

ABSTRACT (CZ)

Tato disertační práce je zaměřena na dva důležité regulátory signalizace žírných buněk. Prvním z nich je komplex vysoce afinního receptoru pro imunoglobulin E (IgE) (FcεRI), který se podílí na získaných (adaptivních) imunitních odpovědích a druhý je stromální interakční molekula 1 (STIM1), která monitoruje hladiny vápníku v endoplasmickém retikulu (ER) a po uvolnění Ca^{2+} z ER se podílí na otevření vápníkovým uvolněním aktivovaných vápníkových (CRAC) kanálů.

I když je struktura FcεRI známa již mnoho let a byla popsána řada molekul asociovaných s tímto receptorem, přesný molekulární mechanismus zahájení a ukončení FcεRI signalizace zůstává nejasný. V této studii jsme vyhodnotili dosavadní poznatky o molekulárních mechanismech iniciace fosforylace FcεRI s důrazem na nově popsaný model, podle kterého vzájemné interakce mezi protein tyrosin fosfatázami (PTPs) a protein tyrosin kinázami (PTKs) nastaví práh tyrosinové fosforylace FcεRI (PTK-PTP interakční model). Dále jsme rozšířili poznatky týkající se topografie fosfatáz citlivých k oxidaci po stimulaci FcεRI v rámci klastrů transmembrálních adaptorových proteinů: T buňky neaktivující „linker“ (NTAL) a „linker“ aktivovaných T lymfocytů (LAT).

Žírné buňky původem z kostní dřene (BMDC) jsme použili jako modelový systém pro získání nových poznatků o vzájemné lokalizaci STIM1 s mikrotubulovými filamenty a pohybu STIM1 závislém na pohybu mikrotubulů, který reflektoval přímou komunikaci mezi STIM1 a proteinem sledujícím plus-konce mikrotubulů, EB1. Abychom určili, zda STIM1 reguluje organizaci mikrotubulů v závislosti na vápníku připravili jsme BMDCs se sníženou expresí STIM1. V souladu s očekáváním jsme zjistili, že buňky se sníženou expresí STIM1 mají po aktivaci narušenou vápníkovou signalizaci, a že de-novo reorganizace mikrotubulů byla inhibovaná. Překvapivě, v buňkách ovlivněných inhibitorem polymerace mikrotubulů (nocodazolem) nebyla narušena translokace STIM1 do oblastí přiblížení ER/plazmatické membrány a aktivace CRAC kanálů nebyla narušena. Vzájemná interakce mezi mikrotubuly a STIM1 byla detailně analyzována sledováním změn v reorganizaci mikrotubulů BMDCs po jejich aktivaci různými podněty (antigenem, thapsigarginem nebo pervanadátem). Aktivace buněk přisedlých přes fibronectin na podložní sklička vedla k tvorbě mikrotubulových výčnělků. Tento doposud neznámý fenotyp žírných buněk vyžadoval integrínovou kostimulaci. Přítomnost STIM1 ve výčnělcích naznačuje, že lokální vápníková signalizace může hrát roli při tvorbě mikrotubulových výběžků.

Významné úsilí bylo také zaměřeno na přípravu nových monoklonálních a polyklonálních protilátek proti STIM1 a vývoji nových polymerázových řetězových reakčních (PCR) směsí vhodných pro amplifikaci DNA fragmentů z krve anebo GC-bohatých templátů. Výstupy z těchto projektů jsou buď komerčně dostupné produkty (anti-STIM1 monoklonální protilátka), nebo jsou v procesu přípravy pro komerční využití (nové kvantitativní PCR směsi).