast cells.* *Cellular Signalling* **20**: 195-205 (2008)
103. Gilfillan, A. M., Tkaczyk, C., *Integrated signalling pathways for mast-cell activation.* *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 218-230 (2006)
104. Philimonenko, A. A., Janáček, J., Hozák, P., *Statistical evaluation of colocalization patterns in immunogold labeling experiments.* *Journal of Structural Biology* **132**: 201-210 (2000)
105. Ripley, B. D.: *Spatial Statistics.* Wiley, New York (1980)
106. Lebduška, P., Korb, J., Tůmová, M., Heneberg, P., Dráber, P., *Topography of signaling molecules as detected by electron microscopy on plasma membrane sheets isolated from non-adherent mast cells.* *J. Immunol. Methods* **328**: 139-151 (2007)
107. Tsujimura, T., Furitsu, T., Morimoto, M., Kanayama, Y., Nomura, S., Matsuzawa, Y., Kitamura, Y., Kanakura, Y., *Substitution of an aspartic acid results in constitutive activation of c-Kit receptor tyrosine kinase in a rat tumor mast cell line RBL-2H3.* *Int. Arch. Allergy Immunol.* **106**: 377-385 (1995)
108. Sharma, P., Varma, R., Sarasij, R. C., Ira, Gousset, K., Krishnamoorthy, G., Rao, M., Mayor, S., *Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes.* *Cell* **116**: 577-589 (2004)

109. Andrews, N. L., Lidge, K. A., Pfeiffer, J. R., Burns, A. R., Wilson, B. S., Oliver, J. M., Lidge, D. S., *Actin restricts FcεRI diffusion and facilitates antigen-induced receptor immobilization*. Nat. Cell Biol. **10**: 955-963 (2008)
110. Jacobson, K., Mouritsen, O. G., Anderson, R. G. W., *Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics*. Nat. Cell Biol. **9**: 7-14 (2007)
111. Reth, M., *Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation*. Nat. Immunol. **3**: 1129-1134 (2002)
112. Swindle, E. J., Coleman, J. W., DeLeo, F. R., Metcalfe, D. D., *FcεRI- and Fcγ receptor-mediated production of reactive oxygen species by mast cells is lipoxygenase- and cyclooxygenase-dependent and NADPH oxidase-independent*. J. Immunol. **179**: 7059-7071 (2007)
113. Rivera, J., Kinet, J. P., Kim, J., Pucillo, C., Metzger, H., *Studies with a monoclonal antibody to the beta subunit of the receptor with high affinity for immunoglobulin E*. Mol. Immunol. **25**: 647-661 (1988)
114. Liu, F. T., Bohn, J. W., Ferry, E. L., Yamamoto, H., Molinaro, C. A., Sherman, L. A., Klinman, N. R., Katz, D. H., *Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody: preparation, isolation, and characterization*. J. Immunol. **124**: 2728-2737 (1980)