2 ABSTRAKT (CZ)

Tato disertační práce je zaměřena především na pochopení regulační úlohy C-terminální Src kinázy (CSK) a proteinu asociovaného s mikrodoménami 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 (SFK), 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 SFK 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) myší divokého typu nebo myší deficientních v proteinu PAG (PAG-KO) nebo myší se sníženou expresí CSK (CSK-KD) nebo se sníženou expresí obou těchto proteinů (CSK-KD/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.