

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

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

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

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Regulační úlohy proteinů PAG a CSK v FcεRI signalizaci žírných buněk

Regulatory roles of PAG and CSK in FcεRI signaling of mast cells

Lucie Potůčková

Školitel/Supervisor: RNDr. Petr Dráber, DrSc.

Oddělení signální transdukce
Ústav molekulární genetiky AV ČR

Praha, 2017

Abstrakt (CZ)

Tato disertační práce je zaměřena především na pochopení regulační úlohy C-terminální Src kinázy (CSK) a proteinu asociovaného s mikrodomény bohatými na glykosfingolipidy (PAG) v FcεRI zprostředkované signalizaci myších žírných buněk. FcεRI aktivace je zahájena agregací receptoru komplexem multivalentního antigenu s IgE a následnou aktivací protein tyrozin kináz, protein tyrozin fosfatáz a dalších molekul signální transdukce. Signalizační děje vedou k degranulaci žírných buněk a uvolnění prozánětlivých mediátorů zodpovědných za vznik alergických onemocnění. Poznání funkce klíčových regulačních molekul, které kontrolují FcεRI zprostředkovanou aktivaci, degranulaci a cytokinovou produkci žírných buněk, může mít terapeutický dopad.

CSK je hlavním negativním regulátorem protein tyrozin kináz z rodiny Src (SFKs), které hrají kritickou úlohu v různých imunoreceptorových dějích. Funkce CSK v žírných buňkách však není zcela objasněna. Předpokládá se, že CSK lokalizovaná v cytoplazmě je translokována do blízkosti membránově vázaných SFKs s využitím membránových adaptorových proteinů a PAG byl hlavním kandidátem. Pro určení úlohy proteinů CSK a PAG v FcεRI signalizaci jsme jako model použili žírné buňky odvozené z kostní dřeně (BMMC) myši divokého typu nebo myši deficientních v proteinu PAG (PAG-KO) nebo myši se sníženou expresí CSK (CSK-KD) nebo se sníženou expresí obou těchto proteinů (CSKKD/PAG-KO). Konkrétně jsme ukázali, že antigenem aktivované buňky s CSK-KD vykazují významně vyšší degranulaci, vápníkovou odpověď a chemotaxi. Překvapivě, PAG měl v těchto dějích opačnou úlohu a buňky s CSK-KD, stejně jako PAG-KO, vykazovaly narušenou fosforylaci transkripčního faktoru STAT5. To bylo pravděpodobně způsobeno zvýšenou enzymatickou aktivitou fosfatázy SHP-1, čímž docházelo k inhibici produkce prozánětlivých cytokinů a chemokinů. Naše výsledky také ukázaly odlišné zapojení adaptorových proteinů LAT a NTAL v CSK- nebo PAG-závislé signalizaci BMMC. Získané výsledky podporují hypotézu, že se CSK váže nejenom na PAG, ale také na jiné adaptorové proteiny, které mohou fungovat lépe než PAG pro lokalizaci CSK v blízkosti SFK, a tím efektivněji přispět k jejich inaktivaci. Na základě těchto výsledků jsme navrhli nový model souhry proteinů CSK a PAG v signalizaci žírných buněk.

Protože tyto studie vyžadovaly citlivou detekci různých cytokinů uvolněných z žírných buněk nebo jimi spotřebovávaných, byla část práce věnována vývoji takové metody. Ve spolupráci s dalšími laboratořemi, jsme tuto metodu, nazvanou nano-iPCR, použili pro detekci klinicky významných reportérů v mozkomíšním moku pacientů a srovnali ji s běžnými imunotesty využívající enzymově značené komplexy antigen-protilátka ukotvené na pevných nosičích (ELISAs).

Tuto metodu jsme také použili pro určení úlohy ORMDL3 proteinu v signalizaci žírných buněk. Klíčovým zjištěním bylo, že ORMDL3 je negativní regulátor produkce prozánětlivých cytokinů, přes AKT- NF-κB řízenou signální dráhu. Naše výsledky také ukázaly, že chemotaxe žírných buněk je regulována proteiny ORMDL3 a CD9. Dále jsme zkoumali vliv běžně používaného rozpouštědla etanolu a látky odstraňující membránový cholesterol, methyl-β-cyclodextrinu, na FcεRI signalizaci. Naše výsledky ukázaly, že etanol inhibuje funkci FcεRI signalozomu, a že cholesterol zde hraje nezastupitelnou úlohu. Tyto výsledky jsme potvrdili na myších *in vivo* s využitím testu pasivní kožní anafylaxe.

Abstract (EN)

This thesis is focused mainly on understanding mechanisms of regulatory roles of C-terminal Src kinase (CSK) and phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG) in the high-affinity IgE receptor (FcεRI)-mediated signalling of murine mast cells. FcεRI activation is initiated by aggregation of the receptor by complexes of multivalent antigen with IgE, followed by activation and enhanced activities of protein tyrosine kinases, phosphatases, adaptor proteins and number of other signal transduction molecules. The signaling events result in mast cell degranulation and release of variety of proinflammatory mediators, responsible for initiation of allergy and other inflammatory diseases. Understanding the function of key regulatory molecules controlling FcεRI-mediated mast cell activation, degranulation, and cytokines production could have therapeutic impact.

CSK is a major negative regulator of Src family tyrosine kinases (SFKs) that play a critical role in various immunoreceptor signaling events. However, its function in mast cell activation has not been completely understood. Because of its cytoplasmic localization, CSK was assumed to be brought to the vicinity of the plasma membrane-bound SFKs via binding to membrane-bound adaptors and PAG was a major candidate. To determine the roles of CSK and PAG in FcεRI signaling, we used as a model bone marrow-derived mast cells (BMMCs) from wild-type or PAG knockout (PAG-KO) mice with reduced amount of CSK (CSK-KD) or with reduced amount of both proteins (CSK-KD/PAG-KO). We found that antigen activated cells with CSK-KD exhibited significantly higher degranulation, calcium response and chemotaxis. Unexpectedly, PAG played an opposite role in these processes and cells with CSK-KD, similarly as PAG-KO, displayed impaired phosphorylation of the transcription factor STAT5. This was probably caused by enhanced enzymatic activity of Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1), which resulted in inhibition of proinflammatory cytokines and chemokines production. Our data also showed distinct involvement of adaptor proteins LAT and NTAL in CSK- or PAG-dependent signaling in BMMCs. Several lines of evidence suggested, that CSK binds not only to PAG, but also to some other anchors, which could serve better than PAG for positioning of CSK in the vicinity of SFKs and thus more efficiently contribute to their inactivation. Based on these data we postulated a new model of CSK-PAG interplay in mast cell activation.

Since these studies required sensitive detection of various cytokines released or utilized by mast cells, part of the thesis was dedicated to development of such assay. In collaborative studies we used this method, called nano-iPCR, for detection of clinically relevant markers in cerebrospinal fluid of patients and compared it with routinely used enzyme-link immunosorbent assays (ELISAs).

We also used this method for elucidating the role of ORMDL3 protein in mast cell signaling. The key finding was determination of ORMDL3 as a negative regulator of proinflammatory cytokines production, mediated via AKT and NF-κB-directed signaling pathways. Our results also showed that mast cell chemotaxis is regulated by ORMDL3 and CD9. Furthermore, we examined mode of action of widely used dissolving agent, ethanol, and cellular cholesterol remover, methyl-β-cyclodextrin, on FcεRI activation. Our data indicated that ethanol has an inhibitory effect on function of FcεRI signalosomes in which cholesterol plays an indispensable role. These data were corroborated in mice *in vivo* using passive cutaneous anaphylaxis.

1. Úvod

Žírné buňky vznikají z hematopoetických kmenových buněk a jako nezralé prekurzory migrují krví do cílových periferních tkání, kde dochází k jejich dozrávání pod vlivem lokálních faktorů [1]. Žírné buňky jsou charakteristické obsahem velkých cytoplazmatických granul obsahujících biologicky aktivní látky, které se rychle uvolňují po aktivaci buněk procesem zvaným degranulace [2]. Funkce žírných buněk zahrnuje různé fyziologické a patofyziologické procesy, jako jsou imunoglobulinem E (IgE) zprostředkované alergie, autoimunitní poruchy, astma a další zánětlivá onemocnění [3].

Aktivace žírných buněk je zahájena prokřížením komplexu IgE a vysokoafinitního receptoru pro IgE, (FcεRI), multivalentním antigenem, čímž dochází k tyrosinové fosforylaci imunoreceptorových aktivačních motivů (ITAMs) umístěných na cytoplasmatickém konci FcεRI β a γ podjednotek. Tuto fosforylaci zprostředkovává LYN kináza. Fosforylované ITAMs obou podjednotek poskytují vysokoafinitní vazebná místa pro navázání dalších kináz LYN a SYK, které obratem fosforylují řadu cílových molekul jako jsou transmembránové adaptorové proteiny LAT, NTAL and PAG. Klíčovou úlohou adaptorových proteinů je distribuce signálních drah vedoucích k uvolnění cytoplasmatického vápníku, degranulaci, aktivaci transkripčních faktorů a produkci cytokinů [4]. Adaptor PAG je všudypřítomný protein s vysokou expresí v buňkách imunitního systému. V žírných buňkách je PAG fosforylován po aktivaci antigenem kinázou LYN, zatímco u T buněk je fosforylován kinázou FYN. Fosforylovaný PAG může poté vázat C-terminální Src kinázu (CSK), a tím umožnit její lokalizaci do přímé blízkosti membránově vázaných kináz z rodiny Src (SFKs) [5]. Klíčovou funkcí CSK je specifická fosforylace tyrozinových zbytků lokalizovaných na C-terminálním konci SFKs, která vede k jejich inaktivaci [6]. Negativní regulační funkce a nepostradatelnost CSK byla znárodněna u myši deficientních v proteinu CSK. Jak se ukázalo, tyto myši umíraly již v časných embryonálních fázích a jejich tkáň vykazovala konstitutivně aktivované SFKs [7].

Aktivační děje žírných buněk odrážejí rovnováhu mezi protein tyrozinovými kinázami a protein tyrozinovými fosfatázami [8]. U žírných buněk deficientních v proteinu PLCβ3 bylo ukázáno, že snížená fosforylace fosfatázy SHP-1 vede k aktivaci transkripčního faktoru STAT5, zvýšené produkci cytokinů doprovázené pozdní anafylaktickou reakcí myši [9]. Hlubší porozumění regulace imunoreceptorové signalizace regulované souhrou PTKs a PTPs, může objasnit některé nezodpovězené otázky týkající se signalizace žírných buněk a jejich úlohy v imunitním systému [10].

2. Cíle práce

Cílem této práce bylo blíže porozumět molekulárním mechanismům FcεRI-zprostředkované signální dráhy vedoucí k aktivaci žírných buněk, degranulaci a produkci zánětlivých cytokinů. Naším cílem bylo především objasnit roli proteinů PAG a CSK v časných fázích aktivace žírných buněk a pochopit jejich úlohu při vzniku zánětu a/nebo anafylaktické reakce. Dalším cílem této práce bylo určit vliv vybraných proteinů (ORMDL3 a CD9) nebo různých chemikálií na aktivaci žírných buněk *in vitro* a také *in vivo*. Součástí této práce bylo také vyvinout jednoduchou a citlivou metodu pro detekci biologicky aktivních molekul a následně ji využít v jednotlivých studiích zahrnutých v této práci.

Konkrétní cíle této práce byly:

1. Určit úlohu proteinu PAG v produkci cytokinů účastnících se zánětu (TNF- α , IL-13 a IL-6) v žírných buňkách aktivovaných antigenem a dále kvantifikovat koncentraci IgE v séru PAG-KO myši.
2. Určit regulační úlohu proteinu CSK v signalizaci žírných buněk po aktivaci antigenem.
 - a. Určit regulační roli CSK v FcεRI-zprostředkované degranulaci, regulaci Ca²⁺, produkci prozánětlivých cytokinů, buněčné adhezi a FcεRI-indukované tyrozinové fosorylaci časných signálních molekul
 - b. Určit úlohu souhry proteinů CSK a PAG v FcεRI-zprostředkované aktivaci žírných buněk
3. Přispět k porozumění úlohy proteinu ORMDL3 v FcεRI zprostředkované aktivaci žírných buněk. Dále připravit BMMCs se sníženou nebo zvýšenou expresí ORMDL3 a určit roli tohoto proteinu v produkci cytokinů účastnících se zánětlivých reakcí.
4. Přispět k pochopení role signalosomu FcεRI-cholesterol a určit efekt etanolu na FcεRI zprostředkovanou degranulaci *in vivo* pomocí testu pasivní kožní anafylaxe u myši.
5. Přispět k objasnění funkce proteinu CD9 v signalizaci žírných buněk. Pro tento účel purifikovat nově připravenou monoklonální protilátku a dále připravit CD9-KD buňky.
6. Vynalézt citlivou a jednoduchou metodu pro detekci cytokinů a dalších proteinů v komplexních biologických vzorcích a srovnat ji s jinými imunoesejemi (ELISA a iPCR).

3. Materiál a metodika

Pro splnění jednotlivých cílů této práce byly použity následující biochemické, imunologické a molekulárně biologické metody. Všechny tyto metody jsou popsány v odpovídajících publikacích a v rukopisu disertační práce.

Izolace a kultivace myších BMMCs

Senzitizace a aktivace BMMCs

Degranulační (β -glukuronidázový) test

Metoda pro detekci uvolněného cytoplasmatického vápníku

Detekce buněčné adheze

Průtoková cytometrie

Imunobloting

Imunoprecipitace

Klonování

Příprava lentivirálních vektorů a genová transdukce

Purifikace CD9 protilátky

Detekce cytokinů pomocí nano-iPCR

Detekce cytokinů a α -tubulinu pomocí iPCR

Detekce růstových faktorů SCF and IL-3 pomocí ELISA

Detekce myšního sérového IgE pomocí ELISA

Test pasivní kožní anafylaxe u myši

4. Výsledky a diskuse

Naše výsledky ukázaly, že antigenem aktivované BMDCs z PAG-KO myši vykazovaly sníženou vápníkovou odpověď, degranulaci a produkci cytokinů, přestože aktivita SFKs byla zvýšená. Toto zjištění bylo překvapující, protože fosforylovaný PAG je všeobecně shledávaným adaptorovým proteinem vázajícím CSK, což je hlavní regulátor SFKs, který je inaktivuje [11]. V této souvislosti je třeba zmínit, že byly popsány výrazné rozdíly mezi časnými regulačními ději imunoreceptoru T buněk a FcεRI signalizace žírných buněk, vzhledem k proteinu PAG [5]. Důležitým výsledkem této studie bylo zjištění, že PAG je pozitivní regulátor produkce prozánětlivých cytokinů po FcεRI-zprostředkované aktivaci žírných buněk, což by mohlo být přímým následkem narušené fosforylace transkripčního faktoru STAT5. Naše výsledky jsou v souladu s předchozími zjištěními, že fosforylovaný STAT5 slouží jako transkripční faktor pro řadu prozánětlivých genů a že STAT5 deficiencie vede k narušené odpovědi žírných buněk na aktivaci přes FcεRI [12]. Naším prvořadým cílem bylo určit, jestli všeobecný pohled na CSK, jako negativního regulátora různých buněčných signalizací a jeho hlavního vazebného partnera PAG, platí v žírných buňkách. V souladu s předchozími studiemi naše výsledky ukázaly, že žírné buňky s CSK-KD vykazují zvýšenou degranulaci, nejenom po aktivaci, ale také na bazální úrovni. Zjištění, že CSK hraje důležitou roli v nastavení aktivačního prahu žírných buněk je podpořeno pozorováním na jiných buněčných typech jako jsou T buňky [13] a granulocyty [14]. Neočekávaným výsledkem bylo zjištění, že CSK pozitivně reguluje produkci prozánětlivých cytokinů (TNF-α, IL-13, IL-6) a chemokinů (CCL-3, CCL-4) v buňkách aktivovaných přes FcεRI. Naše výsledky na buňkách s CSK-KD naznačují, že je to způsobeno následkem zvýšené enzymatické activity fosfatázy SHP-1, která zpětně inhibuje transkripční faktor STAT5, a tím tlumí produkci cytokinů. Souhrnně naše výsledky ukazují, že se CSK váže nejenom na PAG, ale také na jiný adaptorový protein, který poskytuje lepší lokalizaci CSK do přímé blízkosti SFKs a tím je efektivněji inhibuje.

Významný vliv *de novo* syntetizovaných cytokinů uvolněných po aktivaci žírných buněk byl zaznamenán při alergických reakcích a různých zánětlivých onemocněních [15]. Z tohoto důvodu je velice potřebná metoda pro kvantifikaci uvolněných mediátorů žírných buněk. Výsledky představené v této práci ukazují, že nově vyvinutá metoda, nazvaná nano-iPCR, založená na zlatých nanopartikulích konjugovaných s protilátkou a oligonukleotidem, vykazuje oproti ELISA a iPCR širší dynamický rozsah, vyšší citlivost, snadný a cenově výhodnější protokol, při použití stejných protilátek napříč metodami. Tato metoda byla také využita v dalších studiích (ORMDL3, CD9), jak je podrobně diskutováno v disertační práci.

5. Závěry

1. Získané výsledky ukázaly, že adaptorový protein PAG slouží jako negativní nebo pozitivní regulátor signalizace žírných buněk v závislosti na druhu aktivované signalizační dráhy. Žírné buňky izolované z PAG-KO myši vykazují sníženou produkci prozánětlivých cytokinů po aktivaci antigenem. Koncentrace sérového IgE je u těchto myši nezměněná.
2. Naše výsledky podporují představu, že CSK je negativní regulátor vápníkové odpovědi a degranulace, zatímco buněčná adheze a produkce prozánětlivých cytokinů, je pozitivně regulována CSK a to zřejmě mechanismem závislým na STAT5-SHP-1 signální dráze.
 - a. BMMCs s CSK-KD vykazují zvýšenou degranulaci, uvolnění cytoplasmatického vápníku, doprovázenou narušenou fosforylací FcεRI β a γ podjednotek, a signálních proteinů LYN, SYK, NTAL a PLCγ.
 - b. Získaná data naznačují, že některé děje reguluje CSK nezávisle na proteinu PAG za využití jiného adaptorového proteinu, a tím účinněji reguluje kinázy z rodiny Src. Na základě těchto výsledků jsme navrhli nový model souhry proteinů CSK a PAG v BMMCs.
3. Zjistili jsme, že se ORMDL3 protein účastní regulace vzniku lokální zánětlivé reakce zahájené aktivací přes FcεRI v *in vitro* a *in vivo* podmínkách. Snížená hladina ORMDL3 v BMMCs byla spojena se zvýšenou produkcí prozánětlivých proteinů regulovaných přes AKT a NF-κB signální dráhu.
4. Výsledky získané při studiu vlivu ethanolu na aktivaci žírných buněk nám napomohly lépe porozumět časným FcεRI signalizačním dějům. Naše data ukazují, že ethanol narušuje časné fáze signalizace tím, že inhibuje funkci FcεRI-cholesterol signalosomu na cytoplasmatické membráně žírných buněk. Tyto výsledky jsme potvrdili inhibovanou pasivní kožní anafylaktickou reakcí u myši, což naznačuje inhibiční funkci ethanolu v podmínkách *in vivo*.
5. Výsledky založené na studiu proteinu CD9 odhalily, že chemotaxe za antigenem je řízená souhrou mezi FcεRI, CD9, NTAL, a proteiny z rodiny ERM. Nově připravená monoklonální protilátka specifická pro CD9 indukovala aktivaci různých signálních molekul a tím chemotaxi žírných buněk.

-
6. Vyvinuli jsme novou detekční metodu, nazvanou nano-iPCR, pro citlivou detekci cytokinů a dalších proteinů (SCF, IL-3, TNF- α , IL-6, IL-13, tau protein, and α -tubulin) v komplexních biologických vzreích. Výsledky ukazují, že je tato metoda citlivější než jiné imunoseje (ELISA, iPCR) a je vhodná pro detekci imunitní odpovědi za fyziologických a patofyziologických podmínek.

6. Použitá literatura

1. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 2005, **6**:135-142.
2. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol*, 2005, **23**:749-786.
3. Galli SJ, Grimbaldston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*, 2008, **8**:478-486.
4. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol*, 2006, **6**:218-230.
5. Hrdinka M, Horejsi V. PAG-a multipurpose transmembrane adaptor protein. *Oncogene*, 2014, **33**:4881-4892.
6. Okada M. Regulation of the Src family kinases by Csk. *Int J Biol Sci*, 2012, **8**:1385-1397.
7. Nada S, Yagi T, Takeda H, Tokunaga T, Nakagawa H, Ikawa Y, Okada M, Aizawa S. Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk. *Cell*, 1993, **73**:1125-1135.
8. Bugajev V, Bambouskova M, Draberova L, Draber P. What precedes the initial tyrosine phosphorylation of the high affinity IgE receptor in antigen-activated mast cell? *FEBS Lett*, 2010, **584**:4949-4955.
9. Xiao W, Kashiwakura J, Hong H, Yasudo H, Ando T, Maeda-Yamamoto M, Wu D, Kawakami Y, Kawakami T. Phospholipase C- β 3 regulates Fc ϵ RI-mediated mast cell activation by recruiting the protein phosphatase SHP-1. *Immunity*, 2011, **34**:893-904.
10. Heneberg P, Draber P. Nonreceptor protein tyrosine and lipid phosphatases in type I Fc ϵ receptor-mediated activation of mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002, **128**:253-263.
11. Draber P, Halova I, Levi-Schaffer F, Draberova L. Transmembrane adaptor proteins in the high-affinity IgE receptor signaling. *Front Immunol*, 2011, **2**:95.
12. Barnstein BO, Li G, Wang Z, Kennedy S, Chalfant C, Nakajima H, Bunting KD, Ryan JJ. Stat5 expression is required for IgE-mediated mast cell function. *J Immunol*, 2006, **177**:3421-3426.
13. Manz BN, Tan YX, Courtney AH, Rutaganira F, Palmer E, Shokat KM, Weiss A. Small molecule inhibition of Csk alters affinity recognition by T cells. *Elife*, 2015, **4**.
14. Thomas RM, Schmedt C, Novelli M, Choi BK, Skok J, Tarakhovsky A, Roes J. Cterminal Src kinase controls acute inflammation and granulocyte adhesion. *Immunity*, 2004, **20**:181-191.
15. Benoist C, Mathis D. Mast cells in autoimmune disease. *Nature*, 2002, **420**:875-878

1. Introduction

Mast cells are hematopoietic cells of the myeloid lineage originated in bone marrow which are located in peripheral tissues where mature under the influence of local environment [1]. Mast cells are characteristic by a large amount of cytoplasmic granules containing biologically active compounds which are rapidly released upon cell activation, by process called degranulation [2]. Functions of mast cells include several physiological and pathological processes, such as IgE-mediated allergic diseases, asthma, autoimmune disorders and inflammation [3].

Cross-linking of the complexes IgE with the high affinity receptor for IgE (FcεRI), on the mast cell plasma membrane, by multivalent antigen result in phosphorylation of the immunoreceptor tyrosine-based motifs (ITAMs) in the cytoplasmic tails of the FcεRI β and γ subunits by LYN kinase. When phosphorylated, ITAMs of β and γ subunits provide high affinity docking site for binding another molecules of LYN and SYK which phosphorylated several targets molecules, including transmembrane adaptor proteins LAT, NTAL and PAG which are crucial for coordination of the downstream signal pathways that are required for calcium release, degranulation, activation of several transcription factors and production of cytokines [4]. PAG is ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein with high expression in the immune cells. Following FcεRI triggering PAG is phosphorylated by LYN kinase, instead of FYN kinase as in case of T cell, which results in recruitment of C-terminal Src kinase (CSK) to plasma membrane [5]. Key function of CSK is specific phosphorylation of tyrosine residues located in the C-terminal tails of Src family kinases (SFKs), thereby inducing their inactivation [6]. The negative regulatory role and importance of CSK was demonstrated *in vivo* by mice deficient in CSK. These mutant embryos died in early embryonic stages and embryonic tissue exhibited constitutively phosphorylated SFKs [7].

Mast cell activation events reflects the balance between the action of protein tyrosine kinases (PTKs) and protein tyrosine phosphatases (PTPs) [8]. One of the extensively studied PTPs involved in mast cell signaling is phosphatase SHP-1, generally considered as a negative regulator of various immunoreceptor mediated signaling [10]. In PLCβ3-KO mast cells have been shown that abrogated phosphorylation of SHP-1 resulting in constitutive activation of STAT5 accompanied by elevated cytokine production, but normal degranulation and late-phase anaphylactic reaction in mice [9]. Deeper understanding regulation of immunoreceptor signaling by SFKs and PTKs may explain some of the pending questions in mast cell signaling and immunology [10].

2. Aims of the study

The aim of this thesis was to contribute to deeper understanding, in molecular terms, of the FcεRI-mediated signaling pathways leading to mast cell activation, degranulation and cytokines production. Particularly, we aimed to comprehend the role of PAG and CSK at the earliest stages of mast cell activation and their impact on inflammation and/or anaphylaxis. The second challenge of this thesis was to investigate the role of selected proteins (ORMDL3, CD9) or chemical compounds on mast cell activation *in vitro* as well as *in vivo*. Integral part of these studies, at initial period, was to develop a new method for simplified and sensitive detection of biologically important molecules, and use this method subsequently through these studies.

The specific objectives of this thesis were:

1. To determine the role of PAG in production of proinflammatory cytokines (TNF-α, IL-13 and IL-6) in activated mast cells. To quantify the level of IgE in serum of PAG-KO mice.
2. To determine the regulatory roles of CSK in antigen-induced mast cell signaling.
 - a. To determine the role of CSK in FcεRI-mediated degranulation, Ca²⁺ response, production of proinflammatory cytokines, adhesion on fibronectin and FcεRI-induced tyrosine phosphorylation of early signaling proteins
 - b. To determine the role of CSK-PAG cross-talk in FcεRI-mediated mast cell activation
3. To contribute to understanding of the role of ORMDL3 in FcεRI-mediated activation. To prepare BMMCs with reduced and enhanced expression of ORMDL3 and to determine the role of ORMDL3 in production of proinflammatory cytokines
4. To contribute to understanding the role of FcεRI-cholesterol signalosome. To determine effect of ethanol on FcεRI-mediated degranulation under *in vivo* conditions using PCA.
5. To contribute to understanding the role of CD9 in FcεRI-mediated activation. To purify a CD9-specific monoclonal antibody and to prepare BMMCs with CD9-KD.
6. To develop a new method for detection of proinflammatory cytokines and other proteins in complex biological samples and compare it with standard enzyme-linked immuno-sorbent assays (ELISAs) and immuno-PCR (iPCR)

3. Material and methods

To achieve the individual goals of this thesis the following biochemical, immunological, and molecular-biological methods were used. All these methods are described in corresponding publications or in manuscript of dissertation thesis.

BMMCs generation and cultivation

BMMCs sensitization and activation

Degranulation (β -glucuronidase) assay

Calcium release assay

Cell adhesion assay

Flow cytometry

Immunoblotting

Immunoprecipitation

Cloning

Lentiviral vectors and gene transduction

Detection of cytokines by Nano-iPCR

Detection of cytokines and α -tubulin by iPCR

Detection of SCF and IL-3 by ELISA

Detection of IgE in mouse serum by ELISA

Passive cutaneous anaphylaxis in mice

4. Results and discussion

Our results showed that activation of BMDCs from PAG-KO mice led to decreased antigen-mediated calcium mobilization, degranulation, and cytokine production, although activity of SFKs was increased. This finding was unexpected because phosphorylated PAG has been proposed to mediate membrane recruitment of CSK, playing a major role in inactivation of SFKs [11]. It should be noted, that important differences has been described between early regulatory events induced by stimulation of T cell receptor and FcεRI in term of PAG [5]. An important result of this study is a finding of a positive regulatory role of PAG in production of proinflammatory cytokines upon FcεRI-induced mast cell activation which could be a direct consequence of impaired phosphorylation of STAT5. The results are in line with the previous findings that phosphorylated STAT5 serves as a transcription factor for a number of proinflammatory genes and that STAT5 deficiency leads to impaired responses in FcεRI activated mast cells [12]. Our primary goal was to examine whether widely accepted view of CSK as a negative regulator of various cell responses, and as a major interaction partner of PAG, anchoring CSK to plasma membrane, applies also to mast cells. In accord with previous studies our data showed that mast cells with CSK-KD exhibited elevated degranulation, not only upon FcεRI-induced activation, but also in nonactivated state, spontaneous degranulation. The finding that CSK acts in setting of mast cell activation threshold is supported by the observations in T cells [13] and granulocytes [14]. Unexpected was our finding of positive regulatory role of CSK on production of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-13, IL-6) and chemokines (CCL-3, CCL-4) in FcεRI-activated cells. Our data suggest that this was consequence of enhanced enzymatic activity phosphatase SHP1, which resulted in inhibition of transcription factor STAT5 thereby reduce cytokine production. Several lines of evidence suggested, that CSK binds not only to PAG, but also to some other anchors, which could serve better than PAG for positioning of CSK in the vicinity of SFKs and thus more efficiently contribute to their inactivation.

Impact of cytokines de novo synthesized and released by mast cells has been demonstrated in allergy and numerous inflammatory disorders [15]. For this purpose, sensitive and simple detection methods for quantification of mast cell mediators are required. The results presented in this dissertation show that when the same antibodies were used throughout the individual assays, newly developed iPCR method based on armed gold nanoparticles, called nano-iPCR, offers enhanced sensitivity, wider dynamic range, is easier to perform and is more cost-efficient than ELISA and classical iPCR. This method was also used in another studies (ORMDL3, CD9) as was extensively discussed in dissertation thesis.

5. Conclusions

1. Our results showed that adaptor protein PAG plays a role as a positive or negative regulator of BMMCs signaling, depending on the signaling pathway involved. Interestingly, PAG-KO cells exhibited decrease in proinflammatory cytokines production upon antigen activation and these mice have normal level of serum IgE.
2. Our results support the notion that CSK in mast cells is a negative regulator of calcium response and degranulation, whereas production of cytokines regulated via STAT5-SHP1 signaling pathway and adhesion to fibronectin is positively regulated by CSK.
 - a. BMMCs with CSK-KD exhibited elevated degranulation, calcium release, accompanied by altered phosphorylation of FcεRI β and γ subunits, LYN, SYK, NTAL, and PLCγ.
 - b. Obtained data also indicated that, some of these events could be regulated by CSK independently of the PAG and we proposed a new model of CSK-PAG interplay.
3. We found out that ORMDL3 is involved in development of local inflammation initialized by FcεRI triggering under *in vitro* and *in vivo* conditions. Downregulation of ORMDL3 was associated with an increased production of proinflammatory cytokines via AKT and NF-κB signaling pathways.
4. Results obtained in studies investigating effect of ethanol helped us to better understand early signaling events mediated by triggering of FcεRI. Our data showed that ethanol interferes with early antigen-induced signaling events in mast cells by suppressing the function of FcεRI-cholesterol signalosomes at the plasma membrane. These data were corroborated by reduced PCA reaction in mice, suggesting inhibitory role of ethanol under *in vivo* conditions.
5. Data based on studying CD9 revealed that chemotaxis toward antigen is controlled by a cross-talk between FcεRI, CD9, NTAL, and proteins of the ERM family. Newly prepared antibody specific for the CD9 induced activation of several signaling pathways, including mast cell chemotaxis.
6. We developed a nano-iPCR method for detection of several proteins in complex biological fluid (SCF, IL-3, TNF- α, IL-6, IL-13, tau protein, and α-tubulin). Our data indicate that this

method is more sensitive than other immunoassays and is suitable for detection of immune responses under physiological and pathophysiological conditions.

6. References

1. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 2005, **6**:135-142.
2. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol*, 2005, **23**:749-786.
3. Galli SJ, Grimaldeston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*, 2008, **8**:478-486.
4. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol*, 2006, **6**:218-230.
5. Hrdinka M, Horejsi V. PAG-a multipurpose transmembrane adaptor protein. *Oncogene*, 2014, **33**:4881-4892.
6. Okada M. Regulation of the Src family kinases by Csk. *Int J Biol Sci*, 2012, **8**:1385-1397.
7. Nada S, Yagi T, Takeda H, Tokunaga T, Nakagawa H, Ikawa Y, Okada M, Aizawa S. Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk. *Cell*, 1993, **73**:1125-1135.
8. Bugajev V, Bambouskova M, Draberova L, Draber P. What precedes the initial tyrosine phosphorylation of the high affinity IgE receptor in antigen-activated mast cell? *FEBS Lett*, 2010, **584**:4949-4955.
9. Xiao W, Kashiwakura J, Hong H, Yasudo H, Ando T, Maeda-Yamamoto M, Wu D, Kawakami Y, Kawakami T. Phospholipase C- β 3 regulates Fc ϵ RI-mediated mast cell activation by recruiting the protein phosphatase SHP-1. *Immunity*, 2011, **34**:893-904.
10. Heneberg P, Draber P. Nonreceptor protein tyrosine and lipid phosphatases in type I Fc ϵ receptor-mediated activation of mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002, **128**:253-263.
11. Draber P, Halova I, Levi-Schaffer F, Draberova L. Transmembrane adaptor proteins in the high-affinity IgE receptor signaling. *Front Immunol*, 2011, **2**:95.
12. Barnstein BO, Li G, Wang Z, Kennedy S, Chalfant C, Nakajima H, Bunting KD, Ryan JJ. Stat5 expression is required for IgE-mediated mast cell function. *J Immunol*, 2006, **177**:3421-3426.
13. Manz BN, Tan YX, Courtney AH, Rutaganira F, Palmer E, Shokat KM, Weiss A. Small molecule inhibition of Csk alters affinity recognition by T cells. *Elife*, 2015, **4**.
14. Thomas RM, Schmedt C, Novelli M, Choi BK, Skok J, Tarakhovsky A, Roes J. C-terminal Src kinase controls acute inflammation and granulocyte adhesion. *Immunity*, 2004, **20**:181-191.
15. Benoist C, Mathis D. Mast cells in autoimmune disease. *Nature*, 2002, **420**:875-878.

Curriculum vitae

Lucie Potůčková (Stegurová)

Kontakt: lucie.potuckova@img.cas.cz
Tel: +420 241 062 656
Oddělení signální transdukce
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i
Videňská 1083
142 20 Praha 4

Vzdělání:

- od 2009 **Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta**
Disertační práce: Regulační úlohy proteinů PAG a CSK v FcεRI signalizaci žírných buněk
Školitel: RNDr. Petr Dráber, DrSc.
Laboratoř: Oddělení signální transdukce, Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i
- 2006 - 2008 **Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta**
Magisterské studium - Klinická a toxikologická analýza
Diplomová práce: Regulace NADP-dependentní malátdehydrogenasy dekarboxylační v listech tabáku (*Nicotiana tabacum L.*)
Školitel: Doc. Helena Ryšlavá CSc.
Laboratoř: Laboratoř biochemie rostlinných regulací, Katedra biochemie, Př. F. UK
- 2003 - 2006 **Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta**
Bakalářské studium - Klinická a toxikologická analýza

Konference a kurzy:

- 2015 **4th European Congress of Immunology (ECI) in Vienna.** Prezentace posteru: Different regulatory roles of CSK and PAG adaptor protein in the FcεRI signaling
- 2014 **2nd COST action BM1007 Training school, The Hebrew University of Jerusalem, Israel.** (ústní prezentace)
- 2013 **1st Cost Action BM1007 Training school, Nottingham, UK.**
- 2012 **EMBRN-COST International Mast cell and Basophil Meeting, Berlin, Germany.** Prezentace posteru: Different requirements for palmitoylated proteins in signaling pathways leading to mast cell activation
- 2012 **5th IMG PhD Conference. "Draw Us your science...!!!"**, Prague, Czech Republic.
Přednáška: Nano-iPCR, a new method for sensitive detection of cytokines
- 2011 **EMBRN-COST International Mast cell and Basophil Meeting, Southampton**
Přednáška: Nano-iPCR, a new method for sensitive detection of cytokines produced or utilized by mast cells
- 2011 **Course of Cellular and Molecular Immunology**, Institute of Physiology CAS, Prague
- 2010 **Advances in Molecular Biology and Genetics**, Institute of Molecular Genetics, Prague
- 2009 **Osvědčení o odborné způsobilosti k řízení, provádění a kontrole pokusů na zvířatech**, Ministerstvo zemědělství, Česká republika

Členství ve vědeckých společnostech:

Česká imunologická společnost (CIS)

Seznam publikací / Selected publications

Publikace zahrnuté jako součást doktorské práce:

Publication included as a part of doctoral thesis:

1. Dráberová L., Bugajev V., **Potůčková L.**, Hálová I., Bambousková M., Polakovičová I., Xavier R. J., Seed B., Dráber P.: Transmembrane adaptor protein PAG/CBP is involved in both positive and negative regulation of mast cell signaling. *Mol. Cell. Biol.* **34**(23):4285-300, 2014.
2. **Potuckova L.**, Draberova L., Halova I., Paulenda T., Draber P.: C-terminal Src kinase regulates FcεRI activation leading to degranulation and cytokines/chemokines production in opposite ways, independently of the transmembrane adaptor protein PAG. Manuscript, 2017.
3. Bugajev V., Hálová I., Dráberová L., Bambousková M., **Potůčková L.**, Dráberová H., Paulenda T., Junyent S., Dráber P.: Negative regulatory roles of ORMDL3 in the FcεRI-triggered expression of proinflammatory mediators and chemotactic response in murine mast cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**(6):1265-85, 2016.
4. Dráberová L., Paulenda T., Hálová I., **Potůčková L.**, Bugajev V., Bambousková M., Tůmová M., Dráber P.: Ethanol inhibits high-affinity immunoglobulin E receptor (FcεRI) signaling in mast cells by suppressing the function of FcεRI-cholesterol signalosome. *Plos One.* **10**(12):e0144596, 2015.
5. Hálová I., Dráberová L., Bambousková M., Machyna M., **Stegurová L.**, Smrž D., Dráber P.: Cross-talk between tetraspanin CD9 and transmembrane adaptor protein non-T cell activation linker (NTAL) in mast cell activation and chemotaxis. *J Biol. Chem.*, **288**(14):9801-14, 2013.
6. **Stegurová L.**, Dráberová E., Bartos A., Dráber P., Rípová D., Dráber P.: Gold nanoparticle-based immuno-PCR for detection of tau protein in cerebrospinal fluid. *J. Immunol. Methods*, **406**:137-42, 2014.
7. Dráberová E., **Stegurová L.**, Sulimenko V., Hájková Z., Dráber P., Dráber P.: Quantification of α -tubulin isotypes by sandwich ELISA with signal amplification through biotinyl-tyramide or immuno-PCR. *J. Immunol. Methods*, **395**(1-2):63-70, 2013.
8. **Potůčková L.**, Franko F., Bambousková M., Dráber P.: Rapid and sensitive detection of cytokines using functionalized gold nanoparticle-based immuno-PCR, comparison with immuno-PCR and ELISA. *J Immunol. Methods*, **371**(1-2):38-47, 2011.