

ABSTRACT (CZ)

Tato dizertační práce se zaměřuje především na pochopení regulačních úloh transmembránových adaptorových proteinů NTAL („non-T cell activation linker“) a PAG („phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains“) v aktivaci myších žírných buněk. V odborné literatuře existují protikladné studie o úloze proteinu NTAL v aktivační dráze vysoce afinního receptoru pro imunoglobulin E (IgE) (FcεRI). Studie prováděné na žírných buňkách připravených z myši s genovým knockoutem NTALu naznačují, že NTAL je negativní regulátor FcεRI signalizace, zatímco experimenty provedené na lidských žírných buňkách a buňkách bazofilní leukemie potkana s potlačenou expresí proteinu NTAL mu připisují pozitivní regulační roli.

Abychom pochopili zapojení proteinu NTAL v FcεRI zprostředkované signalizaci v myších žírných buňkách a určili, zda různé metodiky delece NTALu mají různé fyziologické následky, použili jsme široké spektrum testů. Jako model jsme použili žírné buňky odvozené z kostní dřeně (BMMC) a připravili jsme BMMC z myši NTAL divokého typu („wild type“) a myši s genovým knockoutem NTALu. Pomocí lentivirových vektorů jsme transdukovali část buněk divokého typu vektorem nesoucím NTAL shRNA („short hairpin RNA“) pro generování buněk s potlačenou expresí NTALu („knockdown“) nebo prázdným vektorem pro přípravu negativní kontroly. Srovnání všech čtyř skupin připravených buněk v našich testech ukázalo, že oba typy NTAL-deficitních BMMC vykazovaly zvýšenou degranulaci, mobilizaci vápníku, chemotaxi, fosforylaci tyrosinu molekul LAT („linker for activation of T cells“) a ERK a depolymeraci filamentárního aktinu. Tyto výsledky prokazují, že NTAL je negativní regulátor FcεRI zprostředkovaných aktivačních dějů v myších BMMC a to nezávisle na případných kompenzačních mechanismech během vývoje.

Abychom získali další pohled na navazující signalizační děje související s proteinem NTAL, zabývali jsme se transkripčními profily získanými z aktivovaných a neaktivovaných všech čtyř typů připravených BMMCs. Prostřednictvím transkripční analýzy jsme identifikovali několik genů, které byly rozdílně regulované v neaktivovaných a antigenem aktivovaných kontrolních a NTAL-deficitních buňkách. Další rozbor ukázal, že se část těchto genů účastní regulace dějů závislých na cholesterolu v chemotaxi zprostředkované antigenem. Získaná data naznačují multiregulační úlohu proteinu NTAL v genové expresi a fyziologii žírných buněk.

Dále jsme ukázali, že transmembránový adaptorový protein PAG má pozitivní i negativní regulační úlohu při aktivaci žírných buněk v závislosti na regulované signalizační dráze.

Protože obě studie vyžadovaly provedení řady analýz genové exprese pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR), část experimentů byla věnována také vývoji nových reakčních směsí (tzv. master mixů) s akcentem na amplifikaci obtížně amplifikovatelných fragmentů DNA. Zjistili jsme, že zásadního zlepšení lze dosáhnout u směsí s přídavkem 1 M 1,2-propandiolu a 0,2 M trehalózy. Tato reakční směs je nyní komerčně dostupná.

Na závěr jsme provedli recenzi nových přístupů k potlačení onemocnění zprostředkovaných žírnými buňkami nebo s nimi souvisejícími patologiemi. Hlavním zaměřením byly nedávno vyvinuté inhibitory intracelulárních signálních drah a jejich význam pro klinické studie.