

0308/4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“FORMACIÓN DE COMPLEJOS ENTRE PROTEÍNAS
CITOSÓLICAS Y RECEPTORES FcεRI EN LA
ACTIVACIÓN DE CÉLULAS CEBADAS DE LA LÍNEA RBL-
2H3”**

T E S I S

Que para obtener el título de

DOCTORA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA

M. en I.B.B. MARTHA ISABEL LARA PADILLA

TUTOR:

**DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Mayo del 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio del Dr. Enrique Ortega Soto, del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México D.F. Parte del trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de la Dra. Janet M. Oliver, Department of Pathology and Cancer Center, University of New Mexico School of Medicine, Albuquerque, NM, USA.

La investigación fue financiada por donativos del CONACYT (31783-N) y la DGAPA-UNAM (IN208399, IN213701). Durante el desarrollo de estos estudios Martha Isabel Lara Padilla fue becaria del CONACYT, de la DGAPA y de la DGEP.

Agradezco el apoyo técnico de la QFB Claudia Angélica Garay Canales

Agradezco a Irene Lee, Carla Santana, A. Marina Martínez, Janet R. Pfeiffer, Dra. Rebecca J. Lee y Dr. Zurab Surviladze, por su contribución en este trabajo.

Agradezco al Dr. Israel Pecht y al Dr. Juan Rivera por su generosidad al donar respectivamente los anticuerpos monoclonales anti-FcεRIα y anti-FcεRIβ, utilizados en este trabajo.

Agradezco a la Dra. Bridget S. Wilson y Dra. Janet M. Oliver por el apoyo en la dirección de este trabajo.

Agradezco a el Dr. Enrique Ortega Soto por la acertada dirección de este trabajo.

Agradezco a todos los compañeros del laboratorio de el Dr. Ortega y de la Dra. Oliver por las críticas técnicas a este trabajo y por el apoyo que me brindaron.

Agradezco a mis padres, hermanos y amigos por el apoyo brindado todos estos años.

Gracias mil.

INDICE

Introducción	1
Antecedentes	23
Justificación	27
Hipótesis	28
Material y Métodos	29
Resultados	33
Discusión	54
Conclusiones	65
Bibliografía	66
Publicaciones	69

INTRODUCCION

Las células expresan una variedad de receptores de membrana para responder a diferentes estímulos del microambiente que las rodea. Tras la estimulación del receptor por su ligando específico, la célula inicia una serie de respuestas celulares muy diversas, tales como mitogénesis, diferenciación, expresión génica, síntesis de proteínas, secreción de enzimas, fagocitosis, estallido respiratorio, etc. Para activar estas funciones los receptores usan diferentes vías bioquímicas las cuales convergen en ciertas vías de señalización comunes. Los receptores se pueden clasificar de acuerdo al mecanismo de activación que utilizan: receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas, receptores acoplados a canales iónicos y receptores que utilizan cambios en el estado de fosforilación de proteínas como primer paso en la activación celular. Las proteínas G, o proteínas que unen guanosina trifosfato (GTP) constituyen una familia de proteínas que utiliza la unión y la hidrólisis de GTP como interruptor bioquímico. Estas proteínas pasan al estado activo mediante el intercambio del GDP unido por GTP. Del estado activo, pasan al inactivo por la hidrólisis del GTP a GDP. La activación, (intercambio de GDP por GTP) es inducida por la unión del ligando al receptor. El cambio del estado inactivo al estado activo de estas proteínas G permite el acoplamiento del receptor a las moléculas efectoras, como los receptores adrenérgicos y los receptores de angiotensina (Sagi-Eisenberg, 1999).

Los receptores que utilizan la inducción de cambios en el estado de fosforilación de las proteínas como mecanismo de activación pueden dividirse en receptores con actividad intrínseca de cinasa y receptores que no poseen actividad de cinasa pero que se asocian a proteínas con actividad de cinasa. Como ejemplo de los primeros tenemos al receptor de insulina (IR), al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R) y el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF-R), entre otros. Entre los receptores que carecen de actividad intrínseca de cinasa están los receptores de interleucinas, el receptor de interferón γ , el receptor de prolactina y los receptores multicadena de reconocimiento inmune, entre otros.

Una característica común de los receptores acoplados a la fosforilación de proteínas para iniciar la activación celular es la dimerización o agregación de los mismos inducida por la unión del ligando o de sustancias que promuevan la agregación de los receptores (Heldin, 1995; Daeron, 1997). Esta agregación induce la fosforilación de proteínas. Dicha fosforilación es mediada por la actividad catalítica de los receptores en el caso de aquellos

con actividad intrínseca de cinasa o por proteínas con actividad de cinasa en el caso de aquellos receptores que no tienen actividad enzimática, pero que se asocian a proteínas que sí la tienen.

En las vías de señalización iniciadas por los receptores de reconocimiento inmune se ha demostrado la participación de cinasas y fosfatasa comunes. Generalmente las primeras cinasas de tirosina en activarse pertenecen a la familia de Src, entre las cuales están Lyn, Fyn y Lck principalmente. Siguiendo en la cascada de señalización tenemos a las cinasas de tirosina pertenecientes a la familia ZAP 70/Syk, las cuales se encargan de ampliar la señal de activación al fosforilar diversos sustratos, los cuales conectan con diversas cascadas de señalización. Entre las cinasas de serina/treonina que participan en la señalización a través de los receptores de reconocimiento inmune se encuentran PKC, MAPK, Raf y MEK. Existen diversas fosfatasa de tirosina que forman parte de las cascadas de señales de activación de estos receptores, entre ellas están CD45, SHP1 y SHP2; así mismo tenemos a la fosfatasa de inositol SHIP. Existen otras enzimas comunes, entre las que se encuentran la PLC γ , la PI3K, Ras, etc.

Receptores multicadena de reconocimiento inmune.

Los receptores multicadena de reconocimiento inmune (MIRRs) participan en la activación de células del sistema inmune inducida por antígeno. Entre estos receptores están el receptor de antígeno de linfocitos B (BCR), el receptor de antígeno de células T (TCR), el receptor de alta afinidad para IgE (Fc ϵ RI), el receptor para IgA (Fc α R) y los receptores para IgG (Fc γ Rs). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas porque una o varias de las subunidades de estos receptores poseen en su porción extracelular dominios semejantes a los observados en las inmunoglobulinas (Daeron, 1997) (Fig. 1).

El TCR reconoce péptidos antigénicos en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), expresadas en la superficie de células presentadoras de antígeno (APC), como macrófagos, linfocitos B y células de Langerhans (Isakov, 1997), así como monocitos y células dendríticas (Revisado en Kinet, 1999). La inmunoglobulina de superficie de linfocitos B (BCR) participa en el reconocimiento del antígeno (Isakov, 1997). Los otros MIRRs unen la porción Fc de las inmunoglobulinas, y reconocen de manera indirecta al antígeno para el cual es específica tal inmunoglobulina. Entre estos

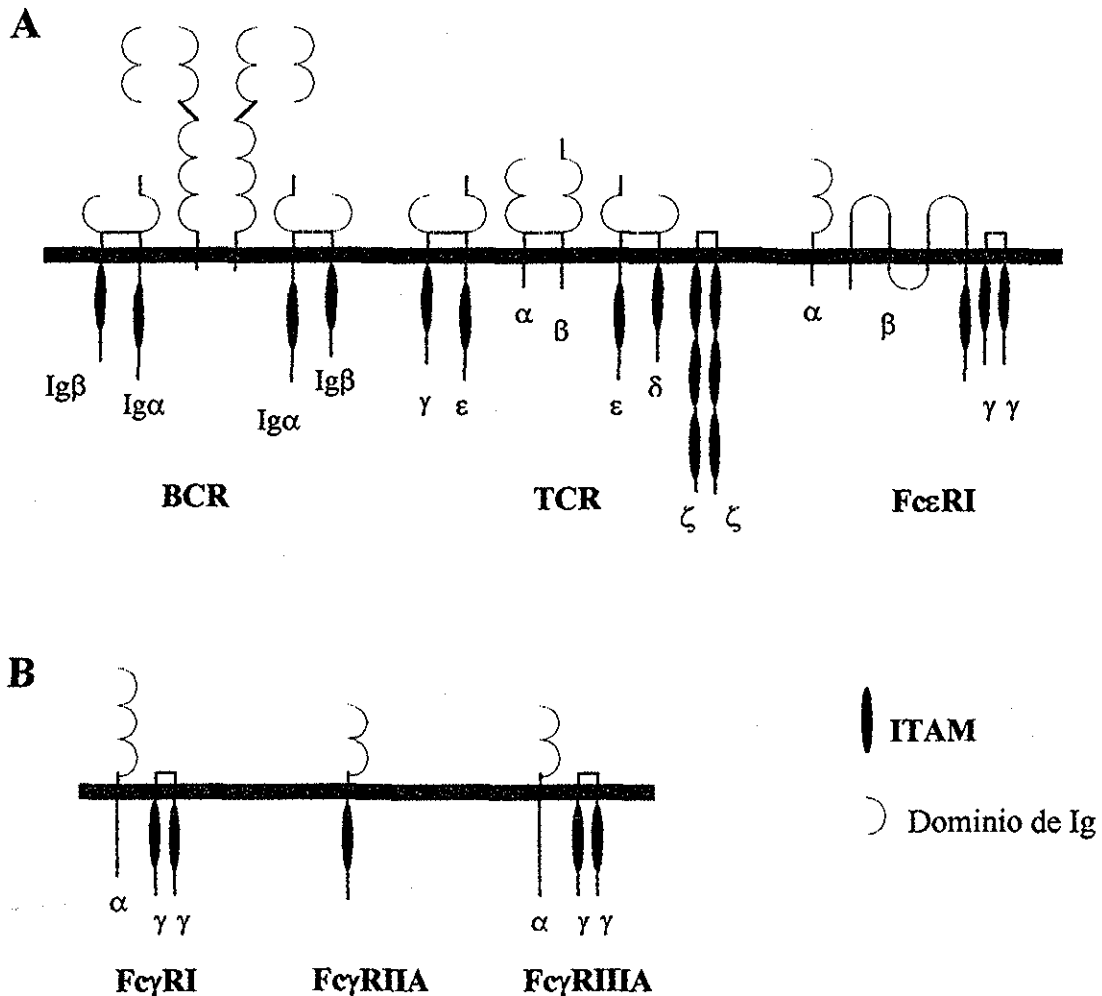


Figura 1. *Representación esquemática de los receptores multicadena de reconocimiento inmune.* Esquema de algunos miembros de la familia de los receptores multicadena de reconocimiento inmune (MIRRs), los cuales pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). A: BCR, TCR y FcεRI; B: FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA. La membrana celular está representada por la línea gris. BCR: Receptor de antígeno de células B; TCR: receptor de antígeno de células T; FcεRI: receptor de alta afinidad para IgE; FcγR: receptor para la porción Fc de la IgG; ITAM: motivo de activación basado en tirosina.

últimos se encuentran el receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI), el receptor de IgA (FcαR) y los receptores para el Fc de la IgG (FcγRs) (Revisado por Daeron, 1997; Isakov, 1997).

Receptor de alta afinidad para IgE: FcεRI

Estructura.

Generalmente se había descrito al FcεRI como un complejo tetramérico compuesto por una cadena α , una cadena β y un homodímero de cadenas γ , pero estudios realizados en los últimos años mostraron que este receptor puede ser expresado tanto como una estructura tetramérica ($\alpha\beta\gamma_2$) en basófilos y células cebadas, o bien como un trímero ($\alpha\gamma_2$) en otros tipos de células humanas. En contraste, en roedores siempre presenta la estructura tetramérica (Revisado en Kinet, 1999). La cadena α es una proteína transmembranal altamente glicosilada, posee un segmento extracelular que contiene 2 dominios de Ig, de los cuales el más cercano a la membrana es necesario para la unión de la IgE. La cadena α tiene un peso molecular aparente de entre 45-65 kDa, pero una vez desprovista de sus azúcares, tiene un peso aproximado de 27 kDa. El FcεRI, al igual que otros receptores de reconocimiento inmune, requiere ensamblarse antes de ser expresado en la membrana, ya que la cadena α por sí sola no puede ser dirigida hacia la membrana. En roedores la cadena α contiene en su dominio citoplasmático secuencias que provocan su retención en el retículo endoplásmico; pero cuando se acopla a las otras cadenas β y γ_2 del receptor, esta secuencia es enmascarada y el complejo puede ser exportado al aparato de Golgi y de ahí ser dirigido hacia membrana plasmática. Los complejos $\alpha\gamma_2$ observados en algunas células humanas pueden ser expresados en membrana celular tan fácilmente como los complejos $\alpha\beta\gamma_2$, lo cual indica que la cadena γ humana es suficiente para enmascarar las señales de retención en retículo endoplásmico existentes en la cadena α humana (Revisado en Kinet, 1999). La región transmembranal de la cadena α es altamente conservada entre humano, rata y ratón. La afinidad de unión entre la cadena α del receptor y la molécula de IgE es de $10^{10}M^{-1}$ (Revisado en Ravetch y Kinet, 1991). La IgE de roedores se une a el FcεRI de roedores y de humanos, mientras que la IgE de humanos sólo se une al FcεRI humano (Revisado en Kinet, 1999).

La cadena β atraviesa 4 veces la membrana celular, por lo que tiene 2 asas extracelulares, y tanto su porción amino como carboxilo terminal están situadas en el citoplasma celular. Su peso molecular aparente es de 32 kDa. El gen que codifica para la cadena β se localiza en el cromosoma 19 (Revisado por Kinet y Metzger, 1990; Ravetch y Kinet, 1991). En roedores, la cadena β es requerida para la expresión en superficie del receptor, mientras que en humanos no. Lo anterior fue el primer indicio de la existencia de dos isoformas de Fc ϵ RI en humanos (Revisado en Kinet, 1999) (Figura 2).

Las cadenas γ tienen homología con las cadenas ζ y η del TCR. Poseen una porción extracelular muy corta (5 aminoácidos), en la cual hay cisteínas que participan en la formación del puente disulfuro que une ambas cadenas, una región transmembranal y una cola citoplasmática de 36 aminoácidos. El peso molecular aparente es de 7-9 kDa. En la porción citoplasmática de estas cadenas se localiza un motivo de activación basado en tirosina, denominado ITAM por sus siglas en inglés (Immuno-receptor Tyrosine-based Activation Motif), el cuál fue descrito por vez primera por Reth (1989). Las cadenas β y γ tienen en su porción citoplasmática un ITAM. Los genes que codifican para las cadenas α y γ se localizan en la región distal del cromosoma 1. En el Fc ϵ RI pueden encontrarse homodímeros de cadenas γ o heterodímeros de cadenas γ - η . El complejo tetramérico ($\alpha\beta\gamma_2$) se mantiene unido por enlaces no covalentes muy lábiles, por lo cual es necesario el uso de detergentes muy suaves para no romper los enlaces entre las cadenas que conforman el receptor.

Expresión.

En roedores, el Fc ϵ RI se expresa en basófilos y células cebadas (Revisado en Kinet, 1999); mientras que en humanos se ha detectado además en monocitos de individuos con dermatitis atópica (Maurer y col., 1994), en eosinófilos de pacientes hipereosinofílicos (Revisado por Paolini y col., 1994), y en células de Langerhans cutáneas (Wang y col., 1992; Bieber y col., 1992), así como en células dendríticas circulantes y en plaquetas (Revisado en Kinet, 1999). En monocitos humanos, células de Langerhans y células dendríticas, no se han podido detectar transcritos de la cadena β , lo cual indica que en estas células el receptor se expresa como complejo $\alpha\gamma_2$, mientras que en basófilos y células cebadas humanas se expresa como complejo $\alpha\beta\gamma_2$ (Fig. 2). Se ha sugerido que en eosinófilos y plaquetas también se expresa como tetrámero, basándose en

la existencia de transcritos de la cadena β por datos de RT-PCR. Aun no se ha establecido si en las células humanas que expresan el tetrámero pudiera también expresarse el complejo trimérico (Revisado en Kinet, 1999).

Funciones

El entrecruzamiento o agregación de los Fc ϵ RI sobre la membrana de células cebadas inicia una cascada de procesos bioquímicos que finalmente desembocan en la liberación de mediadores inflamatorios preformados y almacenados en gránulos, tales como histamina, serotonina, proteasa I y II, β -hexosaminidasa, etc., o bien sintetizados *de novo* a partir de ácido araquidónico, tales como leucotrienos y prostaglandinas. Todos estos mediadores están involucrados en la producción de reacciones alérgicas dependientes de IgE. También se induce la síntesis y secreción de algunas citocinas, entre ellas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF y TNF α .

Estudios *in vivo* e *in vitro* realizados en humanos y en modelos murinos mostraron que el nivel de expresión del receptor en membrana celular puede incrementarse debido a la presencia de IgE. Este incremento en la expresión del receptor permite que las células cebadas murinas o humanas aumenten la secreción de mediadores lipídicos y enzimas preformadas después de la administración de antígeno o anti-IgE, aún a bajas concentraciones de éstos estímulos. Esto puede ser observado en pacientes con reacciones alérgicas o con infecciones parasitarias (Wedemeyer y col., 2000).

Además de participar en la respuesta inmune vía secreción de citocinas, estudios *in vitro* sugieren que las células cebadas y los basófilos pueden funcionar como células presentadoras de antígeno (Wedemeyer y col., 2000). Así mismo, otros estudios mostraron que el Fc ϵ RI expresado en monocitos y células dendríticas participa en la endocitosis de complejos IgE y antígeno para que sean procesados por las células y más tarde sean presentados como complejos MHC-péptido antigénico (Revisado en Kinet, 1999).

Las infecciones parasitarias producidas por helmintos se asocian frecuentemente con un incremento en los niveles de basófilos y eosinófilos circulantes, con un marcado incremento de los niveles de IgE en el suero y por lo tanto un incremento en la expresión de el Fc ϵ RI en basófilos y células cebadas, así como un incremento de éstas células en los tejidos afectados (Wedemeyer y col., 2000). Esto podría sugerir que el Fc ϵ RI tiene un papel en el control de ciertas enfermedades parasitarias. Evidencia que apoya lo anterior

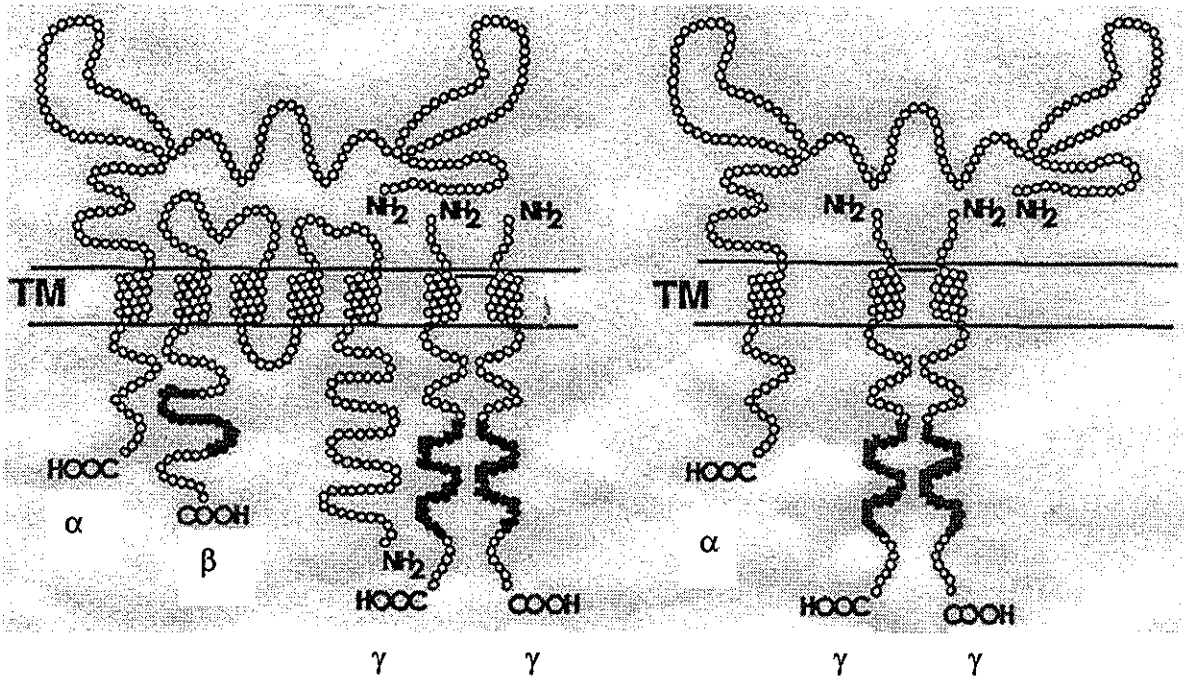
proviene de estudios realizados en ratones que no expresan la cadena α del receptor, los cuáles mostraron un incremento en los granulomas y la fibrosis inducida por la infección de *Schistosoma mansoni* al compararlos con los ratones que sí expresan el receptor. Lo anterior sugiere que las vías de señales mediadas por el Fc ϵ RI y las cascadas de inflamación iniciadas por el mismo receptor tienen un papel benéfico en la infección por éste parásito (Revisado en Kinet, 1999).

Asimismo, este receptor es capaz de mediar endocitosis de complejos inmunes y fagocitosis de glóbulos rojos de carnero opsonizados con IgE (Daeron y col., 1993; Daeron y col., 1994; Bonnerot y col., 1994).

Vías de señalización

El estudio del Fc ϵ RI ha sido un modelo muy usado para estudiar las vías de transducción de señales mediadas a través de los receptores multicadena de reconocimiento inmune, debido a la variedad de estímulos que pueden ser utilizados para inducir respuestas celulares a través de este receptor y la facilidad de utilizar líneas celulares para realizar estos estudios. Entre los diversos estímulos usados están: la IgE agregada con entrecruzadores químicos para formar oligómeros de IgE; complejos inmunes IgE y antígeno, complejos IgE-anti-IgE, IgE acoplada a una fase sólida, o anticuerpos anti-receptor (Fig. 3). Una vez que el receptor Fc ϵ RI es agregado se desencadena una serie de eventos que permiten que las células respondan al estímulo dado. Al igual que los otros MRRs, uno de los primeros eventos que ocurren luego de la agregación del receptor es la activación de la cinasa de tirosina Lyn, la cual se encarga de fosforilar los residuos de tirosina de los ITAMs de las cadenas β y γ del receptor. Una vez que éstos son fosforilados, los ITAMs actúan como sitios de anclaje para proteínas con dominios SH2, entre las cuales se encuentra la cinasa de tirosina Syk (Kinet, 1999).

La cinasa Lyn pertenece a la familia de cinasas de tirosina Src. Esta familia comprende también a Fyn, Yes, Yrc, Hck, Lck, Blk, Src y Fgr. Estas proteínas tienen pesos moleculares que van desde 52 hasta 62 kD y tienen 6 diferentes dominios funcionales:



Distribución de Isoformas de FcεRI en células humanas

Basófilos

Células cebadas

Células de Langerhans

(Dermatitis Atópica)

Eosinófilos ?

Monocitos

Macrófagos alveolares

Células de Langerhans

Células Dendríticas

Eosinófilos?

Plaquetas?

Figura 2. Isoformas del receptor de alta afinidad para IgE y su expresión en células humanas. Esquema de las dos isoformas de FcεRI observadas en humanos y su expresión en células humanas. Los círculos rellenos representan los aminoácidos del ITAM de cada una de las cadenas. NH₂: Extremo amino terminal; COOH: extremo carboxilo terminal; TM: porción transmembranal. Modificado de Kinet, 1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- **El dominio SH4** es una región de 15 a 17 aminoácidos que contiene señales para modificaciones con ácidos grasos. Cuando la Glicina en la posición 2 es miristoilada, la cinasa se ancla a la membrana celular. Este dominio contiene también aminoácidos básicos que son sustratos para modificaciones post-traduccionales tales como la palmitoilación. Esta modificación sólo ocurre en las proteínas que fueron miristoiladas, indicando que este proceso ocurre en la membrana celular. Al ser reversible, la palmitoilación y despalmitoilación pudiera ser el mecanismo por medio del cual se regula la localización de las cinasas de la familia Src en respuesta a la estimulación correspondiente.
- **El dominio único** que es específico para cada proteína de la familia Src. Se ha sugerido que esta región es la responsable de las interacciones específicas de las cinasas con los receptores y con sus sustratos protéicos.
- **El dominio SH3** es necesario para las interacciones de las cinasas de Src con los sustratos protéicos y también asegura las interacciones intramoleculares, controlando la actividad catalítica, la localización de la cinasa en el citosol o en diversos dominios membranales y la asociación de las cinasas con proteínas blanco. Este dominio se une a dominios ricos en prolina de los sustratos protéicos.
- **El dominio SH2** es una segunda región moduladora, que controla el rango de interacción de las cinasas de la familia Src con otras proteínas. Este dominio se une a secuencias cortas de aminoácidos que contienen tirosina fosforilada. Los tres o cinco aminoácidos contiguos a la fosfotirosina son los que determinan la especificidad de unión de los dominios SH2.
- **El dominio de cinasa** se encuentra en todas las cinasas de tirosina, es el responsable de la actividad de cinasa de éstas proteínas y juega un papel relevante en la especificidad del sustrato. Ciertos aminoácidos dentro de éste dominio son idénticos en todas las cinasas y están involucrados en la unión de ATP y la reacción de transferencia del grupo fosfato. En este dominio hay también una tirosina cuya fosforilación incrementa la actividad catalítica.
- **La región carboxilo terminal** tiene un papel importante en la regulación de la actividad catalítica de las cinasas de la familia Src. Dentro de esta región se localiza una tirosina en una posición conservada rodeada de aminoácidos también conservados. La fosforilación de ésta tirosina inhibe la actividad de cinasa en más del 98 %. Se ha

demostrado que la eliminación de esta tirosina incrementa la actividad catalítica de la cinasa (Tatosyan y col , 2000).

Los dominios SH2 y SH3 juegan un papel clave en la regulación de la actividad catalítica de las cinasas de la familia Src. Estudios de cristalografía de rayos X han demostrado que las interacciones entre los dominios SH2 y SH3 estabilizan la estructura conformacional inactiva de las cinasas. El dominio SH3 interactúa con el dominio catalítico y las secuencias de unión localizadas entre el dominio SH2 y el dominio catalítico. El dominio SH2 interactúa con el residuo de fosfotirosina localizado en la región carboxilo terminal de la proteína, dicha interacción induce que la proteína se mantenga en una conformación cerrada pero quedando accesible el dominio catalítico (Figura 4A) El residuo de tirosina carboxilo terminal es fosforilado por la cinasa de tirosina Csk, y la defosforilación de éste residuo (probablemente por CD45) permite la estimulación de la actividad catalítica de la cinasa. El dominio SH3 forma una unión intramolecular con la porción amino terminal del dominio de cinasa. La inactivación de la cinasa podría ser el resultado de la formación de una estructura rígida estabilizada por uniones dobles entre los dominios SH2 y SH3 con el dominio catalítico de la cinasa. Dicha estructura impediría cualquier movimiento en el dominio catalítico de la proteína (Figura 4A).

En resumen, la regulación de la actividad de cinasa ocurre en dos sitios, la modificación de cualquiera de ellos lleva a resultados opuestos. La fosforilación de la tirosina localizada en el asa de activación del dominio de cinasa activa la enzima, mientras que la fosforilación de la tirosina localizada en la porción carboxilo terminal del dominio catalítico reduce su actividad catalítica (Tatosyan y col , 2000).

Se ha demostrado que la cinasa de tirosina que se activa después de Lyn es la cinasa Syk, perteneciente a una familia de cinasas de tirosina que incluye también a la cinasa ZAP-70. Estas cinasas no contienen sitios de miristoilación, por lo cual se localizan en el citoplasma. Esta familia de cinasas tiene dos dominios SH2 en la región amino terminal de la proteína, carece de dominios SH3 y no tiene una región reguladora carboxilo terminal, pero sí un dominio catalítico en esta región de la proteína. Los dominios SH2 se conectan por un segmento de 65 aminoácidos llamado región inter-SH2. Entre el segundo dominio SH2 y la porción catalítica de la enzima se localiza otro segmento llamado región de unión (linker). Las variaciones entre especies que han sido observadas se localizan en éste último segmento. Existen dos isoformas de Syk que difieren en 23 aminoácidos localizados en la

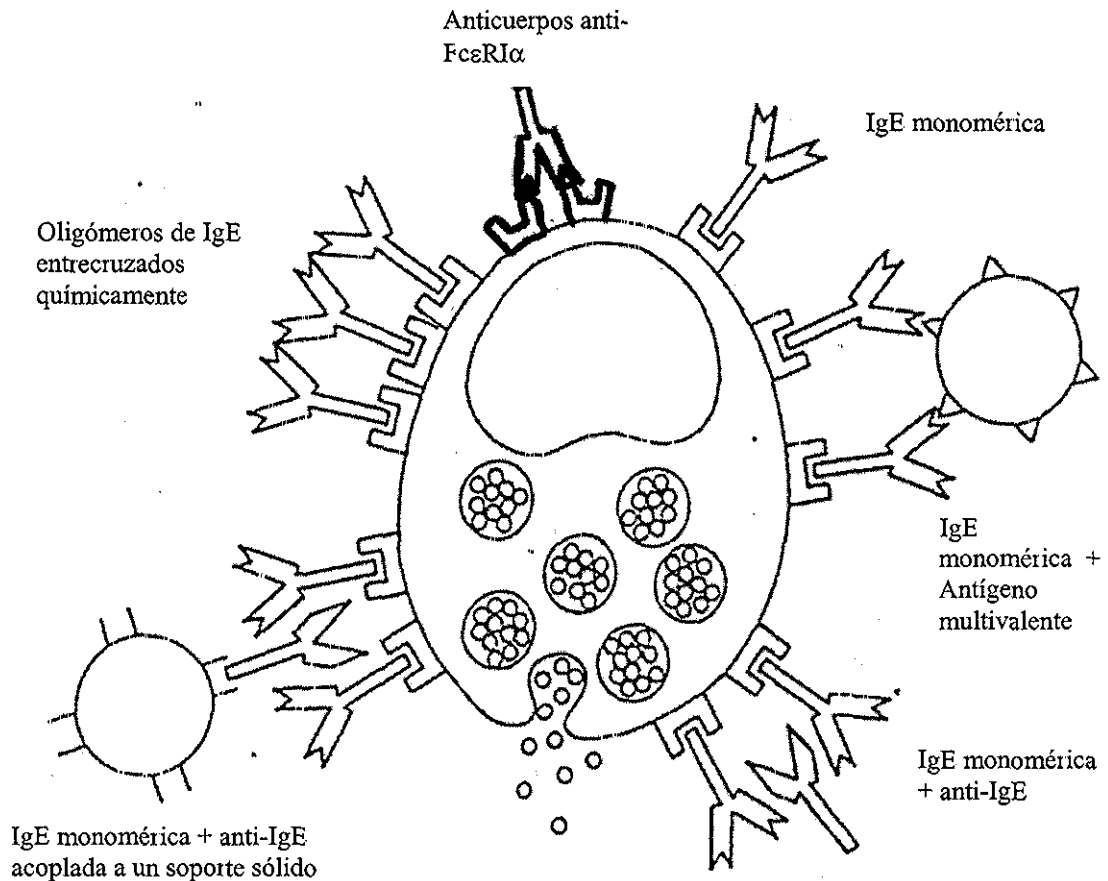


Figura 3. *Diversos estímulos que pueden inducir la activación a través del FcεRI.* En el esquema se muestran estrategias que se han empleado experimentalmente para inducir agregación del FcεRI. In vivo, los basófilos y mastocitos tienen IgE unida a los receptores de alta afinidad en forma monomérica, sin que se induzca activación alguna; una vez que se entrecruzan o agregan esas IgEs monoméricas por la unión de antígeno multivalente, se inducen las vías de señalización que dan como resultado final la secreción de las enzimas contenidas en los gránulos citoplasmáticos, la síntesis de novo de diversos mediadores de la inflamación y de citocinas y su posterior liberación al medio extracelular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

región linker, y ambas isoformas son enzimáticamente activas (Siraganian y col., 1999; Turner y col., 2000).

Syk se expresa en casi todas las células hematopoyéticas, aunque en diferentes concentraciones. Se ha encontrado en altos niveles en el bazo y en bajas concentraciones en el timo. Se encuentra expresada en células B, basófilos, células cebadas, monocitos, leucocitos polimorfonucleares, plaquetas, eritrocitos y en linfocitos T (Siraganian y col., 1999; Turner y col., 2000).

La activación de Syk parece ser el resultado de cambios conformacionales que son inducidos por fosforilación de tirosinas o por la unión, a través de sus dominios SH2, a las tirosinas fosforiladas del ITAM. Syk fosforilada se encuentra en una conformación diferente a la de Syk no fosforilada, como se demuestra por los cambios observados en inmunoreactividad por Kimura y col. (1997a). La unión del ITAM difosforilado resulta también en un cambio conformacional de Syk no fosforilada, estimulando la actividad de cinasa de la proteína hasta 10 veces (Siraganian y col., 1999; Turner y col., 2000).

Existen al menos dos mecanismos de regulación de la actividad de cinasas de tirosina que involucran cambios en el estado de la fosforilación de residuos de tirosina específicos. En el primero participa la cinasa Lyn, y el segundo mecanismo involucra la fosforilación de residuos de tirosina dentro del asa de activación del dominio de cinasa. Estos residuos de tirosina localizados en el dominio catalítico pudieran interferir con la unión del ATP o del sustrato o ambos. La fosforilación de tales tirosinas induce un cambio conformacional en el asa de activación de tal forma que en este estado los sustratos o el ATP puedan tener acceso al dominio de cinasa. Syk tiene un asa de activación con dos tirosinas que pudieran ser importantes en la regulación de la actividad de cinasa. Estas tirosinas pueden ser fosforiladas por otra molécula de Syk (autofosforilación) o bien por otras cinasas de tirosina.

El modelo de activación de Syk durante la activación del FcεRI propone que cuando Syk se asocia al ITAM fosforilado de la cadena γ del receptor, queda en la cercanía de Lyn, la cual está asociada a la cadena β. La relocalización de Syk a la membrana y el cambio conformacional inducido por la unión al ITAM fosforilado podría permitirle ser fosforilada por Lyn u otras cinasas, incrementando su actividad catalítica (Figura 4B). La función de Syk puede también ser regulada por otras moléculas tales como Cbl. La interacción entre Cbl y Syk involucra el dominio rico en prolina de Cbl y una región de Syk que comprende

los dos dominios SH2 y la región de unión entre ambos dominios. La sobre-expresión de Cbl en células RBL-2H3 inhibe la fosforilación en tirosina y la activación de Syk inducida por el receptor, lo que sugiere que Cbl puede regular la actividad de cinasa de Syk mediante la regulación de su nivel de fosforilación en tirosina. Es posible que la función de Syk sea regulada por fosfatasas de tirosina y por otras moléculas con las cuales Syk interactúa (Siraganian y col., 1999; Turner y col., 2000).

Se ha demostrado que otras proteínas están involucradas en la vía de activación mediada por el FcεRI. Entre ellas están la cinasa de tirosina Btk, las cinasas de serina/treonina PKC y Raf-1, la cinasa de adhesión focal (FAK), PLC-γ1, el proto-oncogen Vav (encargado de activar a Ras); proteínas adaptadoras tales como Cbl, LAT y SLP-76, entre otras (Li y col., 1992; Hutchcroft y col., 1992; Kawakami y col., 1994; Stephan y col., 1992; Oliver y col., 1994; Hamawy y col., 1995, Revisado en Daeron, 1997 y en Kinet, 1999). Se ha detectado la generación de mensajeros secundarios, tales como los fosfolípidos de inositol y el incremento de Ca²⁺ intracelular. Se ha detectado también activación de integrinas, polimerización de actina, rearreglo del citoesqueleto, cambios en la morfología de la membrana, etc. (Ortega y col., 1999).

Modelos de activación por agregación del FcεRI.

Actualmente existen 2 modelos para explicar el papel de la agregación en la activación mediada a través del FcεRI. El primero (llamado de colocalización) está basado en estudios realizados por Field, Holowka y Baird, los cuales demostraron a) la asociación del FcεRI con dominios de membrana resistentes a detergentes; b) la presencia de Lyn en dominios membranales insolubles en detergentes no iónicos, luego de la estimulación con complejos IgE y antígeno. Este modelo propone que en la membrana celular existen microdominios discretos enriquecidos en esfingolípidos, colesterol y proteínas unidas a la membrana mediante enlaces de GPI (glucosilfolfatidinositol), así como cinasas de la familia Src. La asociación de las cinasas Src con la membrana está determinada por la presencia de dos cadenas aciladas saturadas, unidas covalentemente a la proteína.

La miristoilación es una modificación constitutiva en todas las cinasas de la familia Src, la cual junto con la palmitoilación, son suficientes y necesarias para mediar la asociación de la cinasa con la membrana. Cuando el FcεRI es agregado la interacción del receptor con los componentes de los microdominios se estabiliza, permitiendo así a la cinasa Lyn fosforilar

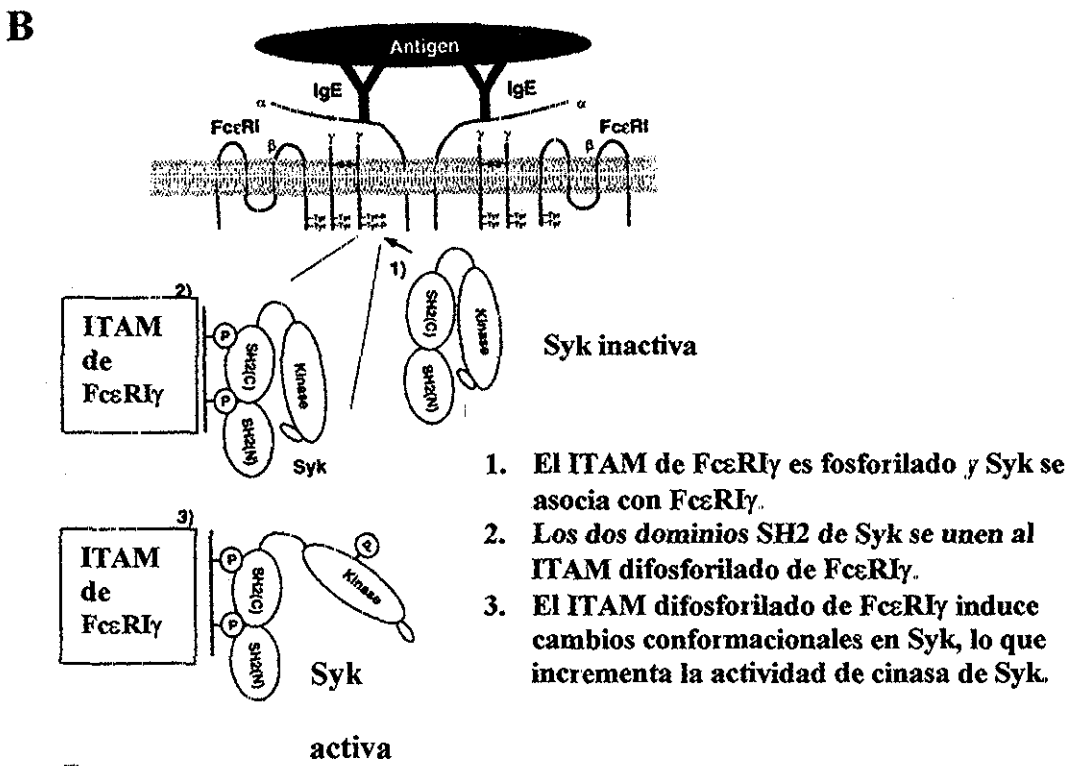
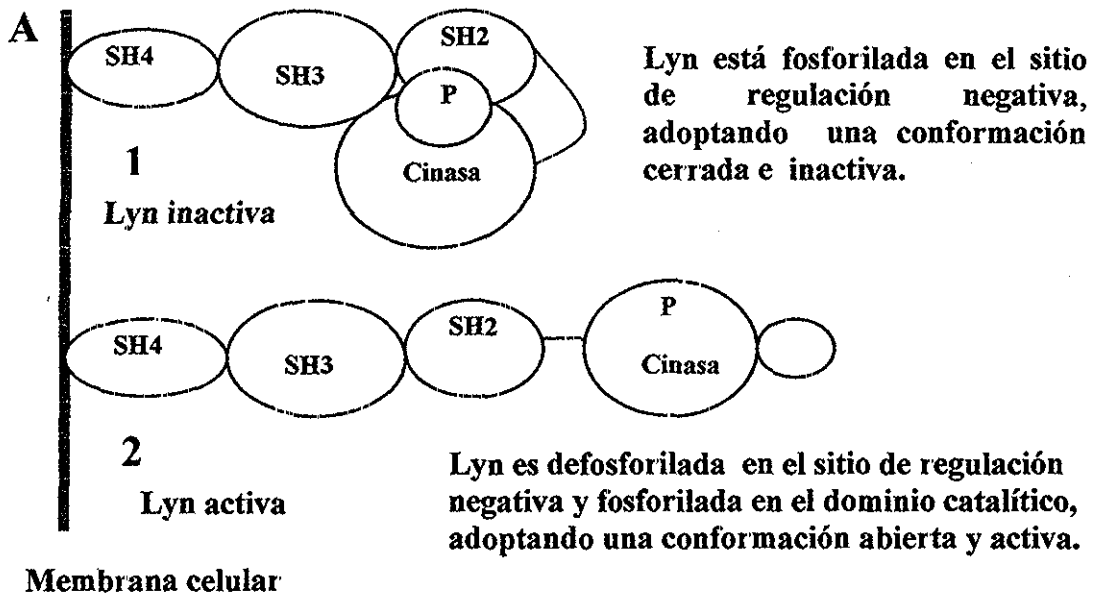


Figura 4. Esquema de la regulación de las cinasas Lyn y Syk. En estos esquemas se muestran A: la regulación de la cinasa Lyn y B: la regulación de la cinasa Syk. B está modificado de Siraganian y col., 1999.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

a los ITAMs de las cadenas del receptor (Metzger, 1999; Field y col., 1999) (Fig. 5).

El segundo modelo de activación celular a través del FcεRI propone que la activación celular se lleva a cabo por la fosforilación de los ITAMs de las cadenas del receptor, mediada por la cinasa Lyn, por un mecanismo de transfosforilación (Figura 6). Este modelo está basado en los siguientes datos: a) El grupo de Metzger demostró que al menos un 3-4% de la cinasa de tirosina Lyn se asocia a la cadena β aún en células no activadas, y que la agregación del FcεRI hace que esta asociación se incremente de 3 a 4 veces (Yamashita y col., 1994); b) Se ha visto que la cinasa Lyn aumenta su actividad catalítica poco después que el receptor es agregado (Eiseman y col., 1992); c) En otros modelos experimentales de activación por MIRRs, se ha visto que la cinasa responsable de la fosforilación de los ITAMs es una cinasa de la familia Src, la cual se une constitutivamente al receptor en células no estimuladas (Revisado en Acuto y Cantrell, 2000; y en Campbell, 1999). Ambos modelos están basados en datos experimentales, los cuales apoyan cada uno de ellos, pero para sintetizar las diferencias existentes entre ambos, el primero propone que la agregación del FcεRI induce la relocalización de los FcεRI a los microdominios de membrana en los cuales los receptores pueden ser fosforilados por la cinasa Lyn asociada a estos microdominios; mientras que el segundo modelo propone que la agregación permite que Lyn unida a un FcεRI fosforile al receptor contiguo.

Independientemente de cual sea el modelo de activación inicial, parece indudable que la cinasa Lyn es la responsable de la fosforilación de los ITAMs del receptor. Esta cinasa se ha visto asociada con el receptor en células no estimuladas (Yamashita y col., 1994) y su actividad catalítica aumenta poco después de la agregación del receptor (Eiseman y col., 1992). Diversos estudios han demostrado que otra cinasa que se activa poco después de la agregación de los FcεRI es Syk, la cual se une a las tirosinas fosforiladas del ITAM de la cadena γ. La unión de Syk a los ITAMs fosforilados induce su activación. Syk fosforila diversos sustratos celulares, continuando así con la cascada de activación celular (Stephan y col., 1992; Benhamou y col., 1993; Kihara y col., 1994; Jouvin y col., 1994; Shiue y col., 1995).

Cada una de las cadenas del FcεRI parece cumplir una función diferente: la cadena α es la encargada de unir IgE, se ha propuesto que la cadena γ es la encargada de transducir la señal de activación, mientras que la cadena β actúa como amplificador y tal vez está involucrada en la regulación negativa de la cascada de activación (Lin y col., 1996; Osborne

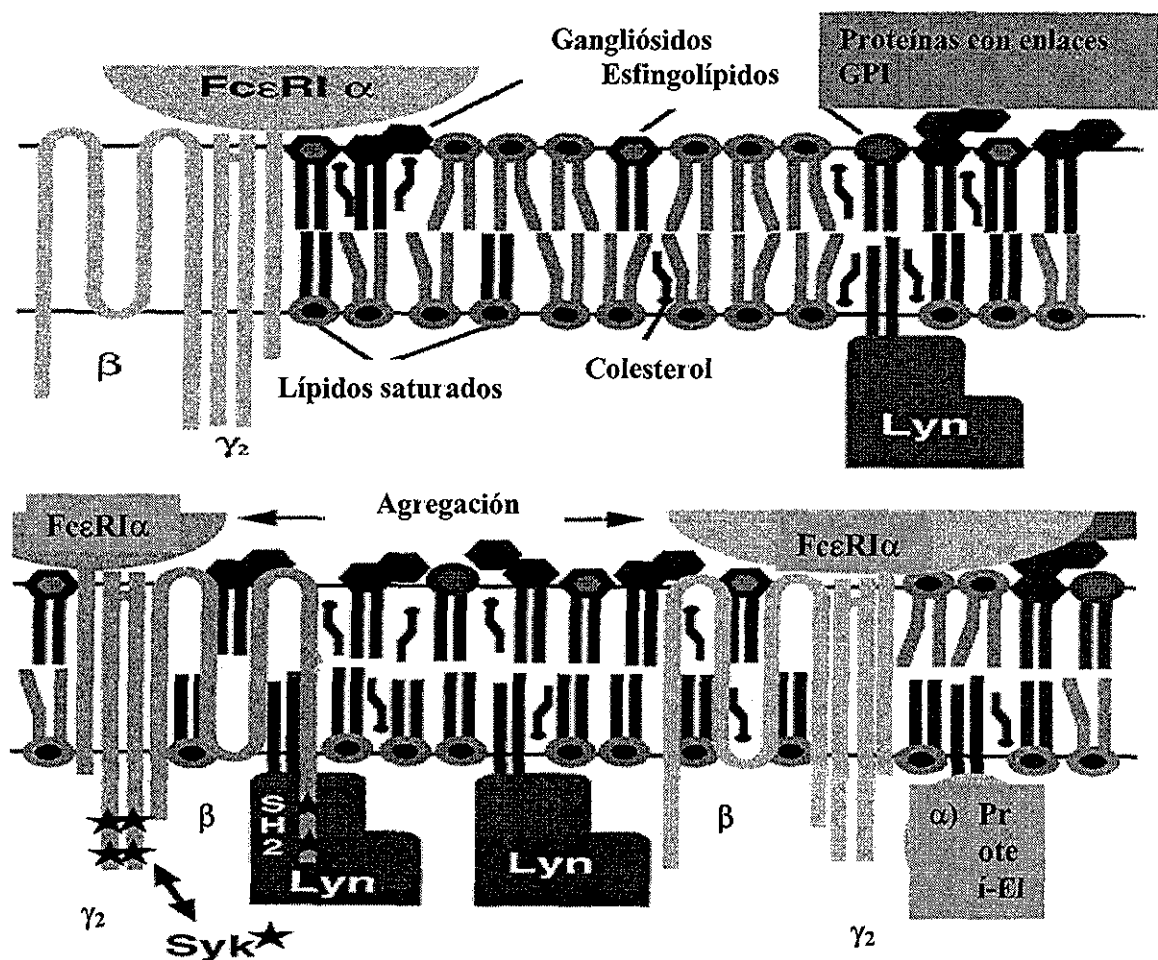


Figura 5. Modelo de co-localización para la activación a través del FcεRI. Antes de la activación del receptor (panel superior), el FcεRI está débilmente asociado o transitoriamente asociado con los componentes de los microdominios membranales denominados balsas (los lípidos que forman las balsas están representados como lípidos oscuros con cadenas aciladas rectas). Las balsas son pequeñas y dinámicas en composición y contienen una cantidad significativa de colesterol, Lyn y proteínas ancladas a la membrana por enlaces GPI. La agregación del FcεRI (panel inferior) estabiliza la asociación de los receptores con los componentes de las balsas, los cuales coalescen entre sí y alrededor de los agregados de FcεRI. Las altas concentraciones localizadas de Lyn activa permiten la fosforilación de los FcεRs asociados a las balsas (representado como O). Después de la fosforilación de los ITAMs de los receptores, más moléculas de Lyn, Syk y otros proteínas con dominios SH2 (proteínas SH2) involucradas en la transducción de señales son reclutadas para continuar la señalización. Modificado de Field y col., 1999.

y col., 1996; Kimura y col., 1997). El concepto de que la cadena β funciona como un amplificador de la señal bioquímica se basa en las siguientes observaciones: (a) no tiene una capacidad autónoma para activar la célula, (b) amplifica la intensidad de las señales de activación de la cadena γ hasta 7 veces, y (c) no altera cualitativamente las señales de activación de la cadena γ (Lin y col., 1996). En estudios realizados *in vitro* se ha demostrado que el ITAM de la cadena β une a diversas fosfatasa, entre las que se encuentran SHP-1, SHP-2 y SHIP, lo cual sugiere que esta cadena pudiera estar involucrada en la regulación negativa de las señales de activación (Osborne y col., 1996; Kimura y col., 1997).

En los últimos años numerosos grupos de investigación han trabajado en la disección de la cascada de señales inducida por el Fc ϵ RI, la importancia de los ITAMs en la activación y las diferencias en las señales inducidas por las dos cadenas involucradas en la señalización a través de este receptor. Estudios realizados con receptores quiméricos que contienen la secuencia del ITAM de β o el ITAM de γ en su porción citoplasmática, han mostrado que el entrecruzamiento de las quimeras de γ induce las mismas respuestas celulares observadas con el receptor completo, aunque con diferencias en la eficiencia de la respuesta. En contraste, las quimeras que contienen el ITAM de β no son capaces de inducir las mismas respuestas (Paolini, y col., 1994; Wilson y col. 1995; Jouvin y col., 1994; Shiue y col., 1995). Estos estudios demuestran que los ITAMs de ambas cadenas son necesarios para inducir una respuesta celular de igual magnitud a la observada con el receptor completo.

Trabajos realizados por Rivera y col. mostraron que usando receptores quiméricos que contienen en su porción citoplasmática la secuencia de la cinasa Syk, es posible inducir la cascada de señales que dispara el Fc ϵ RI induciendo el entrecruzamiento de los receptores quiméricos mediante anticuerpos específicos (Rivera y col., 1995). Por otro lado, se ha demostrado que el piceatannol (inhibidor específico de Syk) abole completamente la cascada de eventos generada por el Fc ϵ RI (Oliver y col., 1994). Ambos estudios señalan la importancia de la cinasa Syk en la cascada de señales (Figura 6).

Más adelante en la cascada de señalización mediada a través del Fc ϵ RI, se ha demostrado que otras cinasas de tirosina pertenecientes a la familia Tec (Btk e Itk) son activadas luego de la agregación del receptor, (Kawakami y col., 1998; Hata y col., 1998). La ausencia de Btk está asociada a la agamaglobulinemia ligada al cromosoma X en humanos y la inmunodeficiencia ligada al cromosoma X en ratones (Revisado en Kinet, 1999). En células

cebadas se ha visto que es necesaria la presencia y activación de Btk para obtener una máxima activación del gene de IL-2 al agregar el FcεRI (Hata y col, 1998).

Estudios realizados en células B y estudios de reconstitución demostraron que el mecanismo de activación de Syk y de las cinasas de Tec es similar y es iniciado por Lyn, la cual fosforila una tirosina localizada en el asa de activación de Syk y Btk, involucrada en la regulación de la actividad enzimática de la proteína (El-Hillal y col., 1997; Rawlings y col., 1996).

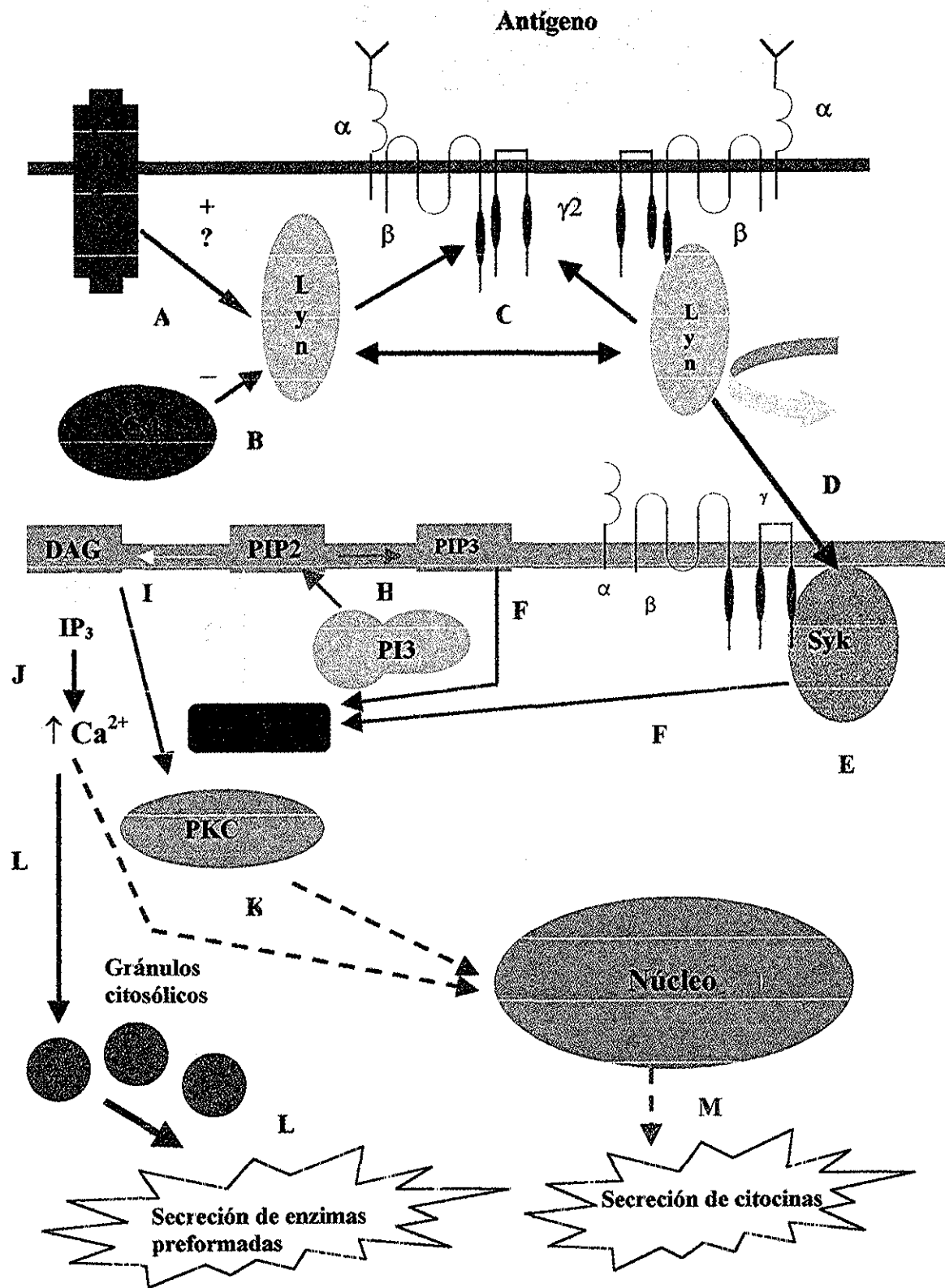
En células B se ha observado que Tec está involucrada en la activación de PLCγ, incrementando la producción de IP3 dependiente de PIP₃, la cual parece ser crítica para mantener el influjo de Ca²⁺ (Scharenberg y col, 1998; Fluckinger y col., 1998) El incremento de Ca²⁺ inducido por la activación de PI3K-Btk- PLCγ, es requerido para la activación de las cascadas de las MAPK: JNK y p38, y la activación de los factores de transcripción NF-AT y NF-κB (Revisado en Kinet, 1999).

Células cebadas

Las células cebadas o mastocitos y los basófilos son células hematopoyéticas especializadas que expresan en membrana el receptor de alta afinidad para IgE, se tiñen metacromáticamente, sintetizan diversas citocinas y tienen cantidades comparables de histamina. Anteriormente se pensaba que estos dos tipos celulares tenían un progenitor común, o que un tipo celular daba origen a otro. Actualmente se sabe que estas suposiciones no son correctas, ya que los basófilos parecen representar una célula diferenciada más que un precursor circulante de las células cebadas (Fig. 7). Además los basófilos y las células cebadas tienen características distinguibles con respecto a su morfología, contenido de mediadores de inflamación (Fig. 8), respuesta a distintas citocinas y moléculas de superficie específicas de cada tipo celular (Li y col., 1999).

Las células cebadas y los basófilos se originan de células pluripotenciales hematopoyéticas; los basófilos completan su diferenciación en la médula ósea, se encuentran circulando en sangre periférica y no se encuentran en tejidos.

Las células cebadas se originan en la médula ósea y atraviesan los vasos sanguíneos para entrar a los tejidos, donde completan su diferenciación y maduración (Fig. 7). Se ha reportado que el precursor de células cebadas en sangre periférica es una célula mononuclear no granulada que expresa el marcador CD34. Las células cebadas maduras



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6. *Modelo de transducción de señales de activación a través del FcεRI*. La primera cinasa en activarse después del entrecruzamiento del receptor es Lyn. La regulación de la activación de Lyn es llevada a cabo por una fosfatasa y una cinasa de tirosina; la primera posiblemente sea CD45, la que actuaría desfosforilando a la tirosina involucrada en la regulación negativa de la cinasa Lyn (A). La cinasa participante en la activación de Lyn es Csk, quien fosforilaría el residuo de regulación, inactivando Lyn (B). La fosforilación de los ITAMs del receptor es llevada a cabo por la cinasa Lyn (ya sea por el mecanismo de transfosforilación o de colocalización) la cual se encuentra unida a la cadena β en células no estimuladas (C), además, Lyn contribuye a la activación de la cinasa Syk al fosforilarla (D). Una vez fosforilado, el ITAM de la cadena γ actúa como sitio de anclaje para la cinasa Syk (E). Esto inicia una serie de eventos entre los cuales está la activación de PLCγ, en cuya activación participan las cinasas Syk y Btk, la molécula PIP₃ y posiblemente las moléculas adaptadoras LAT y SLP76 (F). La PLCγ activa actúa sobre el PI (4,5) P₂ generando DAG e IP₃ (G), mientras que la PI3K actúa sobre el mismo sustrato (PIP₂), pero genera PIP₃ (H). El DAG participa en la activación de ciertas isoformas de PKC (I), y el IP₃ induce la liberación de Ca²⁺ de pozas internas (J). Ambos eventos son necesarios para continuar la cascada de señales que llevan a la activación y traslocación de factores de transcripción al núcleo (K). El incremento de Ca²⁺ conlleva a la secreción de las diversas enzimas contenidas en los gránulos citoplasmáticos, al fusionarse dichos gránulos a la membrana celular, vertiendo su contenido al medio extracelular (L). Las señales que llegan al núcleo inducen la síntesis de proteínas, principalmente citocinas, las cuales son secretadas al medio externo (M).

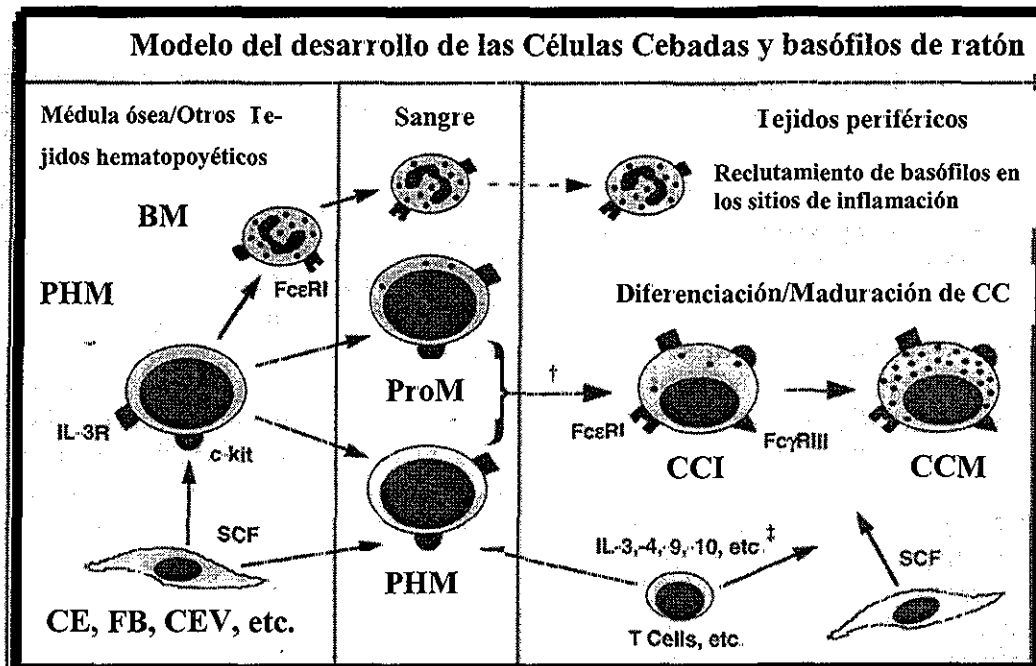


Figura 7. *Modelo del desarrollo de células cebadas y basófilos murinos.* Los basófilos se originan de un progenitor hematopoyético multipotencial (PHM) $c\text{-kit}^+$, y maduran en la médula ósea antes de entrar a torrente sanguíneo. Los basófilos pueden ser reclutados de la sangre a los sitios de inflamación o sitios de respuesta inmune. Los basófilos humanos y murinos expresan niveles relativamente bajos de $c\text{-kit}$ en la membrana celular. Las células cebadas (CC) también se originan de progenitores hematopoyéticos multipotenciales, pero la mayor parte de los procesos de diferenciación y maduración de estas células se lleva a cabo en los tejidos. Las células cebadas expresan niveles altos de $c\text{-kit}$ en membrana durante su desarrollo, y estos receptores pueden interactuar con la forma soluble de stem cell factor (SCF) o la asociada a membrana. El precursor de las células cebadas, llamado promastocito (ProM), ha sido identificado en sangre de fetos murinos. La sangre de fetos murinos y de ratones adultos también contiene progenitores hematopoyéticos multipotenciales, los cuales, en circunstancias apropiadas, pueden dar origen tanto a células cebadas como a otros tipos celulares. No es claro hasta el momento si las células cebadas que residen en tejido son derivadas de los promastocitos o de los progenitores multipotenciales que se encuentran en torrente sanguíneo. El fenotipo de las células cebadas maduras (CCM) puede variar considerablemente dependiendo del sitio anatómico en el cual se encuentre, debido en parte a los niveles locales de SCF y de otras citocinas entre las cuales se encuentran IL-3, IL-4, IL-9 e IL-10. Las características fenotípicas de las células cebadas pueden variar durante el curso de una respuesta inmune o de un proceso inflamatorio. BM: basófilos maduros; CCI: Cel. Ceb. inmaduras; CE: Cél. de estroma; FB: Fibroblastos; CEV: Cél. del endotelio vascular. Modificada de Galli y col., 1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

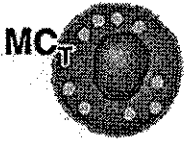
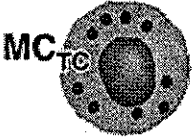
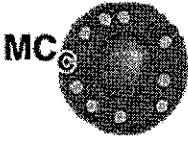

	Contenido	Distribución
	<p> Triptasa ⁺; Quimasa ⁻ Carboxipeptidasa ⁻ IgERI ⁺ Morfología granular </p>	<p> Mucosa Pared Alveolar Mucosa bronquial Mucosa nasal </p>
	<p> Triptasa ⁺; Quimasa ⁺ Carboxipeptidasa ⁺ IgERI ⁺ Morfología granular </p>	<p> Piel Submucosa Mucosa bronquial Mucosa nasal </p>
	<p> Triptasa ⁺; Quimasa ⁺ IgERI ⁺ </p>	<p> Submucosa estomacal Submucosa del intestino delgado Mucosa bronquial </p>
	<p> Triptasa ^{+/-} Cimasa ⁻; IgERI ⁺ Carboxipeptidasa ⁻ Homogéneo Morfología granular </p>	<p> Circulación </p>

Figura 8. Características de distintos tipos de mastocitos y de basófilos y su distribución in vivo. MC_T: Mastocito que contiene triptasa; MC_{TC}: Mastocito que contiene triptasa y quimasa; MC_C: Mastocito que contiene quimasa. Modificada de Li y col., 1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES

En el estudio del mecanismo por el cual la agregación del FcεRI inicia la transducción de señales se han utilizado diversas metodologías, que van desde el uso del ligando natural (IgE + antígeno multivalente) hasta el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos para el receptor. Los estudios realizados sobre este tema han generado una gran cantidad de datos que permiten ir descifrando los requerimientos mínimos necesarios para generar una señal de activación a través del FcεRI, y han ido identificando diversos eventos bioquímicos generados por esa activación.

En este contexto, Ortega y col. (1988) generaron un conjunto de anticuerpos monoclonales específicos para determinantes presentes en la región extracelular de la cadena α del receptor de alta afinidad para IgE. En este estudio se demostró que fragmentos Fab de los anticuerpos monoclonales competían por el sitio de unión de IgE sobre la cadena α del receptor y que la estequiometría de unión era de 1 Fab: 1 FcεRI. Siendo los tres anticuerpos de la clase IgG, esta estequiometría indica que los anticuerpos monoclonales intactos sólo pueden inducir la formación de dímeros del FcεRI (Ortega y col., 1988). Los monoclonales H10, F4 y J17 indujeron la secreción de enzimas contenidas en los gránulos de secreción de las células cebadas de la línea RBL-2H3, demostrando que la unidad mínima de señalización por el FcεRI es el dímero. Una observación importante fue que no todos los anticuerpos monoclonales tenían la misma eficiencia para inducir las señales de activación celular. Los monoclonales H10 y J17 indujeron niveles bajos de liberación de β-hexosaminidasa (una enzima contenida en los gránulos de secreción), mientras que la secreción inducida por el monoclonal F4 era prácticamente el doble de la inducida por los otros monoclonales y similar en términos cuantitativos, al máximo de secreción inducida por IgE y antígeno multivalente (Ortega y col. 1988).

Así mismo, en otros experimentos se observaron diferencias entre los tres monoclonales en su capacidad de inducir la liberación de ácido araquidónico (AA) y leucotrienos (LTC₄): el monoclonal F4 inducía niveles de liberación de AA y LTC₄ semejantes a los inducidos con IgE + antígeno multivalente, mientras que los monoclonales J17 y H10 inducían niveles insignificantes de liberación de AA; el J17 inducía la liberación de LTC₄, y que el H10 no la inducía (Ortega y col., 1989).

Para explicar estas diferencias en la capacidad de los distintos anticuerpos para inducir secreción se propusieron 2 alternativas: a) que debido a su afinidad y sus cinéticas de

asociación/disociación, cada uno de los anticuerpos monoclonales inducía diferente número de dímeros de FcεRI, b) que la mayor secreción inducida por el anticuerpo monoclonal F4 se debiera a que este anticuerpo indujera, directa o indirectamente, la formación de multímeros o agregados mayores de FcεRI (Menon y col., 1986).

Para analizar la primera hipótesis se calculó matemáticamente la proporción de dímeros inducidos por distintas concentraciones de anticuerpo, y se compararon con las curvas de secreción inducida por cada anticuerpo. Los resultados de éste análisis mostraron que el grado de dimerización inducido por cada uno de los monoclonales no explica las diferencias observadas en la respuesta secretora inducida por cada uno de ellos (Ortega y col., 1988), sugiriendo más bien que los dímeros de FcεRI inducidos por cada anticuerpo, tienen distintas eficiencias para inducir secreción.

Una posible explicación de las distintas eficiencias de los dímeros inducidos por cada anticuerpo para mediar secreción es que la unión de cada uno de los diferentes anticuerpos al receptor modifica de alguna manera la capacidad del FcεR para inducir secreción al ser agregado. Para analizar esta posibilidad se realizaron ensayos de secreción utilizando fragmentos Fab de cada uno de los anticuerpos monoclonales, entrecruzando éstos con un segundo anticuerpo. Se observó que utilizando esta metodología los 3 monoclonales eran capaces de inducir niveles de secreción casi iguales a los observados con complejos de IgE y antígeno (Ortega y col., 1988). Estos resultados indican que en la eficiencia de los dímeros inducidos por cada anticuerpo es determinante la estructura intacta de la molécula de IgG, por lo que se sugirió que las diferencias observadas entre los anticuerpos F4, J17 y el H10 se deben a restricciones de conformación/orientación de los dímeros del receptor inducidos por cada uno de los anticuerpos.

La posibilidad de que la estimulación con algunos de los anticuerpos propicie la formación de agregados de FcεR con alta multiplicidad se examinó en ensayos de marcaje de los receptores agregados con oro coloidal, en los cuales se observó que no había formación de agregados grandes de receptores con ninguno de los 3 anticuerpos monoclonales. En células estimuladas con complejos de IgE y antígeno se observaba el comportamiento típico de este estímulo al inducir la formación de grupos de receptores en ciertas zonas de la membrana (Ortega y col., 1999). Estos resultados son congruentes con la hipótesis de que las diferencias observadas en cuanto a la secreción inducida por los anticuerpos monoclonales son debidas a diferencias en la eficiencia de los dímeros formados por los

distintos monoclonales. En otras palabras, que cada uno de los distintos anticuerpos, en virtud de sus propiedades de unión y epítotope reconocido, induce dímeros de FcεR con distintas propiedades (conformacionales, cinéticas, biofísicas) que son determinantes para su capacidad de inducir activación.

La cinética del decaimiento de la fosforescencia de la eritrosina es un método utilizado para estudiar la movilidad rotacional de componentes de membrana, la cual está relacionada con el tamaño y la libertad de movimiento de éstos, y por tanto con su estado de agregación. Los patrones de decaimiento de la fosforescencia de la eritrosina observados fueron diferentes para cada uno de los anticuerpos monoclonales unidos al FcεR sobre células RBL-2H3. El H10 mostró la movilidad rotacional más alta de los tres, a pesar de ser el menos efectivo en la inducción de una respuesta de secreción, mientras que el F4 es aparentemente inmóvil una vez que se une al receptor y sin embargo es el que induce una respuesta de secreción mayor. El J17 mostró variaciones complejas en su comportamiento en las condiciones de temperatura estudiadas (Pecht y col., 1991). Estos datos demostraron que los complejos anticuerpo-receptor formados por cada anticuerpo efectivamente muestran diferencias en al menos una importante propiedad (movilidad rotacional), aunque obviamente no brindan información sobre cual es la base molecular (estructural) de estas diferencias.

Por otro lado, otra vertiente de esta línea de investigación se centró en el estudio de los eventos bioquímicos intracelulares inducidos tras la estimulación de células RBL-2H3 con los anticuerpos. Se sabe que el incremento de Ca^{2+} citosólico está involucrado en la secreción de enzimas, y que la síntesis de fosfolípidos de inositol es importante para éste incremento, por lo que se procedió a estudiar estas dos respuestas bioquímicas, así como los cambios morfológicos de membrana y el rearrreglo del citoesqueleto.

Los resultados de la cuantificación de fosfolípidos de inositol mostraron que el H10 inducía cantidades menores de fosfolípidos de inositol al compararlo con los anticuerpos F4 y J17 (Ortega y col., 1989; Ortega y col., 1999). Estos resultados correlacionan con los datos de secreción de enzimas (Ortega y col., 1988).

Al realizar la cuantificación del incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} inducido por cada uno de los anticuerpos monoclonales en células individuales, se observaron diferencias importantes en los patrones de incremento de Ca^{2+} entre los 3 anticuerpos. La respuesta observada en las células estimuladas con complejos de IgE y

antígeno es una espiga muy pronunciada, la cual indica la salida del Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares, seguido de una elevación sostenida de (Ca^{2+}) debido al influjo del Ca^{2+} del exterior. En las células estimuladas con F4 y J17 se observa un patrón similar al observado con complejos de IgE y antígeno, aunque los niveles de Ca^{2+} no alcanzan los inducidos por éste estímulo. Sin embargo, los patrones inducidos por el H10 mostraron sólo espigas a través del tiempo del ensayo, indicando que existe la liberación del Ca^{2+} de los compartimentos internos, el cual es recapturado en estos compartimentos y liberado al citosol nuevamente de una manera continua (Ortega y col., 1999). Esto sugirió que la estimulación con el anticuerpo H10 sí es capaz de inducir la fase inicial de la respuesta de Ca^{2+} , pero que la estimulación por este anticuerpo no produce una elevación sostenida de la concentración de Ca^{2+} , sugiriendo que no hay influjo de Ca^{2+} del medio extracelular.

Al analizar los cambios morfológicos inducidos en células RBL-2H3 tras la estimulación a través del FcεR mediante microscopía electrónica de barrido, se observó que las células estimuladas con J17, F4 ó complejos de IgE y antígeno mostraron una fuerte respuesta de extensión celular (spreading), así como cambios morfológicos de la membrana celular induciéndose la formación de filamentos de actina (Ortega y col., 1999). Esto contrasta con los cambios morfológicos observados en las células estimuladas con el anticuerpo H10, las cuales mostraron una baja respuesta de extensión celular. El rearrreglo del citoesqueleto y la formación de placas de actina fue analizado mediante microscopía de fluorescencia. Estos estudios mostraron que en las células estimuladas con complejos de IgE y antígeno se detectó el ensamblaje de placas de actina en los sitios de interacción de la célula con el sustrato. Las células estimuladas con los anticuerpos F4 y J17 dieron una respuesta semejante a la inducida con complejos de IgE y antígeno. También se observó que el anticuerpo H10 inducía muy poca o nula formación de placas de actina, en comparación con lo observado con el resto de los estímulos (Ortega y col., 1999).

Los datos obtenidos en el estudio de las respuestas bioquímicas y los cambios morfológicos sugerían que efectivamente existen diferencias en las vías bioquímicas inducidas por el H10 y aquellas inducidas por los estímulos restantes, incentivando estudios encaminados a profundizar el análisis de las diferencias en las vías bioquímicas de activación iniciadas por los dímeros inducidos por cada uno de los anticuerpos monoclonales.

JUSTIFICACION

La respuesta de células cebadas y basófilos a la estimulación a través del FcεRI tiene un papel central en las reacciones alérgicas. De ahí el interés por estudiar el mecanismo de esta respuesta, para encontrar puntos clave que permitan desarrollar agentes capaces de controlarla.

En este contexto, Ortega, Pecht y colaboradores produjeron y han caracterizado un conjunto de anticuerpos monoclonales específicos para el FcεRI en la superficie de células RBL-2H3. Estos anticuerpos, llamados F4, J17 y H10, son capaces de inducir la formación de dímeros de FcεRI, pero no de agregados mayores. Como se resumió en la sección de antecedentes, los estudios han mostrado que los dímeros de FcεRI formados por cada anticuerpo difieren en su capacidad de inducir activación celular.

Los estudios que conforman esta tesis estuvieron encaminados a analizar los mecanismos bioquímicos responsables de estas diferencias, analizando la capacidad de los dímeros de FcεRI producidos por cada anticuerpo para inducir la activación de cinasas de tirosina y la fosforilación de proteínas en tirosina, dos de los eventos bioquímicos más tempranos en la ruta de señalización activada por el FcεRI.

Asimismo, Ortega y col. observaron que las diferencias en la capacidad estimuladora de los anticuerpos monoclonales anti-FcεRI desaparecían al utilizar fragmentos Fab de cada anticuerpo y entrecruzarlos mediante un segundo anticuerpo (Ortega y col, 1988). Por lo tanto también analizamos si los eventos bioquímicos de activación de cinasas y fosforilación de proteínas ocurridos al inducir la formación de dímeros de FcεRI por el H10, son modificados al formar agregados de receptores de mayor tamaño.

Creemos que este trabajo nos permitirá tener mayor información de los procesos involucrados en la activación mediada por el FcεRI.

HIPOTESIS

La hipótesis de este trabajo es que las diferencias cuantitativas observadas en la secreción de enzimas preformadas contenidas en los gránulos citosólicos y de mediadores proinflamatorios sintetizados *de novo* al estimular las células RBL-2H3 con los distintos anticuerpos monoclonales anti-FcεRI: F4, J17 y H10 se deben a diferencias bioquímicas en las vías de transducción de señales iniciadas por los dímeros de FcεRI. Una hipótesis secundaria es que tales diferencias podrían desaparecer si se incrementa el número de receptores que forma cada agregado (de dímeros a oligómeros).

OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar la activación y asociación de cinasas de tirosina al receptor de alta afinidad para IgE y los patrones de fosforilación de las cadenas del receptor al inducir la agregación de éste mediante diferentes estímulos de activación, en la línea celular RBL-2H3.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar la activación y fosforilación de las cinasas Lyn y Syk al agregar los receptores de alta afinidad para IgE con los Ac. Mo. F4, J17, H10, y H10 y un segundo anticuerpo entrecruzante (cabra anti-IgG de ratón) y compararlos con los observados al estimular con complejos IgE y antígeno.
2. Caracterizar la asociación de la cinasa Lyn a las cadenas γ y β del receptor de alta afinidad para IgE al agregar los receptores de alta afinidad para IgE con los Ac. Mo. F4, J17, H10, y H10 y un segundo anticuerpo entrecruzante (cabra anti-IgG de ratón) y compararlos con los observados al estimular con complejos IgE y antígeno.
3. Caracterizar los patrones de fosforilación en tirosina de las cadenas del receptor de alta afinidad para IgE al agregar los receptores de alta afinidad para IgE con los Ac. Mo. F4, J17, H10, y H10 y un segundo anticuerpo entrecruzante (cabra anti-IgG de ratón) y compararlos con los observados al estimular con complejos IgE y antígeno.

MATERIAL Y METODOS

Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal de la clase IgE específico para el hapteno DNP producido por el hibridoma SPE7 fue purificado en columna de afinidad por Claudia Garay Canales; los monoclonales anti- Fc ϵ RI: H10 (IgG2b, K_a : $20 \times 10^7 M^{-1}$), F4 (IgG1, K_a : $1 \times 10^7 M^{-1}$), y J17 (IgG1, K_a : $2 \times 10^7 M^{-1}$) (Ortega y col., 1988), fueron producidos por el Dr. Ortega en el Weizmann Institute of Science (Rohovot, Israel); el monoclonal anti- β (anti-beta), fue proporcionado por el Dr. Juan Rivera (NIH, Bethesda, MD) y el anticuerpo policlonal anti- γ (anti-gamma) por el Dr. J P Kinet (Harvard Medical School, Boston, MA) El anticuerpo PY-20 se obtuvo de Transduction Laboratories (Lexington, KY); los anticuerpos PY20-HRP, Lyn-44 (anti-Lyn) y Syk N-19 (anti-Syk) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); el anticuerpo F(ab')₂ cabra anti-ratón IgG se compró a Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA); y los anticuerpos conejo anti-ratón IgG-HRP y cabra anti-conejo IgG-HRP se obtuvieron de Zymed (San Francisco, CA).

Reactivos. La proteína A y proteína G unidas a perlas de sepharosa, suero fetal bovino, Medio MEM y marcadores de peso molecular (escalera) se obtuvieron de Gibco (Rockville, MD); los siguientes reactivos fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO): p-nitrophenyl-acetyl- β -D-glucosaminide, Penicilina G, Estreptomina, Glucosa, BSA, NaVO₄, Leupeptin, Antipain, PMSF, Brij 96, Tween 20 y Hepes. La Glicina, Trizma, SDS, Acrilamida, Bis-acrilamida, Temed, Persulfato de sodio, Azul de Coomassie y Rojo Ponceau fueron comprados a Bio-Rad (Richmond, CA). El Citrato de sodio, NaCl, Metanol, Ac. acético glacial, NaHPO₄, Na₂PO₄, CaCl₂, NaHCO₂ se obtuvieron de J.T. Baker (Xalostoc, Mex); el $\gamma^{32}P$ -ATP fue obtenido de NEN (Boston, MA).

Cultivos celulares

Las células cebadas RBL-2H3 pertenecen a una línea celular que fue clonada y aislada en 1978 de basófilos de rata Wistar. Esta línea celular fue proporcionada por la Dra. J. Oliver (Universidad de Nuevo México). Las células cebadas RBL-2H3 fueron cultivadas en medio MEM suplementado con 2mM de glutamina, 1000 U/ml de Penicilina G, 0.01 mg/ml de estreptomina y 10 % de suero fetal bovino inactivado. Se mantuvieron en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂, a 37°C.

Activación del FcεRI. Se sembraron células RBL-2H3 en cajas Petri de cultivo celular en MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, glutamina y antibióticos. Se adicionó 1 µg/ml de IgE a las células correspondientes y se incubó toda la noche a 37°C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂. Se lavaron las monocapas de células con buffer de Hank's y se adicionaron los estímulos correspondientes a cada muestra. Se utilizaron 100 ng DNP-BSA (24 moléculas de DNP/molécula de BSA) como antígeno; 7 ó 70 nM de H10 según lo indicado; 70 nM de F4; 70 nM de J17; 10 nM de F(ab')₂ cabra anti-ratón para formar multímeros de H10. Se incubó a 37°C durante los tiempos indicados y se detuvo la estimulación adicionando PBS frío.

Secreción de β-hexosaminidasa. Se siguió el protocolo descrito por Ortega y col. (1991). Brevemente, se cultivaron las células RBL-2H3 en cajas Petri o en placas de 96 pozos, según el experimento a realizar. Se adicionó la IgE a las células correspondientes y se incubó a 37°C durante toda la noche, en atmósfera húmeda. Se lavaron las células con solución de Hanks y se adicionaron los estímulos indicados disueltos en Hanks. Las células se incubaron a 37°C por el tiempo indicado. Se tomaron alícuotas de 20 µl del sobrenadante de cada pozo y se colocaron en una placa de ELISA nueva, añadiendo a continuación 50 µl del sustrato de β-hexosaminidasa (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida en amortiguador de citrato 0.1 M, pH 4.5). Se adicionaron como controles, en otros pozos de la placa, lisados celulares para cuantificar el total de la enzima. Se incubó a 37°C durante 90 min y se detuvo la reacción con 150 µl de glicina 0.2 M pH 10.7. Se leyó a 405 nm en el espectrofotómetro y se hicieron los cálculos de la secreción de la enzima, expresando los resultados como el % neto del total de β-hexosaminidasa presente en las células (Ortega y col., 1991).

Secreción de serotonina. Se cultivaron 2×10^5 células por pozo en placas de 24 pozos y se adicionaron 0.004 µCi de serotonina radiactiva (Amersham; Piscataway, NJ) a todas las células, e IgE a las células correspondientes al estímulo complejos de IgE y antígeno. Se incubó durante toda la noche a 37°C en atmósfera húmeda. Se lavó con MEM suplementado y se adicionaron los estímulos. Las células utilizadas para cuentas totales se lisaron con Tritón X-100 al 1 % y como blanco de reactivo se utilizaron 200 µl de MEM.

Se incubó a 37°C durante 20 min y se detuvo la reacción con 200 µl de PBS frío. Se colocaron 350 µl de los sobrenadantes de cada pozo en los tubos para centelleo y se adicionaron 2 ml de líquido de centelleo. Se cuantificó en el contador de centelleo y se hicieron los cálculos de la secreción de la enzima, expresando los resultados como el % neto del total de serotonina presente en las células.

Inmunoprecipitación. Luego de activar las células con los estímulos establecidos previamente para el experimento, se lisaron con Brij al 1 % en 10 mM de Tris-NaCl 150 mM + 1 µg/ml de cada uno de los siguientes inhibidores Leupeptina, antipaina, NaVO₄ y PMSF. Se determinó y se ajustó la proteína a 5 mg de proteína total por muestra. Se hizo un preaclaramiento de los lisados durante 1 hr a 4°C con perlas de proteína A/G dos veces seguidas. Se adicionaron los lisados preaclarados al de perlas de proteína A/G previamente incubadas con 1 µg/ml del anticuerpo con el cual se realizó la inmunoprecipitación. Se incubó 1 hr a 4°C y se lavaron los inmunoprecipitados 1 vez con buffer de lavado 1 (Brij al 0.1 % en 10 mM de Tris-NaCl 150 mM) + inhibidores. Se realizó otro lavado con buffer de lavado 2 (10 mM de tris-NaCl 150 mM) + inhibidores y se dió un último lavado con buffer de lavado 3 (agua + inhibidores). Se adicionaron 40 µl de Buffer de muestra reductor 3X y se hirvieron las muestras durante 5'.

Inmunoblot. Después de separar las proteínas en un gel de SDS-PAGE al 10 o al 12 % de acrilamida se transfirieron las muestras a membranas de nitrocelulosa. Se visualizaron los pesos moleculares con rojo de Ponceau. **Inmunoblot anti-PY:** se bloqueó la membrana toda la noche en frío con 3 % BSA en TBS-Tween. Se lavó la membrana 15 min con TBS-Tween y se hizo otro bloqueo de 1 hora con 3% de leche + 1% de BSA en TBS-Tween. Se lavó la membrana otros 15 min con TBS-Tween y se adicionó PY-20 HRP en dilución 1:1000 en TBS-Tween con 1% de BSA. Se incubó 1 hr a temperatura ambiente. Se lavó 6 veces durante 5' con TBS-Tween. Se revelaron las proteínas con un sustrato quimioluminiscente (Super Signal de Pierce), el cual se incubó durante 5 min y se realizaron las exposiciones necesarias para observar las bandas utilizando películas Biomax de Kodak.

Para realizar un **inmunoblot proteína específico** se bloqueó la membrana con 5% de leche durante toda la noche a 4°C. Se incubó la membrana con 1 µg/ml del anticuerpo específico para la proteína que se quería visualizar en TBS-Tween + 1% BSA durante 1 hr a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con TBS-Tween y se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa en dilución 1:20,000 en TBS-Tween + 1 % de BSA y se incubó 1 hr a temperatura ambiente. Se lavó 6 veces durante 5' con TBS-Tween. Se revelaron las proteínas con un sustrato quimioluminiscente (Super Signal de Pierce; Rockford, IL), el cual se incubó durante 5 min y se realizaron las exposiciones necesarias para observar las bandas.

Reblotting. Esta metodología es utilizada para quitar el anticuerpo pegado a la membrana y permitir otro inmunoblot sobre la misma membrana. Se lavó la membrana 3 veces con TBS-Tween para retirar el sustrato quimioluminiscente. Se adicionó glicina 0.1 M pH 2.5 + 0.5 % de SDS y se incubó 1 hr a 70°C. Se lavó la membrana 3 veces con TBS-Tween y se realizó el bloqueo correspondiente, según el inmunoblot que fuera a realizarse a continuación.

Ensayos de cinasa *in vitro*. Después de la inmunoprecipitación se lavaron las perlas de sepharosa una vez con buffer de lavado 1, 3 veces con buffer de lavado 2 y una vez con buffer de cinasa (25 mM Hepes, 10 mMCl₂Mn). Se adicionaron 5µCi de γ-³²P-ATP en 40 µl de buffer de cinasa a cada muestra, y se incubó durante 10 min a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 1 ml de buffer de cinasa frío y se lavaron las perlas 5 veces más con buffer de cinasa. Se dió un último lavado con buffer de cinasa diluido 1:10 en agua para disminuir la concentración de las sales. Se adicionaron 40 µl de buffer de muestra reductor 3X y se hirvieron las muestras durante 5 min. Las proteínas se separaron en un gel de SDS-PAGE al 12 % de acrilamida. Luego de teñir el gel con azul Coomassie durante 30 minutos se dejó en destañidor toda la noche. Se secó el gel y se realizaron las autoradiografías exponiendo los geles con película Biomax de Kodak.

RESULTADOS

Como ha sido reportado, los anticuerpos monoclonales denominados F4, J17 y H10, específicos para el FcεRI, inducen distintos niveles de secreción de mediadores en las células RBL-2H3 (Ortega y col., 1988). Se utilizó BSA con 24 moléculas de DNP como antígeno específico para la IgE usada en estos ensayos.

Los resultados de ensayos de secreción de serotonina radiactiva inducida por los lotes de anticuerpos monoclonales usados en este trabajo, se muestran en la figura 9. Como puede verse, la estimulación con complejos IgE y antígeno (Cross-Linker: XL) induce niveles de secreción de alrededor del 80%, mientras que los inducidos por el monoclonal F4 son ligeramente menores. El anticuerpo J17 induce niveles de secreción ligeramente mayores que los observados con el monoclonal H10. Estos resultados confirman los reportados anteriormente (Ortega y col., 1988), siendo el patrón de secreción de la siguiente manera: F4>J17>H10 (Figura 9 y Ortega y col., 1988). Al cuantificar la producción de fosfolípidos de inositol, la respuesta inducida por el anticuerpo J17 fue más alta (Figura 1A, Ortega y col., 1999) con respecto a lo observado anteriormente, sin embargo, el patrón de respuesta sigue siendo el mismo.

Como se dijo antes, los primeros eventos bioquímicos en la transducción de señales mediada por el FcεRI son cambios en el estado de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. Tomando esto en cuenta, se pensó que las diferencias en la secreción inducida por los diferentes monoclonales anti-receptor podían deberse a una menor activación de cinasas de tirosina.

Se realizaron ensayos de actividad de cinasa *in vitro* en inmunoprecipitados anti-fosfotirosina, ya que se sabe que la activación de las cinasas Lyn y Syk está ligada a su fosforilación en tirosina. Los resultados mostraron que la estimulación de células RBL-2H3 con H10 es capaz de inducir la activación de cinasas de tirosina, induciendo la autofosforilación de las mismas y la actuación de éstas sobre otros sustratos celulares. En la figura 10 se muestra que en las células estimuladas con H10 se incorporó fosfato radioactivo en una serie de bandas entre las cuales destacan por su intensidad bandas de aproximadamente 55, 32 y 6-8 kDa, las cuales probablemente corresponden a la cinasa Lyn y a las cadenas β y γ del receptor, respectivamente. Estas dos últimas muestran una

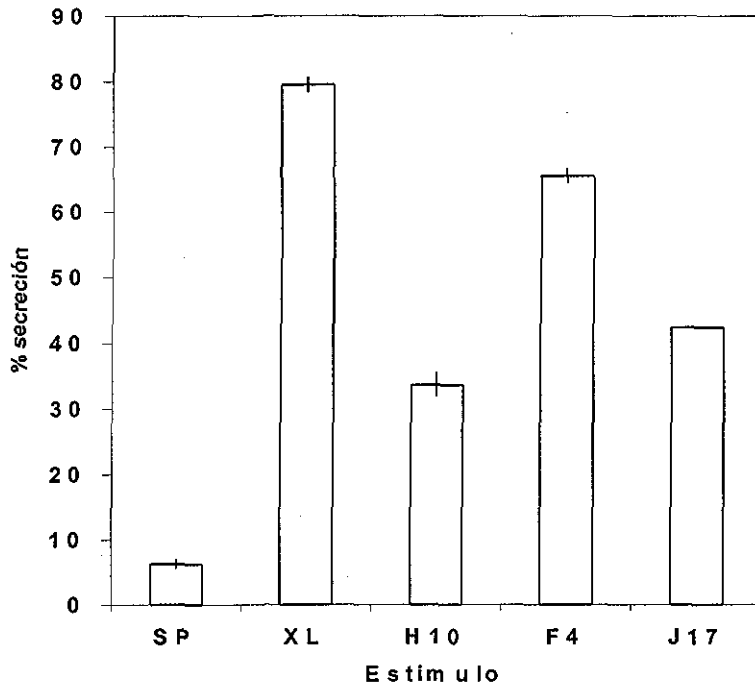


Fig. 9. Secreción de serotonina inducida por los diferentes anticuerpos monoclonales. Se marcaron células RBL-2H3 con ^3H -serotonina y se estimularon las células durante 20 minutos con los diferentes estímulos. La cantidad de serotonina radiactiva liberada después de la estimulación se cuantificó tal como se indica en material y métodos. SP: espontáneo; XL: IgE-Antígeno o crosslinker ; H10, F4 y J17: monoclonales anti-Fc ϵ RI α . Cada una de las barras muestra la desviación estandar de los datos obtenidos en el experimento.

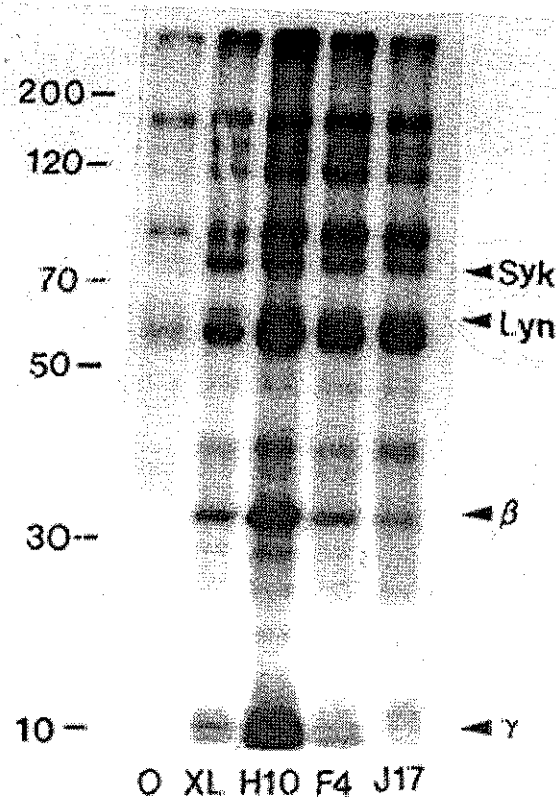


Figura 10. Efecto de la agregación del Fc ϵ RI sobre la actividad de cinasa *in vitro* de complejos inmunes anti-fosfotirosina. Se incubaron células RBL-2H3 por 5 min a 37°C sin adición (O) o con adición de 1 μ g/ml DNP-BSA (XL) o con 70 nM de monoclonales anti-Fc ϵ RI (H10, F4 y J17). La inmunoprecipitación anti-fosfotirosina se realizó con el anticuerpo anti-PY, tal y como se describe en la metodología. El ensayo de cinasa *in vitro* se realizó en los inmunoprecipitados incubándolos con (γ ³²P)ATP durante 10 min. Las fosfoproteínas resultantes fueron separadas por 10 % SDS-PAGE y detectadas por autoradiografía.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

incorporación de marca radiactiva mayor que la encontrada en inmunoprecipitados de células estimuladas con complejos IgE y antígeno (XL) o con los monoclonales F4 y J17. Resultados similares fueron observados en experimentos en los cuales los lisados fueron preaclarados mediante una incubación con perlas de sefárosa acopladas a Proteína A/G antes de usarse en la inmunoprecipitación, por lo cual se descarta que la mayor incorporación de fosfato radioactivo en las bandas de las cadenas β y γ del receptor en el carril correspondiente a H10 se deba a que este anticuerpo se una a las perlas de Proteína A/G e inmunoprecipite al receptor con él, dada la alta afinidad que tiene este anticuerpo por la cadena α del receptor. Estos resultados indican que la señalización defectuosa inducida por el H10 no es debido a la incapacidad de inducir la activación de las cinasas de tirosina responsables de la fosforilación de los residuos de tirosina de los ITAMs del receptor. Más aún, estos datos indican que en los inmunoprecipitados anti-fosfotirosina de células estimuladas con el anticuerpo H10 hay una alta actividad de cinasa *in vitro*, mayor a la observada en inmunoprecipitados de células estimuladas con los otros anticuerpos y con complejos de IgE y antígeno (XL).

En el modelo de activación actualmente aceptado para el Fc ϵ RI se considera que la cinasa encargada de la fosforilación de los residuos de tirosina de los ITAMs de las cadenas del receptor es Lyn, un porcentaje de la cual (alrededor de 3%) se ha visto unida a la cadena β en células no estimuladas, aumentando este porcentaje luego de la estimulación (Yamashita y col., 1994). Para analizar el nivel de activación de Lyn inducido por los diferentes estímulos, se realizaron ensayos de cinasa *in vitro* en inmunoprecipitados anti-Lyn, en un amplio rango de concentraciones del agente entrecruzante y diferentes tiempos de estimulación. Los resultados muestran que en los inmunoprecipitados de las células estimuladas se observa un incremento en la autofosforilación de Lyn (Fig. 11A y 12), siendo este incremento más notorio en las células estimuladas con los tres diferentes anticuerpos monoclonales (Figura 11A). En las células estimuladas con complejos IgE y antígeno o con los monoclonales F4 y J17 sólo se observa una banda fosforilada, a través del tiempo y a los diferentes rangos de concentración de los diversos estímulos (Figura 12) Sin embargo, en las células estimuladas con H10 se observan además de la banda de Lyn, dos bandas prominentes cuyos pesos moleculares relativos corresponden a los de las cadenas β y γ del receptor. Estas bandas se observan independientemente del tiempo de estimulación (Figura 12A) y de la concentración de anticuerpo usada en el ensayo (Figura

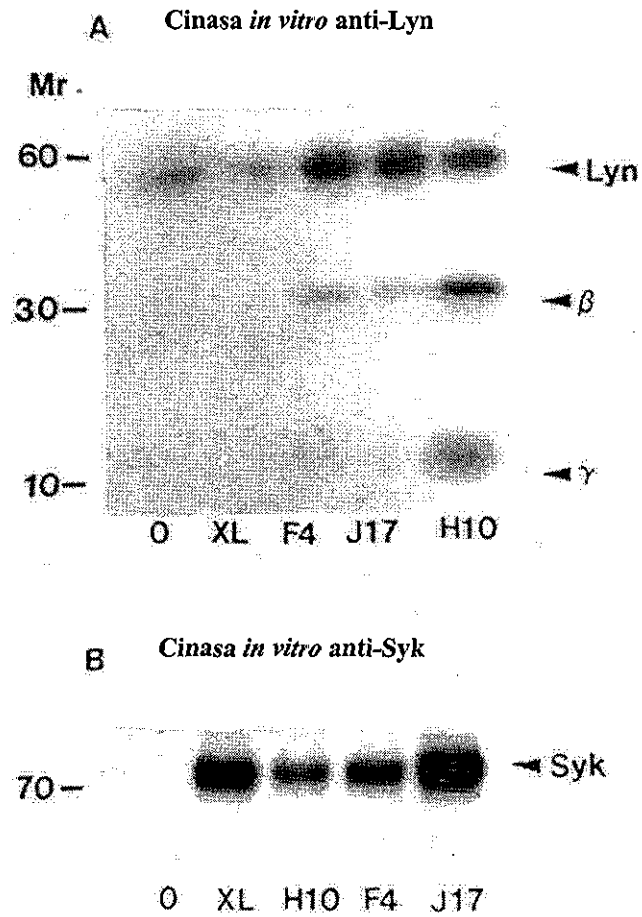


Figura 11. Efecto de la agregación del Fc ϵ RI sobre la actividad de cinasa *in vitro* de Lyn y Syk. Se siguió la metodología descrita en la figura anterior, pero los anticuerpos utilizados en la inmunoprecipitación fueron: a) anti-Lyn y b) anti-Syk.

0: espontáneo; XL: complejos de IgE y antígeno; H10, J17 y F4: anticuerpos monoclonales anti- Fc ϵ RI.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

12B). Estos resultados son la primera evidencia de que el entrecruzamiento del receptor de alta afinidad para IgE con el monoclonal H10 induce la formación de complejos estables entre Lyn y las cadenas del receptor. Esta asociación se observa desde tiempos tan tempranos como los 2 min, haciéndose más notoria a tiempos más largos (Figura 12A). Dicha asociación parece incrementarse al aumentar la concentración de anticuerpo H10 utilizada para estimular las células, hasta alcanzar un máximo a una concentración de H10 de alrededor de 100 nM. A concentraciones mayores de H10 no se observa una mayor asociación (Figura 12B).

De acuerdo al modelo actual de transducción de señales a través del FcεRI, después de la activación de Lyn y la fosforilación de las tirosinas de los ITAMs, ocurre la activación de la cinasa de tirosina Syk. Para estudiar el nivel de activación de Syk luego de la estimulación con los distintos monoclonales, se realizaron ensayos de cinasa *in vitro* en inmunoprecipitados anti-Syk. Los resultados muestran que en las células no estimuladas no hay activación de Syk, pero existe una alta actividad de ésta cinasa en las células estimuladas con Ag o los monoclonales F4 y J17, mientras que la autofosforilación de Syk en las células estimuladas con H10 es la más baja de entre los estímulos utilizados (Figura 11B).

Como se describió arriba, en los ensayos de cinasa *in vitro* en inmunoprecipitados anti-PY (Figura 10) y anti-Lyn (Figura 11A), se detecta una incorporación significativa de fosfato radiactivo en bandas de 32 y 9 kDa. Para determinar la identidad de la banda de aproximadamente 32 kDa observada en dichos ensayos de cinasa *in vitro* se realizaron western blots anti-cadena beta del FcεRI (anti-β) y antifosfotirosina en inmunoprecipitados anti-PY y anti-Lyn. El inmunoblot de inmunoprecipitados antifosfotirosina mostró 3 bandas reconocidas por el anticuerpo anti-β, con diferente comportamiento electrofóretico aunque todas ellas en la zona del peso molecular correspondiente a la cadena beta (Fig. 13A). Tres bandas con comportamiento electrofóretico similar también fueron detectadas en inmunoblot anti-fosfotirosina de los inmunoprecipitados anti-PY (Fig. 13B). Estas bandas fueron designadas β₁, β₂ y β₃, empezando por la que muestra mayor corrimiento electrofóretico. En virtud de que en otras proteínas se han observado diferencias en la migración electrofóretica debidas a distinto grado de fosforilación, es posible que las diferencias observadas en el patrón electrofóretico sean igualmente debidas a diferencias en el grado de fosforilación de cada una de las tres bandas observadas, siendo β₃ la más

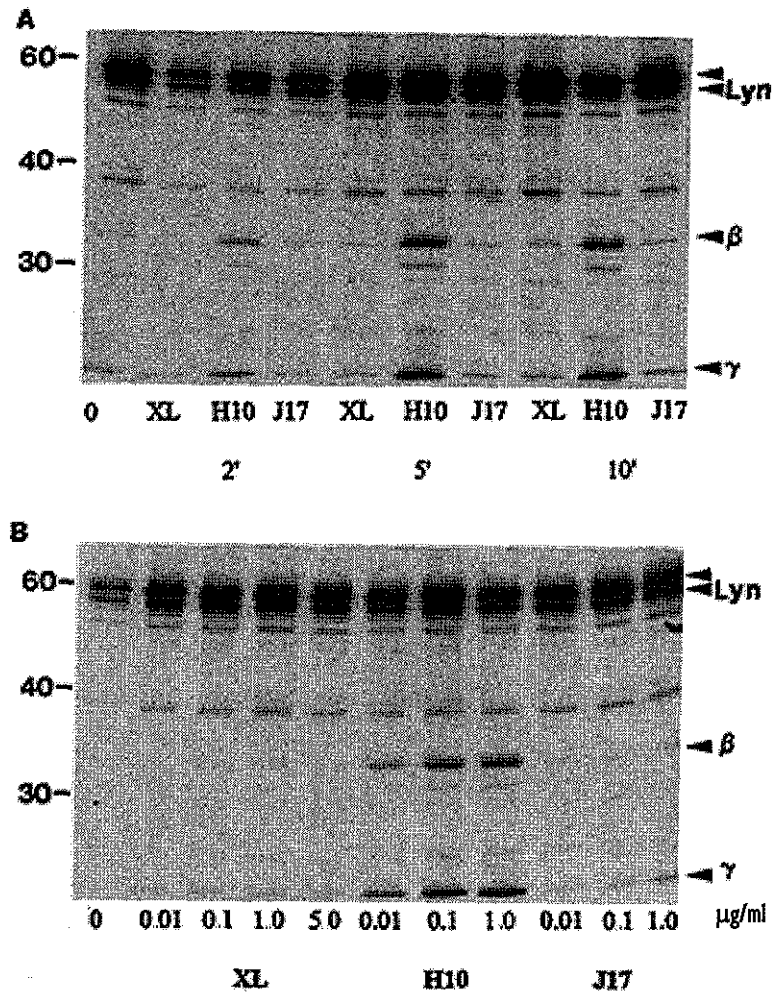


Figura 12. Asociación de las cadenas del Fc ϵ RI con la cinasa Lyn en células estimuladas con H10. A: Las células fueron incubadas durante 2, 5 o 10 minutos a 37 °C con 0.1 μ g/ml de DNP-BSA (XL) o 70 nM de anticuerpos anti- Fc ϵ RI H10 o J17. B: se incubaron las células 5 minutos a 37 °C, variando las concentraciones en μ g/ml de los estímulos utilizados. La metodología usada es igual a la de la fig. 11.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

fosforilada. Es notorio que las cantidades relativas de cada una de las bandas dependen del estímulo: la banda β_3 se observa en las células estimuladas con XL, F4 y J17, siendo apenas perceptible en las células estimuladas con H10 (Fig. 13a). La banda β_2 se observó en todos los estímulos, pero con mayor intensidad en las células estimuladas con H10, mientras que la banda β_1 sólo fue observada en las células estimuladas con H10 (Fig. 13A). En el inmunoblot anti-beta de los inmunoprecipitados anti-Lyn se observó que las bandas β_1 y β_2 se asocian a la cinasa Lyn en las células estimuladas con H10, mientras que en las células estimuladas con XL no se observa coprecipitación de las diferentes bandas de beta fosforiladas con la cinasa Lyn (Fig. 13B). La banda β_2 se observa en células estimuladas con F4, y es apenas perceptible en células estimuladas con J17 (Fig. 13B). Se realizó un análisis densitométrico de este experimento, para estimar las cantidades relativas de β en las distintas bandas observadas con cada uno de los estímulos. La relación $\beta_3: \beta_2: \beta_1$ fue: 42:57:1 en las células estimuladas con IgE + antígeno, 46:52:2 en las células estimuladas con J17, 21:72:7 en las células estimuladas con F4 y 9:76:15 en el carril correspondiente a las células estimuladas con H10 (Figura 13A). Además para determinar si el nivel de fosforilación es similar en las tres bandas de β , se calculó la relación entre la intensidad de la banda en el blot anti-PY con la intensidad de la banda correspondiente en el blot anti- β . Los promedios de los valores obtenidos (señal PY/señal β) fueron: 0.96 para β_3 , 0.25 para β_2 , y 0.15 para β_1 .

Los datos presentados hasta aquí sugieren que la estimulación con el anticuerpo H10 sí es capaz de iniciar la transducción de señales, ya que hay una significativa activación de la cinasa Lyn. Sin embargo, la cascada no continúa, pues la activación de Syk y otras respuestas posteriores es muy baja. Este bloqueo puede estar relacionado a la fuerte asociación detectada entre la cinasa Lyn y las cadenas β y γ del receptor, que es evidente únicamente en células estimuladas por H10. Hemos propuesto que la asociación tan intensa de β y γ con Lyn pudiera no permitir la activación de la cinasa Syk (Ortega y col., 1999). Esto podría ser una explicación a la baja señalización inducida por H10 (Figura 20).

Como ya se mencionó, en distintos sistemas se ha observado que ciertos estímulos no inducen respuesta celular cuando se encuentran en forma soluble o cuando forman dímeros, pero al presentarlos a las células en fase sólida o cuando los agregados inducidos son más grandes, los mismos ligandos inducen activación (Pleinman y col., 1994; Brunswik y col.,

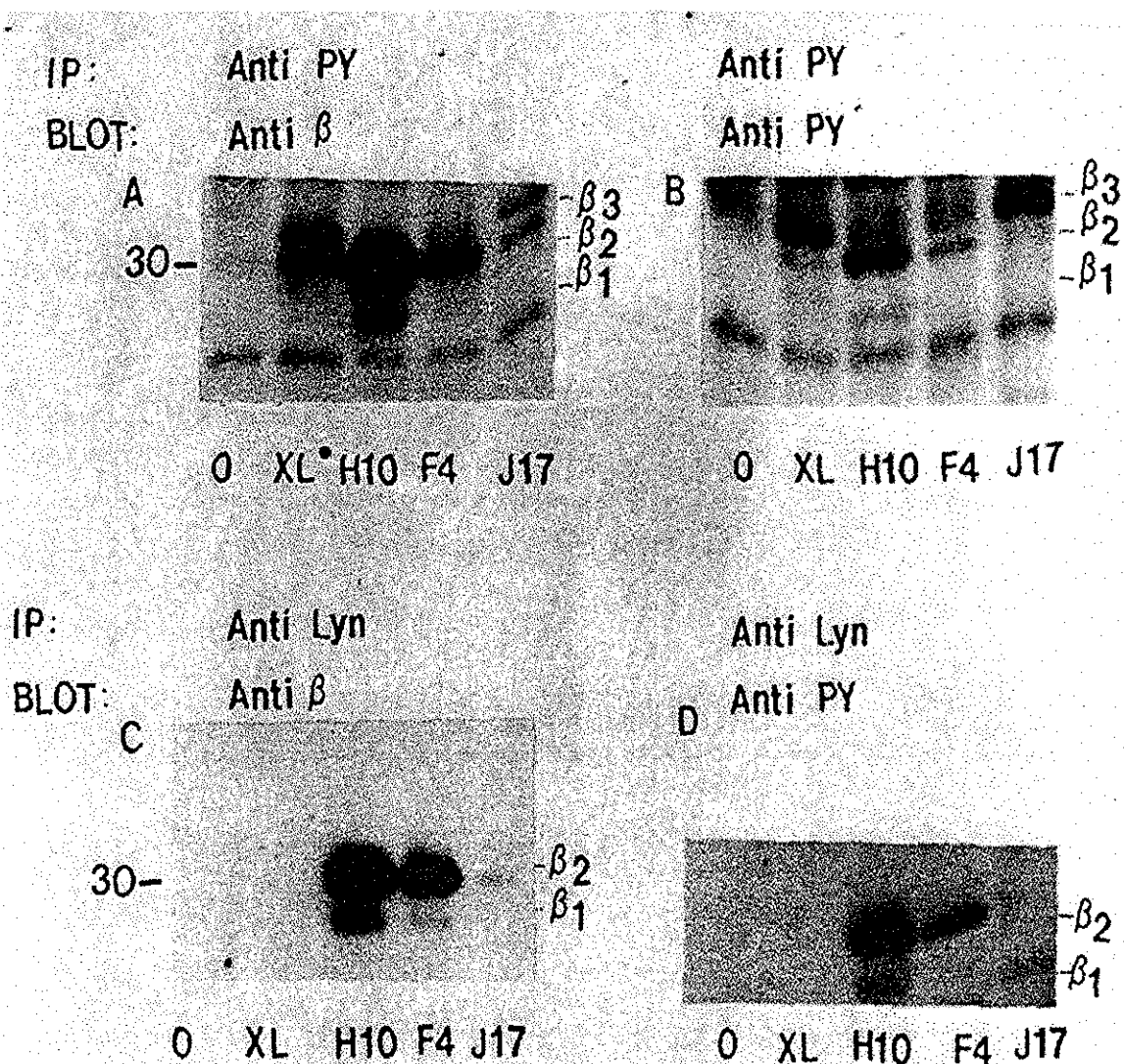


Figura 13. La agregación del Fc ϵ R1 induce tres isoformas fosforiladas de la cadena beta, pero sólo dos de ellas se asocian con Lyn. Las células RBL-2H3 fueron activadas tal y como se indica en la metodología y luego de ser lisadas se inmunoprecipitaron con el anticuerpo PY-20 (A y B) o con anti-Lyn (C y D). Las proteínas fueron separadas en geles al 10 % SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa para realizar inmunoblots con anticuerpos anti-beta (A y C) o anti-fosfotirosina (B y D) seguido de la adición de anticuerpos secundarios marcados con ^{125}I . Las proteínas fueron detectadas por autoradiografía.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1989; Manger y col., 1987; Rojo y col., 1988; Jeddi-Tehrani y col., 1992; Krutmann y col., 1990). En el sistema del FcεRI, Ortega y col., observaron que al entrecruzar con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón los fragmentos Fab del H10 y de otros anticuerpos anti-FcεRI la secreción inducida era comparable a la observada con la estimulación inducida por complejos IgE y antígeno (Ortega y col., 1988). Tomando en cuenta estos datos nos preguntamos si al formar agregados del anticuerpo monoclonal H10 podríamos aumentar la respuesta secretora, y cuáles serían las consecuencias a nivel bioquímico de esta oligomerización con respecto a la asociación de Lyn con β y γ y al nivel de activación de Syk.

Para responder esta pregunta, se realizaron experimentos de secreción de β-hexosaminidasa, una enzima contenida en los gránulos de secreción las células RBL-2H3. Se utilizaron diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal H10 y una concentración fija de fragmentos F(ab')₂ de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón F(ab')₂ GAM. La concentración de H10 a la cual se observó una mayor secreción con H10 y F(ab')₂ GAM fue la de 7 nM, la cual es 10 veces menor a la utilizada en los experimentos anteriores. Se decidió usar esta concentración de H10 en los experimentos siguientes. Los resultados mostraron que la secreción inducida espontáneamente es del 1%. Los dímeros del receptor formados por H10 (H10-D), sólo inducen el 32 % de secreción de β-hexosaminidasa, mientras que los multímeros de H10 [H10 y F(ab')₂ GAM (H10-M)] inducen el 57 % de secreción, casi el doble de lo inducido por H10-D y más cercano al 70% secretado por las células estimuladas con complejos IgE y antígeno (XL) (Fig. 14). Estos resultados indican que al inducir la agregación de los complejos H10-FcεRI, estos multímeros de H10-FcεRI son capaces de inducir una señalización eficiente, sugiriendo que la restricción de la señalización inducida por los dímeros de FcεRI (H10-D), de alguna manera es superada al formar multímeros de FcεRI (H10-M).

Para analizar comparativamente la señalización inducida por H10-M con respecto a la inducida por los dímeros de FcεRI (H10-D), se determinó la actividad de la cinasa Lyn así como su estado de fosforilación. En ensayos de cinasa *in vitro* en inmunoprecipitados anti-PY se observó que la autofosforilación de la cinasa Lyn era similar entre H10-D y H10-M, mientras que la fosforilación de Lyn observada en complejos IgE y antígeno fue más alta (Fig. 15A). Al analizar la fosforilación de la cinasa Lyn *in vivo* mediante blots anti-Lyn de

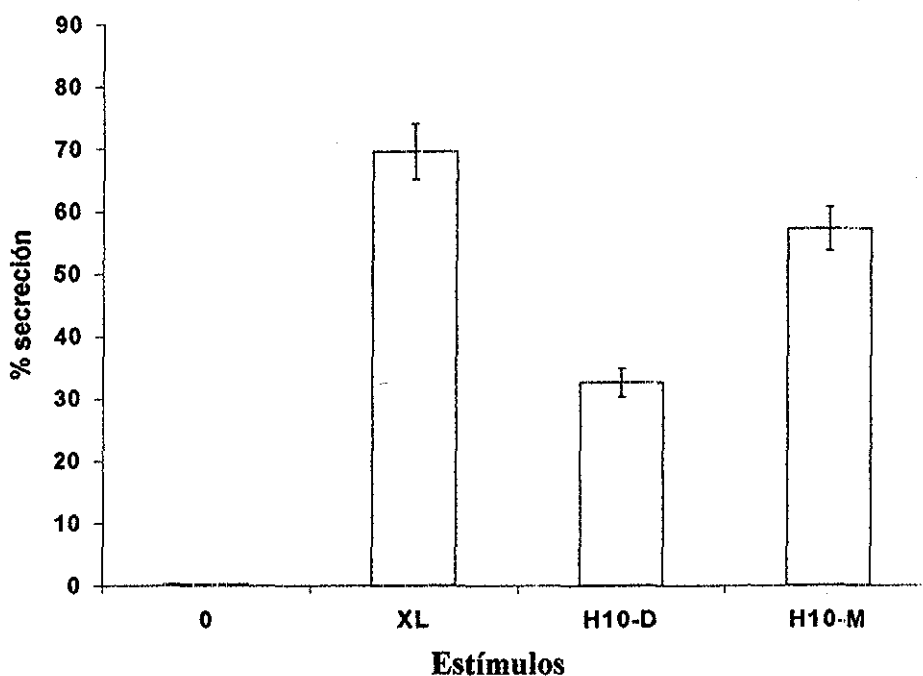


Figura 14. Secreción de β -hexosaminidasa inducida por dímeros y multímeros de Fc ϵ R1 inducidos por H10. Se estimularon las células RBL-2H3 según se describe en metodología y posteriormente se tomaron alícuotas del sobrenadante para cuantificar la enzima secretada. Se adicionaron como controles en otros pozos de la placa lisados celulares para cuantificar el total de la enzima. Se adicionó el sustrato hexosaminidasa (p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminide) y se incubó 90 min. Se detuvo la reacción mediante la adición de 0.2 M pH 10.7. Se leyó a 405 nm en el espectrofotómetro y se hicieron los cálculos de la secreción de la enzima, expresando los resultados como el % neto del total de β -hexosaminidasa presente en las células. En cada una de las barras se muestra la desviación estándar de los triplicados. 0: espontáneo; XL: complejos IgE y antígeno; H10-D: H10; H10-M: H10 y F(ab')₂ anti-IgG de ratón.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

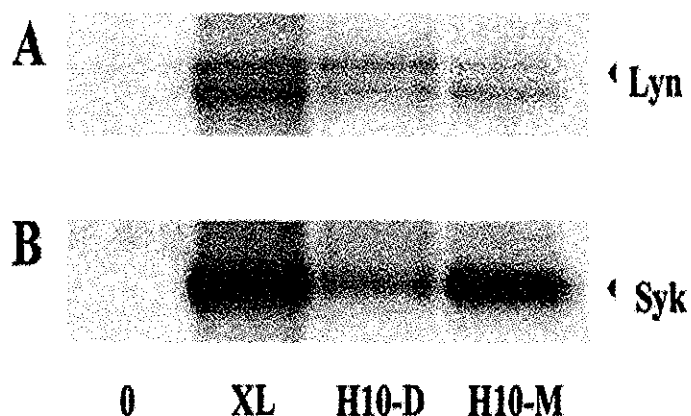


Figura 15. Los multímeros de FcεRI producidos por H10 son capaces de inducir una fosforilación de proteínas más intensa que la inducida por los dímeros de FcεRI producidos por H10. Se realizaron ensayos de cinasa *in vitro* en inmunoprecipitados anti-PY tal y como se indica en la metodología. Los resultados fueron revelados por autoradiografía. (a) Cinasa Lyn. (b) Cinasa Syk. 0: espontáneo; XL: Complejos IgE y antígeno; H10-D: H10; H10-M: H10 y F(ab')₂ anti-IgG de ratón.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

complejos inmunes anti-PY no se observaron diferencias entre los diversos estímulos utilizados (Fig. 18A). Esto sugiere que los estímulos utilizados son capaces de inducir la fosforilación y activación de la cinasa Lyn de una manera similar

Para verificar si el formar multímeros de FcεRI (H10-M) modificaba la asociación observada anteriormente de las cadenas β y γ del receptor con la cinasa Lyn, se realizó un ensayo de cinasa *in vitro* en inmunoprecipitados anti-Lyn. Los resultados mostraron que la asociación de las cadenas del receptor a la cinasa Lyn observada en las células estimuladas con H10-D, disminuía considerablemente en las células estimuladas con H10-M (Fig. 16A). También se confirmaron los resultados observados anteriormente en los cuales las células estimuladas con complejos IgE y antígeno no existe asociación de la cinasa Lyn con las cadenas del receptor (Fig. 16A y Ortega y col., 1999).

Otra manera de analizar la asociación entre la cinasa Lyn y las cadenas del receptor fue detectar, mediante inmunoblots, la presencia de β y γ en inmunoprecipitados anti-Lyn. Estos experimentos mostraron que solamente en las células estimuladas con H10-D se detecta una asociación estable de las cadenas β y γ del receptor con la cinasa Lyn, mientras que en las células estimuladas con complejos IgE y antígeno o H10-M no se observa esta interacción (Fig. 17A y 17B).

Para determinar si la estimulación con H10-M induce la activación de la cinasa Syk, se realizaron ensayos de cinasa *in vitro* en inmunoprecipitados anti-Syk. Los resultados mostraron dos bandas que incorporaron marca radiactiva en el peso molecular relativo correspondiente a la cinasa Syk. Como se puede observar, tras la estimulación con H10-M se obtiene una incorporación de fosfato radiactivo (indicativo de la actividad de Syk) significativamente mayor en intensidad que con H10-D (Fig 16B y Lara y col., 2001).

Otra metodología utilizada para verificar si la estimulación con H10-M induce la activación de Syk fue el uso de inmunoblots anti-Syk de inmunoprecipitados anti-PY. En la figura 18B se observa una baja fosforilación de la cinasa Syk en las células estimuladas con H10-D, mientras que en células estimuladas con H10-M hay una mayor fosforilación, similar a la observada en las células estimuladas con complejos IgE y antígeno.

En la cascada de señalización mediada a través del FcεRI, la fosfolipasa Cγ (PLCγ) puede ser activada por diversas proteínas, entre ellas la cinasa de tirosina Syk, que al fosforilar a la PLCγ la activa. La PLCγ actúa sobre el PIP₂ generando DAG e IP₃. Éste último es el responsable del incremento del Ca²⁺ intracelular. Para verificar si la activación de la cinasa

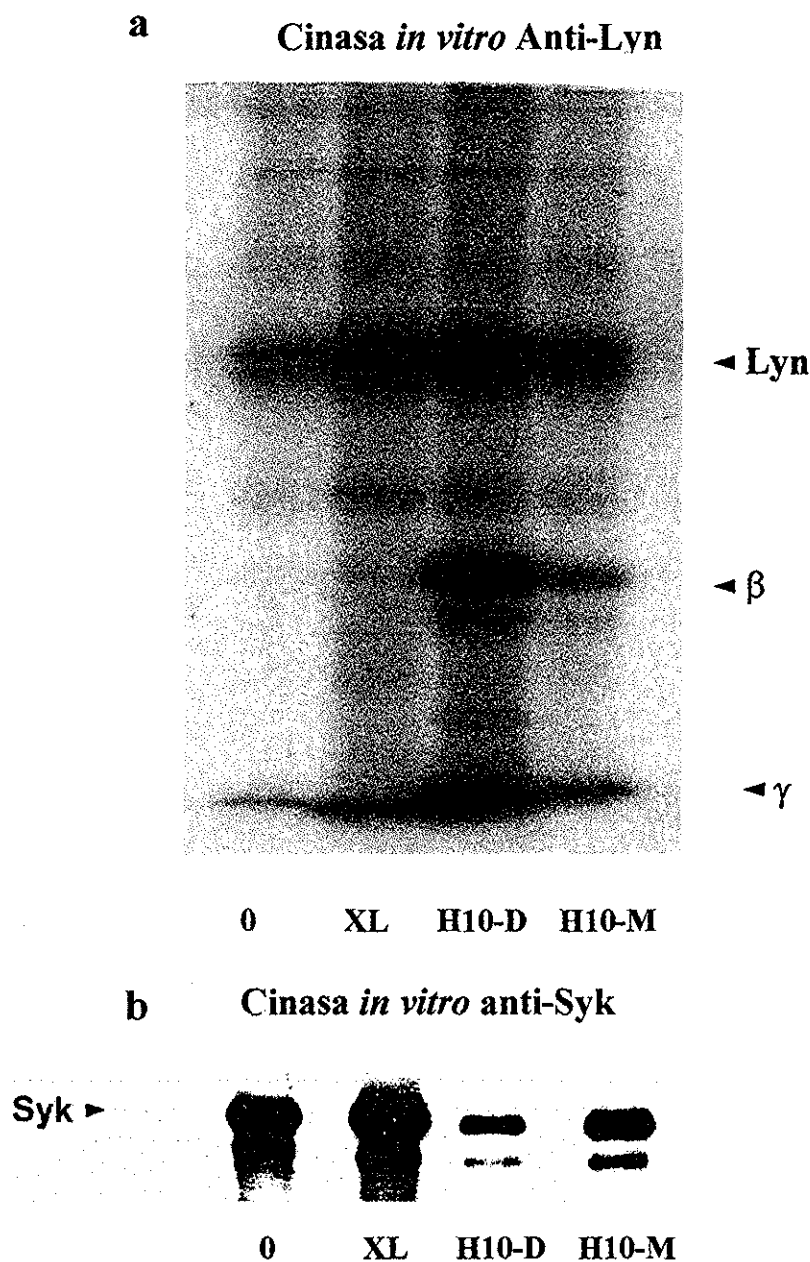


Figura 16. Los dímeros y multímeros de Fc ϵ RI producidos por el H10 son capaces de inducir la actividad de cinasa de Lyn y de Syk, y la asociación de Lyn con las cadenas β y γ del receptor. Se realizaron ensayos de cinasa *in vitro* en inmunoprecipitados anti-Lyn y anti-Syk tal y como se explica en la metodología. Se separaron las proteínas en geles al 10 % SDS-PAGE y se revelaron por autoradiografía. 0: espontáneo; XL: Complejos IgE y antígeno; H10-D: H10; H10-M: H10 y F(ab')₂ anti-IgG de ratón.

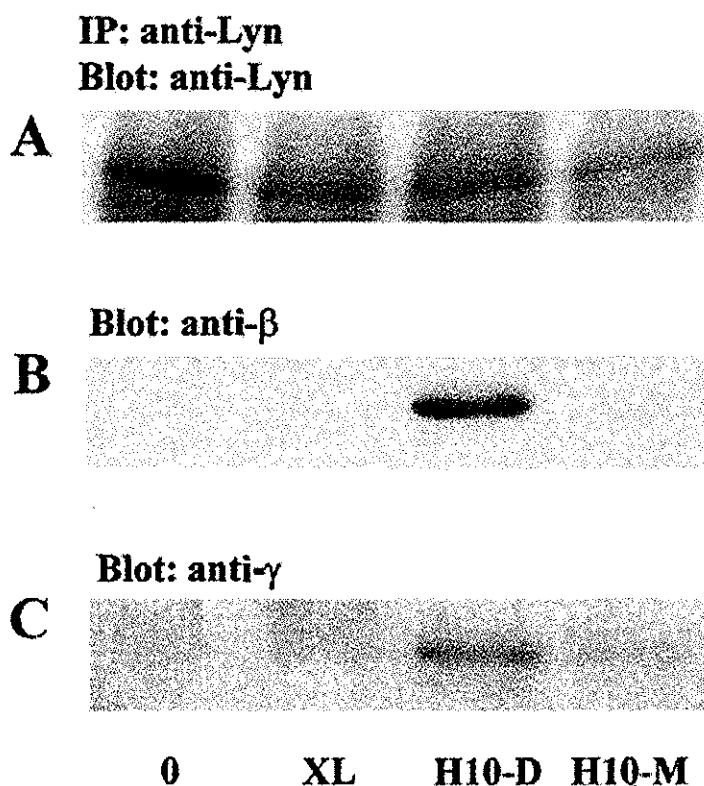


Figura 17. Los dímeros de FcεRI producidos por el H10 son capaces de inducir la fosforilación de Lyn y la asociación de ésta con las cadenas β y γ del receptor. Se realizaron inmunoprecipitaciones anti-Lyn de lisados de células RBL-2H3. Se corrieron geles al 10 % SDS-PAGE y las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Después de que se realizaron los inmunoblots (A) anti-Lyn, (B) anti-β y (C) anti-γ, se adicionó el respectivo anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y se reveló por quimioluminiscencia. 0: espontáneo; XL: Complejos IgE y antígeno; H10-D: H10; H10-M: H10 y F(ab')₂ anti-IgG de ratón.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Syk inducida por H10-M era capaz de generar una señal productiva, se estudió la fosforilación de la PLC γ 2, la isoforma de PLC γ más abundante en las células RBL-2H3.

El estado de fosforilación de la enzima se estudió mediante inmunoblots anti-fosfotirosina de inmunoprecipitados anti-PLC γ 2. Estos resultados mostraron que H10-D es un pobre inductor de la fosforilación de esta enzima, mientras que XL o H10-M inducen una fosforilación mayor (Figura 18C y Lara y col., 2001). Esto sugiere que en las células estimuladas con H10-M, la formación de agregados mayores del receptor permite el paso de la señal que lleva a la generación de segundos mensajeros, lo cual no se observa en H10-D.

Anteriormente se demostró que H10-D induce en células individuales una respuesta de Ca²⁺ diferente a la inducida por complejos IgE y antígeno (Ortega y col., 1999). Esta respuesta se caracteriza por picos sugerentes de liberación momentánea de Ca²⁺ de las pozas internas, pero no existe un influjo sostenido de Ca²⁺ del exterior. Mediante microscopía de fluorescencia se cuantificaron los niveles citoplasmáticos de Ca²⁺ en células marcadas con fura-2. El promedio de las células cuantificadas se muestra en la figura 20, donde las células estimuladas con H10-M mostraron un incremento de 3 veces en el tiempo de respuesta al compararlo con el observado en las células estimuladas con complejos IgE y antígeno, y la concentración de Ca²⁺ citosólico en las células estimuladas con H10-M fué ligeramente menor a la observada en las células estimuladas con complejos IgE y antígeno (800 nM y 1100 nM respectivamente). Las células estimuladas con H10-D indujeron una respuesta de Ca²⁺ muy baja (400 nM) (Fig. 19 y Lara y col., 2001).

La topografía de los dímeros y multímeros de H10-Fc ϵ RI y de las cinasas Lyn y Syk se estudió por microscopía electrónica de transmisión y marcaje con inmuno-oro, en membranas nativas de células RBL-2H3. Por medio de esta metodología se pueden observar diversas regiones de la cara interna de la membrana celular. Se definen como regiones especializadas aquellas que pudieran tener una función específica en el funcionamiento celular, tales como: regiones osmiofílicas, las cuales pudieran ser regiones de señalización; vesículas endosómicas (coated pits), las cuáles pudieran estar involucradas en endocitosis, etc. Asimismo hay grandes regiones de la membrana que pudieran no tener una función específica, a las cuáles se les denominó regiones no especializadas.

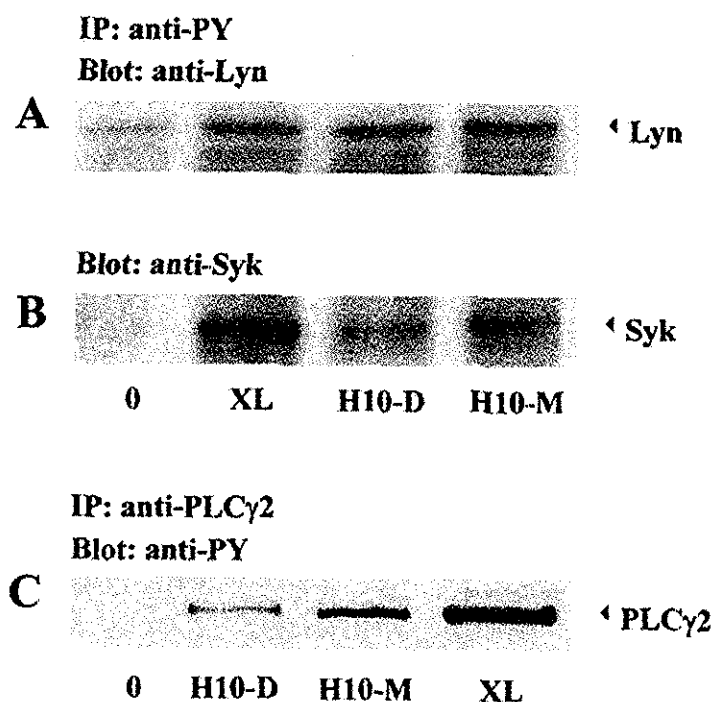
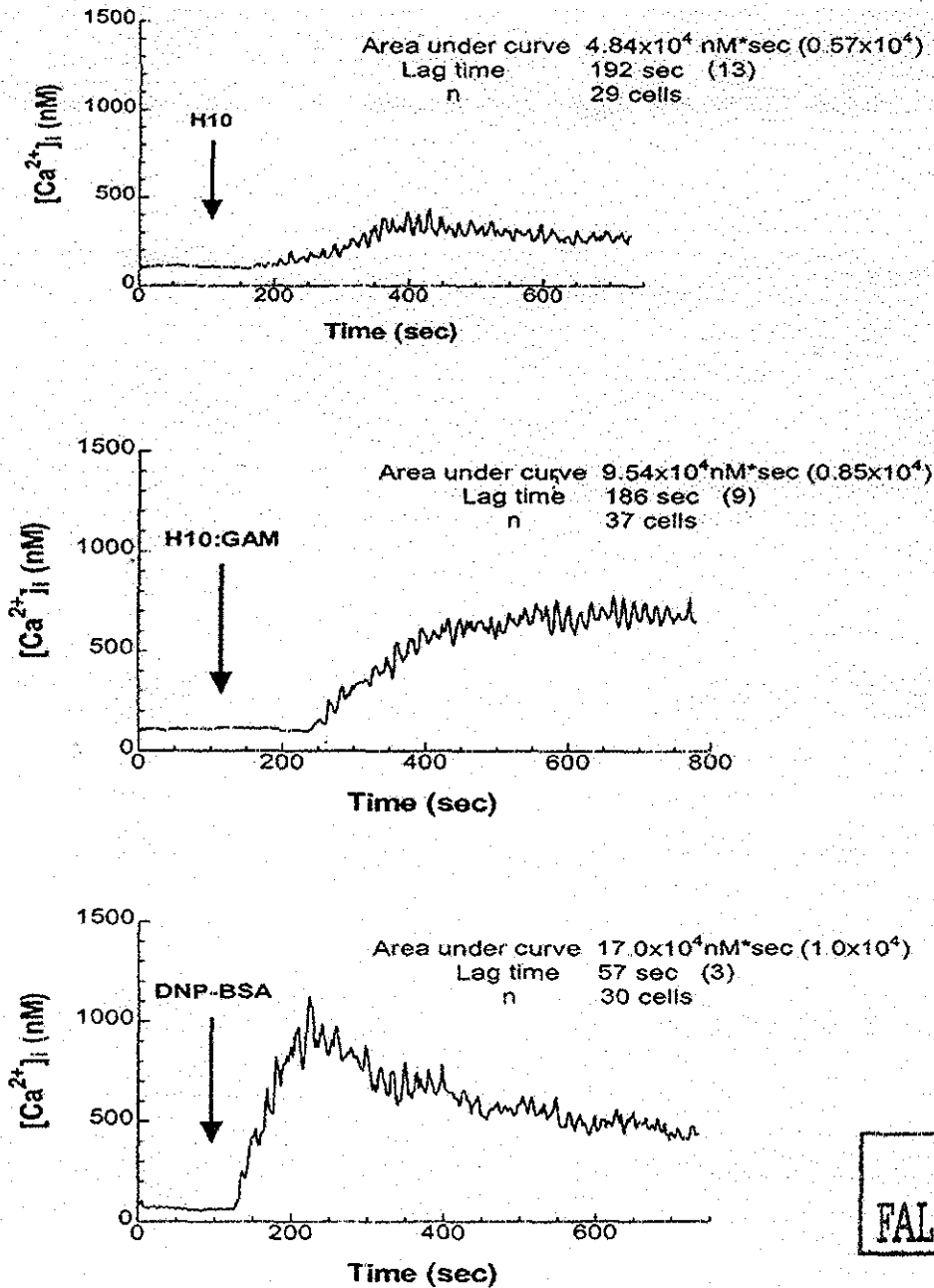


Figura 18. Los multímeros de Fc ϵ R1 producidos por H10 son capaces de inducir una fosforilación de proteínas más intensa que la inducida por los dímeros de Fc ϵ R1 producidos por H10. Se realizaron inmunoprecipitaciones antifosfotirosina (A y B) o anti-PLC γ 2 (C) de células estimuladas y las proteínas fueron separadas por geles al 10% SDS-PAGE, transferidas a membranas de nitrocelulosa y reveladas por inmunoblot anti-Lyn (A), anti-Syk (B) o anti-PY (C). Las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia. 0: espontáneo; XL: Complejos IgE y antiAenog; H10-D: H10; H10-M: H10 y F(ab')₂ anti-IgG de ratón.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 19. Movilización de Ca^{2+} inducida por dímeros y multímeros de $Fc\epsilon RI$ producidos por H10. Los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} fueron cuantificados en células individuales marcadas por fura-2 mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados muestran el promedio de las respuestas de Ca^{2+} de un rango de 29 a 37 células por condición utilizada en el experimento. (a) Células estimuladas con H10. (b) Células estimuladas con H10 y $F(ab')_2$ anti-IgG de ratón. (c) Células estimuladas con complejos IgE y antígeno.

En células no estimuladas las partículas de oro marcando el FcεRI y Lyn se encuentran frecuentemente colocalizadas como pequeños agrupamientos dispersos en regiones membranales aparentemente no especializadas. La estimulación con complejos IgE y antígeno causa una rápida redistribución de las partículas de oro marcando la cadena β del FcεRI en regiones osmiofílicas de la membrana.

Luego de la estimulación con H10, los agregados de FcεRI permanecen pequeños y dispersos. Las partículas de oro que marcan el receptor se encuentran frecuentemente asociadas con Lyn, dando la impresión de que hay más colocalización de la cadena β del receptor con Lyn en células tratadas con H10 que en células no estimuladas. Este comportamiento cambia cuando las células son estimuladas con H10 y F(ab')₂ anti-IgG de ratón (GAM). Los agregados de receptores son pequeños en comparación con los formados por la estimulación con complejos IgE y antígeno, pero el receptor se encuentra en las regiones osmiofílicas de la membrana. Mientras que los agregados de receptores que permanecen fuera de las regiones osmiofílicas incluyen Lyn, los receptores que entran a éstas regiones no se asocian a Lyn (Lara y col., 2001).

En células no estimuladas se observan pocas partículas de oro marcando la cinasa Syk, y no se observa colocalización de esta cinasa con el receptor. En células estimuladas con complejos IgE y antígeno se observa una importante colocalización de Syk con el receptor en las zonas osmiofílicas de la membrana (Lara y col., 2001). En células estimuladas con H10 se observa más asociación de Syk en la membrana comparando con lo observado en células no estimuladas y parte de esa Syk asociada a la membrana colocaliza con el FcεRI en regiones no especializadas de la membrana. La distribución cambia cuando se añade F(ab')₂ anti-IgG de ratón al H10 para formar multímeros. Las partículas de oro marcando el receptor se colocalizan con las que marcan Syk en las regiones osmiofílicas de las membranas, de manera semejante a lo observado con complejos IgE y antígeno (Lara y col., 2001).

La impresión de que los multímeros de H10-FcεRI se redistribuyen con más frecuencia que los dímeros H10-FcεRI en dominios membranales de señalización fue confirmado contando las partículas de oro que identifican al receptor, que se localizan en la zona cercana a las vesículas endosómicas (coated pits). En las células no estimuladas o estimuladas con H10 menos del 20 % de las vesículas endosómicas mostraron partículas de oro (cadena β del receptor) cercanas. En contraste, en células estimuladas con H10 y

F(ab')₂ anti-IgG de ratón el porcentaje de vesículas endosómicas que tuvieron cercanas una o más partículas de oro marcando la cadena β del receptor fue de >60 %, similar al observado en células estimuladas con complejos IgE y antígeno que fue poco más del 70 % (Lara y col., 2001).

El número de partículas de oro adyacentes a las vesículas fue diferente entre las células no estimuladas y las activadas con H10 al compararlas con las células estimuladas con complejos IgE y antígeno o H10 y F(ab')₂ anti-IgG de ratón. Dos partículas de oro fueron los agregados más grandes observados en la periferia de las vesículas endosómicas en las células no estimuladas, mientras que de 3 a 5 partículas de oro adyacentes a las vesículas se observaron en células tratadas con H10. En las células tratadas con H10 y F(ab')₂ anti-IgG de ratón se observaron agregados de más de 6 partículas de oro adyacentes a las vesículas endosómicas, mientras que la estimulación con complejos IgE y antígeno generó agregados de 11 a 25 partículas de oro adyacentes a estas vesículas (Lara y col., 2001).

Otra metodología utilizada para estudiar la asociación de la cadena β del receptor con la cinasa Lyn fue el análisis de los microdominios membranales denominados “balsas” (rafts) aislados mediante centrifugación en gradientes de sacarosa. Las distintas fracciones obtenidas del gradiente se separaron en geles de poliacrilamida y se realizaron inmunoblots para identificar a la cadena β del receptor y a la cinasa Lyn. Los resultados mostraron que en células no estimuladas una fracción de la cadena β colocaliza con Lyn en las fracciones ligeras del gradiente, las cuales contienen los microdominios o “balsas”, y que otra porción de la cadena β se encuentra en las fracciones pesadas (solubles) del gradiente. La estimulación con H10 induce una redistribución muy marcada de la cadena β a las fracciones ligeras (“balsas”) que contienen a Lyn. La agregación del receptor mediante el uso de H10 y F(ab')₂ anti-IgG de ratón o complejos IgE y antígeno también induce un incremento de la cadena β recuperada en las fracciones del gradiente correspondientes a las “balsas” enriquecidas en Lyn en comparación con lo observado en células sin estimular, pero este incremento es menor al observado en las células estimuladas con H10 solamente. El análisis densitométrico de los blots confirmaron que la proporción mayor de β en asociación con las fracciones ligeras del gradiente (“balsas”) se observa en las células estimuladas con H10-D. El 90 % de β se encuentra en las fracciones 3, 4 y 5 que contienen a Lyn luego de la estimulación con H10, mientras que el porcentaje de β observado en estas fracciones es de solamente el 40 % en células no estimuladas y de aproximadamente el

60% en células estimuladas con complejos IgE y antígeno o con H10 y F(ab')₂ anti-IgG de ratón (Lara y col., 2001). Estos resultados refuerzan la evidencia bioquímica y microscópica de la asociación de la cadena β con la cinasa Lyn en los dímeros del receptor formados por H10, mientras que la formación de agregados mayores reduce la proporción de Lyn asociada a β .

DISCUSIÓN

Los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas juegan un papel central en la inmunidad, pues a través de ellos el reconocimiento del antígeno por la molécula de anticuerpo induce la activación de diversas respuestas celulares.

El receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E (FcεRI) participa en la activación de células cebadas y basófilos para la liberación de mediadores con múltiples acciones tanto efectoras como inmunoregulatoras. Además del interés intrínseco por estudiar el mecanismo de activación celular mediado por este receptor, debido a sus posibles implicaciones terapéuticas en las alergias, el sistema IgE-FcεRI ha sido usado como modelo para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la activación de funciones efectoras a través de receptores para anticuerpos (Schweitzer-Stenner y col., 1999).

El papel de la agregación del FcεRI para inducir la secreción de mediadores alérgicos ha sido reconocido desde hace más de 25 años (Levine y col., 1973; Siraganian y col., 1975a y b). Más arduo ha sido determinar las propiedades estructurales (multiplicidad, orientación, conformación, etc) de los agregados de FcεRI que determinan su capacidad de inducir señales de activación.

Trabajos realizados por Metzger y col., usando dímeros, trímeros y oligómeros de IgE producidos por entrecruzantes químicos, sugirieron que si bien los dímeros de receptores es el tamaño mínimo de los agregados que puede inducir una respuesta celular en la línea celular R3L-2H3, esta respuesta es baja (5%) y bastante menor a la lograda con trímeros (20%) o con oligómeros de IgE (Metzger y col., 1986). Más recientemente, Ortega y col. generaron una serie de anticuerpos monoclonales específicos para la cadena α del FcεRI. La estequiometría de unión entre los anticuerpos y el receptor es de 1 Fab: 1 FcεRI, por lo que la multiplicidad máxima de los agregados de FcεRI que cada uno de los anticuerpos puede inducir es dímeros. El hecho de que dos de ellos (F4 y J17) induzcan niveles de secreción similares a los inducidos con complejos IgE y antígeno estableció claramente que la unidad mínima de señalización es el dímero de FcεRI (Ortega y col., 1988). Otro anticuerpo, designado H10, a pesar de ser el de más alta afinidad de los tres anticuerpos monoclonales, induce una respuesta de secreción menor. El análisis de la dimerización de FcεRI inducido por cada anticuerpo demostró que los dímeros formados por la unión de cada uno de los anticuerpos tienen distinta eficiencia para inducir secreción. Estudios subsecuentes mostraron que el uso de fragmentos Fab de los anticuerpos monoclonales y un anticuerpo anti-IgG de ratón para entrecruzarlos inducían que las diferencias observadas con los anticuerpos completos desaparecieran, lográndose en los tres casos repuestas de magnitud similar

a la obtenida con complejos IgE y antígeno (Ortega y col., 1988). Para racionalizar éste y otros resultados (Ortega y col., 1988; Pecht y col., 1991; Schweitzer-Stenner y col., 1994), estos autores propusieron la hipótesis de que las distintas eficiencias para mediar secreción de los dímeros inducidos por cada anticuerpo, están relacionadas con restricciones que cada anticuerpo impone a la configuración del dímero de FcεRI (Ortega y col., 1988; Pecht y col., 1991; Schweitzer-Stenner y col., 1994). Diferencias similares en la capacidad de inducción de respuestas por anticuerpos monoclonales específicos para receptores de membrana habían sido observadas anteriormente con anticuerpos que reconocen la cadena β del TCR, de los cuales, uno de ellos induce respuestas menores que los otros dos (Jeddi-Tehrani y col., 1992). Estudios realizados por Torigoe y Metzger en el sistema de estimulación de células RBL-2H3 por complejos IgE y antígeno; encontraron que la afinidad intrínseca de la interacción entre la IgE y el antígeno, es directamente proporcional a la intensidad de la respuesta inducida. Sin embargo, sus resultados no son directamente comparables a los presentados en este trabajo, ya que en nuestro caso los agregados de FcεRI inducidos son dímeros, y en el caso del estudio mencionado, la multiplicidad de los agregados formados es desconocida. De hecho, muy probablemente el tamaño de los agregados inducidos por antígenos de afinidades distintas, son diferentes. En el caso de los monoclonales empleados en este trabajo, el anticuerpo con la afinidad más alta (H10), es el que induce menor respuesta celular.

En los estudios que constituyen esta Tesis, se amplió la caracterización de la respuesta bioquímica inducida por los tres diferentes anticuerpos monoclonales específicos para el FcεRI, abarcando no solamente la secreción de enzimas preformadas contenidas en los gránulos citoplasmáticos (Fig. 9 y 14) sino también la síntesis de fosfolípidos de inositol, el incremento del Ca^{2+} citoplasmático, los cambios morfológicos y la formación de placas de actina (Ortega y col., 1999; y Lara y col., 2001). Así mismo, se estudiaron los patrones de fosforilación inducidos por los diferentes estímulos, la actividad de las cinasas Lyn y Syk, así como la fosforilación de diversas enzimas y sustratos involucrados en la vía de transducción de señales inducida a través del FcεRI (Fig. 10-13 y Fig. 15-18).

Los resultados de la liberación de enzimas preformadas y la generación de fosfolípidos de inositol demostraron que las células estimuladas con complejos IgE y antígeno (XL) muestran una respuesta más alta, mientras que el anticuerpo F4 indujo una respuesta muy similar en magnitud a la observada con los complejos IgE y antígeno. El H10 indujo una respuesta secretora muy baja (Fig. 9 y 14), así como muy baja síntesis de fosfolípidos (Ortega y col., 1999). La

respuesta inducida por el J17 mostró un cambio con respecto a lo anteriormente reportado, pues se había observado que inducía una respuesta de magnitud similar a la observada con H10 (Ortega y col., 1988; Ortega y col., 1989), mientras que en este estudio mostró una respuesta intermedia entre el F4 y el H10 (Fig. 9 y Ortega y col., 1999).

Entre los primeros eventos que ocurren después de la agregación de los receptores FcεRI está la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. Los modelos más aceptados actualmente para explicar la activación a través del FcεRI proponen que uno de los eventos bioquímicos más tempranos después de la agregación de los receptores es la fosforilación de las cadenas β y γ del receptor. La cinasa responsable de esta fosforilación es la cinasa de tirosina Lyn, aunque el mecanismo exacto de cómo ocurre este paso inicial aún no se conoce. El modelo de transfosforilación propone que Lyn, un porcentaje de la cual se encuentra asociada a una baja proporción (<5%) de los receptores en células no estimuladas, al producirse la agregación de dos o más FcεRI fosforile a las cadenas de un receptor cercano. Se ha propuesto también que el encuentro de Lyn con los receptores agregados se lleva a cabo en microdominios especializados de la membrana o "balsas", ya que se ha demostrado que la agregación de los receptores provoca su migración a estos microdominios, los cuales contienen una cierta cantidad de Lyn, cuyo nivel basal de activación podría ser suficiente para llevar a cabo esta fosforilación (Metzger, 1999; Field y col., 1999). Una vez que las cadenas β y γ son fosforiladas, éstas actúan como sitios de anclaje de moléculas que contienen dominios de unión a fosfotirosina (dominios SH2). Entre éstas moléculas se encuentran la cinasa Lyn, cuyo reclutamiento propiciaría su activación y por tanto una amplificación de la respuesta, y la cinasa de tirosina Syk, la cual al unirse se activa y actúa catalíticamente sobre diversos sustratos que continúan con la cascada de señalización (Metzger, 1999).

Los resultados obtenidos al medir la actividad de cinasa *in vitro* en inmunoprecipitados anti-fosfotirosina (anti-PY) de células estimuladas con cada uno de los anticuerpos o con IgE y antígeno, mostraron que todos los estímulos son capaces de inducir la actividad de cinasas de tirosina, lo cual se ve reflejado en la gran cantidad de proteínas que incorporaron ³²P radiactivo. La banda más prominente en las células estimuladas es la correspondiente a la cinasa Lyn. Sorprendentemente, el estímulo que indujo una mayor incorporación de ³²P fue el H10, el cual induce la fosforilación intensa de bandas en las regiones de los pesos moleculares correspondientes a las cadenas β y γ del receptor. A pesar de que el resto de los estímulos

también indujo la fosforilación de éstas cadenas, la incorporación de marca radiactiva fue mucho menor (Fig 10)

Al analizar específicamente la fosforilación y la actividad de la cinasa Lyn en complejos inmunes anti-Lyn mediante blots anti-Lyn o ensayos de cinasa *in vitro*, no se observaron diferencias en la fosforilación de Lyn inducida por los diversos estímulos (Figs. 11A, 12 y 18A). Esto sugiere que la reducida respuesta secretora observada en las células estimuladas con H10 no es debida a una baja activación de la cinasa Lyn. Aún más, de nueva cuenta es notorio que sólo en las células estimuladas con H10 se observa una intensa fosforilación de las bandas correspondientes a las cadenas β y γ del receptor, sin importar el tiempo o la concentración de estímulo utilizado (Fig. 11A y 12). Estos datos nos sugirieron que en las células estimuladas con H10 se produce una asociación de las cadenas del receptor con la cinasa Lyn, la cual es resistente a las condiciones empleadas en la lisis e inmunoprecipitación. Esta asociación se reduce a más de la mitad al formar los multímeros de Fc ϵ RI (Fig. 16A), indicando que al formar agregados mayores a dímeros, la asociación disminuye. Esto explica porque esta asociación no es detectable en células estimuladas con IgE y antígeno, en donde la agregación de Fc ϵ RI es profusa.

Como se dijo arriba, después de que las subunidades del receptor son fosforiladas en tirosina, éstos residuos sirven de sitios de anclaje para proteínas con dominios SH2, entre ellas la cinasa Syk. Al analizar la actividad de cinasa *in vitro* en complejos inmunes anti-Syk se encontró que la autofosforilación de la cinasa Syk en células tratadas con complejos IgE y antígeno o con J17 fue considerable (Fig. 11B). La actividad de cinasa mostrada por las células estimuladas con F4 fue menor a la observada con complejos IgE y antígeno y J17, mientras que las células tratadas con H10 fueron las que menor actividad de Syk mostraron. Esto podría sugerir que en células estimuladas con H10 existe un bloqueo de la señal entre la activación de Lyn y la activación de Syk, ya que a pesar de que la actividad de Lyn es comparable a la observada con los otros estímulos productivos, la señal de activación no llega a inducir completamente el siguiente paso en la transducción de señales, es decir la activación completa de la cinasa Syk. Este bloqueo parece ser superado al agregar los complejos H10-(Fc ϵ RI)₂ con un segundo anticuerpo (Fig. 16B y 18B)

Tomando en cuenta lo anterior, sugerimos que nuestros datos son congruentes con la idea de que los dímeros de receptores inducidos por H10 tienen una conformación adecuada para inducir la activación de Lyn, pero que esta activación no conduce a una activación eficiente de Syk, y que esto puede ser superado por la formación de agregados mayores. Asimismo, la formación de

multímeros de H10-FcεRI incrementa la fosforilación de PLCγ2 en comparación con la observada al formar únicamente dímeros H10-(FcεRI)₂. La movilización de Ca²⁺ intracelular provee también evidencia de la baja capacidad de H10 para producir activación que se supera al formar agregados mayores de FcεRIs, ya que la movilización de Ca²⁺ intracelular inducida por multímeros de H10-(FcεRI)₂ casi alcanza los niveles producidos por complejos IgE y antígeno, aunque el tiempo que tarda en alcanzar esos niveles es mayor (Fig. 19). Esto sugiere que los diversos estímulos utilizados generan señales diferentes, pues los complejos de IgE y antígeno inducen la respuesta característica de liberación de Ca²⁺ de los compartimentos intracelulares seguido por el influjo de Ca²⁺ del exterior (Fig. 19C). Las células estimuladas con dímeros H10-(FcεRI)₂ muestran espigas continuas, indicando cambios de concentración del Ca²⁺ intracelular continuos, y el inicio de la respuesta celular muestra un retraso de 4 veces lo observado con los complejos IgE y antígeno (Fig. 19A). El tiempo que tardan en responder las células estimuladas con los multímeros H10-(FcεRI)₂ es similar a lo observado con los dímeros H10-(FcεRI)₂, pero el patrón observado sugiere que el Ca²⁺ cuantificado podría venir del exterior, pues no se observa la espiga característica de la liberación de las pozas internas (Fig. 19B).

Estudios realizados en linfocitos T muestran un fenómeno similar, Jeddi-Tehrani y colaboradores reportaron que anticuerpos monoclonales anti-CD3 presentaban diferencias cuantitativas en cuanto a la activación inducida en linfocitos T, y que al entrecruzar los anticuerpos monoclonales con un segundo anticuerpo la respuesta observada anteriormente se incrementaba (Jeddi-Tehrani y col., 1992).

Un resultado interesante de nuestro trabajo fue el hallazgo de distintas formas fosforiladas de la cadena β que pueden separarse en SDS-PAGE. Al realizar blots anti β o anti-PY de complejos inmunes anti-PY para detectar las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, se observó que en células no estimuladas no se detecta fosforilación en la cadena β, sugiriendo que los niveles basales de fosforilación en tirosina de esta subunidad del receptor es muy baja o inexistente (Fig. 13A). Los complejos inmunes de las células estimuladas con los distintos anticuerpos mostraron la presencia de 3 bandas en la región de peso molecular correspondiente a la cadena β, las cuales se designaron β₁, β₂ y β₃ (Fig. 13A). β₃ se detectó en células tratadas con complejos IgE y antígeno, J17 y en menor grado en las tratadas con F4, mientras que prácticamente no fue detectada en las células tratadas con H10. β₂ es la banda más intensa observada en células estimuladas con H10, siendo menor la proporción de esta banda en células estimuladas con complejos IgE y antígeno y F4. β₁ fue muy abundante en las células estimuladas con H10,

mientras que con los otros estímulos fue casi imperceptible (Fig 13A) Las tres bandas fueron detectadas por blot anti-PY, demostrando que todas están fosforiladas en residuos de tirosina. La banda β_1 reacciona levemente con el anticuerpo anti-PY, la banda β_2 muestra una reacción mayor a la de la β_1 , pero la banda β_3 es la que reacciona más intensamente con el anticuerpo anti-PY.

Estas isoformas fosforiladas de la cadena β también muestran diferencias en su asociación con la cinasa Lyn. Las bandas menos fosforiladas que predominan en las células tratadas con H10 coprecipitan con Lyn en complejos inmunes anti-Lyn. La isoforma más fosforilada (β_3), no coprecipita con Lyn. Estos resultados son consistentes con evidencia previa de que la unión de Lyn a la cadena β parcialmente fosforilada promueve mayor fosforilación de las cadenas β y γ (Yamashita y col., 1994; Pribluda y col., 1994) Como ya se ha dicho, la asociación de las subunidades β y γ del receptor a la cinasa Lyn en células estimuladas con H10 desaparece al adicionar un segundo anticuerpo para formar agregados mayores a dímeros (Fig. 17A y 17B). No podemos proponer un mecanismo definitivo en el bloqueo de la fosforilación de la cadena β y la disociación de Lyn en células estimuladas con H10, pero es notorio que ese bloqueo desaparece al incrementar el tamaño del agregado. Ortega y col.(1988) concluyen que diferencias en la configuración de los dímeros inducidos por los diversos monoclonales podrían explicar las diferencias en la señalización. Nuestros datos sugieren la posibilidad de que esas diferencias en la orientación de los dímeros hagan inaccesibles a la cinasa Lyn ciertos sitios de fosforilación de la cadena β en células estimuladas con H10.

Pribluda y col., demostraron que la agregación del Fc ϵ RI por antígeno multivalente induce la fosforilación de 3 tirosinas, en la cadena β , todas localizadas en la región del ITAM, la cual tiene la secuencia: RLYEELHVYSPIYSAL. Dos de ellas son las tirosinas del ITAM y la tercera es una tirosina interna. El grado de fosforilación de estas tirosinas es variable. Dos serinas localizadas dentro del dominio del ITAM de β se fosforilan indistintamente luego de la agregación del Fc ϵ RI (Pribluda y col., 1997). Las tres isoformas fosforiladas de β podrían representar especies de esta subunidad mono, di y trifosforiladas y una de las 3 tirosinas del ITAM de β podría permanecer inaccesible a Lyn en las células tratadas con H10, previniendo la total fosforilación de la subunidad. Si la fosforilación completa es necesaria para la disociación de Lyn, esto bloquea la señal al prevenir la disociación de la cinasa Lyn.

La isoforma β_2 inducida en células estimuladas con H10 se une a Lyn, pero la isoforma β_2 inducida en células estimuladas con complejos IgE y antígeno no lo hace. Es posible que la banda β_2 incluya varias especies que son fosforiladas en diferentes tirosinas o en diferente combinación

de tirosina y serina, resultando similares en cuanto a movilidad electroforética, pero con distintas capacidades de unión a Lyn y potenciales diferentes de fosforilación para pasar a la isoforma β_3 . La isoforma β_1 podría ser la especie monofosforilada en cualquiera de los posibles sitios, exclusiva de las células estimuladas con H10. Esta banda sólo se observa utilizando concentraciones de 70 nM del anticuerpo H10 (datos no mostrados), lo cual podría indicar una dependencia en concentración, sin embargo no podemos descartar que esta banda sea el resultado de una proteólisis parcial de la banda β_2 .

La aparición de isoformas fosforiladas de la subunidad β en células estimuladas con complejos IgE y antígeno no es nueva. Li y colaboradores demostraron que el entrecruzamiento del Fc ϵ RI causa un cambio en la movilidad electroforética de la subunidad β del receptor la cual es dependiente del tiempo y de la concentración, semejante a el cambio de β_2 a β_3 (Li y col., 1992). Paolini y colaboradores demostraron también un cambio en la movilidad electroforética de β en respuesta al entrecruzamiento del Fc ϵ RI en células RBL-2H3 y mostraron que la isoforma con menor movilidad puede retornar a la isoforma de mayor movilidad luego de la adición de hapteno monovalente (Paolini y col., 1996). Kinet y colaboradores observaron un cambio en la movilidad electroforética de la cadena β dependiente de Lyn y del agente entrecruzante utilizado, lo cual se asemeja a lo observado con la isoformas β_2 a β_3 (Jouvin y col., 1994; Lin y col., 1996). La isoforma β_1 no ha sido reportada previamente en células estimuladas con complejos IgE y antígeno. Sin embargo Jouvin y col., desarrollaron una mutante de la cadena β , la cual carecía de las 3 tirosinas del ITAM pero conteniendo las serinas como posibles sitios de fosforilación. Ellos transfectaron células P815 con esta mutante y observaron que ésta mostraba una movilidad mayor a la observada con la β no mutante (Jouvin y col., 1994). El estudio de la inducción de anergia en linfocitos T mediante el uso de péptidos alterados mostró que la ocupación del TCR por péptidos alterados puede inducir la fosforilación de la cadena ζ con muy poca activación o reclutamiento de ZAP-70. En estos estudios se encontró una isoforma de la cadena ζ con menor grado de fosforilación pero una alta movilidad, la cual estaba en mayor proporción que la isoforma más fosforilada inducida por los péptidos inmunogénicos. Las células tratadas con los péptidos alterados mostraron anergia al ser tratados más tarde con los péptidos inmunogénicos (Sloan-Lancaster y col., 1994; y Madrenas y col., 1995). En otros estudios, un anticuerpo anti-CD3 no mitogénico indujo isoformas de ζ con menor grado de fosforilación que aquellas encontradas en

células tratadas con anti-CD3 mitogénicos. Esta isoforma de ζ con menor grado de fosforilación sólo indujo una pobre activación de ZAP-70 (Smith y col., 1997).

De los resultados obtenidos en este trabajo, sugerimos que la disociación de Lyn de la subunidad β completamente fosforilada del receptor es un nuevo paso de regulación en la cascada de señales inducidas por el Fc ϵ RI, el cuál es requerido para la activación de Syk y la propagación de la señal (Figura 20). La explicación de por qué en dímeros inducidos por H10 no se completa la fosforilación de β , mientras que en los inducidos por F4 y J17 sí ocurre, no lo conocemos. Sin embargo, Ortega y col. (Ortega y col., 1988; Pecht y col., 1991; Schweitzer-Stenner y col., 1994) han sugerido que las diferencias en señalización entre los tres monoclonales se deben a que la orientación que cada monoclonal impone a los dímeros del Fc ϵ RI son distintas. La observación de que si los dímeros formados por H10 son agregados por un segundo anticuerpo, supera el bloqueo, es congruente con esta interpretación de la orientación de los dímeros pues puede postularse la formación de agregados mayores a dímeros aumenta la probabilidad de que los receptores se encuentren con la orientación adecuada.

Evidencias adicionales que apoyan que la disociación de Lyn es un paso de regulación en la señalización por el Fc ϵ RI fueron obtenidas de estudios de microscopía electrónica realizados en preparaciones de membrana de células RBL-2H3. En estos estudios se observó que en células no estimuladas el Fc ϵ RI se localiza en la membrana celular muy pobremente asociado a Lyn, y sin asociación a Syk. Al agregar un agente entrecruzante (complejos IgE y antígeno) se induce la redistribución del receptor a regiones osmiofilicas de la membrana plasmática, donde se localiza también a la cinasa Syk, pero la cinasa Lyn se encuentra excluida de estas regiones (Wilson y col., 2000). Los dímeros de Fc ϵ RI inducidos por la adición de H10 no son capaces de separarse de Lyn y redistribuirse a las regiones osmiofilicas de la membrana, sin embargo se encuentran colocalizados ocasionalmente con Syk fuera de esas regiones. Es posible que Syk tenga una baja actividad debido a la distribución incorrecta de esta cinasa, la cual no alcanza a sus sustratos por encontrarse fuera de las regiones osmiofilicas de la membrana (Lara y col., 2001). En cambio los multímeros de Fc ϵ RI-H10 se observan localizados en la regiones osmiofilicas, en donde Lyn no está presente pero Syk sí (Lara y col., 2001).

En los últimos años se ha propuesto que la transducción de señales se inicia en dominios especializados de la membrana celular llamados "balsas", los cuales están enriquecidas en Lyn y otras proteínas que participan en la transducción de señales (Field y col., 1999). Utilizando gradientes de sacarosa para separar los diferentes componentes lipídicos de las membranas celu-

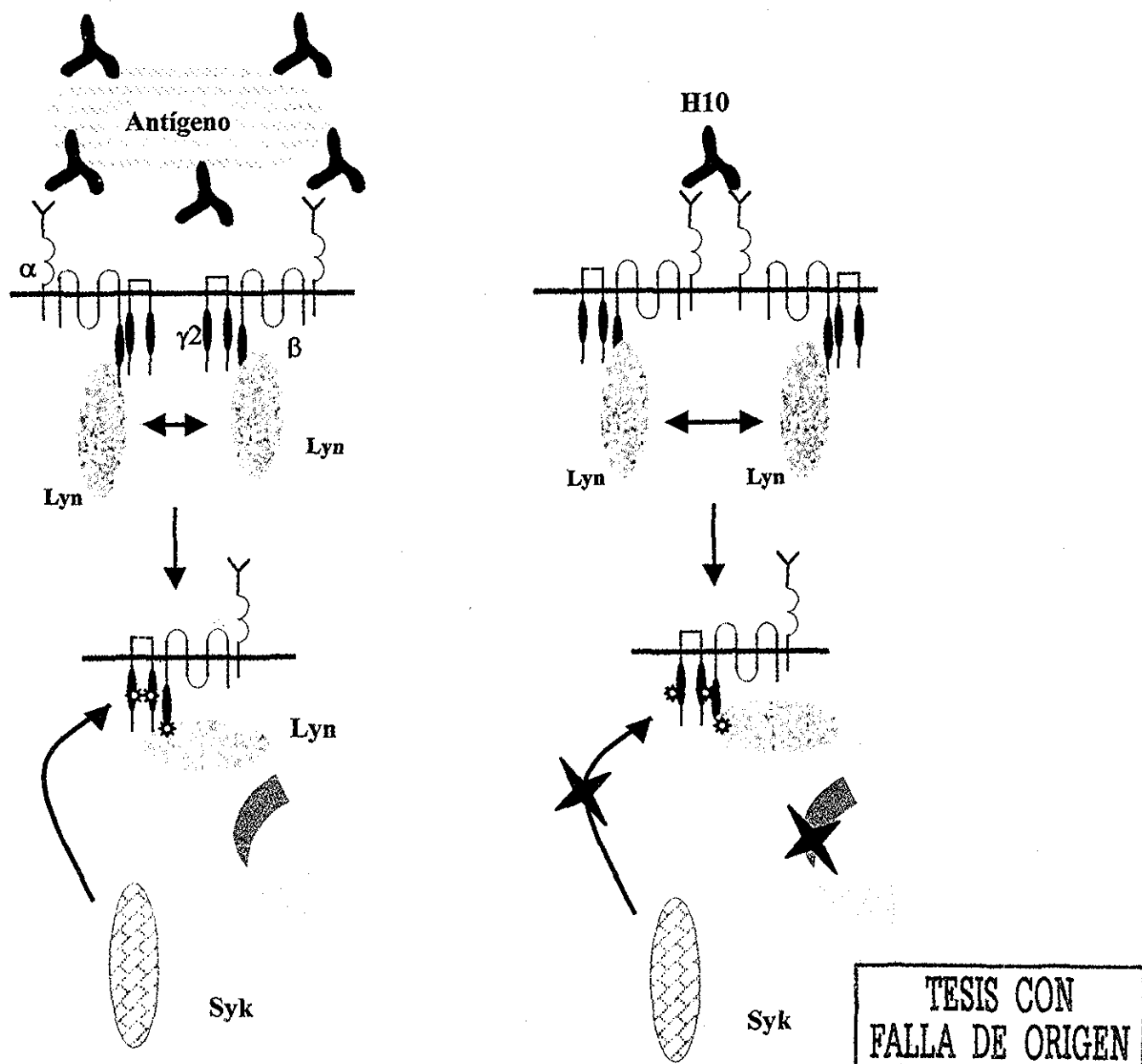


Figura 20. Modelo de activación del FcεRI inducido por H10 y por complejos IgE y antígeno. Este esquema muestra los modelos propuestos para la activación de la células cebadas de la línea celular RBL-2H3. Este modelo propone que la activación del FcεRI inducida por complejos IgE y antígeno requiere la disociación de la cinasa Lyn de la cadena β del receptor para permitir el reclutamiento de la cinasa Syk por las cadenas γ y del mismo y continuar con la cascada de señalización. Al inducir la activación mediante la adición de H10, la cinasa Lyn es secuestrada en el complejo del receptor, impidiendo que continúe la señal de activación, y por tanto, la cinasa Syk no puede ser reclutada al complejo del receptor.

lares, se encontró que los dímeros de FcεRI-H10 causan una amplia redistribución de la cadena β del FcεRI de las fracciones solubles (pesadas) a las fracciones insolubles (ligeras) que contienen las llamadas “balsas” enriquecidas en Lyn, mientras que los multímeros de FcεRI-H10 inducen una redistribución mucho menor (Lara y col., 2001). Estos datos proporcionan una evidencia adicional de que los dímeros de FcεRI-H10 forman complejos estables con Lyn.

Existen observaciones hechas en otros sistemas de señalización que apoyan la hipótesis de que la orientación de los dímeros de los receptores influye en la señal de activación generada. En el modelo de el receptor de eritropoyetina se ha encontrado que la dimerización de los receptores no es suficiente para generar una respuesta de activación, sino que es necesario que los dímeros del receptor tengan cierta orientación relativa para que se pueda iniciar la señalización (Jiang y Hunter, 1999). Los datos obtenidos en este trabajo sobre la baja eficiencia los dímeros de FcεRI-H10 para inducir cambios morfológicos de membrana, así como cambios en la secuencia topográfica y bioquímica de la señalización mediada a través del FcεRI, podrían deberse a restricciones configuracionales de los dímeros FcεRI-H10. Estas restricciones son inaparentes en agregados grandes de receptores en los cuales se incrementa la probabilidad de que algunos FcεRI se encuentren en la orientación adecuada.

Nuestros resultados han permitido proponer un posible punto de regulación de la señalización a través del FcεRI, este es la fosforilación completa de β y la subsecuente disociación de Lyn y activación de Syk. Es importante mencionar que en modelaje matemático de las cinéticas de fosforilación en tirosina, Wofsy y col (1997, 1999) llegaron a la conclusión de que activación de la cinasa Lyn es el paso limitante en el señalización a través del FcεRI. Con base en estos resultados, y en los nuestros, puede proponerse que reactivos que induzcan un estado de “secuestro” de la cinasa Lyn debido a la formación de complejos estables entre Lyn y el FcεRI, deben ser inhibidores efectivos de la activación de basófilos y mastocitos, y podrían tener aplicaciones terapéuticas en las reacciones alérgicas.

En los últimos años se han realizado diversos estudios encaminados a buscar terapias para el control del asma y las alergias. Diversos investigadores han buscado la manera de bloquear la transducción de señales a través del FcεRI, ya que proponen que inhibiendo la secreción de enzimas proinflamatorias de los basófilos y las células cebadas se bloquean los síntomas de la inflamación alérgica mediada por IgE, aunque no necesariamente se combata la causa inmunológica que la produce.

Actualmente se conoce que los basófilos, las células cebadas y las células dendríticas pueden además generar citocinas proinflamatorias y actuar como células presentadoras de antígeno. Esto sugiere que el bloqueo de la señalización del FcεRI pudiera no sólo aliviar los síntomas de la alergia, sino también arrestar el ciclo de eventos inmunológicos asociados con el desarrollo de la enfermedad.

Se han propuesto diversas metodologías por medio de las cuales lograr este objetivo. La más directa sería inhibiendo la señalización mediada a través del FcεRI bloqueando la unión del ligando natural al receptor. El uso de anticuerpos anti-IgE ha demostrado la reducción de los síntomas del asma y de la rinitis alérgica, así como la reducción de los niveles de IgE circulante y de la expresión del FcεRI en basófilos (Heusser y col., 1997; Saini y col., 1999).

Otra de las estrategias propuestas es la prevención de la señalización mediada por el FcεRI, bloqueando las primeras etapas de la señalización. Una de las opciones sería bloqueando la activación de Lyn, impidiendo que Lyn se despreque del complejo del FcεRI fosforilado o bloqueando el reclutamiento y la activación de Lyn. Los datos obtenidos en la presente tesis nos permiten proponer que la disociación de Lyn de los dímeros del FcεRI, así como la fosforilación productiva de la cadena β del FcεRI son pasos requeridos para la activación de Syk y la propagación de la señal (Ortega y col., 1999). La propuesta derivada de este trabajo sería generar y probar entrecruzantes del FcεRI que induzcan el secuestro de la cinasa Lyn como agentes terapéuticos en las enfermedades alérgicas. Una de las opciones a probar sería la detección de los sitios de unión del anticuerpo H10 con el FcεRI, para generar anticuerpos humanizados que puedan ser utilizados en la inmunoterapia.

CONCLUSIONES

1. La estimulación de las células RBL-2H3 con el anticuerpo H10 induce un incremento en la fosforilación de la cinasa Lyn y de las cadenas β y γ del Fc ϵ RI.
2. El anticuerpo H10 induce la asociación de las cadenas β y γ del Fc ϵ RI con la cinasa Lyn, la cual no es dependiente ni del tiempo ni de la concentración del anticuerpo H10 utilizado.
3. Las células estimuladas con H10 muestran una disminución en la actividad de cinasa de Syk.
4. La agregación del Fc ϵ RI induce tres isoformas fosforiladas de la cadena β , pero sólo dos de las isoformas inducidas por el H10 se asocian con la cinasa Lyn.
5. Los multímeros del Fc ϵ RI-H10 inducen una secreción de β -hexosaminidasa similar a la inducida por IgE-Antígeno.
6. En las células estimuladas con los multímeros del Fc ϵ RI-H10 se observa la reducción de la asociación de las cadenas β y γ del Fc ϵ RI con la cinasa Lyn.
7. Los multímeros del Fc ϵ RI-H10 inducen un incremento en la actividad y fosforilación de la cinasa Syk y un incremento en la fosforilación de la PLC γ 2.

BIBLIOGRAFIA

- Acuto O. and Cantrell D. 2000. *Ann. Rev. Immunol.* **18**: 165-184.
- Benhamou M., Ryba N., Kihara H., Nishikata H., Siraganian R. 1993. *J. Biol. Chem.*, **268**: 23318-23324.
- Bieber T., de la Salle H., Wollenberg A., Hakimi J., Chizzonite R., Ring J., Hanau D., de la Salle C. 1992. *J. Exp. Med.*, **175**: 1285-1290.
- Bonnerot C., Däeron M. 1994. *Immunomethods*, **4**: 41-47.
- Brunswick M., June C. H., Finkelman F. D., Mond J.J. 1989. *J. Immunol.*, **143**: 1414-1421.
- Campbell K.S. 1999. *Cur. Opin. Immunol.* **11**; 256-264.
- Däeron M., Malbec O., Latour S., Bonnerot C., Segal D., Fridman W. 1993. *Int. Immunol.* **5**: 1393-1401.
- Däeron M., Malbec O., Bonnerot C., Latour S., Segal D., Fridman W. 1994. *J. Immunol.* **152**: 783-792.
- Daeron M. 1997. *Annu. Rev. Immunol.* **15**; 203-234.
- Eiseman E., Bolen J. 1992. *Nature*, **355**: 78-80.
- El-Hillal O., Kurosaki T., Yamamura H., Kinet J. P., Scharenberg A M. 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 1919-1924.
- Field K. A., Holowka D., Baird B. 1999. En: *Signal Transduction in mast cells and basophils*. Edhud Razin and Juan Rivera Editors. Editorial Springer-Verlag New York, Inc. 102-114.
- Field K.A., Holowka D., Baird B., 1999. *J. Biol. Chem.*, **274**: 1753-1758.
- Fluckinger A. C., Li Z., Kato R. M., Wahl M. I., Ochs H. D., Longnecker R., Kinet J. P., Witte O. N., Scharenberg A M., Rawlings D. J., 1998. *EMBO J.*, **17**: 1973-1985.
- Galli S. J., Tsai M., Lantz C. S. 1999. En: *Signal Transduction in mast cells and basophils*. Edhud Razin and Juan Rivera Editors. Editorial Springer-Verlag New York, Inc. 11-30.
- Gurish M. F., Austen K.F., 1989. *Ciba Found Symp.* **147**: 36-52.
- Hata D., Kawakami Y., Inagaki N., Lantz C. S., Kitamura T., Kan W. N., Maeda-Yamamoto M., Miura T., Han W., Hartman S., E., Yao L., Nagai H., Golfeld A. E., Alt F. W., Galli S. J., Witte O. N., Kawakami T. 1998. *J. Exp. Med.*, **187**: 1235-1247.
- Hamawy M., Minoguchi K., Swaim W., Mergenhagen S., Siraganian R. 1995. *J. Biol. Chem.* **270**: 12305-12309.
- Heldin C. H., 1995. *Cell*, **94**: 5-8.
- Heusser C., Jardieu P. 1997. *Curr. Opin. Immunol.*, **9**: 805-814.
- Hutchcroft J., Geahlen R., Deanin G., Oliver J. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 9107-9111.
- Isakov N. 1997. *J. Leukoc. Biol.* **61**; 6-16.
- Jeddi-Tehrani M., Choq S. C., Ansotegui I.J., Jondal M., Wigzell H. 1992. *Cellular Immunol.*, **141**: 1-9.
- Jiang G., Hunter T. 1998. *Current Biol.*, **9**: 568-571.
- Jouvin M., Adamczewski M., Numerof R., Letourner O., Vallé A., Kinet J. 1994. *J. Biol. Chem.*, **269**: 5918-5925.
- Kawakami Y., Yao L., Miura T., Tsukada S., Witte O., Kawakami T. 1994. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 5108-5113.
- Kawakami Y., Hartman SE., Holland PM., Cooper JA., Kawakami T. 1998. *J. Immunol.*, **161**: 1795-1802.
- Kihara H., Siraganian R. 1994. *J. Biol. Chem.*, **269**: 22427-22432.

- Kimura T.** Sakamoto H., Apella E., Siraganian R. P. 1997. *JBC*, **272**: 13991-13996.
- Kimura T.** Zhang J., Sakaguchi K., Apella E., Siraganian R. P. 1997. *J Immunol.*, **159**: 4426-2234
- Kinet J.**, Metzger H. 1990. En: Fc receptors and the action of antibodies American Society for Microbiology. 239-259.
- Kinet J.** 1999. *Annu. Rev. Immunol.* **17**: 931-972
- Krutmann J.**, Kirnbauer R., Kock A., Schwarz T., Schopf E., May L T., Sehgal P. B., Luger T. A. 1990. *J Immunol.*, **145**: 1337-1342.
- Lara M.**, Ortega E., Pecht I., Pfeiffer J. R., Martinez A., M., Lee R. J., Surviladze Z., Wilson S. W., Oliver J.M. 2001. *J Immunol.*, **167**: 4329-4337.
- Levine B. B.**, Siraganian R.P., Schenkein I. 1973. *N. Engl. J. Med.*, **288**: 894-896.
- Li L.**, Zhang X., Krilis S.A. 1999. En: Signal Transduction in mast cells and basophils. Edhud Razin and Juan Rivera Editors. Editorial Springer-Verlag New York, Inc. 54-65.
- Li W.**, Deanin G., Margolis B., Schlessinger J. Oliver J. 1992. *Mol. Cell. Biol.*, **12**: 3176-3182.
- Lin S.**, Cicala C., Scharenberg M., Kinet J.P. 1996. *Cell*, **85**: 985-995.
- McKay D. M.**, Bienenstock J. *Immunol. Today*, **15**: 533-538.
- Madrenas Y.**, Wange L.R., Wang J.L., Isakov N., Samelson L.E., Germain R.N. 1995. *Science*, **267**: 515-518.
- Manger B.**, Weiss A., Imboden J., Laing T., Stobo J.D. 1987. *J Immunol.*, **139**: 2755-2760.
- Maurer D.**, fiebiger E. Reinninger B., Wolff-Winiski B., Jouvin M., Kilgus O., Kinet J., Sting G. 1994. *J. Exp. Med.*, **179**: 745-750.
- Menon A.K.**, Holowka D., Baird B. 1986. *J. Cell Biol.* **102**: 534-540.
- Metzger H.**, Alcaez G., Hohman R., Kinet J.P., Pribluda V., Quarto R. 1986. *Ann. Rev. Immunol.*, **4**: 419-470.
- Metzger H.** 1999. En: Signal Transduction in mast cells and basophils. Edhud Razin and Juan Rivera Editors. Editorial Springer-Verlag New York, Inc. 97-101.
- Oliver J.M.**, Burg D., Wilson B., McLaughlin J., Geahlen R. 1994. *J. Biol. Chem.* **269**: 29697-29703.
- Oliver J. M.**, Kopley C.L., Ortega E., Wilson B.S. 2000. *Immunopharmacology*, **48**: 269-281.
- Ortega E.**, Schweitzer-Stenner R., Pecht I. 1988. *EMBO J.*, **7**: 4101-4109.
- Ortega E.**, Hazan B., Zor U., Pecht I. 1989. *Eur. J. Immunol.*, **19**: 2251-2256.
- Ortega E.**, Schweitzer-Stenner R., Pecht I. 1991. *Biochemistry*, **30**: 3473-3483.
- Ortega E.**, Lara M., Lee I., Santana C., Martínez M., Pfeiffer J.R., Lee R.J., Wilson B.S. y Oliver J.M. 1999. *J. Immunol.*, **162**: 176-185.
- Osborne M. A.**, Zenner G., Lubinus M., Zhang X., Songyang Z., Cantley L. C., Majerus P., Burn P., Kochan J. P. 1996. *JBC*, **271**: 29271-29278.
- Paolini R.**, Numerof R., Kinet J. 1994. *Immunomethods*, **4**: 35-40.
- Paolini R.**, Serra S., Kinet J. 1996. *J. Biol. Chem.* **271**: 15987-15992.
- Pecht I.**, Ortega E., Schweitzer-Stenner R. 1991. *Biochemistry*, **30**: 3450-3458.
- Pleiman C.**, D'Ambrosio D., Cambier J. 1994. *Immunol. Today*, **15**: 393-398.
- Pribluda V.**, Pribluda C., Metzger H. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 11246-11250.
- Pribluda V.**, Pribluda C., Metzger H. 1997. *J. Biol. Chem.*, **272**: 11185-11192.
- Ravetch J.**, Kinet J. 1991. *Ann. Rev. Immunol.*, **9**: 457-492.
- Rawlings D. J.**, Witte O. N. 1995. *Semin. Immunol.*, **7**: 237-246.
- Reth M.** 1989. *Nature* **338**: 383-384.
- Rivera V.**, Brugge J. 1995. *Mol. Cell. Biol.*, **15**: 1582-1590.
- Rojo J. M.**, Janeway C.A. Jr. 1988. *J Immunol.* **140**: 1081-1088.

- Sagi-Eisenberg Ronit.** 1999. En: Signal Transduction in mast cells and basophils Edhud Razin and Juan Rivera Editors. Editorial Springer-Verlag New York, Inc. 286-299.
- Saini S. S., MacGlashan D. W., Sterbinsky S. A., Togias A., Adelman D. C., Lichtenstein L. M., Bochner B. S.** 1999. *J. Immunol.*, **162**: 5624-5630.
- Scharenberg A. M., Kinet J.P.** 1998. *Cell*, **94**: 5-8.
- Schweitzer-Stenner R., Ortega E., Pecht I.** 1994. *Biochemistry*, **33**: 8813-8825.
- Schweitzer-Stenner R., Pecht I.** 1999. *Immunology Letters*, **68**: 59-69.
- Shiue L., Green J., Karas J., Morgenstern J., Ram M., Taylor M., Zoller M., Zydowsky L., Bolen J., Brugge J.** 1995. *Mol. Cell. Biol.*, **15**: 272-281.
- Shiue L., Zoller M., Brugge J.** 1995. *J. Biol. Chem.* **270**: 10498-10502.
- Siraganian R. P., Levine BB.** 1975. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **48**: 530-536.
- Siraganian R. P., Levine BB.** 1975. *Cli. Immunol. Immunopathology*, **4**: 59-66.
- Siraganian R. P., Zhang J., Kimura T.** 1999. En: Signal Transduction in mast cells and basophils. Edhud Razin and Juan Rivera Editors. Editorial Springer-Verlag New York, Inc. 115-133.
- Sloan-Lancaster J., Shaw A.S., Rothbard J.B., Allen P.M.** 1994. *Cell*, **79**: 913-922.
- Smith J.A., Tso J.Y., Clark M.R., Cole M.S., Bluestone J.A.** 1997. *J. Exp. Med.*, **185**: 1413-1422.
- Stephan V., Benhamou M., Gutkind S., Robbins K., Siraganian R.** 1992 *J. Biol. Chem.*, **267**: 5434-5441.
- Tatosyan A. G., Mizenina O. A.** 2000. *Biochemistry (Moscow)*, **65**: 49-58.
- Torigoe Ch., Metzger H.** 1998. *Science*, **281**: 568-572.
- Turner M., Schweighoffer E., Colucci F., DiSanto J. P., Tybulewicz V. L.** 2000. *Immunol Today*, **21**: 148-154.
- Wang B., Rieger A., Kilgus O., Ochiai K., Maurer D., Födinger D., Kinet J., Sting G** 1992. *J. Exp. Med.*, **175**: 1353-1365.
- Wang A., Scholl P., Geha R.** 1994. *J. Exp. Med.* **180**: 1165-1170.
- Wedermeyer J., Tsai M., Galli S. J.** 2000. *Curr. Op. Immunol.*, **12**: 624-631.
- Wilson B. S., Kapp N., Lee R. J., Pfeiffer J. R., Martinez A. M., Platt Y., Letourneur F., Oliver J.M.** 1995. *J. Biol. Chem.*, **270**: 4013-4022.
- Wilson B., S., Pfeiffer J.R., Oliver J.M.** 2000. *J. Cell Biol.*, **149**: 1131-1141.
- Wofsy C., Torigoe Ch., Kent U. M., Metzger H., Golstein B.** 1997. *J. Immunol.*, **159**: 5984-5992.
- Wofsy C., Vonakis B. M., Metzger H., Golstein B.** 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 8615-8620.
- Yamashita T., Mao S., Metzger H.** 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 11251-11255.

PUBLICACIONES GENERADAS:

1. Enrique Ortega, Martha Lara, Irene Lee, Carla Santana, Marina Martinez, Janet R. Pfeiffer, Rebecca J. Lee, Bridget S. Wilson, Janet M. Oliver. 1999 "Lyn dissociation from phosphorylated FcεRI subunits, a new regulatory step in the FcεRI signalling cascade revealed by studies of FcεRI dimer activity." *Journal of Immunology*, **162**, Pág. 176-185.

2. Martha Lara, Enrique Ortega, Israel Pecht, Janet R. Pfeiffer, Marina Martínez, Rebecca J. Lee, Zurab Surviladze, Bridget S. Wilson, Janet M. Oliver. 2001. "Overcoming the signaling defect of Lyn -sequestering, signal-curtailing FcεRI dimers: Agregated dimers can dissociate from Lyn and form signaling complexes with Syk." *Journal of Immunology*, **167**: 4329-4337.

Lyn Dissociation from Phosphorylated FcεRI Subunits: A New Regulatory Step in the FcεRI Signaling Cascade Revealed by Studies of FcεRI Dimer Signaling Activity¹

Enrique Ortega,* Martha Lara,* Irene Lee,* Carla Santana,* A. Marina Martinez,† Janet R. Pfeiffer,† Rebecca J. Lee,† Bridget S. Wilson,† and Janet M. Oliver^{2†}

Cross-linking the heterotrimeric ($\alpha\beta\gamma$) IgE receptor, FcεRI, of mast cells activates two tyrosine kinases: Lyn, which phosphorylates β and γ subunit immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, and Syk, which binds γ -phospho-immunoreceptor tyrosine-based activation motifs and initiates cellular responses. We studied three FcεRI-dimerizing mAbs that maintain similar dispersed distributions over the surface of RBL-2H3 mast cells but elicit very different signaling responses. Specifically, mAb H10 receptor dimers induce very little inositol 1,4,5-trisphosphate synthesis, Ca^{2+} mobilization, secretion, spreading, ruffling, and actin plaque assembly, whereas dimers generated with the other anti-FcεRI mAbs induce responses that are only modestly lower than that to multivalent Ag. H10 receptor dimers activate Lyn and support FcεRI β and γ subunit phosphorylation but are poor Syk activators compared with Ag and the other anti-FcεRI mAbs. H10 receptor dimers have two other distinguishing features. First, they induce stable complexes between activated Lyn and receptor subunits. Second, the predominant Lyn-binding phospho- β isoform found in mAb H10-treated cells is a less tyrosine phosphorylated, more electrophoretically mobile species than the predominant isoform in Ag-treated cells that does not coprecipitate with Lyn. These studies implicate Lyn dissociation from highly phosphorylated receptor subunits as a new regulatory step in the FcεRI signaling cascade required for Syk activation and signal progression. *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 176–185.

In primary and cultured basophils and mast cells, cross-linking the high affinity IgE receptor, FcεRI,³ activates a signaling sequence that leads within minutes to degranulation and membrane/cytoskeletal responses, including actin polymerization, ruffling, spreading, integrin activation, and actin plaque assembly, and within hours to increased cytokine synthesis (reviewed in Ref. 1). Recent studies have provided insight into the sequence of early events by which cross-linking this multichain ($\alpha\beta\gamma$) immune system receptor leads to functional responses. RBL-2H3 rat tumor mast cells contain two FcεRI-associated protein tyrosine kinases, the Src-related enzyme, Lyn (2), whose principal substrates are the receptor's β and γ subunits (3), and PTK72/Syk (4), which phosphorylates a wide range of downstream signaling molecules, including phospholipase C γ isoforms, the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase, Vav, Grb2, and others (5–9), and is essential

for all known FcεRI-mediated responses (3). In resting RBL-2H3 cells, a proportion of Lyn associates with the FcεRI β subunit (10, 11) in an SH4 domain-dependent fashion (12). FcεRI cross-linking permits Lyn associated with one receptor to phosphorylate tyrosines located within immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) in the β and γ subunits of the adjacent receptor. Some of the resulting β subunit phosphotyrosines serve as binding sites for the recruitment and activation of more Lyn molecules that, in turn, support more subunit phosphorylation (10). Other phosphotyrosines bind other signaling molecules containing SH2 domain motifs.

Analyses of subunit cytoplasmic domain sequences have shown that the FcεRI γ subunit contains a typical ITAM, with 10 amino acids, including three threonines, between the two critical tyrosine residues (reviewed in Ref. 13). It has been established that both γ -ITAM tyrosines are phosphorylated to approximately similar levels in activated cells (14) and that the doubly phosphorylated FcεRI γ -ITAMs serve as binding sites for the tandem SH2 domains of Syk, resulting in its autophosphorylation and activation (15). These and other data identify Syk as the principal γ -ITAM ligand. In contrast, the FcεRI β -ITAM has only nine amino acids, including two serines and a tyrosine between the typical ITAM tyrosines, and its three tyrosines are phosphorylated to different extents (membrane distal > membrane proximal > internal) (14). Ligands for the phosphorylated β subunit ITAM include Lyn and the negative signaling molecule, inositol polyphosphate 5-phosphatase (16). As well as stimulating tyrosine phosphorylation, FcεRI cross-linking stimulates β -ITAM serine and γ -ITAM threonine phosphorylation (7, 14, 17). The identities of the kinases and the contributions of these ITAM phosphorylation events to signal transduction are not yet established (discussed in Ref. 17).

ITAM motifs are found in the cytoplasmic tails of other members of the multichain immune recognition receptor family that

*Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México; and †Department of Pathology and Cancer Research and Treatment Center, University of New Mexico Health Sciences Center, Albuquerque, NM 87131

Received for publication January 29, 1998. Accepted for publication September 10, 1998.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by National Institutes of Health Grant RO1GM49814 and Fogarty International Research Collaboration Award RO3TW00440. Work in the U.S. laboratory was additionally supported by National Institutes of Health Grants RO1GM50562 and P50HL56384. Work in the Mexican laboratory was additionally supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 3154P-N9607 and Universidad Nacional Autónoma de México Grant IN204696.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Janet M. Oliver, Cell Pathology Laboratory, Cancer Research Facility, Suite 201, 2325 Camino de Salud, University of New Mexico School of Medicine, Albuquerque, NM 87131. E-mail address: jmo@thor.unm.edu

³ Abbreviations used in this paper: FcεRI, the high affinity IgE receptor; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; Ins(1,4,5)P₃, inositol 1,4,5-trisphosphate

includes, in addition to the FcεRI, the ICR, the B cell receptor, and several Fcγ receptors. Engagement of all these receptors results in ITAM tyrosine phosphorylation mediated by receptor-associated Src kinases, creating sites for the binding and activation of Syk kinases that, in turn, phosphorylate and activate enzymes that initiate a variety of response pathways (reviewed in Refs 13, 18, and 19). Thus, the model of signal initiation by sequential kinase activation described above is not limited to the FcεRI signaling cascade, but applies to a family of related receptors.

In 1988, Ortega and colleagues reported the development of a series of mAbs, designated F4, J17, and H10, specific for the α subunit of the FcεRI expressed on RBL-2H3 cells (20). All three of these anti-FcεRI mAbs induced secretion, supporting previous evidence (reviewed in Ref. 21) that the FcεRI dimer is the minimal unit capable of activating FcεRI-coupled responses. Importantly, comparison of the secretory dose-response curves with the extent of FcεRI dimerization demonstrated that not all dimers have equivalent signaling activities. In particular, anti-FcεRI mAb H10-induced dimers elicited substantially less secretion than anti-FcεRI mAbs F4 and J17. The differences discovered between these anti-FcεRI mAbs in studies of the kinetics of FcεRI dimerization induced by each Ab and in biophysical studies of dimerized receptor properties, including rotational mobility and dimer lifetime, could not unambiguously explain the low signaling activity of mAb H10 (20–23). Thus, it was proposed that configurational differences between dimers induced by mAb H10, compared with mAbs F4 or J17, might contribute to their different signaling activities.

We have used this battery of anti-FcεRI mAbs to explore the initial events in the FcεRI signaling cascade. The experiments reported here support previous evidence that all three mAbs generate FcεRI dimers but not higher oligomers and substantially extend previous evidence for the limited signaling activity of H10-induced dimers in comparison with dimers induced with mAbs F4 and J17. Importantly, they link the weak signaling activity of H10-induced dimers to the formation of stable complexes between Lyn and incompletely phosphorylated FcεRI.

Materials and Methods

Reagents

The preparation and characterization of three anti-FcεRI mAbs, H10 (IgG2b), F4 (IgG1), and J17 (IgG1) were described previously (20). Polyclonal anti-phosphotyrosine Ab was produced by G. Deanin and J. Potter, University of New Mexico, and purified as described previously (24). DNP-specific anti-IgE mAb (anti-DNP-IgE) (25) was purified from ascites as previously described (26). Rabbit anti-IgE Ab was prepared as described previously (27). mAb to the FcεRI β subunit was a gift from Dr. J. Rivera, National Institute of Health (28). Rabbit anti-Syk Ab raised against a Syk-specific peptide was a gift from R. Geahlen (Purdue University). Mouse anti-phosphotyrosine mAb, PY20, was from Transduction Laboratories (Lexington, KY), and rabbit anti-Lyn Ab was obtained from Santa Cruz Laboratories (Santa Cruz, CA). Biotinyl anti-mouse IgG was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA), and protein A and protein A/G-conjugated Sepharose were obtained from Oncogene (Cambridge, MA). Fifteen-nanometer protein A-gold- and streptavidin-conjugated colloidal gold particles and Abs and solutions for ECL were purchased from Amersham (Arlington Heights, IL). DNP₂₄-BSA (DNP-BSA), fura-2, and fura-2/AM were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). [³H]serotonin and [³H]Ins(1,4,5)P₃ were obtained from DuPont-New England Nuclear (Boston, MA).

Cell activation

Conditions for RBL-2H3 cell culture were previously described (26). For studies of the signaling activity of FcεRI oligomers, cells were incubated overnight with 1 μg/ml anti-DNP-IgE, then washed with modified Hanks' buffer (29) containing 0.1% BSA and activated at 37°C by the addition of either 0.1 or 1.0 μg/ml of DNP-BSA or 1 μg/ml rabbit anti-IgE. For studies of the signaling activities of anti-FcεRI mAbs, cells were simply activated by the addition of mAb (0.1 μg/ml unless otherwise stated).

Secretion

Secretion was measured from the Ag- or anti-FcεRI mAb-induced release of preloaded [³H]serotonin from cells grown as monolayers on 24-well tissue culture dishes as previously described (26). All measurements were performed in duplicate and corrected for spontaneous release of [³H]serotonin during the standard 20-min assay period. To determine the percent degranulation, total cell-associated [³H]serotonin was measured by Triton X-100 lysis of nonincubated cells.

Ins(1,4,5)P₃ levels

Cells (8 × 10⁶/assay) were activated in suspension with Ag or anti-FcεRI mAbs. Ins(1,4,5)P₃ levels were determined in the supernatant fractions of neutralized TCA extracts using the isomer-specific radioreceptor assay of Challis and colleagues (30) as modified previously (31). Data were expressed as picomoles of Ins(1,4,5)P₃ per milligrams of TCA-insoluble protein.

Ca²⁺ mobilization

Ag- and anti-FcεRI mAb-induced changes in intracellular Ca²⁺ were measured in individual, fura-2/AM-loaded RBL-2H3 cells using fluorescence ratio imaging microscopy as previously described (32).

Microscopy

To observe Ag- or anti-FcεRI mAb-induced membrane ruffling and spreading, cell monolayers on glass coverslips were activated, then fixed either with 2% glutaraldehyde for scanning electron microscopy or with 2% paraformaldehyde/0.5% saponin followed by rhodamine-phalloidin for fluorescence microscopy (27, 33). Cells were examined using a Hitachi S800 scanning electron microscope or a Zeiss Photomicroscope III equipped for epifluorescence microscopy.

Receptor mapping

For receptor mapping studies, cells were activated with 1 μg/ml anti-IgE Ab or 0.1 μg/ml anti-FcεRI mAb on glass coverslips. The cells were then fixed for 10 min at room temperature in 10% paraformaldehyde, 0.075% glutaraldehyde, and 0.2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, as previously described (27). After fixation, IgE-primed, anti-IgE-activated cells were rinsed and incubated for 30 min in PBS-1% BSA containing a 1/17 dilution of 15-nm protein A-gold particles (27). After further rinsing, the cells were postfixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, and processed for scanning electron microscopy. For these samples, inherent receptor distributions were determined by conducting the first fixation before the addition of anti-IgE, and nonspecific gold labeling was observed by anti-IgE labeling without prior IgE priming. Anti-FcεRI mAb-labeled cells were incubated after the initial fixation with biotinyl anti-mouse IgG followed by 15-nm streptavidin-gold particles. For these samples, inherent receptor distributions were determined by anti-FcεRI mAb incubation at 4°C, and nonspecific gold labeling was observed by biotinyl anti-mouse IgG-streptavidin gold labeling without prior incubation with anti-FcεRI mAb.

Immune complex kinase assays

Cell suspensions (6 × 10⁶ cells/ml; 0.5 ml/assay) were activated with Ag or anti-FcεRI mAb, then lysed in ice-cold 50 mM HEPES (pH 7.2), 150 mM NaCl, 1% Brij-96, and 1 μg/ml each of leupeptin, antipain, and pepstatin. In most experiments the lysis supernatants were cleared of any protein A- or A/G-reactive proteins by incubation for 2 h at 4°C with protein A- or protein A/G-Sepharose beads. After preclearing (omitted when immunoprecipitation was with directly bead-coupled Abs), they were incubated for 2 h at 4°C with specific Abs prebound to protein A-Sepharose (polyclonal anti-Lyn and anti-Syk), protein A/G-Sepharose (monoclonal anti-phosphotyrosine), or anti-phosphotyrosine-agarose or anti-Lyn agarose beads. After washing four times, kinase activity was determined from the incorporation of ATP into specific proteins during a 2-min incubation at 30°C with 10 μCi of [^γ-³²P]ATP as previously described (26).

Immunoblotting

Cells were activated, lysed, and precleared (if appropriate), and specific proteins were immunoprecipitated with Abs as described above. Ab-protein complexes were released from the washed beads by boiling, separated by 10% SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose. After overnight incubation at 4°C in 3% BSA to block nonspecific binding, blots were probed with specific Ab for 1 h at room temperature and washed again. For autoradiography, blots were incubated for an additional hour with ¹²⁵I-labeled anti-mouse IgG, and dried membranes were exposed to x-ray film.

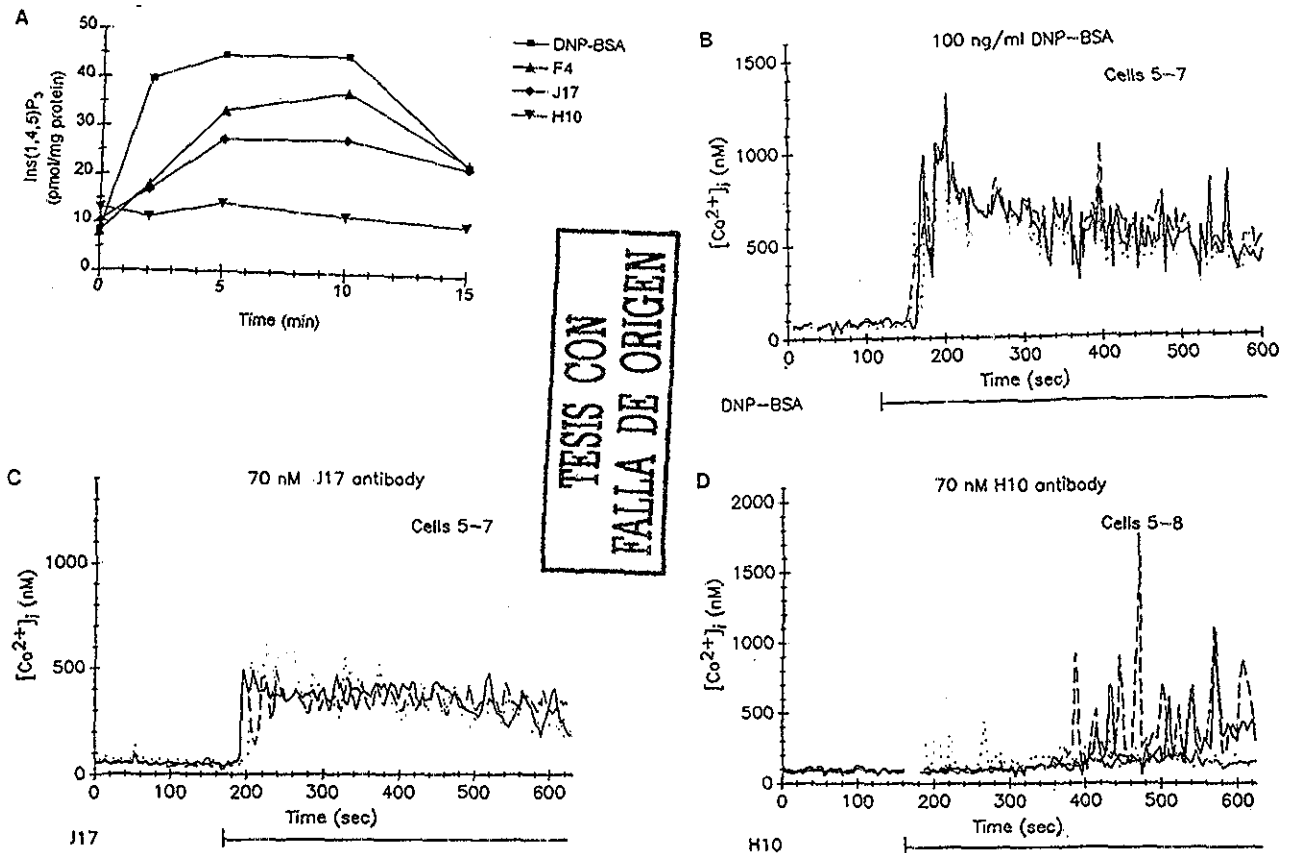


FIGURE 1. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ synthesis and Ca^{2+} mobilization induced by $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ dimers and oligomers. In *A*, RBL-2H3 cells were incubated for various times with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNP-BSA (IgE-primed cells) or with 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti- $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ mAbs (unprimed cells). Reactions were stopped with TCA, and levels of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in the resulting supernatants were measured. Each point is an average from two separate experiments, each performed in duplicate. In *B–D*, cytoplasmic Ca^{2+} levels were measured in individual fura-2-loaded cells by ratio imaging microscopy. Ag (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNP-BSA) or mAbs (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ J17 or H10) were added at the time points indicated. Results show the Ca^{2+} responses of three or four cells per experiment.

For chemiluminescence detection, blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse Abs, washed, immersed in enhanced chemiluminescence solution, and exposed to x-ray film.

Results

Secretion

The anti- $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ mAbs used here were originally selected for their ability to induce secretion from RBL-2H3 cells. Further characterization showed that they compete with each other and with IgE for binding to the $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ α subunit, that they bind in a stoichiometry of 1 Fab:1 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$, and that they elicit quantitatively different secretory responses (20). Originally, 2–20 nM (~3–30 ng/ml) anti- $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ mAb elicited optimal secretion, and the order of activity in degranulation assays was $\text{Ag} = \text{F4} > \text{J17} \gg \text{H10}$. With current anti- $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ mAb preparations and RBL-2H3 cells, 70-nM (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) concentrations of all three mAbs are necessary to induce optimal secretion, and the order of activity has changed somewhat. mAb H10 remains a poor secretagogue, consistently inducing the release of 15–20% of the total [^3H]serotonin under conditions where optimal Ag (0.1 or 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNP-BSA) causes the release of 40–70% of the total mediator, depending on cell culture density and passage number. Current preparations of mAb J17 are strong secretagogues, inducing only 5–10% less secretion than Ag in a 20-min assay. mAb F4 receptor dimers have been less consistent, originally inducing more secretion than mAb J17 (20) but recently inducing responses that are usually smaller than J17-induced responses but consistently greater than the responses induced by

mAb H10. Based on all degranulation assays performed during the course of this work, the relative activities as secretagogues of current anti- $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ mAb preparations are: multivalent Ag > or = J17 > or = F4 \gg H10.

Synthesis of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$

The activation of phospholipase C γ isoforms, leading to the synthesis of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, is one of the earliest responses of RBL-2H3 cells to $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ cross-linking. The results in Fig. 1*A* show that multivalent Ag and anti- $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ mAbs F4 and J17 induce an increase in cytoplasmic $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ levels that is detectable after 1 min and persists for about 10 min before returning toward baseline. In contrast, mAb H10 induces very little $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ synthesis in RBL-2H3 cells.

Ca^{2+} mobilization

Secretion depends on Ca^{2+} mobilization that is initiated by the $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -mediated release of intracellular stores and maintained by Ca^{2+} influx. Ratio imaging microscopy was used to compare the Ca^{2+} mobilization responses of RBL-2H3 cells to anti- $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ mAb-induced receptor dimers and to DNP-BSA-induced receptor oligomers. Typical results are shown in Fig. 1, *B–D*. In duplicate experiments, 100% of cells mobilized Ca^{2+} in response to 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations of DNP-BSA and of anti- $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ mAbs J17 and H10. However, there were characteristic differences in the lag time to the initial Ca^{2+} spike response, previously attributed to the release of Ca^{2+} from intracellular stores

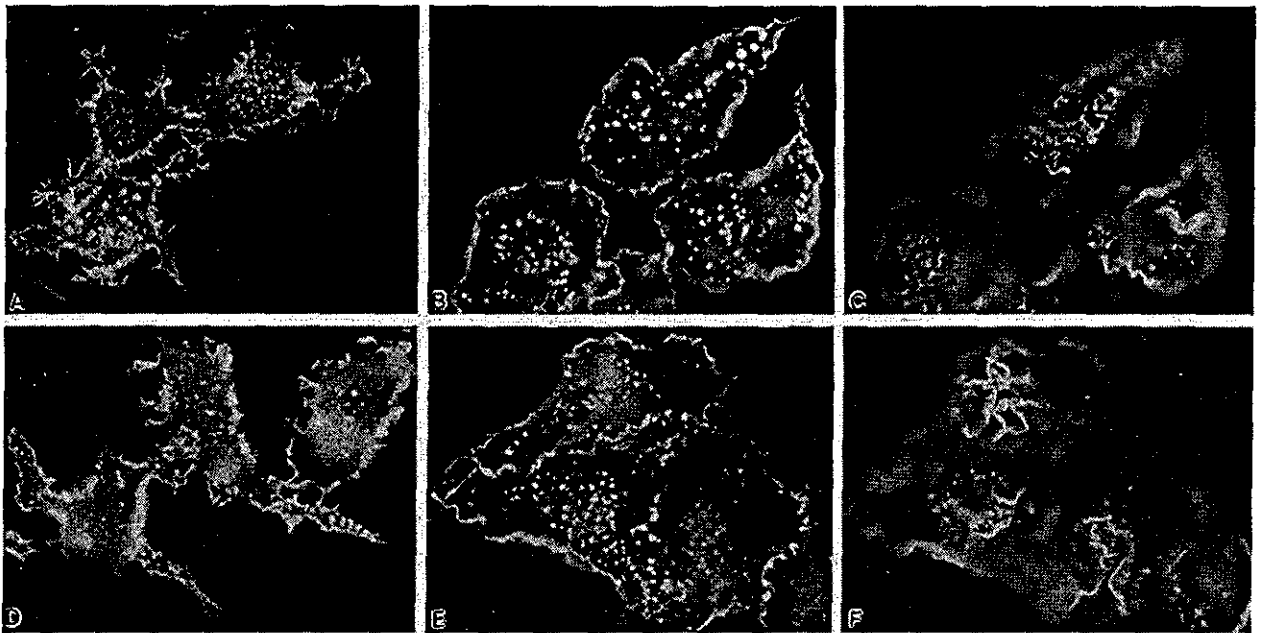


FIGURE 2. Cytoskeletal and adhesive responses induced by FcεRI dimers and oligomers. Monolayers of RBL-2H3 cells on glass coverslips were incubated for 10 min at 37°C with no addition (*A*), 1 µg/ml DNP-BSA (*B* and *C*), 0.1 µg/ml anti-FcεRI mAb H10 (*D*), or 0.1 µg/ml anti-FcεRI mAb J17 (*E* and *F*). Cells were fixed, and filamentous actin was labeled with rhodamine-phalloidin as described in *Materials and Methods*. Unstimulated cells are relatively rounded with short actin-containing extensions (*A*). Incubation with Ag or anti-FcεRI mAb J17 induces a marked spreading response that is accompanied by the assembly of actin plaques at the ventral cell surface (*B* and *E*) and of lamellae on the dorsal cell surface (*C* and *F*). Anti-FcεRI mAb H10 induces a modest spreading response with very little cytoskeletal reorganization (*D*). Magnification, ×630.

(32): 42 ± 15 s ($n = 7$ cells) for DNP-BSA-stimulated cells, 70 ± 12 s ($n = 7$ cells) for J17-stimulated cells, and 170 ± 109 s ($n = 8$ cells) for H10-stimulated cells. Additionally, Ag and anti-FcεRI mAb J17 induced a persistent increase in cytoplasmic Ca^{2+} levels, attributable to Ca^{2+} influx (32). In contrast, anti-FcεRI mAb H10 induced a series of Ca^{2+} spikes, presumably resulting from the periodic release and reuptake of Ca^{2+} stores, but failed to support a sustained elevation in cytoplasmic Ca^{2+} levels. The supply of anti-FcεRI mAb F4 was too limited for extensive studies of Ca^{2+} mobilization. However, in a single experiment, anti-FcεRI mAb F4 receptor complexes induced responses similar to those to J17 (not shown).

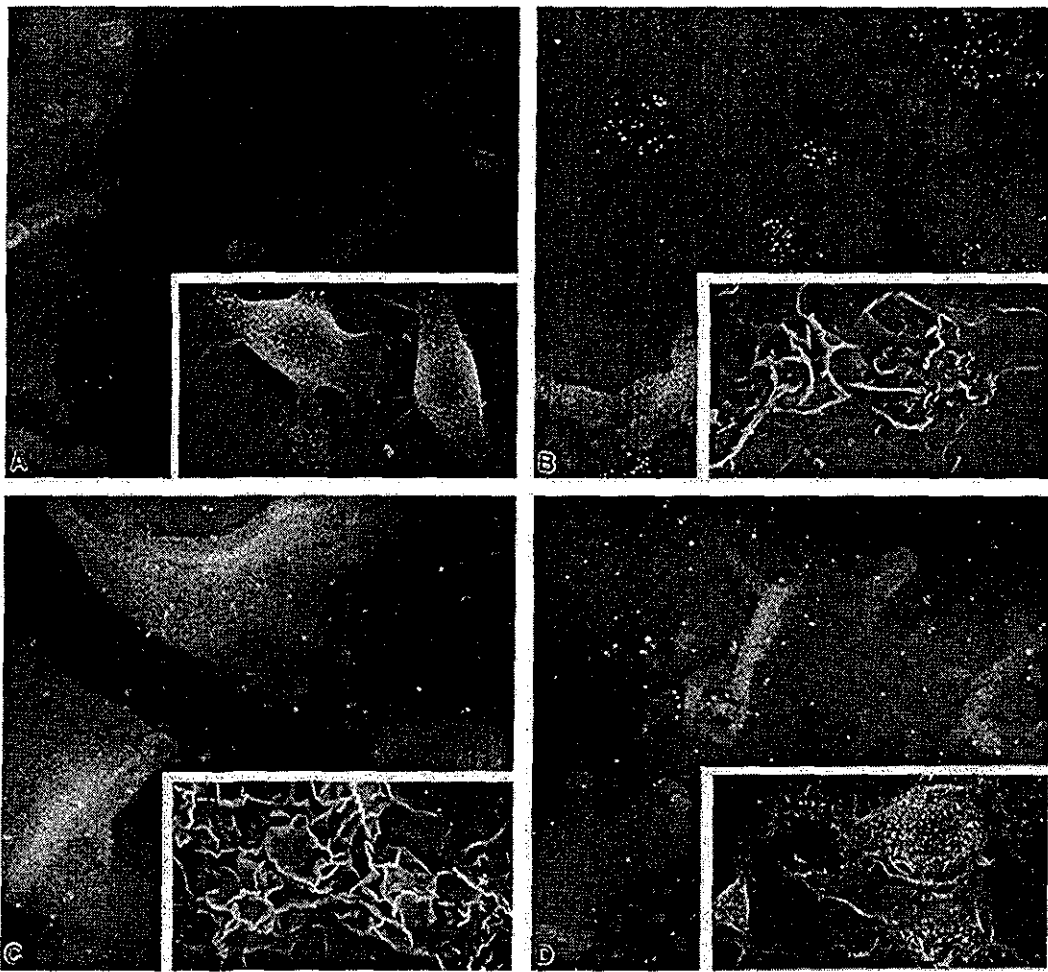
Membrane and cytoskeletal responses

Cross-linking IgE-FcεRI complexes with multivalent Ag induces striking membrane and cytoskeletal responses, including filamentous actin polymerization, membrane ruffling, spreading, integrin up-regulation, and the assembly of specialized adhesion structures called actin plaques (1, 33, 34). We used fluorescence and scanning electron microscopy to examine a subset of these responses, including spreading, actin plaque assembly, and membrane ruffling. Resting cells adhere loosely to glass coverslips, and filamentous actin, localized with rhodamine-phalloidin, is distributed as a cortical meshwork that outlines pseudopodia as well as in amorphous cytoplasmic aggregates (Fig. 2*A*). These cells maintain a microvillous surface morphology (Fig. 3*A*, inset). Cross-linking with DNP-BSA for 10 min induces a strong spreading response, accompanied by the assembly of actin plaques at sites of cell-substrate interaction (Fig. 2*B*) and by a transformation of the upper cell surface to a lamellar topography (Figs. 2*C* and 3*B*, inset). Cross-linking with anti-FcεRI mAbs F4 (not shown) and J17 (Fig. 2, *E* and *F*, and Fig. 3*C*, inset) induces spreading, actin plaque assembly, and ruffling responses that are essentially the same as those induced by Ag. In contrast, H10-activated cells show a mod-

est spreading response, with little or no actin plaque assembly (Fig. 2*D*) or membrane ruffling (Fig. 3*D*, inset).

Indistinguishable membrane topography of mAb-induced FcεRI dimers

Ortega et al. (20) showed previously that the binding stoichiometry of anti-FcεRI mAb Fab fragments was one Fab to one FcεRI, implying that all three mAbs can cross-link receptors only into dimers. Independently, Baird and colleagues demonstrated that small receptor oligomers induced with chemically cross-linked IgE molecules can induce large scale receptor clustering by a process that is independent of interoligomer cross-linking (35). Further studies by the Baird group suggested that the underlying mechanism may involve the segregation of membrane lipids to create local environments that are especially favorable for receptor clustering (36). Extending this concept, Stauffer and Meyer (37) suggested recently that IgE receptor signaling requires the transient association of cross-linked receptors with punctate plasma membrane microdomains where they induce the spatially restricted activation of SH2 domain-containing proteins such as Syk and phospholipase C-γ1. Based on these results, it seemed possible that the stronger signaling activity of anti-FcεRI mAb F4- and J17-induced dimers could reflect their ability to be drawn into clusters or membrane domains that might engage kinases and other signaling molecules more effectively than mAb H10 receptor dimers. To test this, we localized anti-FcεRI mAb-FcεRI complexes on the surfaces of resting and activated cells by immunogold labeling and backscattered electron imaging in the scanning electron microscope. For comparison, we looked at the effects of cross-linking IgE-receptor complexes on the same cell population with polyclonal anti-IgE Ab that elicits strong signaling activity (27). FcεRI oligomers induced on IgE-primed cells by polyclonal anti-IgE were detected by postfixation labeling with 15-nm protein A-gold particles as previously described (27). Anti-FcεRI mAb-receptor



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FIGURE 3. FcεRI dimers maintain a dispersed cell surface distribution. In *A–D*, RBL-2H3 cell monolayers were incubated for 10 min with no addition (*A*), with polyclonal anti-IgE Ab (1.0 μg/ml; *B*), or with anti-FcεRI mAbs (0.1 μg/ml J17 and H10; *C* and *D*). After fixation, receptors on IgE-primed cells that bound anti-IgE (*B*) were labeled with 15-nm protein A-gold particles, while receptors on unprimed cells incubated with no addition (*A*) or with anti-FcεRI mAbs (*C* and *D*) were labeled sequentially with biotinyl anti-mouse IgG and 15-nm streptavidin-gold particles. The distribution of membrane-bound gold particles marking cross-linked receptors was observed by backscattered electron imaging in the scanning electron microscope. Very little colloidal gold binds to untreated cells (*A*). FcεRI aggregates induced by polyclonal anti-IgE Ab are extensively clustered on the cell surface (*B*). Anti-FcεRI mAb-induced receptor dimers maintain a dispersed cell surface distribution (*C* and *D*). Conventional scanning electron microscope images generated from the same samples are inset to illustrate the microvillous morphology and limited spreading of untreated (*A*) and anti-FcεRI mAb H10-treated (*D*) cells and the lamellar surface topography and extensive spreading of anti-IgE mAb-treated (*B*) and anti-FcεRI mAb J17-treated (*C*) cells. Magnification, ×20,000; inset magnification, ×500.

complexes were detected by postfixation labeling with biotinylated anti-mouse IgG followed by streptavidin-conjugated 15-nm gold particles.

No gold particles bound to cells that were incubated with secondary reagents without prior exposure to cross-linking Abs (Fig. 3*A*). Typical receptor aggregates induced on IgE-primed cells by 5-min cross-linking with polyvalent anti-IgE at 37°C are illustrated in Fig. 3*B*. In contrast, gold particles localizing anti-FcεRI mAb-receptor complexes remained dispersed, mostly as singlets and doublets, over the entire membrane of cells that were incubated for 10 min at 4°C (not shown), for 10 min at 37°C (illustrated for mAbs J17 and H10 in Fig. 3, *C* and *D*), or for 20 min or longer (not shown) with all three anti-FcεRI mAbs. To detect patterns of receptor redistribution that might not be apparent by eye, photographic negatives from cells labeled at 4 or 37°C and on cells that were fixed before labeling were digitized, and gold particle distributions were determined by an image analysis system developed by C. Wofsy, M. Sanders, and G. Donohoe at the University of New Mexico (38). Image analysis also failed to reveal consistent

differences in aggregate size or distribution between the different mAbs or labeling conditions. Transmission electron microscopic analyses of similar samples showed no internalization of receptor-mAb-colloidal gold complexes during incubation for up to 20 min at 37°C (not shown).

Different anti-FcεRI mAbs induce different phosphoprotein profiles in anti-phosphotyrosine kinase assays

The abilities of the different anti-FcεRI mAbs to activate protein tyrosine phosphorylation was tested by anti-phosphotyrosine immune complex kinase assays. Typical results are shown in Fig. 4. Anti-phosphotyrosine immune complexes from resting cells support relatively little incorporation of [γ -³²P]ATP into proteins. Anti-phosphotyrosine immune complexes from cells that were activated for 2 min with 0.1 μg/ml multivalent Ag phosphorylate a series of proteins, including a 53/56-kDa doublet known from previous studies (4, 26) to represent phosphorylated Lyn and bands at around 33 and 10–12 kDa shown previously (7) to correspond to

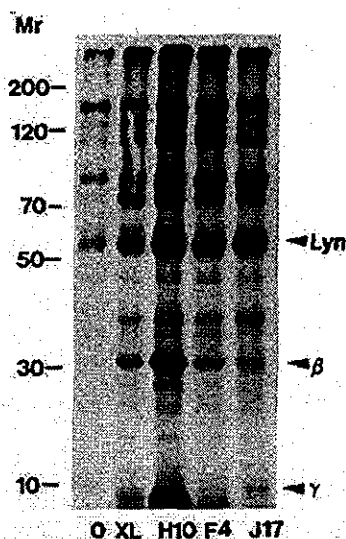


FIGURE 4. Effects of FcεRI cross-linking on anti-phosphotyrosine immune complex kinase activities. RBL-2H3 cells were incubated for 2 min at 37°C with no addition (0) or with 1 μg/ml DNP-BSA (XL) or for 5 min with 0.1 μg/ml anti-FcεRI mAbs (H10, F4, and J17). Cells were lysed, and tyrosine-phosphorylated proteins were precipitated from precleared lysates by incubation with anti-phosphotyrosine mAb PY20-conjugated to protein A/G beads. The immune complexes were incubated for 5 min with [γ - 32 P]ATP, and the resulting phosphoproteins were separated by SDS-PAGE and detected by autoradiography. The migration of m.w. markers is indicated, and three known proteins among the principal phosphorylated bands are identified. Signal intensity from the FcεRI β and γ subunits is much stronger in immune complexes from anti-FcεRI mAb H10-treated cells than in those from cells treated with Ag or other anti-FcεRI mAbs. Results are typical of three replicate experiments.

the phosphorylated FcεRI β and γ subunits. The signal from phosphorylated Lyn was stronger when anti-phosphotyrosine immune complexes were from cells treated with any of the three anti-FcεRI mAbs than when they were from Ag-treated cells. These data suggest that all anti-FcεRI mAb receptor dimers are fully competent to initiate Lyn-mediated β and γ subunit ITAM phosphorylation, the event that launches the FcεRI signaling sequence. Importantly, the signals from bands corresponding to the phosphorylated β and γ subunits were strikingly stronger when anti-phosphotyrosine immune complexes were generated from H10-activated cells than when they were from cells activated with Ag or the signaling-competent anti-FcεRI mAbs, F4 and J17. Results were the same regardless of whether lysates were cleared with protein A/G-Sepharose beads before the addition of anti-phosphotyrosine-coated beads. Thus, the excess $\beta\gamma$ signal in lysates of H10-treated cells could not be explained by the nonspecific interaction of detergent-solubilized mAb receptor complexes with protein A/G beads.

H10 receptor complexes induce stable complexes between activated Lyn and FcεRI receptor subunits

The results of anti-Lyn immune complex kinase assays are given in Figs. 5A and 6. In Fig. 5A, cells were incubated for 5 min with either 0.1 μg/ml DNP-BSA or 0.1 μg/ml of all three anti-FcεRI mAbs. In Fig. 6, incubation was for 2, 5, or 10 min with the same concentrations of DNP-BSA and of two anti-FcεRI mAbs, H10 and J17 (Fig. 6A), or for 5 min with a 100- to 500-fold range of Ag, H10, and J17 concentrations (Fig. 6B). In all cases, cells were lysed, and the lysis supernatants were clarified by incubation with protein A-Sepharose beads. Lyn and Lyn-associated proteins were then precipitated from the clarified lysis supernatants using anti-

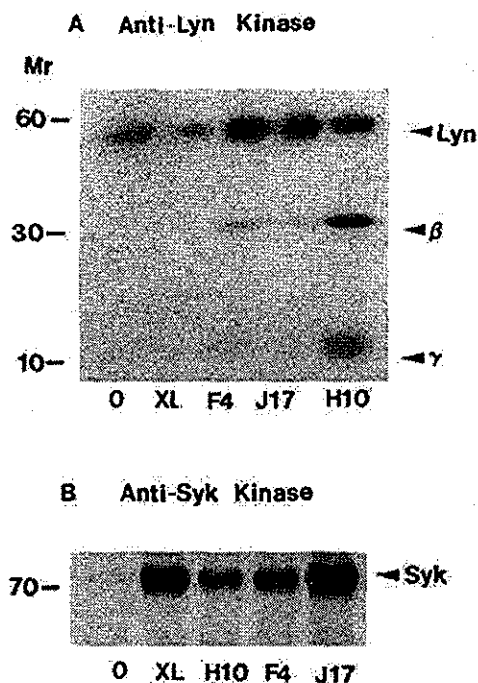


FIGURE 5. Effect of FcεRI cross-linking on anti-Lyn and anti-Syk immune complex kinase activities. The experiment was performed as described in Fig. 4, except that DNP-BSA and anti-FcεRI mAbs were added for 5 min, and immunoprecipitation from cell lysates was performed with anti-Lyn (A) or anti-Syk (B) mAbs. Anti-Lyn immune complexes (A) from resting and activated cells could all autophosphorylate Lyn in vitro. FcεRI β and γ subunits coprecipitated with Lyn from lysates of mAb H10-treated cells and were detected by their in vitro phosphorylation. There is vanishingly little Syk activity in anti-Syk immune complexes from resting cells (B). Syk activation was greatest in Ag- and anti-FcεRI mAb J17-treated cells and least in H10-treated cells. Results with anti-Syk immune complexes are typical of three replicate experiments. Additional anti-Lyn immune complex kinase assays are reported in Fig. 6.

Lyn-protein A-Sepharose beads. Kinase activity was again determined from the incorporation of [γ - 32 P]ATP into proteins.

An autophosphorylated doublet of Lyn is present under all incubation conditions. In experiments using older lots of polyclonal anti-Lyn Ab (as in Fig. 5A) (4) there was typically an increase in autophosphorylated Lyn when immune complexes were prepared from lysates of activated cells. This is apparent in Fig. 5A, where Lyn autophosphorylation is substantially greater in cells treated with all three anti-FcεRI mAbs than in resting cells (the low signal from Ag-treated cells in this experiment is unusual). With more recent lots of polyclonal anti-Lyn Ab (as in Fig. 6) (26), Lyn typically shows strong autophosphorylation in anti-Lyn in vitro kinase assays whether the initial immunoprecipitation with polyclonal anti-Lyn Ab is from resting or activated cells.

In cells activated with Ag or anti-FcεRI mAbs F4 and J17, the autophosphorylated doublet of Lyn is the only strong band seen in anti-Lyn immune complex kinase assays over a range of incubation times (Figs. 5A and 6A) and concentrations of stimulus (Fig. 6B). In contrast, anti-Lyn immune complexes from H10-treated cells, when assessed in in vitro kinase assays, always showed substantial incorporation of [γ - 32 P]ATP into the FcεRI β and γ subunits regardless of the incubation time (Figs. 5A and 6A) or concentration of stimulus (Fig. 6B). These results provided the first evidence that FcεRI cross-linking with mAb H10 induces the formation of stable complexes between Lyn and its principal endogenous substrates, the receptor's β and γ subunits. This Lyn-bound

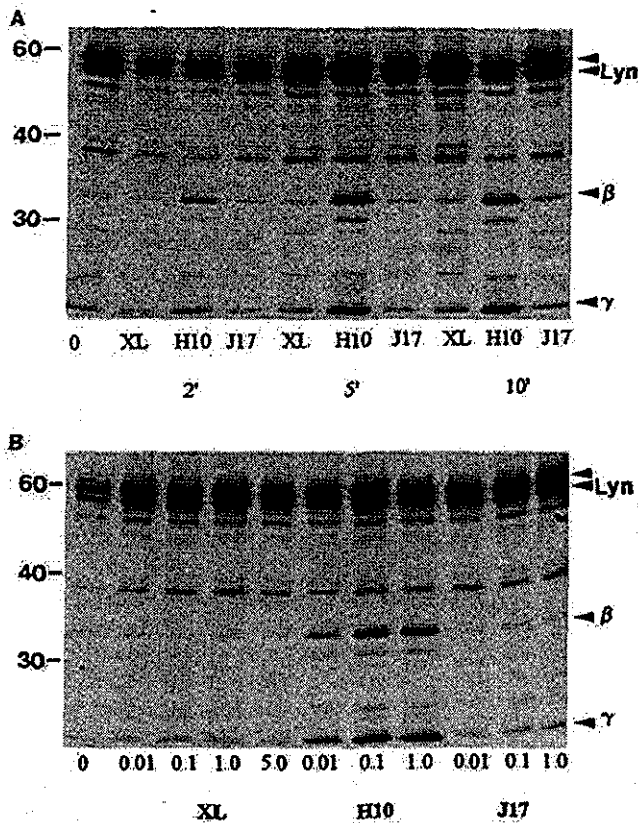


FIGURE 6. Anti-FcεRI mAb 10-receptor complexes induce stable complexes between Lyn and receptor subunits. In *A*, cells were incubated for 2, 5, or 10 min at 37°C with either 0.1 μg/ml DNP-BSA (XL) or 0.1 μg/ml anti-FcεRI mAbs H10 and J17. In *B*, incubation was for 5 min at 37°C, but concentrations of DNP-BSA or anti-FcεRI mAbs H10 and J17 ranged from 0.01–5 μg/ml. Cells were lysed, proteins were immunoprecipitated from precleared lysates using polyclonal anti-Lyn Ab coupled to protein A-Sepharose beads, and the immune complexes were incubated for 5 min with [γ - 32 P]ATP. Phosphoproteins were separated by SDS-PAGE and detected by autoradiography. Autophosphorylated 53/56-kDa Lyn is present in all experiments under all incubation conditions. There are additional strong signals from phosphorylated FcεRI β and γ subunits in anti-Lyn immune complexes from anti-FcεRI mAb H10-treated cells. In H10-treated cells, this strong signal from coprecipitated substrate persists over a range of incubation times (*A*) and concentrations of stimulus (*B*). No signal from coprecipitated receptor subunits of other kinase substrate is induced in cells treated with Ag or anti-FcεRI mAb J17.

receptor is a likely source of some or all of the strong phospho- β and phospho- γ signals detected by anti-phosphotyrosine immune complex kinase assays shown in Fig. 4.

H10 receptor complexes are poor Syk activators

In Fig. 5*B*, anti-Syk immune complexes were incubated with [γ - 32 P]ATP to measure cross-linker-induced Syk autophosphorylation, an index of Syk activity. As previously reported (26), there is little or no Syk activity in resting cells. Syk is strongly activated by Ag and anti-FcεRI mAb J17. There is an intermediate level of Syk activation in anti-FcεRI mAb F4-treated cells. Consistent with their impaired signaling activity, anti-FcεRI mAb H10 receptor complexes induce the least Syk activation in kinase-specific assays.

Different cross-linking agents induce different phospho- β isoforms in RBL-2H3 cells

In Fig. 7, *A* and *B*, anti-phosphotyrosine-reactive proteins were immunoprecipitated from variously activated cells, separated by SDS-PAGE, and probed with either anti- β subunit mAbs (Fig. 7*A*) or anti-phosphotyrosine mAbs (Fig. 7*B*). The results of anti- β blotting showed that anti-phosphotyrosine immune complexes from resting cells (*left lane*) are essentially free of β subunits. It thus appears that there is little intrinsic tyrosine phosphorylation of receptor subunits and of proteins that bind and coprecipitate these subunits in RBL-2H3 cells. Anti-phosphotyrosine immune complexes from cells activated for 5 min with Ag or anti-FcεRI mAbs contained three anti- β -reactive bands, designated β 1, β 2, and β 3. β 3 (~33 kDa) was readily detected in cells treated with Ag and anti-FcεRI mAb J17, was less abundant in cells treated with anti-FcεRI mAb F4, and was virtually undetectable in cells treated with anti-FcεRI mAb H10. β 2 (~30 kDa) was the predominant band in cells treated with anti-FcεRI mAbs H10 and F4. There was also a substantial signal from β 2 in cells treated with Ag and with anti-FcεRI mAb F4. β 1 (~27 kDa) was readily detected in mAb H10-treated cells, but contributed very little signal in cells treated with Ag or with anti-FcεRI mAbs F4 and J17 (see Fig. 7).

All three anti- β -reactive bands were detected by anti-phosphotyrosine blotting of anti-phosphotyrosine immune complexes (Fig. 7*B*), indicating that they are all tyrosine phosphorylated in activated cells. However, the distribution of signal intensities between isoforms was strikingly different when detection was with anti-phosphotyrosine compared with anti- β mAbs. In particular, anti-phosphotyrosine reacted weakly with the β 1 isoform, more strongly with the β 2 isoform, and most strongly with the β 3 isoform (see Fig. 7). Thus, the different electrophoretic mobilities of these phosphorylated β subunit isoforms are most likely explained by their different extents of tyrosine phosphorylation.

Lyn does not associate with the FcεRI β 3 isoform

In Fig. 7, *C* and *D*, anti-Lyn immune complexes were precipitated from lysates of Ag- or anti-FcεRI mAb-activated cells and separated by SDS-PAGE, and Western blots of replicate gels were probed as described above with either anti- β or anti-phosphotyrosine mAbs. The two less phosphorylated β subunit isoforms, β 1 and β 2, discovered in highest amounts in anti-phosphotyrosine immune complexes from H10-activated cells, were also prominent in anti- β blots of anti-Lyn immune complexes from H10-activated cells (Fig. 7*C*). These results support evidence from anti-Lyn immune complex kinase assays (Figs. 5*A* and 6) that a substantial amount of Lyn exists in a stable complex with FcεRI subunits in H10-treated cells. They identify H10-induced β 1 and β 2 as Lyn-binding isoforms. In contrast, the highly phosphorylated β 3 isoform, found particularly in anti-phosphotyrosine immune complexes from Ag- and J17-treated cells, is completely absent from anti-Lyn immune complexes and is thus identified as having very little binding activity for Lyn. Ag- and anti-FcεRI mAb J17-induced β 2 also showed very little association with Lyn. The simplest explanation is that the β 2 band may consist of proteins that are phosphorylated on different tyrosines or on a different combination of tyrosine and serines, resulting in their similar electrophoretic mobilities but different Lyn-binding activities and potential for further phosphorylation to the β 3 isoform.

In many replicate experiments, the β 2 and β 3 isoforms were consistently resolved by immunoblotting antiphosphotyrosine immune complexes from activated cells (as in Fig. 7), while immune complex kinase assays usually revealed a single band (as in Figs.

TESIS CON

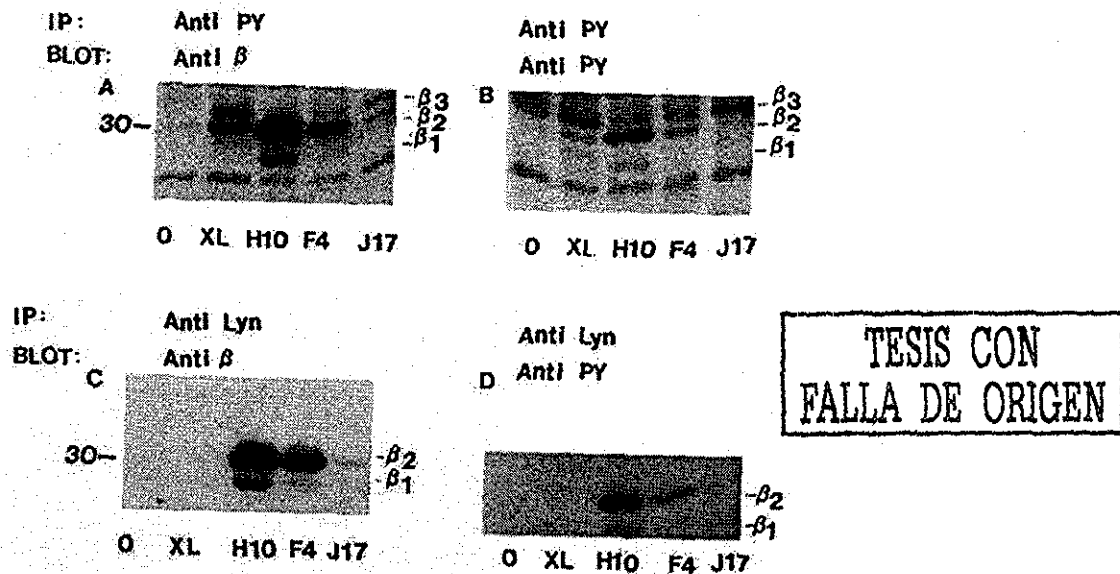


FIGURE 7. Three phospho- β isoforms are induced by Fc ϵ RI cross-linking, but only two associate with Lyn. Cells were activated for 2 min with 0.1 μ g/ml DNP-BSA or for 5 min with 0.1 μ g/ml anti-Fc ϵ RI mAbs. Anti-phosphotyrosine (A and B) or anti-Lyn (C and D) immune complexes were generated from precleared cell lysates as described in Fig. 4. Proteins were separated on duplicate 10% SDS gels and transferred to nitrocellulose for Western blotting using anti- β (A and C) or anti-phosphotyrosine (B and D) mAbs followed by 125 I-labeled donkey anti-mouse IgG. After blotting, the gels were dried, and radiolabeled Fc ϵ RI β subunits, designated β 1, β 2, and β 3, were detected by autoradiography. The experiment illustrated here (one of three with very similar results by autoradiography) was also analyzed using a PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Comparison of the amounts of various β subunit isoforms in this single experiment revealed β 3: β 2: β 1 ratios of 42:57:1 in Ag-treated cells, 46:52:2 in J17-treated cells, 21:72:7 in F4-treated cells, and 9:76:15 in H10-treated cells. Comparison of signal intensities between corresponding bands in A and B showed ratios of anti-phosphotyrosine signal:anti- β signal of 0.96 for β 3, 0.25 for β 2, and 0.15 for β 1.

4–6). We speculate that this difference reflects the release of constraints to reaching the most phosphorylated state under the conditions of our *in vitro* assays. In contrast, a band resembling β 1 was detected in lysates of anti-Fc ϵ RI mAb H10-treated cells both by anti- β immunoblotting (Fig. 7) and by anti-phosphotyrosine and anti-Lyn immune complex kinase assays (Figs. 4 and 6). The small amounts of β 1 even in cells treated with anti-Fc ϵ RI mAb H10 raises uncertainty about its identity. β 1 may be a third phospho- β subunit isoform that cannot be phosphorylated to completion by Lyn *in vitro*. Alternatively, it may be a product of limited proteolysis of the β 2 or β 3 isoform.

Discussion

A series of older reports suggested that receptor dimers are the minimal unit capable of transducing signals from Fc ϵ RI cross-linking to secretory responses (21). The work of Ortega and colleagues with two signaling-competent anti-Fc ϵ RI mAbs, F4 and J17, provided definitive support for this proposal. A third mAb to the Fc ϵ RI α subunit, H10, was found to induce very limited secretory activity. The differences in secretory activity of Fc ϵ RI dimers induced by different mAbs have been postulated to arise from different configurational constraints of the dimers (20, 22, 23). Here, we have extended the characterization of signaling differences among the three anti-Fc ϵ RI mAbs to include not only secretion, but also Ins(1,4,5) P_3 synthesis, Ca^{2+} mobilization, ruffling, spreading, and actin plaque assembly. The effectiveness of cross-linker-induced cell activation in these studies was Ag > or = J17 > or = F4 \gg H10, somewhat different from that originally reported (20).

We considered the possibility that the different anti-Fc ϵ RI mAb-induced receptor dimers may redistribute by a process that is independent of interdimer cross-linking into differently sized aggregates with correspondingly different signaling activities. In

particular, recent evidence that cross-linked IgE receptors may redistribute to punctate plasma membrane domains visible at the resolution of the fluorescence microscope (37) led to the hypothesis that Fc ϵ RI dimers induced by anti-Fc ϵ RI mAb J17 might redistribute into larger clusters than Fc ϵ RI dimers induced by anti-Fc ϵ RI mAb H10. Fluorescence microscopy (not shown) resolved receptor clusters in cells treated with anti-IgE but not with anti-Fc ϵ RI mAbs. The dispersed distributions of receptor complexes induced by all three anti-Fc ϵ RI mAbs were confirmed at the higher resolution of the scanning electron microscope. Based on these results, it is clear that formation of large receptor clusters is not required for signaling. It remains possible that the signaling-competent mAbs induce very small clusters of Fc ϵ RI dimers that cannot be distinguished from fully dispersed H10-induced dimers by our gold-labeling procedures, which tag only a small proportion of total receptors.

Contemporary models suggest that the Fc ϵ RI signaling cascade is initiated by the Lyn-mediated transphosphorylation of tyrosines in the receptor subunit cytoplasmic tails, creating β subunit phosphotyrosine binding sites for the SH2 domains of additional Lyn molecules that, in turn, catalyze further Fc ϵ RI β and γ subunit phosphorylation (10, 12, 39). The results of anti-phosphotyrosine immune complex kinase assays revealed strong signals from phosphorylated Lyn in H10-activated cells. The signals from phosphorylated receptor subunits were substantially greater when anti-phosphotyrosine immune complexes were prepared from H10-activated cells than when they were from Ag-activated cells. These data indicate that H10 receptor dimers are fully competent to support the initial events of Lyn-mediated subunit transphosphorylation that launch the Fc ϵ RI signaling sequence.

Importantly, we detected strong signals from phosphorylated Fc ϵ RI β and γ subunits when lysates of H10-treated cells were used as a source of Lyn (and Lyn-associated proteins) for anti-Lyn

immune complex kinase assays. In contrast, signals from phosphorylated receptor subunits were weak or absent when Lyn was immunoprecipitated from lysates of cells that were activated with Ag or with anti-FcεRI mAbs J17 or F4. These experiments established that mAb H10, but not Ag or the more signaling-competent anti-FcεRI mAbs, induces stable complexes between activated Lyn and receptor subunits.

There was less Syk phosphorylation in anti-Syk immune complex kinase assays when lysates were from H10-activated cells than when they were from cells activated with Ag or with anti-FcεRI mAbs F4 and J17. It thus appeared that the presence of stable Lyn-receptor complexes may be incompatible with strong Syk activation and signal propagation in intact cells.

We discovered that anti-phosphotyrosine immune complexes from activated cells contain two principal phosphorylated FcεRI β subunit isoforms, designated β2 and β3, each with its own characteristic electrophoretic mobility, resulting at least in part from differences in the extent of β subunit tyrosine phosphorylation. (Differences in serine phosphorylation might also contribute to these distinct mobilities.) A third phospho-β band, β1, detected in mAb H10-treated cells may represent an additional phospho-β isoform but could also be a degradation product from the principal isoforms. Importantly, different cross-linking agents induced different distributions of total FcεRIβ between these phospho-β isoforms. Specifically, the most phosphorylated, least mobile phospho-β form, β3, was most prominent in Ag- and J17-stimulated cells, occurred in modest levels in F4-stimulated cells, and was barely detectable in H10-treated cells. The moderately phosphorylated, moderately mobile phospho-β form, β2, was found at highest levels in H10-treated cells and in substantial amounts in cells stimulated with Ag and anti-FcεRI mAbs F4 and J17. Finally, the least tyrosine-phosphorylated, most mobile phospho-β species, here called β1, was found almost exclusively in H10-treated cells. These phospho-β isoforms can be distinguished not only by their phosphorylation levels, but also by their ability to bind Lyn. Thus, the incompletely phosphorylated β1 and β2 bands that predominate in mAb H10-treated cells coprecipitate with Lyn in anti-Lyn immune complexes. In contrast, β3, the highly phosphorylated phospho-β isoform found in cells treated with Ag and the signaling-competent anti-FcεRI mAbs, does not coprecipitate with Lyn.

These results are consistent with previous evidence that Lyn binding to partially phosphorylated FcεRIβ promotes further β and γ subunit phosphorylation (10, 40). They suggest for the first time that Lyn dissociation is a prerequisite for Syk recruitment to γ subunit phospho-IIAMs and for signal propagation. They indicate that Lyn dissociation depends on the successful progression of a Lyn-mediated FcεRI β subunit phosphorylation sequence. We cannot as yet propose a definitive mechanism for the blockade of β subunit phosphorylation and Lyn dissociation in H10-treated cells. However, Ortega et al. (20) concluded that configurational differences between FcεRI dimers induced by H10 and other mAbs might explain their different signaling properties. Our data raise the possibility that these configurational constraints make a phosphorylation site(s) on the β subunit inaccessible to activated Lyn in H10-treated cells.

Recent work by Pribluda et al. (14) established that FcεRI cross-linking with multivalent Ag causes the phosphorylation of three tyrosines, all located within the β subunit IIAM region. Two are typical IIAM tyrosines, and the third is an atypical internal tyrosine. The extent of phosphorylation of these tyrosines is variable. Two serines located within the β-IIAM sequence are also variably phosphorylated following FcεRI cross-linking. In the simplest case, it is conceivable that the three phospho-β isoforms represent mono-, di-, and trityrosine-phosphorylated species and that one of

the three β-IIAM tyrosines remains inaccessible to Lyn in H10-treated cells, preventing complete subunit phosphorylation and Lyn dissociation. However, H10-induced β2 binds Lyn, whereas Ag-induced β2 has little Lyn-binding activity. Thus, it is perhaps more likely that the β2 band includes several species that are phosphorylated on different tyrosines or on a different combination of tyrosines and serines, resulting in their similar electrophoretic mobilities but distinct Lyn-binding activities and potential for further phosphorylation to the β3 isoform in intact cells. Further work is also needed to decide whether β1 participates in the normal phosphorylation sequence.

The occurrence of multiple phospho-β subunit isoforms in intact, Ag-stimulated cells is not a new observation. In 1992, we demonstrated that FcεRI cross-linking causes a time- and Ag concentration-dependent shift in the electrophoretic mobility of anti-phosphotyrosine-reactive FcεRI β in [γ - 32 P]orthophosphate-labeled Ag-treated RBL-2H3, resembling the β2 to β3 transition (7). Paolini et al. (41) also demonstrated a mobility shift in response to 1 min of receptor cross-linking in RBL-2H3 cells and showed that the less mobile form of phosphorylated β induced by Ag could be returned to its original higher mobility form by the addition of monovalent hapten for 30 s. Other work by Kinet and colleagues has demonstrated a cross-linker- and Lyn-dependent β subunit mobility shift, resembling the β2 to β3 transition, in both P815 and NIH-3T3 cells induced to express wild-type and mutant FcεRI subunits (11, 42). The β1 isoform has not been reported previously in Ag-stimulated RBL-2H3 cells. However, Jouvin et al. (11) showed in transfected P815 cells that mutagenized FcεRI β lacking all three β-IIAM tyrosine phosphorylation sites but still capable of serine phosphorylation had a distinctive faster mobility than the wild-type β isoform. The similar behaviors of H10-induced β1 in RBL-2H3 cells and mutated β in P815 transfectants encourage phosphopeptide sequence analyses to determine whether β1 in RBL-2H3 cells is a third phospho-β subunit isoform with a low level of tyrosine phosphorylation, possibly supplemented by serine phosphorylation. As noted, we cannot exclude the alternative possibility that β1 is simply a product of limited proteolysis of the β2 or β3 isoforms.

Previous investigators have had difficulty in demonstrating Lyn-receptor complexes in Ag-stimulated cells (10). Our data predict this result. For signaling-competent cross-linking agents, the speed at which Lyn is recruited to Ag-receptor complexes, mediates the FcεRI subunit phosphorylation sequence, and then dissociates from the receptor implies that only a small proportion of Lyn is likely to be in the receptor-bound form during active signaling. It is clear from recent studies that Lyn is limiting for signaling (39). Thus, the transient interaction of Lyn with subunits has at least two advantages. First, it permits Syk's access to γ-phospho-IIAMs, as required for signal propagation. Second, it maintains a supply of Lyn for signal initiation through new receptor cross-linking events.

In summary, we suggest Lyn dissociation from highly phosphorylated FcεRI subunits as a new regulatory step in the FcεRI signaling cascade that is required for Syk activation and signal propagation. We predict that a similar regulatory step will be discovered by analyses of other multichain immune recognition receptor signaling pathways. Consistent with this, two groups studying the induction of T cell anergy by altered peptide ligands found that occupying the ICR by altered peptides can in some cases induce ICR ζ-chain phosphorylation with very little ZAP70 recruitment or activation (43, 44). In both studies an unusual highly mobile, less phosphorylated ζ subunit isoform dominated over the less mobile, highly phosphorylated ζ isoform induced by immunogenic peptide. Cells exposed to the altered peptide ligands were

only weakly activated by these ligands and were resistant to subsequent challenge with immunogenic peptides Smith et al (45) found that a nonmitogenic anti-CD3 mAb similarly induced a less phosphorylated phospho- ζ isoform than the one found in cells treated with mitogenic anti-CD3 and was also unable to induce substantial ZAP70 activation. By analogy with our studies in mast cells, it is likely that ZAP70 activation may have been impaired in all these studies due to the formation of stable complexes between incompletely phosphorylated ζ subunits and Src family members that block the ZAP70- ζ interaction

Acknowledgments

We thank Dr Israel Pecht (Department of Chemical Immunology, Weizmann Institute of Science), for generous access to mAbs generated in his laboratory and Claudia Garay for excellent technical assistance.

References

- Oliver, J. M., J. R. Pfeiffer, and B. S. Wilson. 1997. Regulation and roles of the membrane, cytoskeletal and adhesive responses of RBL-2H3 rat tumor mast cells to Fc ϵ R1 crosslinking. In *IgE Receptor (Fc ϵ R1) Function in Mast Cells and Basophils* M. M. Hamawy, ed. R. G. Landes Co., Austin, p. 139.
- Eiseman, E., and J. B. Bolon. 1992. Engagement of the high affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. *Nature* 355:78.
- Oliver, J. M., D. L. Burg, B. S. Wilson, J. McLaughlin, and R. L. Geahlen. 1994. Inhibition of mast cell Fc ϵ R1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol. *J. Biol. Chem.* 269:29697.
- Hutchcroft, J. E., R. L. Geahlen, G. G. Deanin, and J. M. Oliver. 1992. Fc ϵ R1-mediated tyrosine phosphorylation and activation of the 72-kDa protein-tyrosine kinase, PTK2 in RBL-2H3 rat tumor mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9107.
- Park, D. J., H. K. Min, and S. G. Rhee. 1991. IgE-induced tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1 in rat basophilic leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 266:24237.
- Margolis, B., P. Hu, S. Katsav, W. Li, J. M. Oliver, A. Ulrich, and J. Schlessinger. 1991. Tyrosine phosphorylation of the *vav* protooncogene product, a potential transcriptional regulator with SH2 and SH3 domains. *Nature* 356:71.
- Li, W., G. G. Deanin, B. Margolis, J. Schlessinger, and J. M. Oliver. 1992. Fc ϵ R1-mediated tyrosine phosphorylation of multiple proteins, including phospholipase C- γ 1 and the receptor β 2 complex, in RBL-2H3 rat basophilic leukemia cells. *Mol. Cell Biol.* 12:3176.
- Barker, S. A., K. K. Caldwell, A. Hall, A. M. Martinez, J. R. Pfeiffer, J. M. Oliver, and B. S. Wilson. 1995. Wortmannin blocks lipid and protein kinase activities associated with PI 3-kinase and inhibits a subset of responses induced by Fc ϵ R1 cross-linking. *Mol. Biol. Cell* 6:1145.
- Barker, S. A., K. K. Caldwell, J. R. Pfeiffer, and B. S. Wilson. 1998. Wortmannin-sensitive phosphorylation, translocation and activation of PLC γ 2, but not PLC γ 1, in antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells. *Mol. Biol. Cell* 9:483.
- Yamashita, T., S.-Y. Mao, and H. Metzger. 1994. Aggregation of the high affinity IgE receptor and enhanced activity of p53/56^{lck} protein-tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11251.
- Jouvin, M., M. Adamczewski, R. Nemerof, O. Lctourneur, A. Valle, and J.-P. Kinet. 1994. Differential control of the tyrosine kinases *lyn* and *syk* by the two signaling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor. *J. Biol. Chem.* 269:5918.
- Vonakis, B. M., H. Chen, H. Halceem-Smith, and H. Metzger. 1997. The unique domain as a site on Lyn kinase for its constitutive association with the high affinity receptor for IgE. *J. Biol. Chem.* 272:24072.
- Cambier, J. C. 1995. Antigen and Fc receptor signaling. *J. Immunol.* 155:3281.
- Pribluda, V. S., C. Pribluda, and H. Metzger. 1997. Biochemical evidence that the phosphorylated tyrosines, serines and threonines on the aggregated high affinity receptor for IgE are in the immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *J. Biol. Chem.* 272:11185.
- Shiue, L., M. J. Zoller, and J. S. Brugge. 1995. Syk is activated by phosphotyrosine-containing peptides representing the tyrosine-based activation motifs of the high affinity receptor for IgE. *J. Biol. Chem.* 270:10498.
- Kimura, K., H. Sakamoto, E. Appella, and R. P. Siraganian. 1997. The negative signaling molecule SH2 domain-containing inositol-polyphosphate 5-phosphatase (SHIP) binds to the tyrosine phosphorylated β subunit of the high affinity IgE receptor. *J. Biol. Chem.* 272:13991.
- Rivera, J. 1977. Phosphorylation of serines and threonines in Fc ϵ R1-mediated responses in mast cells. In *IgE Receptor (Fc ϵ R1) Function in Mast Cells and Basophils* M. M. Hamawy, ed. R. G. Landes Co., Austin, p. 107.
- Ortega, E. 1995. How do multichain immune recognition receptors signal? A structural hypothesis. *Mol. Immunol.* 32:941.
- Wange, R. L., and L. E. Samelson. 1996. Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* 5:197.
- Ortega, E., R. Schweitzer-Stenner, and I. Pecht. 1988. Possible orientational constraints determine secretory signals induced by aggregation of IgE receptors on mast cells. *EMBO J.* 7:4101.
- Metzger, H., G. Alcaez, R. Hohman, J.-P. Kinet, V. Pribluda, and R. Quarto. 1986. The receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Annu. Rev. Immunol.* 4:419.
- Pecht, I., E. Ortega, and I. M. Jovin. 1991. Rotational dynamics of the Fc ϵ R receptor on mast cells monitored by specific monoclonal antibodies and IgE. *Biochemistry* 30:3450.
- Schweitzer-Stenner, R., E. Ortega, and I. Pecht. 1994. Kinetics of Fc ϵ R1 dimer formation by specific monoclonal antibodies on mast cells. *Biochemistry* 33:8813.
- Kamps, M. P., and B. M. Sefton. 1988. Identification of multiple novel polypeptide substrates of the *v-src*, *v-yes*, *v-fps*, *v-ros* and *v-erb-B* oncogenic tyrosine kinases utilizing antisera against phosphotyrosine. *Oncogene* 2:305.
- Liu, F. T., J. W. Bohn, E. L. Ferry, H. Yamamoto, C. A. Molinaro, L. A. Sherman, N. R. Klinman, and D. H. Katz. 1980. Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody: preparation, isolation and characterization. *J. Immunol.* 124:2728.
- Wilson, B. S., N. Kapp, R. J. Lee, J. R. Pfeiffer, A. M. Martinez, Y. Platt, J. F. Letourneur, and J. M. Oliver. 1995. Distinct functions of the Fc ϵ R1 γ and β subunits in the control of Fc ϵ R1-mediated tyrosine kinase activation and signaling responses in RBL-2H3 mast cells. *J. Biol. Chem.* 270:4013.
- Seagrave, J. C., J. R. Pfeiffer, C. Wofsy, and J. M. Oliver. 1991. Relationship of IgE receptor topography to secretion in RBL-2H3 mast cells. *J. Cell Physiol.* 148:139.
- Rivera, J., J.-P. Kinet, J. Kim, C. Pucillo, and H. Metzger. 1988. Studies with a monoclonal antibody to the β subunit of the receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Mol. Immunol.* 25:647.
- Becker, E. L. 1972. The relationship of the chemotactic behavior of the complement-derived factors C3A, C5A and C567 and a bacterial chemotactic factor to their ability to activate the proesterase of rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 135:376.
- Challis, R. A., I. Y. Batty, and S. R. Nahorski. 1988. Mass measurements of inositol(1, 4, 5)trisphosphate in rat cerebral cortex slices using a radioreceptor assay: effects of neurotransmitters and depolarization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157:684.
- Deanin, G. G., A. M. Martinez, J. R. Pfeiffer, M. E. Gardner, and J. M. Oliver. 1991. Tyrosine kinase-dependent phosphatidylinositol turnover and functional responses in the Fc ϵ R1 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179:551.
- Lee, R. J., and J. M. Oliver. 1995. Roles for Ca²⁺ stores release and two Ca²⁺ influx pathways in the Fc ϵ R1-activated Ca²⁺ responses of RBL-2H3 mast cells. *Mol. Biol. Cell* 6:825.
- Pfeiffer, J. R., and J. M. Oliver. 1994. Tyrosine kinase-dependent assembly of actin plaques linking Fc ϵ R1 cross-linking to increased cell-substrate adhesion in RBL-2H3 tumor mast cells. *J. Immunol.* 152:270.
- Pfeiffer, J. R., J. C. Seagrave, B. H. Davis, and J. M. Oliver. 1985. Membrane and cytoskeletal changes associated with IgE-mediated serotonin release in rat basophilic leukemia cells. *J. Cell Biol.* 101:2145.
- Menon, A. K., D. Holowka, W. W. Webb, and B. Baird. 1986. Clustering, mobility and triggering activity of small oligomers of immunoglobulin E on rat basophilic leukemia cells. *J. Cell Biol.* 102:534.
- Thomas, J. L., D. Holowka, D. B. Baird, and W. W. Webb. 1994. Large scale co-aggregation of fluorescent lipid probes with cell surface proteins. *J. Cell Biol.* 125:795.
- Stauffer, T., and I. Meyer. 1997. Compartmentalized IgE receptor-mediated signal transduction in living cells. *J. Cell Biol.* 139:1447.
- Sanders, M. 1996. Analysis of spatial cluster processes: applications in cell biology. Doctoral dissertation. University of New Mexico, Albuquerque, NM.
- Torigoe, C., B. Goldstein, C. Wofsy, and H. Metzger. 1997. Shuttling of initiating kinase between discrete aggregates of the high affinity receptor for IgE regulates the cellular response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1372.
- Pribluda, V. S., C. Pribluda, and H. Metzger. 1994. Transphosphorylation as the mechanism by which the high-affinity receptor for IgE is phosphorylated upon aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11246.
- Paolini, R., S. Serra, and J.-P. Kinet. 1996. Persistence of tyrosine phosphorylated Fc ϵ R1 in deactivated cells. *J. Biol. Chem.* 271:15987.
- Lin, S., C. Cicala, A. M. Scharenberg, and J.-P. Kinet. 1996. The Fc ϵ R1 β subunit functions as an amplifier of Fc ϵ R1 γ -mediated cell activation signals. *Cell* 85:985.
- Sloan-Lancaster, J., A. S. Shaw, J. B. Rothbard, and P. M. Allen. 1994. Partial T cell signaling: altered phospho- ζ and lack of Zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* 79:913.
- Madrenas, Y., R. L. Wange, J. L. Wang, N. Isakov, I. E. Samelson, and R. N. Germain. 1995. ζ phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* 267:515.
- Smith, J. A., J. Y. Tso, M. R. Clark, M. S. Cole, and J. A. Bluestone. 1997. Nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibodies deliver a partial T cell receptor signal and induce clonal anergy. *J. Exp. Med.* 185:1413.

Overcoming the Signaling Defect of Lyn-Sequestering, Signal-Curtailing FcεRI Dimers: Aggregated Dimers Can Dissociate from Lyn and Form Signaling Complexes with Syk¹

Martha Lara,* Enrique Ortega,^{2*} Israel Pecht[†], Janet R. Pfeiffer,[‡] A. Marina Martinez,[‡] Rebecca J. Lee,[‡] Zurab Surviladze,[‡] Bridget S. Wilson,[‡] and Janet M. Oliver[‡]

Clustering the tetrameric ($\alpha\beta\gamma_2$) IgE receptor, FcεRI, on basophils and mast cells activates the Src-family tyrosine kinase, Lyn, which phosphorylates FcεRI β and γ subunit tyrosines, creating binding sites for the recruitment and activation of Syk. We reported previously that FcεRI dimers formed by a particular anti-FcεRI α mAb (H10) initiate signaling through Lyn activation and FcεRI subunit phosphorylation, but cause only modest activation of Syk and little Ca^{2+} mobilization and secretion. Curtailed signaling was linked to the formation of unusual, detergent-resistant complexes between Lyn and phosphorylated receptor subunits. Here, we show that H10-FcεRI multimers, induced by adding F(ab')₂ of goat anti-mouse IgG to H10-treated cells, support strong Ca^{2+} mobilization and secretion. Accompanying the recovery of signaling, H10-FcεRI multimers do not form stable complexes with Lyn and do support the phosphorylation of Syk and phospholipase C γ 2. Immunogold electron microscopy showed that H10-FcεRI dimers colocalize preferentially with Lyn and are rarely within the osmiophilic "signaling domains" that accumulate FcεRI and Syk in Ag-treated cells. In contrast, H10-FcεRI multimers frequently colocalize with Syk within osmiophilic patches. In sucrose gradient centrifugation analyses of detergent-extracted cells, H10-treated cells show a more complete redistribution of FcεRI β from heavy (detergent-soluble) to light (Lyn-enriched, detergent-resistant) fractions than cells activated with FcεRI multimers. We hypothesize that restraints imposed by the particular orientation of H10-FcεRI dimers traps them in signal-initiating Lyn microdomains, and that converting the dimers to multimers permits receptors to dissociate from Lyn and redistribute to separate membrane domains that support Syk-dependent signal propagation. *The Journal of Immunology*, 2001, 167: 4329–4337.

In basophils and mast cells, clustering the type I receptor for IgE, FcεRI, activates a signaling sequence that leads within minutes to degranulation and membrane/cytoskeletal responses, including actin polymerization, ruffling, spreading, integrin activation, and actin plaque assembly, and leads within hours to increased cytokine synthesis (reviewed in Ref. 1).

Previous studies with the rat mucosal-type mast cell line RBL-2H3 have established the probable sequence of early events by which cross-linking this tetrameric ($\alpha\beta\gamma_2$) immunoreceptor leads to cell activation. RBL-2H3 cells contain two FcεRI-associated protein-tyrosine kinases, the Src-related enzyme, Lyn (2), whose principal substrates are the receptor's β and γ subunits (3, 4), and the 72-kDa protein-tyrosine kinase, Syk (5), which phosphorylates a wide range of downstream signaling molecules including phos-

pholipase C γ (PLC γ)³ isoforms, the p85 subunit of phosphatidylinositol 3 (PI 3)-kinase, p95^{src}, Grb2, Cbl, linker for activation of T cells, Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa, and others (reviewed in Refs. 1 and 6). Biochemical and morphological studies showed that a portion of the Lyn in resting RBL-2H3 cells associates with the FcεRI β subunit (7, 8). FcεRI cross-linking permits Lyn to phosphorylate tyrosines located within immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) in the β and γ subunits of adjacent receptors (9). The doubly phosphorylated FcεRI γ ITAMs serve as binding sites for the tandem Src homology 2 domains of Syk, resulting in its autophosphorylation and activation (10). A similar sequential activation of FcεRI-associated kinases and downstream signaling molecules has been observed in mouse bone marrow-derived mast cells (11) and in human blood basophils (12). A very similar biochemical cascade of successive Src and Syk kinase activation leading to downstream responses is also initiated by ligating other immunoreceptors, including the TCR, the B cell receptor, and several members of the Fc γ R family (reviewed in Ref. 13).

Recent studies have emphasized the importance of membrane topography in FcεRI signaling. From sucrose gradient centrifugation studies, Field et al. (14–16) suggested that clustered FcεRI may encounter Lyn in detergent-resistant microdomains that are also enriched for the glycerophosphatidylinositol-linked protein Thy-1, glycosphingolipids, gangliosides, and cholesterol. Stauffer and Meyer (17) used fluorescence microscopy to suggest that Syk also associates with aggregated FcεRI in ganglioside-enriched

*Departamento de Immunología, Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México; [†]Department of Chemical Immunology, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel; and [‡]Department of Pathology and Cancer Center, University of New Mexico School of Medicine, Albuquerque, NM 87131

Received for publication January 17, 2001. Accepted for publication August 21, 2001.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported in part by National Institutes of Health Grants RO3 TW00440, RO1 GM49814, and P50 HL56384, by American Cancer Society Grant RPG992330CIM, by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 31783N and by Universidad Nacional Autónoma de México Grant IN208399.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Enrique Ortega, Departamento de Immunología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap Postal 70228, Cd. Universitaria CP 04510 México DF, México. E-mail address: ortoso@servidor.unam.mx

³ Abbreviations used in this paper: PLC γ , phospholipase C γ ; PI 3, phosphatidylinositol 3; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; GaM, F(ab')₂ of goat anti-mouse IgG; anti-PY, anti-phosphotyrosine; Ab, DRM, detergent-resistant membrane.

membrane patches Wilson et al (8) used immunogold electron microscopy on native membrane sheets obtained from RBL-2H3 cells to show that FcεRI interacts with Lyn and Syk in topographically distinct microdomains. In unstimulated cells, FcεRI and Lyn are loosely colocalized in small, dispersed membrane clusters that are rarely adjacent to coated pits. FcεRI cross-linking with multivalent Ag induces a separation of receptor from Lyn, apparently by Lyn segregation to the periphery of larger receptor clusters. These Lyn-excluding clusters characteristically form on membrane patches that stain intensely with osmium and are very often found adjacent to coated pits. Syk shows no association with FcεRI in resting cells but is dramatically recruited to the FcεRI aggregates that form on osmiophilic membrane patches in Ag-stimulated cells. The presence of Syk and other signaling molecules (PLCγ2, PI 3-kinase, Gab2, and others; Refs 8 and 18) identifies the osmiophilic membrane patches as likely sites of active signaling to downstream responses.

Previously, we have explored the signaling properties of a series of anti-FcεRI mAbs that compete with each other and with IgE for binding sites on the α subunit of the FcεRI expressed on RBL-2H3 cells. Comparison of the secretory dose-response curves with the extent of FcεRI dimerization demonstrated that anti-FcεRI mAb H10-receptor dimers elicit substantially less secretion than dimers induced by several other anti-FcεRI mAbs (19). mAb H10-receptor dimers also induce very little inositol 1,4,5-trisphosphate synthesis, Ca²⁺ mobilization, spreading, ruffling, and actin plaque assembly in comparison with dimers generated with the other anti-FcεRI mAbs and with multivalent Ag (20).

Studies of the FcεRI-associated kinases showed that although H10-receptor dimers activate Lyn and support FcεRI β and γ subunit phosphorylation, they are poor Syk activators in comparison with Ag and the other anti-FcεRI mAbs (20). The apparent curtailment of signaling downstream of β and γ subunit phosphorylation in mAb H10-treated cells was linked to the formation of unusual detergent-resistant complexes between activated Lyn and receptor subunits. We hypothesized from these studies that the signal curtailment properties of H10-receptor dimers may result from the failure of Lyn dissociation from receptor subunits, a previously unrecognized regulatory step in the FcεRI signaling cascade needed for Syk activation and signal progression.

Here we show that H10-FcεRI multimers generated by adding F(ab')₂ of goat anti-mouse IgG (GaM) to cross-link the H10-FcεRI dimers are able to elicit near-normal signaling responses. The multimers more effectively support the dissociation of Lyn from phosphorylated FcεRI subunits, the phosphorylation and activation of Syk, and the progression of the signaling cascade to PLCγ2 phosphorylation and Ca²⁺ mobilization and secretion. Immunogold electron microscopy of membrane sheets prepared from RBL-2H3 cells treated with mAb H10 dimers and multimers suggests that H10-receptor dimers become trapped in signal-initiating Lyn microdomains, and that added GaM restores signaling by enabling the redistribution of H10-multimers to separate membrane microdomains that accumulate the signal-propagating kinase, Syk.

Materials and Methods

Reagents

The mAb H10 has been previously described (19). The purification of monoclonal mouse anti-DNP IgE from ascites and the preparation of rabbit anti-mouse IgE was also done as previously described (21–23). Mouse mAb JRK against the FcεRI β subunit was a gift from Dr. J. Rivcra (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Sheep polyclonal Ab against the FcεRI γ subunit was a gift from Dr. J.-P. Kinet (Harvard Medical School Boston, MA), and polyclonal rabbit anti-Syk Ab was a gift from Dr. P. Draber (Institute of Cell Biology Prague, the Czech Republic). Mouse anti-phosphotyrosine mAb PY20 (anti-PY) and PY20-HRP were obtained

from Transduction Laboratories (Lexington, KY); rabbit polyclonal anti-Lyn, anti-Syk, and anti-PLCγ2 Abs were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); and HRP-conjugated secondary Ab and GaM were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). DNP₂₄-BSA (DNP-BSA) was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR), and colloidal gold particles (3–10 nm in diameter) conjugated to anti-rabbit IgG and anti-mouse IgG were obtained from Nanoprobe (Stony Brook, NY) and Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ).

Cell activation

Conditions for RBL-2H3 cell culture were previously described (23). For stimulation, cell suspensions or monolayers were usually washed three times with modified Hanks' buffer (24) containing 0.1% BSA and activated for 5 min at 37°C by the addition of 0.1 or 1.0 μg/ml of DNP-BSA (Ag XL), 7 nM H10 (H10, H10-D), or 7 nM H10 plus 10 nM GaM (H-10M), all in Hanks'-BSA buffer. The Ag-treated cells, but not the H10-treated cells, were previously incubated overnight with 1 μg/ml of anti-DNP-IgE.

Secretion

Release of the granule enzyme β-hexosaminidase was measured as previously described (19). All measurements were done in triplicate. To calculate the percentage of total enzyme released under every experimental condition, total cell β-hexosaminidase content was measured by Triton X-100 lysis of an equivalent number of unstimulated cells.

Ca²⁺ mobilization

Untreated or IgE-primed RBL-2H3 cells were placed on coverslips in a stage microincubator (TC202A, Harvard Apparatus, Holliston, MA) and loaded for 30 min with 2 μM fura 2-AM (Molecular Probes) at room temperature under 5% CO₂. After loading, extracellular dye was removed by solution exchange with Hanks'-BSA, and the temperature was increased to 37°C. Experiments were done on a Zeiss IM35 inverted microscope equipped with a 200 W Hg/xenon combination lamp and computer-controlled filter wheels and shutters that allow excitation light to pass alternately through 10 nm bandpass filters centered at 350 and 385 nm (Zeiss, Oberkochen, Germany). Emitted fluorescence was collected at >510 nm using an intensified Sony CCD camera (Sony, Tokyo, Japan) interfaced to a Compix image analysis system (Compix, Cranberry Township, PA). After acquisition of baseline fluorescence for ~2 min, stimuli were added by pipette to give final concentrations of (approximately) 7 nM H10, 7 nM H10 plus 10 nM GaM, and 0.1 μg/ml DNP-BSA, and fluorescence emissions were measured for an additional 6–8 min. Data were corrected for background, and average ratio values for each cell in a field were calculated for user-defined areas within each cell as previously described (25, 26). Average ratio values were converted to intracellular Ca²⁺ concentration on the basis of calibration solutions containing maximal and minimal Ca²⁺ levels. Each experiment provided time-resolved analysis of Ca²⁺ levels for between 10 and 40 individual cells. The extent of the increase in intracellular Ca²⁺ concentration was determined using the Prism "area under the curve" analysis. A 240-s integral was calculated for each cell beginning at its initial response. Appropriate baselines for each cell were determined and subtracted from the calculated areas. Results reported are averages of the stimulated Ca²⁺ responses for the indicated number of individual cells.

Immune complex kinase assays

Cell culture dishes (6 × 10⁶ cells/100-mm dish) were activated as described above and then lysed in 1 ml ice-cold 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Brij-96, and 1 μg/ml each of leupeptin, antipain, PMSF, and NaVO₄. Protein concentration in the lysis supernatants was determined by the DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA) following the manufacturer's instructions. Lysates were cleared of any protein A/G-reactive proteins by incubation for 1 h at 4°C twice with protein A/G-Sepharose beads. Precleared cell lysates were incubated for 1 h at 4°C with specific Ab prebound to protein A/G-Sepharose beads. After washing six times, kinase activity was determined from the incorporation of ³²P into specific proteins during a 10-min incubation at 37°C with 5 μCi of [γ-³²P]ATP as described in Ref. 23.

Immunoblotting

Cells were activated, lysed, and precleared, and target proteins were immunoprecipitated with specific Abs as described above for immune complex kinase assays. Ab-protein complexes were released from the washed beads by boiling in Laemmli sample buffer, separated by 10% SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose. The membranes were blocked overnight by incubation with 1% BSA plus 3% milk for anti-PY blots or with 5%

milk for blotting with other Abs. After blocking, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with the blotting Ab washed, incubated with HRP-conjugated secondary Ab for 1 h at room temperature, and washed again. The membranes were developed by 5-min incubation with SuperSignal substrate (Pierce, Rockford, IL) and exposed to Biomax film (Eastman Kodak, Rochester, NY).

Densitometry

Digitized images of the autoradiograms (from *in vitro* kinase assays) or from the photographic films used to capture chemiluminescent signals from the immunoblots were obtained with the Gel-Doc 2000 System (Bio-Rad) and analyzed with the Bio-Rad Quantity One software. In most cases, signal intensities were normalized to the intensity measured in the H10-D treatment samples.

Immunoelectron microscopy

RBL-2H3 cells were allowed to settle overnight onto 15-mm round, clean glass coverslips. FcεRI were cross-linked by incubation for 5 min with mAb H10 with and without goat anti-mouse IgG as described above. Alternatively, cells were primed with anti-DNP IgE and activated for 2 min with DNP-BSA (0.1–1 μg/ml). Plasma membrane sheets were prepared by a modification of the method of Sanan and Anderson (27) as previously described (8). Briefly, cell monolayers on coverslips were rapidly chilled by immersion in ice-cold HEPES buffer (25 mM HEPES (pH 7), 25 mM KCl, and 2.5 mM magnesium acetate) and were then inverted onto formvar and carbon-coated nickel electron microscopy grids that, on the day of the experiment, had been glow-discharged and floated on (poly)l-lysine (0.8 mg/ml for 30 min), followed by 10 s rinsing in distilled water and air-drying. Excess liquid was removed by blotting, and pressure was applied for 20 s by bearing down with a cork. The coverslips were lifted, leaving sections of the upper cell surface adherent to the (poly)l-lysine-coated grid. Membranes were rinsed in 4°C HEPES buffer, fixed in 2% paraformaldehyde for 7 min, and receptor subunits and kinases were labeled by sequential incubation with primary Abs and gold-conjugated secondary reagents,

with intermediate washes by inverting the grids onto droplets. Primary Abs were diluted in PBS and 0.1% BSA at the following concentrations: FcεRI β 28 μg/ml; Lyn 2 μg/ml; and Syk 10 μg/ml. Gold-conjugated secondary reagents were diluted 1/20 from commercial stocks in PBS-BSA. The samples were postfixed in 2% glutaraldehyde in PBS and processed for TEM analysis using a Hitachi 600 transmission electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan).

Detergent extraction, sucrose gradient centrifugation, and analysis of membrane fractions

IgE-primed RBL-2H3 cells (40×10^6 cells/treatment condition) were harvested from culture dishes with 1.5 mM EDTA in Hanks'-buffered saline without divalent cations. Washed cells were resuspended in Hanks'-buffered saline and incubated for 5 min at 37°C with no addition or with 1 μg/ml DNP-BSA (XL), 7 nM H10 (H10-D), or 7 nM H10 plus 10 nM GaM (H10-M). Cells were collected by centrifugation at 4°C, cell pellets were resuspended in 750 μl ice-cold lysis buffer containing low concentrations of detergent (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.05% Triton X-100, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM glycerophosphate, 1 mM NaVO₄, and 1× protease inhibitor mixture from Roche Molecular Chemicals, Indianapolis, IN). Lysates were mixed with 750 μl 80% sucrose (prepared in 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 50 mM NaCl, and 2 mM EDTA) and overlaid onto 0.5 ml 80% sucrose in polyallomer tubes (13 × 51 mm), followed by 0.5-ml layers of 35, 25, and 20% and 0.6-ml aliquots of 15 and 10%. The gradient was centrifuged in a SW 55 rotor (Beckman Coulter, Fullerton, CA) at 200,000 × g for 16 h at 4°C. Fractions (0.5 ml) were harvested sequentially from the top of the gradient. For analyses of protein composition, aliquots (35 μl) were mixed with equal volume of 2× SDS sample buffer, boiled for 5 min, and separated by 8 or 10% SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose using a standard blotting system (Labconco, Kansas City, MO). Blots were probed with anti-Lyn and anti-FcεRI β Abs followed by HRP-conjugated secondary Abs. Detection by chemiluminescence was performed as described above.

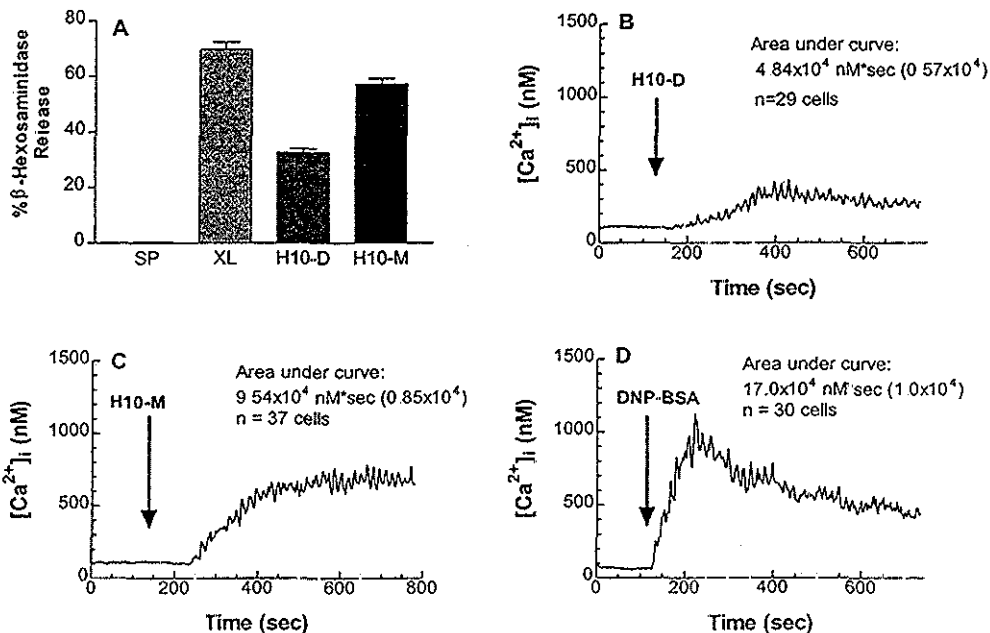


FIGURE 1. Signaling competence of H10-FcεRI dimers and multimers. **A**, RBL-2H3 cell monolayers on culture plates (3×10^7 cells in 10 ml Hanks'-BSA) were incubated for 30 min at 37°C with 1 μg/ml of DNP-BSA (XL) or with 7 nM H10 (H10-D), or 7 nM H10 plus 10 nM GaM (H10-M). Reactions were stopped with 10 ml ice-cold PBS, and β-hexosaminidase activity was measured in three replicate portions of the resulting supernatants as well as in replicate portions of lysates prepared from the corresponding cell monolayers. Results are given as percentage of total enzyme content (± SEM). The experiment is representative of multiple degranulation assays performed routinely in conjunction with the biochemical analyses. **B–D**, RBL-2H3 cell monolayers on glass coverslips were loaded with fura 2-AM and mounted in an environmental chamber on the stage of a microscope configured for ratio imaging microscopy (25). Baseline Ca²⁺ levels were measured for 2–3 min. Cells were then activated by the addition of ~7 nM mAb H10 (**B**), 7 nM H10 plus 10 nM GaM (**C**) or 0.1 μg/ml of DNP-BSA (**D**) directly to the incubation chamber, and measurement was continued for 6–8 min. Traces are the averaged Ca²⁺ mobilization responses for all cells in the experiment. The area under the curve (± SEM) is averaged from individual determinations for each cell as described in *Materials and Methods*. Numbers of cells per condition are indicated. Results are typical of three separate experiments.

Results

Different secretory activities of H10-FcεRI dimers and multimers

Due to its bivalency and its stoichiometry of binding to the FcεRI, intact mAb H10 can aggregate FcεRI only into dimers (H10-D) mAb H10 differs from some other FcεRI-specific IgG mAbs by inducing only low levels of mediator secretion (19, 20). To confirm previous evidence (19) that larger aggregates of H10-FcεRI complexes can induce more robust FcεRI-mediated secretion, we incubated RBL-2H3 cells with intact mAb H10 plus GaM to generate H10-FcεRI multimers (H10-M). The secretion of β-hexosaminidase from RBL-2H3 cells stimulated with Ag, H10-D, and H10-M is shown in Fig 1A. Approximately 1% of total β-hexosaminidase was released spontaneously. H10-FcεRI dimers stimulated the release of ~32% of total enzyme. mAb H10 alone did not induce more secretion at any of a range of concentrations tested (0–100 nM, data not shown; see also Ref 19). In contrast, H10-FcεRI multimers induced the release of ~60% of total β-hexosaminidase, twice the release induced by dimers and similar to the 70% release induced by IgE plus Ag. Similar results were observed in multiple independent experiments during the course of the studies reported here.

Different Ca²⁺ mobilization induced by H10-FcεRI dimers and multimers

FcεRI cross-linking by multivalent Ag and by signaling-competent anti-FcεRI mAbs induces the release of cytoplasmic stored Ca²⁺ and the influx of extracellular Ca²⁺ (20). Because the mobilization of Ca²⁺ is essential for secretion, we predicted that H10-FcεRI multimers might be more effective than H10-FcεRI dimers at inducing Ca²⁺ responses. This is confirmed in the averaged Ca²⁺ responses from groups of ~30 cells, illustrated in Fig 1, B–D. H10-FcεRI dimers induce a small sustained increase in cytoplasmic Ca²⁺ levels (Fig 1B). Additionally, the traces from individual cells published in Ref 20 revealed that H10-FcεRI dimers induce repetitive Ca²⁺ spikes that are obscured by averaging the responses for a field of cells. H10-FcεRI multimers (Fig 1C) induced a much larger and more sustained Ca²⁺ response in RBL-2H3 cells than the H10-FcεRI dimers. Multivalent Ag consistently induced the largest Ca²⁺ responses (Fig 1D).

Effects of H10-FcεRI dimers and H10-FcεRI multimers on the phosphorylation of Lyn, Syk and PLCγ2

Previous *in vitro* kinase assays indicated that H10-FcεRI dimers activate Lyn but are poor activators of Syk (20). In Fig 2, anti-PY immune complexes prepared from resting and activated cells were incubated with [γ -³²P]ATP, and the incorporation of radiolabel into Lyn and Syk was determined by SDS-PAGE and autoradiography. Predictably, IgE plus Ag increased the intensity of *in vitro* phosphorylated Lyn and Syk in these assays. Fig 2A (and the accompanying densitometry in the legend to Fig 2A) shows that Lyn phosphorylation measured by the *in vitro* kinase assay is similarly increased over resting levels whether cells are stimulated with H10-FcεRI dimers or with H10-FcεRI multimers. In contrast, Fig 2B (and its accompanying densitometry) shows that Syk phosphorylation measured in the same *in vitro* kinase assay is increased substantially more in cells stimulated with H10-FcεRI multimers than with H10-FcεRI dimers.

The differential phosphorylation of Lyn and Syk by H10-FcεRI dimers and multimers was also demonstrated in intact cells. In Fig 3, A and B, anti-PY immune complexes from resting and activated cells were separated by SDS-PAGE, followed by anti-kinase blotting. Fig 3A (and the accompanying densitometry in the legend) shows that H10-FcεRI dimers (H10-D), H10-FcεRI mul-

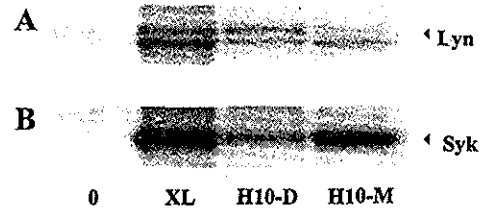


FIGURE 2. Effect of H10-FcεRI dimers and multimers on Lyn and Syk *in vitro* phosphorylation. RBL-2H3 cells were incubated with no addition (0), and with 1 μg/ml of DNP-BSA (XL), 7 nM H10 (H10-D), and 7 nM H10 plus 10 nM GaM (H10-M) for 5 min at 37°C. Cells were lysed, the lysates precleared, and PY-20-reactive proteins were immunoprecipitated from equivalent protein amounts of precleared lysates by incubation with mAb PY-20 bound to protein A/G-Sepharose beads. Immune complexes were incubated for 10 min at 37°C with [γ -³²P]ATP, and the resulting phosphoproteins were resolved by SDS-PAGE and detected by autoradiography. Results show the Lyn (A) and Syk (B) bands, respectively, from one of four similar *in vitro* kinase assays. Relative signal intensities obtained by densitometric analysis of these autoradiograms were, for Lyn: XL, 2.5; H10-D, 1.0; and H10-M, 0.98; and for Syk: XL, 2.9; H10-D, 1.0; and H10-M, 1.98. Signal intensities in the control lanes (0) were below the limits of detection.

timers (H10-M), and IgE plus Ag (XL) all induce strong Lyn tyrosine phosphorylation *in vivo*. Fig 3B (and its densitometry) shows that there is no detectable phosphorylated Syk in resting cells and very little phosphorylated Syk in cells activated with H10-FcεRI dimers. H10-FcεRI multimers induce a substantial increase in phospho-Syk in comparison with H10-FcεRI dimers. In this experiment, phosphorylated Syk is dramatically present in cells stimulated with IgE plus Ag.

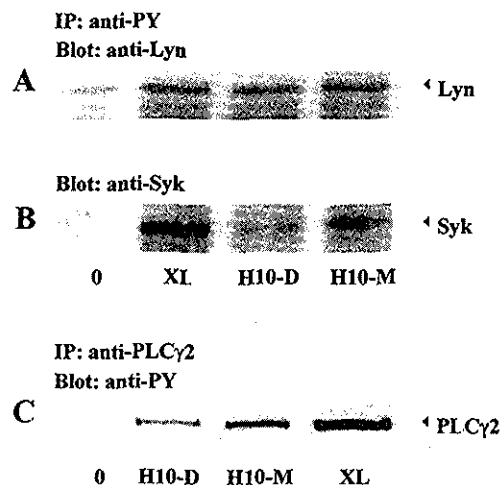


FIGURE 3. Effect of H10-FcεRI dimers and multimers on the *in vivo* phosphorylation of Lyn, Syk, and PLCγ2. RBL-2H3 cells were incubated with no addition and with XL, H10-D, and H10-M as in Fig 2. Proteins were immunoprecipitated from equivalent amounts of protein from each of the precleared lysates by incubation with mAb PY-20 (A and B) or anti-PLCγ2 (C) conjugated to protein A/G-Sepharose beads. Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and detected on the blots using anti-Lyn (A), anti-Syk (B), and anti-PY (C). Abs followed by HRP-anti-rabbit IgG. Blots were developed with an ECL reagent. Relative signal intensities obtained by densitometric analysis of this autoradiogram were, for Lyn: 0, 0.54; XL, 2.10; H10-D, 2.04; and H10-M, 2.17; and for Syk: 0, 0; XL, 4.33; H10-D, 1.0; and H10-M, 2.24. For PLCγ2, relative intensities were, for 0, 0; XL, 3.17; H10-D, 1.0; and H10-M, 1.78. Similar results were obtained twice.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Tyrosine phosphorylation of PLC γ 2, the most abundant PLC γ isoform in RBL-2H3 cells, is an important downstream consequence of Syk activation (28). In Fig. 3C, PLC γ 2 was immunoprecipitated from variously activated cells, and its phosphorylation state was examined by anti-PY blotting. There was no detectable phosphorylation of PLC γ 2 in resting cells. H10 dimers induced a small phosphorylation of PLC γ 2, whereas both H10-Fc ϵ RI multimers and IgE plus Ag induced strong PLC γ 2 phosphorylation. Thus, H10 multimers not only activate Syk, but also permit efficient activation of downstream effectors in the Fc ϵ RI signaling cascade.

H10-Fc ϵ RI dimers, but not H10-Fc ϵ RI multimers, form stable complexes with Lyn

Previously, we suggested that the poor signaling activity of H10-Fc ϵ RI dimers may be related to the formation of stable complexes between Lyn and phosphorylated Fc ϵ RI β and γ subunits that impair signal propagation (20). The results in Figs. 4 and 5 show the effect of converting dimers to multimers on these unusual detergent-resistant Fc ϵ RI-Lyn complexes.

In Fig. 4, variously stimulated RBL-2H3 cells were lysed, and anti-Lyn immune complex kinase assays were performed. Anti-Lyn immunoprecipitates from cells stimulated with IgE and Ag (XL), H10 alone (H10-D), and H10 plus GaM (H10-M) all contain Lyn that is readily autophosphorylated in immune complex kinase assays. Anti-Lyn immunoprecipitates from cells stimulated with H10-Fc ϵ RI dimers also contain substantial amounts of coprecipitated Fc ϵ RI β subunit that is available for phosphorylation *in vitro*. In contrast, there is essentially no coprecipitated β subunit available for phosphorylation *in vitro* in anti-Lyn immunoprecipitates from resting, H10-M and Ag-stimulated cells.

To obtain an independent assessment of the association of the Fc ϵ RI β and γ subunits with Lyn, we used Western blotting to

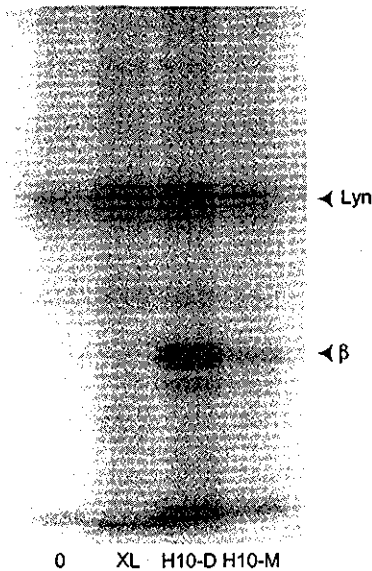


FIGURE 4. Stronger association of Fc ϵ RI β -chains with Lyn in H10-Fc ϵ RI dimers, but not multimers, revealed by immune complex kinase activities. RBL-2H3 cells were activated as in Fig. 2. The supernatants were precleared by incubation with protein A/G-Sepharose beads. Proteins were then immunoprecipitated from equivalent amounts of total protein from each lysate using anti-Lyn Abs coupled to protein A/G-Sepharose beads, and the immunoprecipitates were incubated with [γ - 32 P]ATP before SDS-PAGE and autoradiography. The β :Lyn ratios, calculated from the densitometric signals of the corresponding bands in the H10-D and H10-M lanes, were respectively >2:1 and 0.5:1. Results are from one of three independent experiments with similar results.

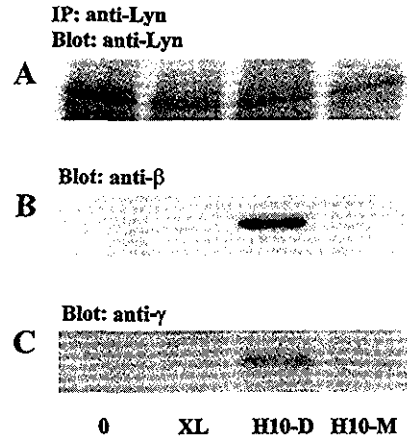


FIGURE 5. Association of Fc ϵ RI β with Lyn in H10-Fc ϵ RI dimers but not multimers revealed by immunoblotting. RBL-2H3 cells were activated as in Fig. 2 and then lysed, and Lyn and its associated proteins were immunoprecipitated from equivalent amounts of total protein from precleared lysates by incubation with anti-Lyn mAb. Proteins were separated on 12% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose for Western blotting using Abs to Lyn followed by anti-rabbit IgG-HRP (A) or to Fc ϵ RI β followed by anti-mouse-HRP (B). Blots were developed with an ECL reagent. Lyn is detected in all lanes (overloaded in the control sample, in similar amounts (XL, 0.9; H10-D, 1.0; and H10-M, 0.8) by densitometry of the three treatment samples). In this experiment, Fc ϵ RI β and γ subunits were detectable only in lysates prepared from H10-treated cells. In a separate experiment, the Fc ϵ RI β :Lyn ratios between treatments were, for 0, 0.08; XL, 0.29; H10-D, 1.0; and H10-M, 0.03.

probe for the presence of β and γ in anti-Lyn immunoprecipitates from variously activated cells (Fig. 5). The results in Fig. 5A show that anti-Lyn immunoprecipitates from differently activated cells all contain Lyn. Fig. 5B shows that Fc ϵ RI β and γ subunits are present in anti-Lyn immunoprecipitates from cells stimulated with mAb H10 alone, but are essentially undetectable in anti-Lyn immunoprecipitates from resting cells or from cells stimulated with H10 plus GaM or with Ag.

Membrane topography of H10-Fc ϵ RI dimers and multimers and their associated kinases

The topography of H10-Fc ϵ RI dimers and multimers and of the Fc ϵ RI-associated tyrosine kinases Lyn and Syk was determined by immunogold labeling and transmission electron microscopic analysis of native membrane sheets prepared from the dorsal surface of RBL-2H3 cells.

The micrographs in Fig. 6 show the typical distributions of gold particles marking Fc ϵ RI and Lyn in variously treated cells. Replicating previous work (8), gold particles marking Fc ϵ RI and Lyn are frequently colocalized in unstimulated cells as singlets and small dispersed clusters on apparently unspecialized membrane regions (Fig. 6A). Treatment with IgE plus Ag causes a rapid redistribution of gold particles marking Fc ϵ RI β to osmiophilic membrane patches (Fig. 6B). Coated pits occur at the periphery of a high proportion of these osmiophilic patches. Lyn segregates from Fc ϵ RI β during this clustering and becomes concentrated in topographically separate membrane patches.

In the presence of mAb H10 alone, Fc ϵ RI clusters remain small and dispersed. Gold particles marking receptor are again frequently associated with Lyn. In fact, microscopy gives the impression that there is more colocalization of Fc ϵ RI β with Lyn in H10-treated cells than in resting cells (Fig. 6C). This changes when cells are stimulated with H10 plus GaM. Receptor clusters are still small in comparison to the aggregates seen in cells stimulated by IgE plus Ag (8), but we now

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

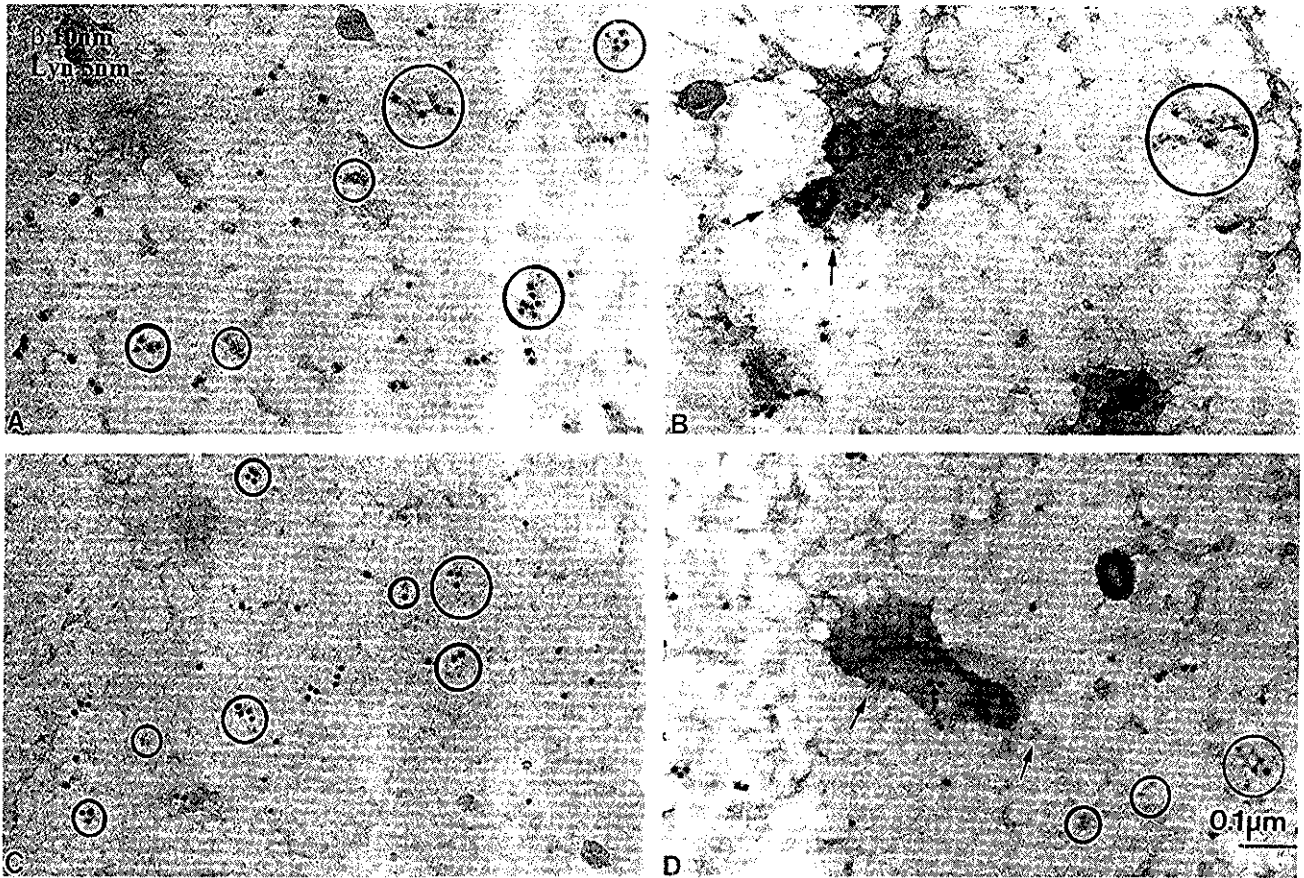


FIGURE 6. Membrane topography of H10-induced FcεRI dimers and multimers and of the FcεRI-activated kinase Lyn. Cell monolayers on glass coverslips were incubated at 37°C with no addition (A) or for 2 min with DNP-BSA (B), or for 5 min with H10-D (C) or H10-M (D). Membrane sheets were prepared from these cells and labeled from the inside with 10 nm protein A colloidal gold particles conjugated to anti-FcεRI β mAb and with 5 nm protein A gold particles conjugated to rabbit Abs to Lyn. Control samples (not shown) were incubated with unconjugated protein A gold particles. There was essentially no nonspecific labeling in these experiments. Representative clusters of receptor and Lyn, some mixed and some separate, on bulk membrane are circled. Arrows point to Lyn that appears to be specifically excluded from FcεRI β-containing osmiophilic membrane patches. Bar = 0.1 μm.

find receptor in the osmiophilic patches adjacent to coated pits. Whereas receptor clusters that remain outside of the osmiophilic patches often include Lyn, receptors that enter the patches are no longer associated with Lyn (Fig. 6D).

The micrographs in Fig. 7 replicate these labeling conditions, except that the smaller gold particles now reveal the distribution of Syk. In resting cells, receptor is again distributed as dispersed clusters. There are relatively few gold particles marking Syk on resting membranes and no Syk-FcεRI colocalization (Fig. 7A). As previously described (8), gold particles marking FcεRI and Syk are strongly colocalized in osmiophilic patches after treatment with IgE plus Ag (Fig. 7B).

Fig. 7C shows the typical appearance of FcεRI and Syk in mAb H10-treated cells. Receptor remains dispersed in small clusters. However, there is more membrane-associated Syk than in resting cells, and some of this Syk appears to colocalize with FcεRI on unspecialized membrane. The distribution changes when GaM is added to induce H10-FcεRI multimers (Fig. 7D). With the addition of GaM, gold particles marking FcεRI are observed mixed with Syk-gold particles in osmiophilic patches resembling those that form in Ag-stimulated cells.

The association of coated pits with a high proportion of osmiophilic patches provides a marker for locating these putative signaling domains. The impression that H10-FcεRI multimers redistribute to membrane signaling domains more often than H10-FcεRI dimers was confirmed by identifying coated pits on all the

micrographs from three separate experiments and counting the numbers of gold particles marking FcεRI β in the immediately adjacent membrane. Fig. 8, A and B, shows that >80% of coated pits from both unstimulated and H10-stimulated cells had no adjacent FcεRI β-gold particles. In contrast, <40% of coated pits from H10 plus GaM-stimulated cells and <30% of gold particles from Ag-stimulated cells had no adjacent FcεRI β-gold particles (Fig. 8, C and D). The size of FcεRI β-gold aggregates associated with pits was also different between resting and H10-activated cells and cells stimulated with H10 plus GaM or Ag. Thus, 2 gold particles was the largest gold cluster seen adjacent to coated pits in resting cells, and 3–5 FcεRI β-gold particles adjacent to coated pits was the largest cluster seen in cells stimulated with H10-FcεRI dimers. In contrast, clusters of >6 FcεRI β-gold particles adjacent to coated pits were frequently seen in cells stimulated with H10-FcεRI multimers (Fig. 8C) and multivalent Ag commonly induced clusters of 11–25 gold particles adjacent to coated pits (Fig. 8D).

Composition of isolated lipid "rafts" from cells activated by H10 dimers and multimers

The evidence that H10-FcεRI dimers may induce a more stable association of FcεRI β with Lyn than either IgE plus multivalent Ag or H10-FcεRI multimers was further investigated by analysis of the biochemical composition of membrane rafts isolated by detergent extraction and sucrose density gradient centrifugation analysis of variously activated cells. The results in Fig. 9A reproduce

TESIS CON
 PART A DE ORIENT

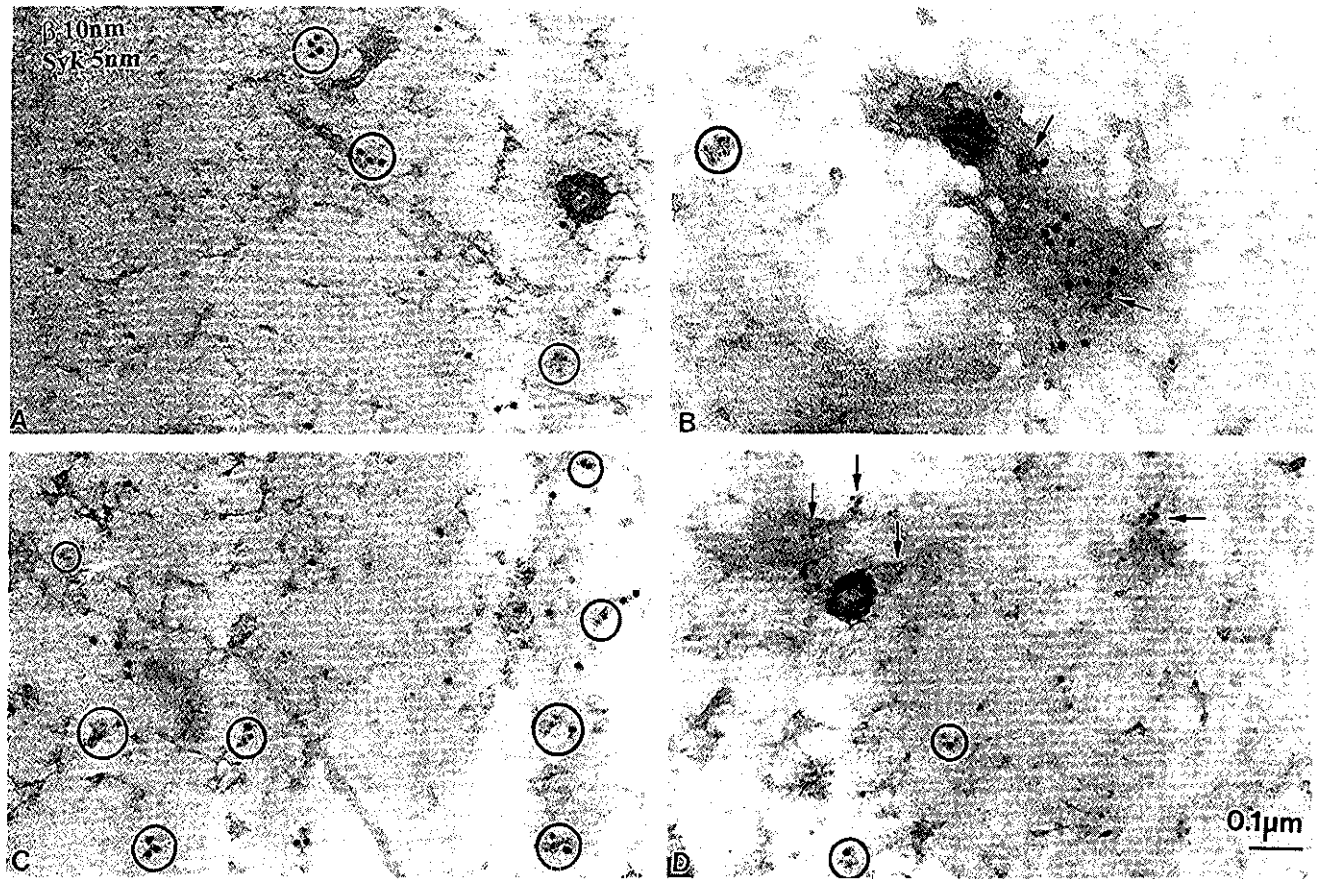


FIGURE 7. Membrane topography of H10-induced Fc ϵ RI dimers and multimers and of the Fc ϵ RI-activated kinase Syk. Cells were incubated at 37°C with no addition (A) or for 2 min with DNA-BSA (B) or for 5 min with H10-D (C) or H10-M (D). Membrane sheets prepared from these cells were labeled from the inside with 10 nm protein A-colloidal gold particles conjugated to anti-Fc ϵ RI β mAb and with 5 nm protein A gold particles conjugated to rabbit Abs to Syk. Representative clusters of receptor and Syk, some mixed and some separate, are circled. Arrows point to Syk that appears to be specifically included with Fc ϵ RI β in osmiophilic membrane patches. Bar = 0.1 μ m.

published evidence (14, 15, 16) that a portion of Fc ϵ RI β is colocalized with Lyn in the light fractions containing detergent-resistant membranes (DRMs or rafts) of resting cells and that additional Fc ϵ RI β is distributed in the heavy (soluble) fractions of the gradient. Stimulation with mAb H10 alone causes a marked redistribution of Fc ϵ RI β into the light (Lyn-containing) fractions of the gradient (Fig 9B). Fc ϵ RI cross-linking with either H10 plus GaM (Fig 9C) or IgE plus multivalent Ag (Fig 9D) also causes an increase in the portion of Fc ϵ RI β recovered in the Lyn-enriched raft fractions in comparison with unstimulated cells. However, the extent of the redistribution is less than the redistribution induced by H10 alone. Densitometric analyses of the distribution of Fc ϵ RI β in the individual gradient fractions confirms that, by far, the greatest shift of Fc ϵ RI β into the light (DRM) fractions is induced by H10-Fc ϵ RI dimers. Close to 90% of β is found in the Lyn-containing fractions 3, 4, and 5 after stimulation with H10 alone, vs 40% in resting cells and ~60% in cells stimulated by IgE plus Ag or H10 plus GaM. This result is consistent with both biochemical and microscopic evidence (as described above) that H10-Fc ϵ RI dimers associate stably with Lyn, and that formation of higher order aggregates reduces the proportion of Fc ϵ RI β that associates with Lyn.

Discussion

mAb H10 differs from other mAbs specific for the Fc ϵ RI α subunit by its high affinity and its poor ability to induce secretion and other responses from RBL-2H3 cells (19, 20, 29). Previously, it was proposed that this reduced capacity to induce cell activation may be

related to orientational constraints imposed by mAb H10 on the two Fc ϵ RI complexes in the dimers (reviewed in Ref. 30). Recent studies showed that the signaling-impaired H10-Fc ϵ RI dimers induce an unusual, detergent-resistant association of Lyn with the Fc ϵ RI β and γ subunits and only a weak activation of Syk (20). These results provide the first evidence that the hypothesized changes in the configuration of the H10-Fc ϵ RI dimers may translate to changes in the sequence of biochemical events that initiate Fc ϵ RI signaling.

If the orientation of receptors is indeed crucial for proper signaling, it was predicted that creating higher order aggregates of H10-Fc ϵ RI complexes might increase the frequency of two receptors contacting each other with the appropriate relative orientation to promote signaling. Here, we confirm the prediction by showing that cross-linking the H10-Fc ϵ RI dimers into multimers stimulates not only secretion (reported previously in Ref. 19) but also the mobilization of Ca²⁺ and the phosphorylation of PLC γ 2. Accompanying the recovery of cell signaling, the β and γ subunits of the H10-Fc ϵ RI multimers no longer form stable complexes with Lyn. Furthermore, the weak phosphorylation and activation of Syk characteristic of cells activated with H10-Fc ϵ RI dimers is replaced by strong Syk phosphorylation and activation when cells are stimulated with H10-Fc ϵ RI multimers.

The results of immunoelectron microscopic studies provided a separate perspective on the properties of H10-Fc ϵ RI dimers and multimers. Previous studies in IgE plus Ag-treated cells showed that non-cross-linked Fc ϵ RI occur in mast cell membranes in loose association with Lyn but not Syk, and that the addition of cross-linking agent induces a striking redistribution of receptor aggregates to

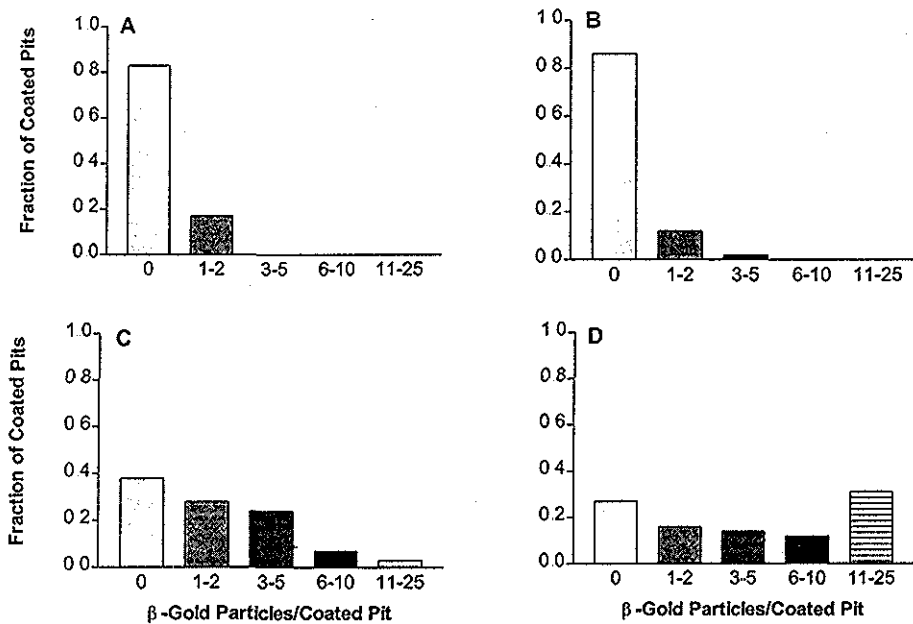


FIGURE 8. Association of H10-FcεRI dimers and multimers with membrane adjacent to coated pits. Cell monolayers on glass coverslips were incubated for 5 min at 37°C with no addition (A), with H10-D (B), or with H10-M (C) or for 2 min at 37°C with XL (D). Membrane sheets were prepared from these cells and labeled with 10 nm protein A-colloidal gold particles conjugated to anti-FcεRI β mAb. Coated pits that form at the periphery of osmiophilic signaling patches and serve as markers for these membrane domains were identified on randomly selected micrographs, all photographed at ×20,000, from three separate experiments. Each pit was scored for the number of gold particles marking FcεRI β on osmiophilic membrane continuous with the pit or on unspecialized membrane that fell within one radius of the pit. The bar graphs show the fraction of total coated pits with zero, 1–2, 3–5, 6–10, or 11–25 adjacent FcεRI β-gold particles. Results are based on analysis of 41 micrographs (43 pits) from resting cells, 54 micrographs (103 pits) from cells treated for 5 min with 7 nM mAb H10, 61 micrographs (148 pits) from cells treated for 5 min with 7 nM H10 plus 10 nM GaM, and 38 micrographs (104 pits) from Ag-stimulated cells.

osmiophilic patches. These membrane patches exclude Lyn and accumulate Syk (8). It was proposed that the osmiophilic patches represent domains of FcεRI signaling to downstream responses.

Here we show that H10-FcεRI dimers are impaired in their ability to separate from Lyn and redistribute to osmiophilic membrane

patches. In contrast, H10-FcεRI multimers are frequently observed without Lyn in osmiophilic membrane patches. Thus, the hypothesized changes in the configuration of the H10-FcεRI dimers that result in the formation of stable Lyn-receptor complexes also arrest the sequence of topographical events that initiate FcεRI signaling. This sequence of events is restored by aggregating the dimers with GaM to form H10-FcεRI multimers.

As expected, gold particles marking the H10-FcεRI multimers in osmiophilic membrane patches are consistently colocalized with markers for Syk. Surprisingly, H10-FcεRI dimers also seem to interact with Syk even though they rarely enter the putative signaling domains. It is possible that this recruited Syk has reduced catalytic activity due to its incorrect topography. There is precedent for this in work showing that H-Ras becomes biologically inert by treatments that modify its topography (31). At least in Ag-stimulated cells, the osmiophilic patches also accumulate signaling molecules such as PLCγ2, PI 3-kinase, and Gab2 (18). Thus, H10-FcεRI dimers that recruit and activate Syk, but cannot enter the putative signaling domains, would have reduced access to a number of Src homology 2 domain-containing proteins that are phosphorylated directly or indirectly by Syk and mediate downstream signaling.

Other investigators have used detergent extraction and gradient centrifugation rather than microscopy on native membranes to explore the microdomain organization of FcεRI signaling (15, 16). These experiments have identified specialized fractions called DRMs or lipid rafts as sites that are inherently enriched for Lyn and are foci for the redistribution and phosphorylation of cross-linked FcεRI during signaling. Our experiments show that H10-FcεRI dimers cause an extensive redistribution of FcεRI β from heavy (soluble) to light (raft, DRM, Lyn microdomain) fractions, and that H10-FcεRI multimers cause a less complete recruitment of FcεRI β to DRMs. The more extensive redistribution of FcεRI

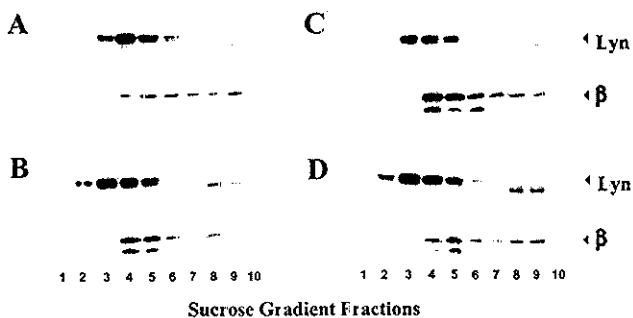


FIGURE 9. Analysis of proteins distributed across sucrose density fractions. RBL-2H3 cells were incubated for 5 min at 37°C with no addition (A), with H10-D (B), or with H10-M (C) or for 2 min at 37°C with DNP-BSA (D). Cells were solubilized in 0.05% Triton-X-100, and lysates were loaded onto 80% sucrose cushions, followed by layers of 35, 25, 20, 15, and 10% sucrose. Following ultracentrifugation, fractions were collected from the top to the bottom of the gradient (from the lightest to heaviest fractions). Proteins in equal aliquots of the fractions were separated by SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis using Abs to Lyn and FcεRI β. The percentage of FcεRI β in each fraction was calculated from densitometric quantitation of the corresponding bands. In resting cells (A) ~40% of FcεRI β is found in the Lyn-containing fractions 3, 4, and 5. The percentage of total FcεRI β found in the Lyn-containing fractions increases to almost 90% after activation with H10 (B) and to ~60% after activation with H10 plus GaM (C) and with IgE plus Ag (D). Similar results were obtained in two separate experiments.

β to Lyn-containing fractions in H10-treated cells provides independent support for the hypothesis that H10-Fc ϵ RI dimers are impaired in their ability to separate from Lyn. Because signaling is poorest when the association of Fc ϵ RI β with Lyn microdomains is greatest, these results also support the hypothesis that Lyn microdomains are intermediates in the formation of the osmiophilic patches that accumulate Fc ϵ RI β and Syk and appear to represent sites of signal propagation in mast cells.

Previously, we proposed that the Lyn-sequestering signal-curtailing properties of mAb H10-Fc ϵ RI dimers may result from an unfavorable dimer configuration (19, 29, 30) whose consequences include the inability of Lyn to dissociate from H10-Fc ϵ RI complexes (20). Extending the orientational hypothesis to other tyrosine kinase-coupled receptors, the efficiency of signaling through cytokine receptors is now known also to depend critically on the separation, orientation, and relative disposition of receptor dimers (32, 33). Here we show that these orientational or configurational constraints in the H10-Fc ϵ RI dimers are expressed as changes in the sequence of topographical as well as in the biochemical events that initiate Fc ϵ RI signaling. Specifically, H10-Fc ϵ RI dimers have very little access to the osmiophilic membrane patches that normally accumulate Syk and downstream signaling molecules. Importantly, these restraints are reversible. Further cross-linking to form H10-Fc ϵ RI multimers results in a renewed ability of cross-linked receptors both to dissociate from Lyn and to redistribute to membrane domains specialized for Syk-mediated signal propagation.

Although mAb H10 allows some signaling, and so is not itself an ideal signal-blocking drug, the Lyn-sequestering, signal-curtailing properties of mAb H10-Fc ϵ RI dimers do suggest new approaches for the treatment of allergic inflammation. Work in the Metzger group (34–36) has established that Lyn is rate limiting for Fc ϵ RI signaling in RBL-2H3 cells. Assuming the same is true in human basophils and mast cells, stringently Lyn-sequestering cross-linkers of the human Fc ϵ RI should not only block the subset of ligated receptors but, by sequestering the initiating kinase, Lyn, might also inhibit allergen-induced Fc ϵ RI signaling through independently cross-linked IgE-receptor complexes. The inhibition might be relatively long-lived because, in contrast to Fc ϵ RI multimers, Fc ϵ RI dimers are not internalized by receptor-mediated endocytosis (20).

Acknowledgments

We thank Claudia Garay for excellent technical assistance, the University of New Mexico School of Medicine for resources for electron microscopy and the University of New Mexico Cancer Research and Treatment Center for resources for ratio imaging microscopy.

References

- Wilson, B. S., and J. M. Oliver. Effector roles of IgE antibodies: targeting allergen to the high affinity IgE receptor for Fc ϵ RI-dependent signaling and antigen presentation. In *Inflammatory Mechanisms in Allergic Diseases*. B. Zweiman and L. B. Schwartz, eds. Marcel-Dekker, New York, p. 197.
- Eiseman, E., and J. B. Bolen. 1992. Engagement of the high affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. *Nature* 355:78.
- Oliver, J. M., D. L. Burg, B. S. Wilson, J. McLaughlin, and R. L. Geahlen. 1994. Inhibition of mast cell Fc ϵ RI-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor piccatanol. *J. Biol. Chem.* 269:29697.
- Yamashita, T., S.-Y. Mao, and H. Metzger. 1994. Aggregation of the high affinity IgE receptor and enhanced activity of p53/56^{lyn} protein-tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11251.
- Hutcheroff, J. E., R. L. Geahlen, G. G. Deanin, and J. M. Oliver. 1992. Fc ϵ RI-mediated tyrosine phosphorylation and activation of the 72-kDa protein-tyrosine kinase, PTK72 in RBL-2H3 rat tumor mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9107.
- Kinet, J. P. 1999. The high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI): from physiology to pathology. *Annu. Rev. Immunol.* 17:931.
- Vonakis, B. M., H. Chen, H. Haleem-Smith, and H. Metzger. 1997. The unique domain as a site on Lyn kinase for its constitutive association with the high affinity receptor for IgE. *J. Biol. Chem.* 272:24072.
- Wilson, B. S., J. R. Pfeiffer, and J. M. Oliver. 2000. Observing Fc ϵ RI signaling from the inside of the mast cell membrane. *J. Cell Biol.* 149:1131.
- Pribluda, V. S., C. Pribluda, and H. Metzger. 1994. Transphosphorylation as the mechanism by which the high-affinity receptor for IgE is phosphorylated upon aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:91.
- Shiue, L. M., J. Zoller, and J. S. Brugge. 1995. Syk is activated by phosphotyrosine-containing peptides representing the tyrosine-based activation motifs of the high affinity receptor for IgE. *J. Biol. Chem.* 270:10498.
- Costello, P. S., M. Turner, A. E. Walters, C. N. Cunningham, P. H. Bauer, J. Downward, and V. L. Tybulewicz. 1996. Critical role for the tyrosine kinase Syk in signaling through the high affinity IgE receptor of mast cells. *Oncogene* 13:2595.
- Kepley, C. L., B. S. Wilson, and J. M. Oliver. 1998. Roles for the protein kinases Lyn, Syk and Zap70 in Fc ϵ RI-mediated human basophil degranulation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102:304.
- Tamir, I., and J. C. Cambier. 1998. Antigen receptor signaling: integration of protein-tyrosine kinase functions. *Oncogene* 17:1353.
- Field, K. A., D. Holowka, and B. Baird. 1995. Fc ϵ RI-mediated recruitment of p53/56^{lyn} to detergent-resistant membrane domains accompanies cellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9201.
- Field, K. A., D. Holowka, and B. Baird. 1997. Compartmentalized activation of the high affinity immunoglobulin E receptor within membrane domains. *J. Biol. Chem.* 272:4276.
- Field, K. A., D. Holowka, and B. Baird. 1999. Structural aspects of the association of Fc ϵ RI with detergent-resistant membranes. *J. Biol. Chem.* 274:1753.
- Stauffer, T. P., and T. Meyer. 1997. Compartmentalized IgE receptor-mediated signal transduction in living cells. *J. Cell Biol.* 139:1447.
- Wilson, B. S., J. R. Pfeiffer, Z. Surviladze, E. Gaudet, and J. M. Oliver. 2001. High resolution mapping of mast cell membranes reveals primary and secondary domains of Fc ϵ RI and LA1. *J. Cell Biol.* 154:645.
- Ortega, E., R. Schweitzer-Stenner, and I. Pecht. 1988. Possible orientational constraints determine secretory signals induced by aggregation of IgE receptors on mast cells. *EMBO J.* 7:4101.
- Ortega, E., M. Lara, I. Lee, C. Santana, A. M. Martinez, J. R. Pfeiffer, R. J. Lee, B. S. Wilson, and J. M. Oliver. 1999. Lyn dissociation from phosphorylated Fc ϵ RI subunits: a new regulatory step in the Fc ϵ RI signaling cascade revealed by studies of Fc ϵ RI dimer signaling activity. *J. Immunol.* 162:176.
- Liu, F. T., J. W. Bohn, E. L. Ferry, H. Yamamoto, C. A. Molinaro, L. A. Sherman, N. R. Klinman, and D. H. Katz. 1980. Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody: preparation, isolation and characterization. *J. Immunol.* 124:2728.
- Seagrave, J. C., J. R. Pfeiffer, C. Wofsy, and J. M. Oliver. 1991. The relationship of IgE receptor topography to secretion in RBL-2H3 mast cells. *J. Cell Physiol.* 148:139.
- Wilson, B. S., N. Kapp, R. J. Lee, J. R. Pfeiffer, A. M. Martinez, Y. Platt, F. Letourneur, and J. M. Oliver. 1995. Distinct functions of the Fc ϵ RI β and γ subunits in the control of Fc ϵ RI-mediated tyrosine kinase activation and signaling responses in RBL-2H3 mast cells. *J. Biol. Chem.* 270:4013.
- Becker, E. L. 1972. The relationship of the chemotactic behavior of the complement-derived factors C3a, C5a and C567 and a bacterial chemotactic factor to their ability to activate the proesterase of rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 135:376.
- Lee, R. J., and J. M. Oliver. 1995. Roles for Ca²⁺ stores release and two Ca²⁺ influx pathways in the Fc ϵ RI-activated Ca²⁺ responses of RBL-2H3 mast cells. *Mol. Biol. Cell.* 6:825.
- Kepley, C. L., D. Lujan, E. Ortega, P. A. Morel, B. S. Wilson, and J. M. Oliver. 2000. Negative regulation of Fc ϵ RI signaling by co-crosslinking to Fc γ RII in human blood basophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106:337.
- Sanan, D. A., and R. G. W. Anderson. 1991. Simultaneous visualization of LDL receptor distribution and clathrin lattices on membranes torn from the upper surface of cultured cells. *J. Histochem. Cytochem.* 39:1017.
- Barker, S. A., K. K. Caldwell, A. Hall, A. M. Martinez, J. R. Pfeiffer, J. M. Oliver, and B. S. Wilson. 1995. Wortmannin blocks lipid and protein kinase activities associated with PI 3-kinase and inhibits a subset of responses induced by Fc ϵ RI cross-linking. *Mol. Biol. Cell.* 6:1145.
- Pecht, I., R. Schweitzer-Stenner, and E. Ortega. 1989. Is there specificity involved in Fc receptor aggregation which leads to an effective secretory stimulus? In *Progress in Immunology*, Vol VII. F. Melchers, E. D. Albert, H. V. Bochner, M. P. Dierich and L. du Pasquier, eds. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, p. 676.
- Ortega, E. 1995. How do multichain immune recognition receptors signal? A structural hypothesis. *Mol. Immunol.* 32:941.
- Prior, I. A., A. Harding, J. Yab, J. Sluimer, R. G. Parton, and J. F. Hancock. 2001. GTP-dependent segregation of H-Ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat. Cell Biol.* 3:368.
- Syed, R. S., S. W. Reid, C. Li, J. C. Cheatham, K. H. Aoki, B. Liu, H. Zhan, T. D. Osslund, A. J. Chirino, J. Zhang, et al. 1998. Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* 395:511.
- Jiang, G., and T. Hunter. 1998. Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Curr. Biol.* 9:R568.
- Wofsy, C., C. Torigoc, U. M. Kent, H. Metzger, and B. Goldstein. 1997. Exploiting the difference between intrinsic and extrinsic kinases: implications for regulation of signaling by immunoreceptors. *J. Immunol.* 159:5984.
- Wofsy, C., B. M. Vonakis, H. Metzger, and B. Goldstein. 1999. One Lyn molecule is sufficient to initiate phosphorylation of aggregated high-affinity IgE receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8615.
- Torigoc, C., B. Goldstein, C. Wofsy, and H. Metzger. 1997. Shuttling of initiating kinase between discrete aggregates of the high affinity receptor for IgE regulates the cellular response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1372.