



11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
ENTIDAD: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

ACTIVACION DE LA CINASA *Syk* POR RECEPTORES
PARA ANTICUERPOS (*FcyRs*) Y EL RECEPTOR TIPO
TRES DEL COMPLEMENTO (CR3) DURANTE
LA DIFERENCIACION DE CELULAS MONOCITICAS
THP-1.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOMEDICAS)
P R E S E N T A :
MED. CIR. JOSE AGRAMONTE HEVIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

MEXICO, D. F.,

2003.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

dcb/grad/O91Jur/2003.

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ
Director General de la
Administración Escolar
Presente.

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité Académico del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas que tuvo lugar el 7 de mayo del presente año, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas del Méd. Cir. **JOSÉ AGRAMONTE HEVIA** con no. de cuenta 98854013 y no. de expediente 78981000 con la tesis titulada: "Activación de la cinasa Syk por receptores para anticuerpos (FcγRs) y el receptor tipo tres del complemento (CR3) durante la diferenciación de células monocíticas THP-1", dirigida por el Dr. Enrique Ortega Soto.

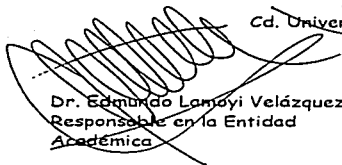
| | |
|-------------|-------------------------------|
| Presidente: | Dr. Alejandro Zentella Dehesa |
| Secretario: | Dr. Enrique Ortega Soto |
| Vocal: | Dr. José Moreno Rodríguez |
| Vocal: | Dr. Edgar Zenteno Galindo |
| Vocal: | Dr. Eduardo García Zepeda |
| Suplente: | Dra. Isabel Soto Cruz |
| Suplente: | Dr. Leopoldo Santos Argumedo |


Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"Por mi raza hablará el espíritu"

Cd. Universitaria, D.F., 4 de septiembre de 2003


Dr. Edmundo Lanjuy Velázquez
Responsable en la Entidad
Académica


Dr. J. Javier Espinosa Aguirre
Coordinador del Doctorado
en Ciencias Biomédicas

c.c.p. - Secretaría de Asuntos Escolares

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la asesoría y dirección del Dr. Enrique Ortega Soto. El comité de evaluación semestral estuvo formado por los doctores: Leopoldo Santos Argumedo, Carlos Rosales Ledezma y Enrique Ortega Soto.

Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de una beca completa para estudios de posgrado de DEGEP, UNAM. El proyecto recibió apoyo financiero de CONACYT (31783N) y de DGAPA (IN 213701).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dedicatoria:

A mis hijos (Zeltzin y Claudio):

*Por ser el motor que me da fuerza para tratar
de ser mejor persona cada día.*

A mis padres (Zoila y Servando):

Por la dedicación, el apoyo, la orientación y el amor incondicional.

A mi esposa (Aliesha):

Por haber logrado que sea un hombre completamente feliz

A mis hermanos y a las buenas protecciones

(Teresa, Claudio, Rafael, Francisco y Eduardo):

*Por esa fuerza inmensa que desde allá me hacen llegar y
logra mantenerme siempre de pie.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Agradecimientos

A México

Por ser mi segundo país

A mi familia Mexicana

(Araceli, Romelia D., Moisés A., Luis A., Alejandra, Gelacia, Oscar)

Por haberme hecho sentir parte de ustedes y por el apoyo incondicional

A DEGEP (UNAM)

Por el apoyo económico

A mis compañeros de laboratorio

(Claudia H., Paula S., Martha L., Armida B., Isabel S., Ilse R.):

*Por compartir conmigo los momentos buenos, malos,
académicos y no académicos, por comprender y entender las diferencias culturales,
por todo, ¡gracias!*

A Claudia Garay:

Por el apoyo técnico, académico y la amistad.

A mi asesor (Enrique Ortega):

Por la orientación, el apoyo en los momentos difíciles y la amistad

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis amigos (Ana M^a D., Manuel C., Rafael C., Jerzy M., Diana B., Marco V.):

Por la verdadera amistad y su contribución a la realización de este proyecto

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resumen

En monocitos y macrófagos, la activación de la cinasa de residuos de tirosina Syk es un paso esencial en la cascada bioquímica de señalización que se activa tras la agregación de receptores para inmunoglobulinas G (FcγRs) y de receptores de la familia de las integrinas β₂ como el receptor tipo 3 del complemento (CR3), para llevar a cabo funciones efectoras. Se ha observado un incremento en la fosforilación y la actividad catalítica de Syk durante la diferenciación de células mieloides con diferentes agentes. En este trabajo estudiamos el estado de activación de Syk en respuesta a la estimulación de células monocíticas THP-1 a través de los receptores FcγRI, FcγRII o CR3 antes y después de la diferenciación *in vitro* con 1α,25-dihidroxi-vitamina D₃ (1α, 25-(OH)₂-Vit D₃). Demostramos que en células THP-1 no diferenciadas la agregación individual de los receptores FcγRII o CR3 induce fosforilación y activación de Syk. Sin embargo, en células THP-1 diferenciadas con VD₃, la agregación individual de ambos receptores (FcγRII o CR3) induce una disminución significativa de la actividad de Syk. En contraste, la agregación del FcγRI induce activación de Syk tanto en células diferenciadas como no diferenciadas. La diferenciación *in vitro* con VD₃ no induce cambios en la expresión en membrana de los receptores FcγRI y FcγRII, pero aumenta la expresión del CR3 de manera significativa y dependiente del tiempo. Los transcritos de las isoformas del FcγRIIb (FcγRIIb₁ y FcγRIIb₂) disminuyen a las 24 y 48 h de tratamiento y mientras que el transcrito de la isoforma FcγRIIa₁ disminuye solo a las 72 h. El decremento en el estado de activación de Syk tras la agregación individual de los receptores FcγRII o CR3 en células THP-1 diferenciadas, puede deberse a cambios

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

inducidos por la diferenciación en la expresión y nivel de activación basal de Syk y/o a la activación de la proteína con actividad de fosfatasa de residuos de tirosina, SHP-1, cuyo nivel de asociación con Syk es modulado por la diferenciación. Estos resultados sugieren que las vías bioquímicas de señalización inducidas por los receptores FcγRII o CR3 pueden depender del estado de diferenciación de la célula, y que la activación de dichas vías en células diferenciadas por receptores FcγRI y FcγRII no es idéntica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Abstract

In monocytes and macrophages, activation of the tyrosine kinase Syk is an essential step in the biochemical cascades linking aggregation of receptors for immunoglobulin G (Fc γ R) and β_2 -integrin receptors, like complement receptor 3 (CR3) during the initiation of effector functions. An increase in Syk activation during differentiation of myeloid cells with different agents has been reported. We determined if *in vitro* differentiation of monocytic THP-1 cells with $1\alpha, 25$ -dihydroxy-vitamin D $_3$ ($1\alpha, 25$ -(OH) $_2$ -Vit D $_3$) affects the activation status of Syk in response to Fc γ RI, Fc γ RII or CR3 crosslinking. We show here that while in undifferentiated THP-1 cells clustering of Fc γ RII or CR3 induce significant phosphorylation and activation of Syk kinase, in THP-1 cells differentiated by $1\alpha, 25$ -dihydroxy-vitamin D $_3$ (VD3), Syk activation induced by both receptors (Fc γ RII or CR3) was greatly reduced. This VD3 induced effect was not observed in THP-1 cells stimulated through Fc γ RI. VD3 treatment did not induce changes in the expression of Fc γ RI and Fc γ RII isoforms. However, a time-dependent expression in CR3 surface expression was observed. Also, mRNA levels of some Fc γ RII isoforms were modulated with VD3 treatment. Fc γ RIIb (Fc γ RIIb $_1$ and Fc γ RIIb $_2$) decreased at 24 and 48 h of treatment, while mRNA levels of Fc γ RIIa $_2$ decreased only at 72 h of treatment. The reduction in the phosphorylation and activity of Syk after crosslinking Fc γ RII or CR3, could be mediated by differentiation-induced changes in the expression and activation level of Syk, as well as changes in the association of Syk with the tyrosine phosphatase SHP-1.

These results suggest that the biochemical signaling pathways induced by Fc γ RII or CR3 are dependent on the differentiation status of the cell and that the activation of the biochemical signaling pathways induced by Fc γ RI and Fc γ RII in differentiated cells are different.

TESIS CON
FALLA DE IMPRESION

INDICE

| | |
|---|---------|
| Resumen | vi-vii. |
| Abstract | viii-ix |
| Introducción | 1 |
| A. Receptores FcγR (generalidades, funciones, interés) | 3 |
| <i>Mecanismos bioquímicos de la activación por los FcγR</i> | 7 |
| B. Receptor tipo tres del complemento (CR3, CD11b/CD18, Mac-1 o αMβ₂) | 16 |
| <i>Cooperación funcional entre las diferentes clases de FcγRs y entre los FcγRs y el CR3</i> | 21 |
| C. Cinasa de tirosina Syk | 25 |
| <i>Estructura, función y regulación de su activación</i> | 26 |
| <i>Papel de la cinasa de tirosina Syk en la activación y diferenciación celular</i> | 27 |
| D. Vitamina D3. Estructura, función y papel en la diferenciación de células mieloides. | 31 |
| Planteamiento del problema científico | 36 |
| Hipótesis | 39 |
| Objetivos: | 39 |
| <i>General</i> | 39 |
| <i>Particulares</i> | 39 |
| Materiales y métodos | 40 |
| Resultados | 49 |
| Discusión | 59 |
| Conclusiones | 69 |

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

x

| | |
|---------------------------|----|
| Bibliografía | 71 |
| Anexos | 86 |

TESIS CON
FALLA DE QUEEN

INTRODUCCIÓN.

Los Fagocitos Mononucleares

Los monocitos se producen en la médula ósea a partir de células formadoras de colonias, que dan origen a los monoblastos, los cuales se diferencian a promonocitos y estos posteriormente a monocitos. Todo este proceso es regulado por citocinas tales como el factor estimulador de colonias de macrófagos (CSF-M) y la interleucina 3 (IL-3) (1). Los monocitos son liberados de la médula ósea al torrente sanguíneo donde circulan de uno a cuatro días. Un porcentaje de estos monocitos migra hacia tejidos blanco y una vez allí se diferencian y maduran a macrófagos. Las localizaciones comunes de los macrófagos tisulares (y algunos de sus nombres especializados) son pleura, alveolo (macrófagos alveolares), peritoneo, hígado (células de Kupffer), médula ósea, nódulos linfáticos, hueso (osteoclastos), piel, sistema nervioso central (microglia) y sinovia (células de revestimiento tipo A).

Las células del sistema de monocitos-macrófagos desempeñan un papel fundamental en la expresión de la reactividad inmunitaria por medio de funciones tales como la presentación de los antígenos a los linfocitos T y la secreción de citocinas. Asimismo, los monocitos-macrófagos median funciones efectoras tales como la destrucción de bacterias, células tumorales e incluso células hematopoyéticas normales (en ciertos tipos de citopenias autoinmunitarias) cubiertas de anticuerpos. Los macrófagos activados también pueden mediar una actividad lítica no específica de antígenos y eliminar algunos tipos de células, como las tumorales o células apoptóticas sin la presencia de anticuerpos.

Durante el proceso inflamatorio, la movilización y reclutamiento de los monocitos desde sangre periférica hacia un tejido blanco se lleva a cabo mediante adhesión al endotelio, migración transendotelial y locomoción, mediados por estímulos inmunológicos y/o

inflamatorios y en donde moléculas de adhesión como las selectinas e integrinas (como el receptor tipo 3 del complemento, CR3) tienen un papel esencial (2).

En el sitio de infección el monocito/macrófago es capaz de englobar y fagocitar microorganismos, partículas extrañas y células apoptóticas. Citocinas como las IL-2, IL-1, IL-10, IL-6, IL-12, IL-15; el factor de necrosis tumoral (TNF α), la prostaglandina E₂ y distintas quimiocinas son liberadas por el macrófago activado. En respuesta a estos agentes y a otros productos provenientes del macrófago, los linfocitos T (CD4⁺) y las células NK son también atraídas y estimuladas (3).

El proceso de reconocimiento, englobamiento y fagocitosis es mediado por diferentes moléculas presentes en la superficie del macrófago. Estos incluyen a los receptores para la porción Fc de la IgG (Fc γ Rs) y a los receptores para complemento (CR) tipo 1, 3 y 4 (CR1, CR3 y CR4) (3). El número de moléculas de CR3 expresadas en las células fagocíticas presentes en el foco inflamatorio varía sustancialmente dependiendo del estado de activación de las células. El aumento de la expresión de CR3 en la membrana celular puede ser llevado a cabo mediante la translocación desde un almacén intracelular aproximadamente 10 a 15 min después de la activación del fagocito (4). Además del aumento en la expresión del CR3, esta proteína es capaz de sufrir un rápido proceso de activación y desactivación (5). Aunque para el CR3 es conocido que el nivel de expresión y de activación están regulados por el estado de activación y de diferenciación del monocito, es poco conocido si hay variaciones en el comportamiento funcional de los Fc γ Rs durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago en el tejido blanco.

A. LOS RECEPTORES FcγR

Los FcγRs están ampliamente distribuidos en la superficie de células hematopoyéticas y pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (6). Los FcγRs permiten que la inmunidad humoral se comuniquen e interactúen con la inmunidad celular. Estos receptores participan en una amplia variedad de funciones de gran importancia para los mecanismos de defensa, entre ellas la fagocitosis de microorganismos patógenos. Asimismo, los FcγR son los encargados de eliminar complejos inmunes de la circulación, evitando así que un exceso de estos pudiera ocasionar daños al organismo. Por otro lado, estos receptores sirven de puente para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de células tumorales o infectadas por virus. Finalmente, a través de ellos, distintas células son inducidas a liberar factores con actividad proinflamatoria e inmunomoduladora (7).

Se han descrito tres clases de receptores para la porción Fc de la IgG (FcγRs): FcγRI (CD 64) de 72 kDa, FcγRII (CD 32) de 40 kDa y FcγRIII (CD 16) de 50 a 80 kDa de peso molecular (8, 9). Cada clase además, incluye varias isoformas. Los FcγRs existen tanto como receptores de membrana o en forma de moléculas solubles, los cuales son producidas por corte y empalme alternativo de los transcritos o por proteólisis de los receptores de membrana. Se ha postulado que las formas solubles de los receptores pueden participar en mecanismos de regulación de la concentración sérica de IgG (9). El FcγRI une IgG monomérica con alta afinidad y se ha clasificado como receptor de alta afinidad. Los receptores FcγRII y FcγRIII presentan una menor afinidad por la molécula de IgG monomérica, por lo que solo son capaces de unir complejos inmunes multiméricos. Existen tres genes conocidos como A, B y C que codifican para cada uno de los receptores FcγRI y FcγRII, y dos genes (A y B), que codifican para el FcγRIII. Del FcγRI se conoce una sola

isoforma funcional expresada en membrana (FcγRIA). Sin embargo, del receptor FcγRII existe una mayor diversidad de proteínas expresadas en la membrana. Del FcγRIIA, se han descrito dos isoformas (FcγRIIA₁, FcγRIIA₂), del FcγRIIB tres (FcγRIIB₁, FcγRIIB₂ y FcγRIIB₃) y del FcγRIIC hasta cuatro (FcγRIIC₁₋₄). En el caso del FcγRIII se conocen dos isoformas (FcγRIIIA y FcγRIIIB) (9).

CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE LOS FcγRs

En humanos todos los genes que codifican para las tres clases de FcγRs están localizados en el brazo largo del cromosoma 1 (1q21.1, 1q23-24 y 1q23-24 respectivamente) (9, 10, 11) (Tabla 1). Todos los genes codifican para la subunidad α de los receptores (subunidad que interactúa con el ligando) y tienen una organización intrón-exón similar. Dos exones líderes hacia el extremo 5' del gen codifican para un péptido señal que sufre proteólisis en el receptor maduro, en un sitio proteolítico codificado por el segundo exón. Secuencialmente en la estructura del gen dos o tres exones de cada gen codifican cada uno para un dominio extracelular de tipo inmunoglobulina. Un solo exón codifica para el dominio transmembranal, el citoplasmático y para secuencias no traducidas hacia el extremo 3' (11).

En relación con los posibles mecanismos que regulan la expresión de los receptores FcγRs, se ha reportado que la metilación de segmentos del extremo 5' de genes de los receptores FcγRs regulan la expresión del FcγRII en linfocitos T, B, mastocitos y macrófagos murinos, controlando posiblemente la transcripción de genes (12). En linfocitos B y mastocitos murinos la transcripción del gen B de los FcγRII y FcγRIII está controlada por dos regiones diferentes del gen, una región metilada en segmentos del extremo 5' y dos regiones no metiladas localizadas en el promotor y en el tercer intrón del gen B (13). Diferentes citocinas se han visto involucradas en la regulación de la expresión de los receptores FcγRs.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La modulación de los FcγRs y sus transcritos después de la activación de los macrófagos por el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) demuestra que la expresión del FcγRI y del FcγRIIb disminuyen de manera significativa en macrófagos cultivados en presencia de TNF, mientras que el ARNm del del FcγRIIb aumenta de manera importante debido a un incremento en la estabilidad de dicho ARNm. Por lo tanto, la expresión del FcγRIIb es modulada durante la activación del macrófago por un mecanismo que involucra la regulación postranscripcional (14). En monocitos cultivados en presencia de IL-4, se ha observado un regulación negativa en general de la expresión de los receptores FcγRI, FcγRII y FcγRIII (15), excepto el receptor FcγRIIb que aumenta con la IL-4 (16). Por otro lado se ha demostrado que el interferón gamma (INFγ) incrementa la expresión del FcγRI y del FcγRIIa a nivel tanto de la proteína como del transcrito (16, 17). En el caso del FcγRI han sido descritas las secuencias presentes en el promotor del gen del FcγRI que son las responsables de regular la transcripción inducida por el INFγ. Estas secuencias han sido llamadas regiones de respuesta a INFγ. Esta región que actúa como un activador de la transcripción en presencia de INFγ, parece actuar como un regulador negativo en su ausencia (18). Estos resultados indican que las citocinas procedentes de linfocitos de tipo cooperadores TH1 y TH2 regulan diferencialmente la expresión de la familia de receptores FcγRs, alterando el balance entre receptores FcγRs de una u otra clase.

DISTRIBUCIÓN CELULAR

El FcγRI se expresa en monocitos, macrófagos y neutrófilos tratados con INFγ. El gen del FcγRI conocido como A, codifica para un receptor transmembranal que contiene una porción extracelular con tres dominios de tipo inmunoglobulina, una porción transmembranal y una citosólica. Los genes B y C dan lugar a receptores que contienen

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

solo dos dominios de tipo inmunoglobulina y carecen de región transmembranal. Estas son formas solubles del receptor que probablemente sean secretadas (20).

TABLA 1.

Características generales de los receptores para la porción Fc de la IgG humana

| Receptor (CD) | Peso Molecular (kDa) | Genes (localización cromosó - mica) | Motivo Involucrado en la señalización | Subunidades asociadas | Afinidad por la IgG (K _a) |
|----------------|----------------------|--|---------------------------------------|------------------------|---|
| FcγRI (CD64) | 72 | FcγRIA FcγRIB FcγRIC (1q21.1) | - - - | γ* ND ND | Alta (10 ⁸ -10 ⁹ M ⁻¹) |
| FcγRII (CD32) | 40 | FcγRIIA FcγRIIB FcγRIIC (1q23-24) | ITAM ITIM ITAM | γ - ND | Baja (<10 ⁷ M ⁻¹) |
| FcγRIII (CD16) | 50 - 80 | FcγRIIIA FcγRIIIB (1q23-24) | - - | γ, ζ [†] - | Media (±3×10 ⁷ M ⁻¹) Baja (<10 ⁷ M ⁻¹) |

Abreviaturas:

FcγR, receptor para la porción Fc de la IgG; *ITAM*, motivo de activación basado en tirosina; *ITIM*, motivo de inhibición basado en tirosina; *ND*, no determinado; (-), no presencia.

* subunidad que presenta un motivo o [†] tres motivos *ITAM* en su estructura.
(Adaptado de Ref.19)

Los receptores FcγRII y FcγRIII son moléculas formadas por dos dominios de tipo inmunoglobulina en su porción extracelular, una porción transmembranal y una porción citosólica (excepto para el FcγRIIIB, que se encuentra anclado a la membrana celular por

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

glicofosfatidil-inositol). El Fc γ RIIA y C están expresados en monocitos, macrófagos, neutrófilos, megacariocitos y plaquetas. Las cuatro isoformas del Fc γ RIIC se han encontrado en células asesinas naturales (NK) (21), mientras el Fc γ RIIB se expresa fundamentalmente en mastocitos y linfocitos B, aunque también se ha encontrado expresado en monocitos y macrófagos. El Fc γ RIIIA se expresa en macrófagos, monocitos activados, células NK, linfocitos pre-B y en poblaciones de linfocitos T γ/δ . Es importante destacar que los receptores Fc γ RI y el Fc γ RIIIA se presentan en la membrana como complejos de una subunidad α (que une al ligando) asociados a dímeros de cadenas γ o ξ . En contraste, el Fc γ RII tiene la peculiaridad de estar formado solo por la subunidad α (3, 21).

Mecanismos Bioquemicos de la activación por los Fc γ R.

Aunque en ocasiones los receptores Fc γ R muestran la misma capacidad de unir a las distintas subclases de IgG, las funciones celulares efectoras inducidas a través de ellos pueden ser distintas. Esto está dado porque a pesar de que presentan una alta homología en sus porciones extracelulares, son diferentes en sus porciones citosólicas. Desde un punto de vista funcional los Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIC y Fc γ RIIIA son receptores activadores, caracterizados por la presencia de un motivo común identificado en muchas cadenas de receptores para antígenos. Este motivo es conocido como ITAM (*motivo de activación basado en tirosina*), el cual consiste de dos pares de residuos de tirosinas y leucinas dentro de una secuencia consenso D/E-X₂-Y-X-X-L-X_{7/13}-Y-X-X-L (22, 23). Se ha demostrado que estas secuencias son muy importantes para la transducción de la señal bioquímica durante la activación celular. Estos motivos están localizados en el dominio citosólico del receptor Fc γ RIIA o en las cadenas γ o ξ asociadas a los receptores Fc γ RI y Fc γ RIIIA,

consideradas como subunidades accesorias involucradas en la señalización (24). En contraste, el Fc γ RIIB es un receptor inhibitorio, ya que en lugar de ITAM en su dominio intracelular contiene un ITIM (*motivo de inhibición basado en tirosina*). El ITIM consiste de una secuencia de 13 aminoácidos (AENTITYSLLKHP) y se ha demostrado que la coagregación de receptores que contienen esta secuencia con receptores considerados activadores, como el receptor de antígeno de células B (BCR) causan inhibición de la activación de linfocitos (25).

Los receptores activadores están expresados en plaquetas, monocitos, granulocitos y células NK, mientras que en linfocitos están expresados sólo en bajos niveles. Sin embargo, los receptores inhibitorios (Fc γ RIIB), se expresan fundamentalmente en linfocitos B, mastocitos y células dendríticas. Los macrófagos expresan tanto receptores activadores como inhibitorios (11).

RECEPTORES Fc γ ACTIVADORES

La agregación de los receptores Fc γ en la membrana celular por complejos inmunes o partículas opsonizadas con IgG induce la fosforilación de los residuos de tirosina presentes en los motivos ITAM (para el caso de los receptores Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIC y Fc γ RIIIA). Se sabe que proteínas con actividad de cinasa pertenecientes a la familia de las cinasas de residuos de tirosina *Src* (*Src*, *Lyn*) que se encuentran en la vecindad de los receptores inactivos, ancladas a la membrana por residuos de glicina miristoilados o palmitoilados, son las encargadas de fosforilar a los residuos de tirosina presentes en los ITAMs de las porciones citosólicas del Fc γ RIIA y Fc γ RIIC o de las cadenas (γ o ξ) asociadas al Fc γ RI y al Fc γ RIIIA (26). Estas cinasas se activan por desfosforilación, y se ha postulado que CD45 es la fosfatasa que realiza esta función en la mayoría de células

hematopoyéticas (27). Los residuos de tirosina fosforilados se convierten en sitios transitorios de anclaje de proteínas que presentan en su estructura dominios SH-2 (*dominio homólogo al de la cinasa Src tipo 2*). Estas proteínas al interactuar con los ITAMs fosforilados se activan y (en el caso de las cinasas) fosforilan sustratos más abajo en la cascada de señalización o (en el caso de proteínas adaptadoras) colaboran en el ensamblaje del complejo de transducción. En células fagocíticas, la principal proteína que se asocia a los ITAMs fosforilados es la cinasa de residuos de tirosina *Syk*, de la familia *Syk-ZAP 70* (26, 28). *Syk* una vez activada fosforila a la fosfolipasa C (PLC γ) activándola, dando lugar a la consiguiente formación de diacilglicerol (DAG) e inositol tri-fosfato (IP $_3$) (29). (Fig. 1).

El IP $_3$ interactúa con receptores para IP $_3$ presentes en la membrana del retículo endoplásmico provocando la liberación de Ca $^{2+}$ y un aumento transitorio del Ca $^{2+}$ intracitosólico. Este incremento de la concentración de Ca $^{2+}$ libre en el citosol se cree que provoca la apertura de canales de Ca $^{2+}$ presentes en la membrana plasmática resultando en un incremento sostenido en la concentración intracelular de este catión. El DAG formado activa la vía de la proteína cinasa C (PKC), algunos de cuyos productos pueden alcanzar el núcleo e inducir la transcripción de varios genes. Por otro lado, la cinasa *Syk* puede fosforilar a la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3-K), activándola y esta enzima a su vez induce la activación de proteínas con actividad dependiente de GTP (GTPasas), específicamente de la familia de Rho, las cuales participan en el rearrreglo del citoesqueleto que ocurre durante la fagocitosis, la ADCC o la secreción de factores proinflamatorios (28, 29, 30) (Fig. 1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

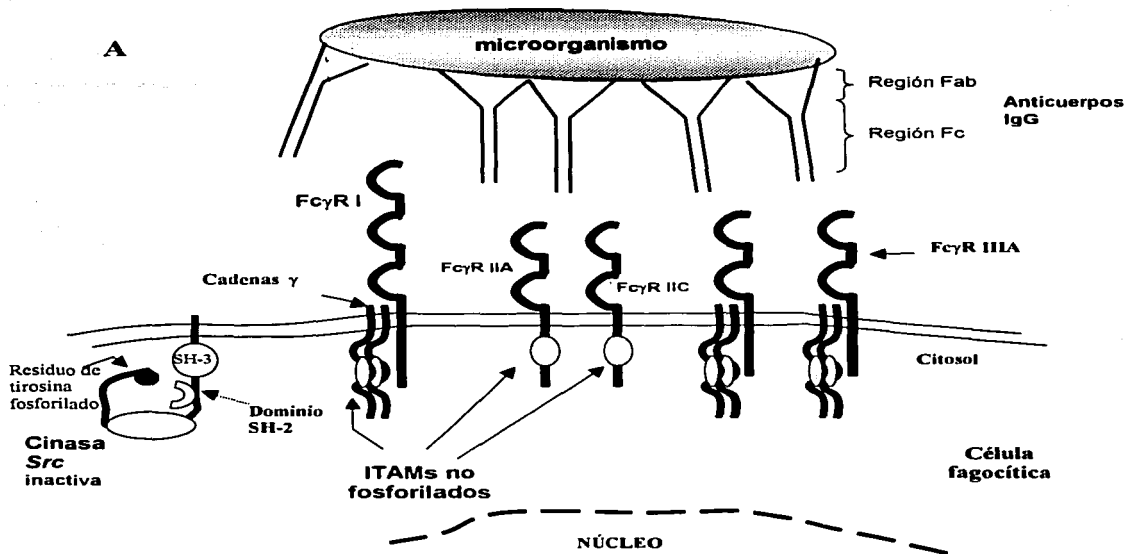
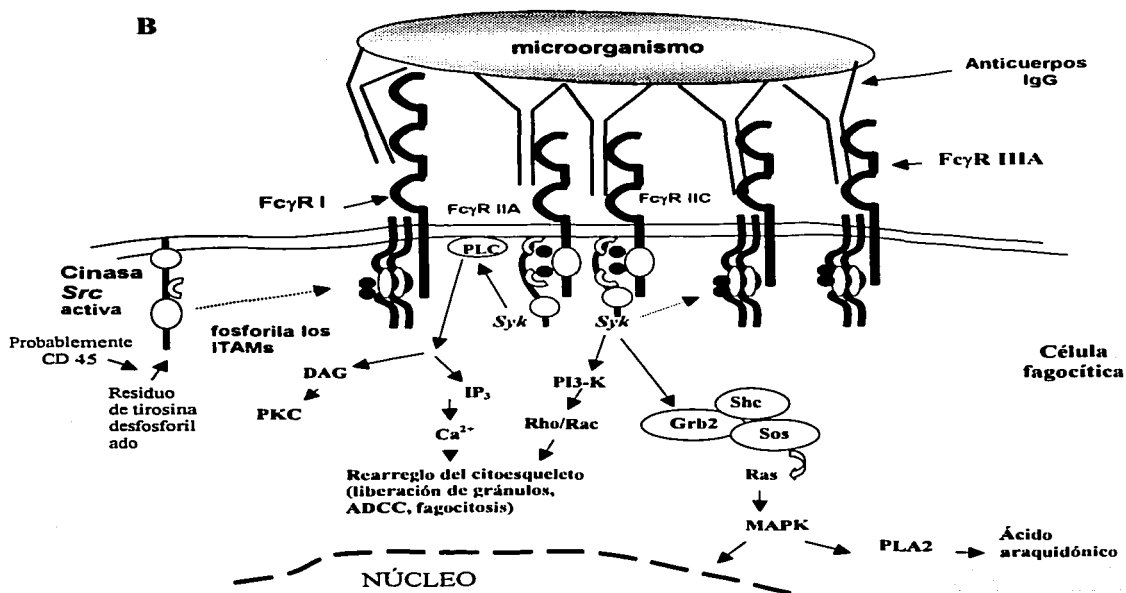


Figura 1. Activación de la fagocitosis a través de los Fc γ R.

Eventos bioquímicos tempranos que se llevan a cabo después de que los receptores Fc γ R reconocen a la porción Fc de los anticuerpos unidos a microorganismo. (A) En la célula fagocítica en estado de reposo los receptores Fc γ R se encuentran inactivos (no agregados). La cinasa Src se encuentra inactiva debido a la formación de un puente intramolecular establecido entre el residuo de tirosina 527 y su dominio SH-2.



(B) La unión de la partícula opsonizada por IgG a la célula produce la coagregación de diferentes isoformas de FcγRs, lo que induce la activación de cinasas de la familia Src; éstas fosforilan a los ITAMs, los cuales permiten que se reclute y se active Syk. Syk fosforila sustratos específicos, lo que da lugar a que se propague la señal necesaria para la fagocitosis, la degranulación, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), y/o la transcripción de genes como los de algunas citocinas.

Componentes de las vías de señalización asociadas a receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina, tales como Ras (una GTPasa pequeña), Shc fosforilada y Grb2 (ambas moléculas adaptadoras), Sos (un intercambiador de nucleótidos de guanina, activador de Ras) y las MAPK (cinasas activadas por mitógenos) son también activados por la agregación de los FcγRs (31). Incluso se sabe que la activación de la fosfolipasa A₂, (PLA₂) la cual es responsable de la liberación de ácido araquidónico, es dependiente de la MAPK. Resultados en varios sistemas han permitido delinear una posible secuencia en los eventos bioquímicos que son disparados por la estimulación de los FcγRs. Según este modelo, la forma activa de la cinasa Syk fosforila a Shc que interacciona con Grb2, quien a su vez se une a Sos. El complejo Grb2-Sos es capaz de activar a Ras, la cual induce la activación de Raf, una cinasa de residuos de serina y treonina. Raf a su vez activa a MEK (cinasa de MAPK o Erk) y ésta última a MAPK (también conocida como Erk1, Erk2) (31, 32). A través de esta vía iniciada por la activación de los FcγR activadores la señal llega al núcleo, activando factores de transcripción que finalmente inducirán la expresión de determinados genes. FcγRI y FcγRIIA inducen la activación de NF-κB (factor nuclear kappa B) en neutrófilos mientras que FcγRIIA induce la activación de NF-AT (factor nuclear de células T activadas) (33).

RECEPTORES Fcγ INHIBIDORES

El receptor FcγRIIB₁ se expresa en linfocitos B, mientras que el FcγRIIB₂ se expresa preferentemente en células del linaje mieloide. El modelo mejor estudiado de la regulación negativa de la activación celular por el FcγRIIB es el linfocito B. Tras la coagregación del receptor para antígeno del linfocito B (BCR) con el FcγRIIB sobre la misma célula, los residuos de tirosina del ITIM del FcγRIIB son fosforilados por la cinasa Lyn (también

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

perteneciente a la familia *Src*). Esto convierte a los residuos de tirosina en ligandos potenciales de proteínas con dominios SH-2 (34). Se ha visto que péptidos sintéticos con secuencias idénticas a la de los ITIMs son capaces de unir *in vitro* a proteínas con actividad de fosfatasa. Tal es el caso de las fosfatasas de residuos de tirosina que contienen dos dominios SH-2 tipo 1 y 2 (SHP-1 y SHP-2) y la 5-fosfatasa de fosfatos de inositol tipo 1 y 2 (SHIP1, SHIP2) (19, 34). Las fosfatasas reclutadas al dominio citosólico del FcγRIIB, se activan y actúan sobre sustratos específicos. Se ha demostrado que SHP-1 desfosforila a los residuos de tirosina de los ITAMs, a cinasas de residuos de tirosina (como a la cinasa *Syk in vitro*), y a moléculas adaptadoras (como la proteína SLP-76) (35) apagando así la señal de activación que había sido iniciada por el receptor para antígeno del linfocito B, BCR (Fig. 2). El papel de SHP-2 no es aún claro en la señalización por el FcγRIIB.

Las fosfatasas de fosfatos de inositol SHIP1 y SHIP2 presentan un solo dominio SH-2 en su estructura y catalizan la escisión del grupo fosfato de la posición 5' del fosfato de inositol (IP) y de la posición 3' del fosfatidil inositol trifosfato (PIP₃). SHIP1 tiene preferencia por el fosfatidil inositol (3,4,5)-trifosfato, el cual participa en la translocación a la membrana de la cinasa de Bruton (Btk) por medio de su dominio similar a la pleckstrina (36). En linfocitos B, Btk es importante para que la PLCγ se active e hidrolice el PIP₂ a IP₃, el cual participa en el incremento citosólico de Ca²⁺ libre (ver arriba). Recientemente, se demostró que SHIP1 recluta a una molécula adaptadora denominada Dok. En su estado fosforilado Dok recluta a RasGAP, la cual se sabe que inactiva la vía de Ras intercambiando el GTP asociado a Ras por GDP (37).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

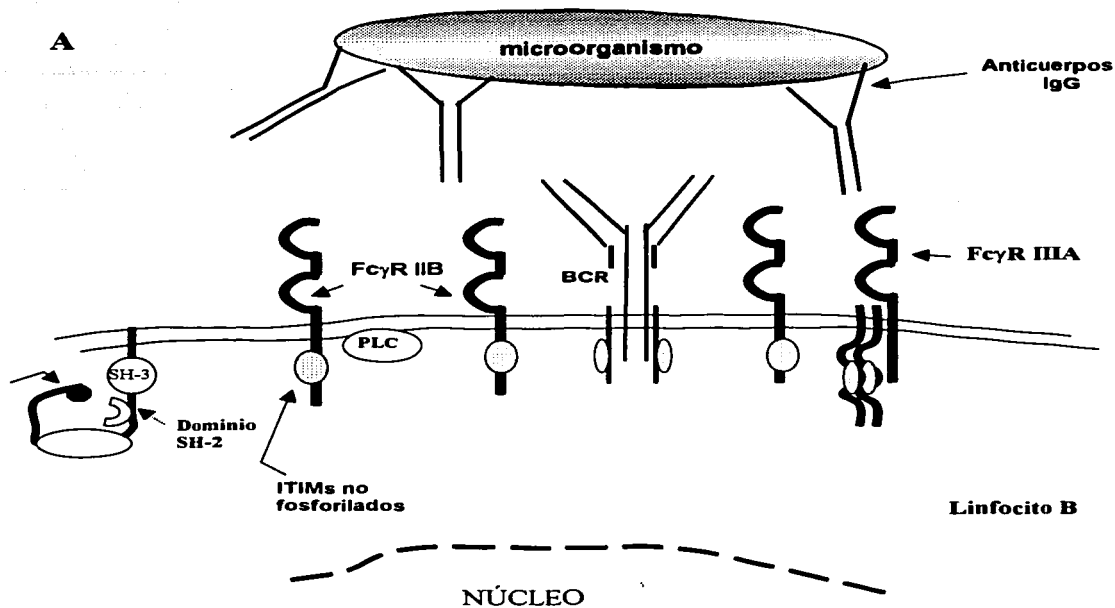
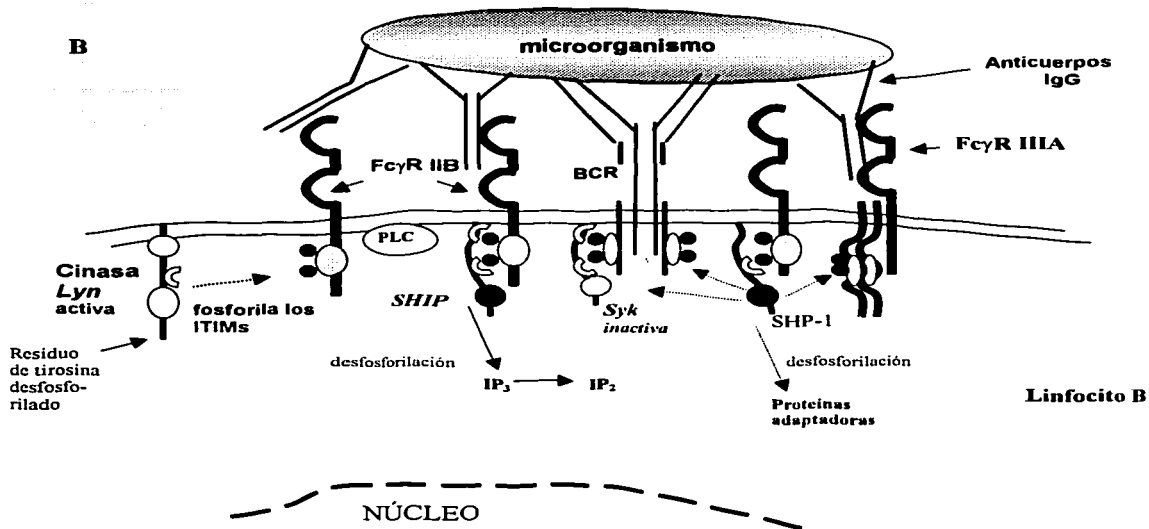


Figura 2. Regulación de la activación del linfocito B por el FcγR IIB.

Eventos bioquímicos tempranos que se llevan a cabo antes y después de la coagregación del receptor para antígeno del linfocito B con el FcγR IIB. A) En el linfocito B en estado de reposo los receptores FcγR se encuentran inactivos (no agregados). La cinasa Lyn se encuentra inactiva debido a la formación de un puente intramolecular establecido entre un residuo de tirosina y su dominio SH-2.



(B) La unión de la partícula opsonizada por IgG a la célula produce la coagregación de diferentes isoformas del FcγRIIB, lo que induce la activación de la cinasa Lyn; ésta fosforila a los ITIMs del FcγRIIB. La coagregación del FcγR IIB con el BCR recluta a las fosfatasas SHP-1 y SHIP y estas ya activadas desfosforilan a sus sustratos, impidiendo que se propague la señal de transducción. Lyn, cinasa de la familia Src; BCR, receptor de células B; IP₂, inositol difosfato.

Hasta ahora, aún no se ha definido el papel de SHIP2 en la señalización por el FcγRIIB. Se ha demostrado *in vitro*, que tanto SHP-1 como SHIP1 son capaces de unirse a los ITIM del FcγRIIB. Recientemente, se trató de determinar si *in vivo* al momento de la coagregación

del FcγRIIB con receptores que contienen ITAM como el BCR y el FcεRI, SHP-1 o SHIP1 se unen al ITIM del FcγRIIB al mismo tiempo, si una fosfatasa lo hace primero que la otra o si la unión de una u otra depende del tipo de receptor que se coagrega con el FcγRIIB en la membrana celular. No se encontró reclutamiento de SHP-1 al ITIM del FcγRIIB *in vivo* cuando este receptor es coagregado con el FcεRI en la membrana del mastocito, o con el BCR en linfocitos B (36, 37, 38). Estos resultados sugieren que aunque el ITIM del FcγRIIB tiene la capacidad potencial para reclutar a proteínas con actividad de fosfatasa (SHP-1, SHIP-1), es muy probable que la coagregación de este receptor con receptores que contienen ITAM *in vivo* involucre a otras moléculas (ej. proteínas adaptadoras) que también formarían parte del complejo de traducción.

B. El receptor tipo tres del complemento (CR3, CD11b/CD18, Mac-1 o Mo1)

Distribución celular

El CR3 se expresa en la membrana plasmática de leucocitos polimorfonucleares (PMN), fagocitos mononucleares, células asesinas naturales (NK) y en aproximadamente el 10% de los linfocitos T periféricos (principalmente subpoblaciones CD8⁺) (39). También se han visto expresados en la membrana de células B CD5⁺ (40).

Los monocitos expresan altos niveles de CR3 y es conocido que se produce un incremento en su expresión durante la maduración del monocito a macrófago (41). Leucocitos polimorfonucleares en reposo expresan relativamente pocas moléculas de CR3 por célula, pero como mencionamos anteriormente, poseen una reserva importante de receptores intracelulares que se pueden externalizar después de la estimulación con agentes quimiotácticos o ésteres de forbol. La densidad de receptores en gránulos intracelulares es

más alta que en la membrana (4). Es importante destacar que este incremento en la expresión del CR3 no es bloqueado por inhibidores de la síntesis de proteínas. (42).

El CR3 está localizado en gránulos negativos para la peroxidasa, mientras los que resultan positivos para la peroxidasa (gránulos azurófilos) carecen de CR3 (43); también está presente en gránulos de gelatinasa, los cuales son más fácilmente movilizables que los gránulos específicos (44).

Estructura

El CR3 es una glicoproteína heterodimérica de membrana que pertenece a la familia de las integrinas β_2 , la cual incluye al antígeno-1 de función del linfocito (LFA-1; CD11a/CD18) y a la proteína 150,95 (CD11c/CD18 o CR4). Cada uno de los diferentes receptores consiste de una subunidad α de la que puede haber tres variantes (CD11a, b y c), asociada no covalentemente a una subunidad β común (CD18). La cadena α del CR3 tiene un peso molecular de 185 kDa y la β de 95 kDa, ambas se enlazan como un dímero $\alpha_1\beta_1$ y ambas están expuestas en la superficie celular (42).

La subunidad α del CR3 es una proteína transmembranal de 1137 residuos de aminoácidos con un largo dominio extracelular que contiene 1092 residuos, presenta 26 aminoácidos hidrofóbicos en la región transmembranal y un dominio citosólico corto de 19 aminoácidos (45). El dominio extracelular contiene cuatro supuestas secuencias que unen cationes divalentes (descritas por Williams en 1986, DXDXGXXDXXE) que son importantes para el proceso de unión al ligando. Estas secuencias son similares a los sitios de unión de Ca^{2+} encontradas en proteínas como: calmodulina, proteína intestinal de unión a la vitamina D3, paralbumina, cadena ligera de la miosina y troponina (46). El ligando principal del CR3 es el fragmento del complemento C3bi (47, 48). Existen evidencias que sugieren que el sitio

de unión para el C3bi está localizado, al menos en parte, sobre el polipéptido α . Una región de aproximadamente 200 residuos de aminoácidos presente en una o más copias en muchas proteínas, relacionadas en la interacción célula-célula y célula-matriz denominado dominio A (también llamado dominio I) ha sido identificado en la cadena α del CR3 (49). Diversos estudios han mostrado que el dominio I del CR3 es una unidad estructural y funcional independiente y participa en muchas de las funciones de unión del receptor intacto a diferentes ligandos (49). Es importante destacar que el CR3 además del dominio I, (por el cual reconoce al C3bi, al ICAM-1 y al fibrinógeno) expresa un dominio de tipo lectina con capacidad para unir ciertos polisacáridos complejos como el β -glucano (50).

Ligandos y funciones asociadas

Se han identificado muchos ligandos capaces de interactuar con la molécula de CR3, la unión a muchos de estos ligandos parece ser críticamente dependiente del estado de activación del receptor (ver más adelante) y de la presencia de una secuencia de tipo RGD (Arginina-Glicina-Ácido Aspártico) en su estructura, esencial para la unión de los ligandos. En la **Tabla 2** se presenta un resumen de los principales ligandos del CR3 clasificados de acuerdo a su naturaleza protéica o no protéica y la función con la que se han visto relacionados.

La primera función descrita para el CR3 fue su capacidad para unir el fragmento C3bi del complemento y mediar fagocitosis, lo cual fue demostrado por la capacidad de anticuerpos monoclonales anti CR3 para bloquear la unión e internalización de partículas opsonizadas con C3bi por PMN normales y la incapacidad de estas partículas para unirse a PMN deficientes de la molécula CR3 (42). Posteriormente se describió la expresión de este receptor en células NK, donde mostró ser importante para la citotoxicidad de estas células.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se ha demostrado la participación del CR3 en la agregación homotípica (reconociendo estructuras aún no completamente identificadas en el contrareceptor celular), en la adherencia celular a células endoteliales activadas (vía ICAM-1), y en la adhesión celular a la matriz extracelular a través de proteínas como fibrinógeno y el factor X de la coagulación. Experimentos utilizando formas mutantes quiméricas del CR3 o anticuerpos neutralizantes demostraron que muchas de las funciones de adhesión del CR3 son mediadas por el dominio I situado en la subunidad α (CD11b) del CR3 (55).

Mecanismo de la activación

Algunos experimentos han mostrado que la actividad de unión del CR3 a sus ligandos no es constitutiva, sino que es inducida por un mecanismo de señalización que utilizan las integrinas en el cual la señal de activación va del interior celular hacia el exterior. Este mecanismo ("inside-out signaling") es llevado a cabo por la estimulación por su ligando de moléculas receptoras presentes en la vecindad del CR3 que intracelularmente logran producir un cambio conformacional en la molécula de CR3, lo que favorece un cambio hacia el estado activo de esta integrina, que se refleja en un aumento de la afinidad por el ligando, y facilita la función del receptor. Contrariamente, cuando el CR3 es agregado por algunos ligandos, es capaz de transducir señales desde el exterior al interior celular ("outside-signaling") resultando en la activación de respuestas efectoras celulares dependientes de proteínas con actividad de cinasa (53). El CR3 también puede ser activado a través de su dominio de lectina y esto ocurre como resultado de un cambio conformacional en el dominio I adyacente (expresión de un epítipo de activación) dependiente de la fosforilación en residuos de tirosina y de cationes divalentes como el Mg^{2+} (49).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 2. Ligandos del CR3.

| Naturaleza del ligando | Ligandos | Dominio involucrado | Función |
|---|----------------------|----------------------------|---|
| <i>Proteicos</i> matriz extracelular | Fibrinógeno | - dominio I | - adhesión célula-matriz, migración celular. |
| contrareceptores, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas | ICAM-1 | - dominio I | - adhesión célula-célula |
| | ICAM-2 | - dominio I | |
| proteínas de la coagulación sanguínea | Heparina Factor X | - dominio I | - adhesión célula-matriz, migración celular e iniciación de la cascada de la coagulación asociada a los monocitos |
| fragmento de la cascada del complemento | C3bi | - dominio I | - fagocitosis y activación celular. - citotoxicidad de células NK. |
| otros | CyA | --- | - fagocitosis de <i>B. pertussis</i> |
| | NIF | - dominio I | - Inhibición de la migración de neutrófilos |
| | FHA | - dominio I | - fagocitosis |
| | HMW | --- | - factor de virulencia de <i>H. influenzae</i> |
| <i>No proteicos</i> | LPS | - dominio de lectina | - fagocitosis y activación celular |
| | Zymosan (β-glucano) | - dominio de lectina | |
| | WI-1 | --- | --- |

Abreviaturas: factor X, factor X de la coagulación; ICAM-1, molécula de adhesión intercelular 1; ICAM-2, molécula de adhesión intercelular 2; C3bi, fragmento proteolítico de la proteína del complemento C3; LPS, lipopolisacárido; WI-1, antígeno 1 inmunodominante de la pared celular; FHA, filamentos de hemaglutinina; CyA, toxina adenilato ciclasa; HMW, kinógeno de alto peso molecular; NIF, factor inhibidor de neutrófilos; (--) desconocido. Recopilado de las referencias (42, 43, 48, 51-54).

Microorganismos que expresan polisacáridos en su estructura (bacterias, levaduras, etc.) o que están opsonizados con C3bi, son eliminados directamente por células efectoras que expresan CR3 (56).

El descubrimiento de un dominio de lectina en el CR3 no solamente proporciona un nuevo sitio de reconocimiento para que la célula fagocítica se adhiera y fagocite microorganismos no opsonizados, sino que también sugiere un mecanismo para una nueva forma de cooperación inter-receptores. Se ha demostrado experimentalmente una interacción física en membrana del CR3 con receptores glicoproteicos anclados a la membrana por glicosfosfatidilinositol (GPI), como el receptor para la porción Fc de la IgG, FcγR IIIB; el receptor para la proteína urocinasa activador de plasminógeno, UPAR y el receptor de lipopolisacárido, LPS (57). En la figura 3 se presenta de manera esquemática las principales moléculas descritas involucradas en el proceso de señalización a través del CR3 (Fig. 3).

Cooperación funcional entre las diferentes clases de FcγRs, y entre los FcγRs y el CR3.

Las opsoninas son moléculas con la capacidad de facilitar la fagocitosis. Varios tipos de opsoninas han sido descritos. Los fragmentos derivados del complemento y los anticuerpos son dos de las opsoninas más importantes involucradas en la fagocitosis. En situaciones *in vivo* es probable que un microorganismo o partícula esté opsonizado con, o que el complejo inmune este formado por varios isotipos de anticuerpos de IgG.

Por tanto en el momento de la interacción de estos complejos inmune con la célula efectora es probable que más de un tipo de receptor Fcγ se agregue o incluso otros receptores que no sean de la familia de los FcγRs y que están involucrados en el reconocimiento y fagocitosis del microorganismo o partícula extraña, también sean agregados. En estas circunstancias, es

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

posible que opere una cooperación positiva entre diferentes receptores FcR para un mismo isotipo de anticuerpo, tales como el FcγRI y el FcγRIIA en macrófagos, o para diferentes isotipos como el caso del FcεRI y el FcγRIIA en mastocitos. La cooperación positiva puede explicar como puede funcionar el FcγRIIB en neutrófilos. Una primera propuesta es que el FcγRIIB actúe en sinergismo con el FcγRIIA utilizando el aparato transductor de este último. Otra posibilidad es que, ya que el FcγRIIB es incapaz de inducir una señal de activación por sí mismo por carecer de porción membranal e intracitoplasmática, se ha postulado que otras moléculas membranales pudieran actuar como co-receptores transduccionales a través de interacciones extracelulares.

Entre las otras moléculas descritas que podrían cooperar con el FcγRIIB, la interacción con receptores del complemento ha sido la más estudiada. Se han obtenido evidencias que claramente señalan al CR3 como un colaborador importante de los FcγRs en la fagocitosis: a) anticuerpos dirigidos contra el CR3 inhiben la fagocitosis de partículas revestidas con IgG (58), b) al comparar la fagocitosis de inmunocomplejos (IC) solos o asociados a C3bi (C3bi-IC) en neutrófilos humanos, se observa que la fagocitosis de los inmunocomplejos asociados a C3bi es mayor que la observada con los IC solos (59), c) el entrecruzamiento del CR3 causa asociación física (coagregación) entre el FcγRIIB y el CR3 (60). Por otro lado, d) se observó que la activación del FcγRIII por inmunocomplejos aumenta la proximidad entre el CR3 y el citoesqueleto medido por transferencia de energía, indicando un enlace del CR3 con el citoesqueleto durante la activación por el FcγRIIB (61).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

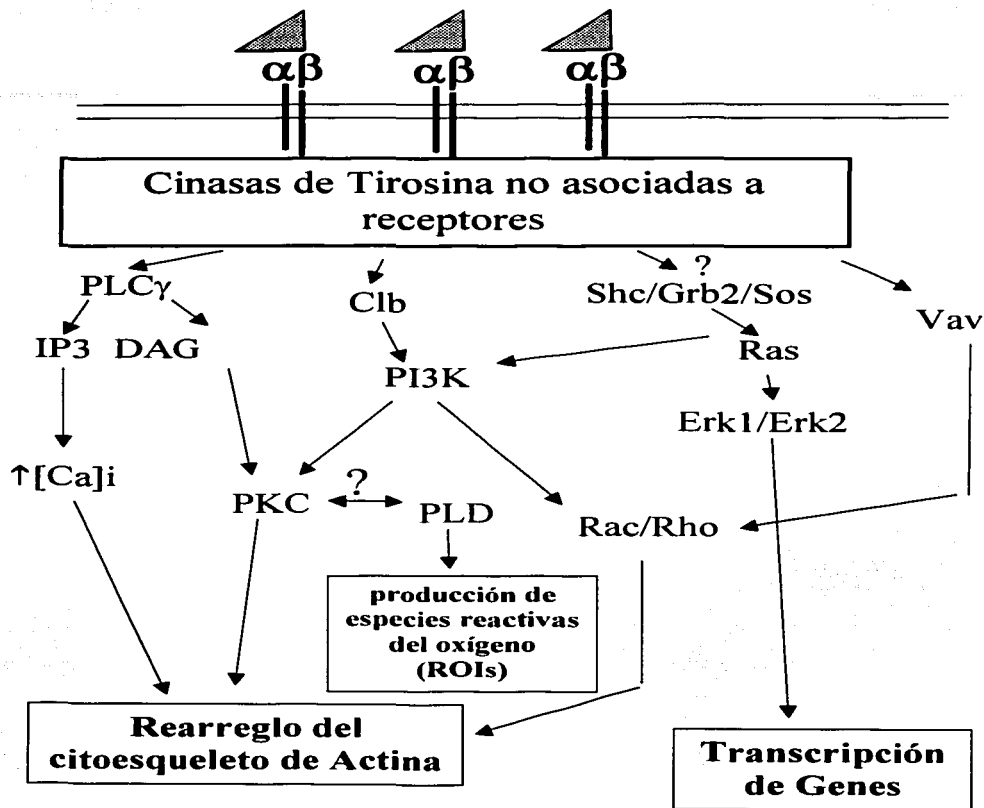


Figura 3. Principales vías de señalización activadas por el CR3. La unión al CR3 activa vías de señalización que inducen rearrreglo del citoesqueleto, transcripción de genes y liberación de metabolitos intermediarios del oxígeno que favorecen la eficiencia de la fagocitosis y la muerte de microorganismos patógenos. La interacción CR3/ligando induce la formación de un complejo multiprotéico de señalización, que incluye cinasas de residuos

de tirosina citosólicas, proteínas del citoesqueleto y moléculas adaptadoras. Las cinasas de residuos de tirosina de la familia Src ($p58^{Fgr}$, $p59/61^{Hck}$ y $p53/56^{Lyn}$) y la cinasa Syk parecen ser puntos iniciadores de las señales. Estas cinasas una vez activadas fosforilan a proteínas asociadas al citoesqueleto, tales como paxilina, α -actinina y talina, involucradas en el arreglo del citoesqueleto de actina. La activación de las cinasas de residuos de tirosina también promueven la activación de las vías bioquímicas de señalización que involucran a la PLC γ y a la PI3K. La PLC γ induce la liberación de calcio de los reservorios intracelulares y la subsecuente entrada de este desde el exterior celular, estos eventos activan a muchas proteínas que modulan finalmente el ensamblaje del citoesqueleto de actina. La PI3K, activada promueve la activación de la PLD (una señal importante que regula el englobamiento de partículas y la generación de ROIs) y la estimulación de pequeñas proteínas con actividad de GTPasa conocidas como Rho y Rac (fuertemente implicadas en la modulación del citoesqueleto). Adicionalmente, las cinasas de residuos de tirosina activadas por el CR3 pueden encender la vía de Ras/Erk, probablemente por la formación del complejo Shc-Grb2-Sos. A través de esta vía CR3 puede dirigir la transcripción de genes y la activación celular (53). Abreviaturas:

▷ Ligandos; PLC γ , fosfolipasa C-gamma; IP3, inositol (1, 4, 5)P3; DAG, diacilglicerol, [Ca²⁺]_i, incremento citosólico de calcio; PKC, proteína cinasa C; Cbl, cobalamina (producto del proto-oncogen cbl); PI3K, cinasa 3 de fosfatidilinositol; PLD, fosfolipasa D; ROIs, metabolitos intermediarios reactivos del oxígeno; Shc, homóloga al dominio SH-2 de la colágena; Ras, producto del proto-oncogen ras (GTPasa pequeña); Rac y Rho, GTPasas pequeñas; Erk1/2, cinasas reguladas por señales extracelulares 1/2; Vav, vermicola sporolablast valvogenic (factor intercambiador de nucleótidos).

e) Se ha demostrado que neutrófilos de pacientes deficientes de CR3 (síndrome de deficiencia en la adhesión leucocitaria, LAD), muestran una baja capacidad para fagocitar eritrocitos cubiertos con IgG (62). f) Cuando el CR3 y el FcγRIIB son transfectados en fibroblastos, la expresión de ambos receptores es necesaria para la fagocitosis de eritrocitos opsonizados (61).

Por otro lado, también se ha visto que el FcγRII (CD32) puede interactuar funcionalmente con las integrinas (57). Estudios recientes han enfatizado en que existen diferencias en el modo de señalización vía los FcγRs y el receptor del complemento tipo 3 (CR3).

Hellwig et al. compararon el efecto de la entrada de *Bordetella pertussis* vía FcγRs (FcγRII/FcγRIII) o vía CR3 por medio de anticuerpos monoclonales biespecíficos dirigidos contra ambos tipos de receptores. La eliminación de la infección cuando la entrada de la bacteria es mediada por los FcγRII/FcγRIII mostró ser más eficiente que cuando es mediada por el CR3 (63). Esto demuestra que en la vía utilizada por los FcγRs o el CR3 para endocitar determinados microorganismos pueden existir diferencias, lo que permitiría explicar las diferentes respuestas celulares. Sin embargo, es conocido que existen similitudes en el proceso de señalización entre ambos tipos de receptores. Un ejemplo de esto radica en que el entrecruzamiento de ambos tipos de receptores inducen un aumento en la producción de PIP₃, probablemente como resultado de la activación de uno o más miembros de la familia de cinasas de PI-3 (PI-3K).

C. Cinasas de residuos de tirosina Syk

Muchas cinasas de residuos de tirosina citosólicas que se expresan en células del sistema inmune son capaces de interactuar con los ITAMs, entre ellas encontramos a las ya mencionadas cinasas de la familia *Src* y a la cinasa de tirosina de Bruton (BTK) de la

familia de cinasas TEC. Una tercera clase de cinasas de residuos de tirosina es la familia de las cinasas Syk/ZAP-70. Syk está expresada en todas las células hematopoyéticas y es esencial para el desarrollo de linfocitos y la transducción de señal a través de receptores involucrados en la respuesta inmune en células no linfoides (64).

Estructura, función y regulación de la activación de Syk

La cinasa Syk es una proteína de aproximadamente 625 aminoácidos, con un peso molecular entre 68-72 kDa. Está compuesta por un dominio de cinasa localizado hacia el extremo carboxilo terminal, una región de enlace (linker) designada como interdominio B, la cual contiene múltiples residuos de tirosina y separa al dominio de cinasa de dos dominios SH-2 distribuidos en tandem hacia el extremo amino terminal. A través de estos dominios, Syk puede interactuar con los ITAMs.

Dos isoformas de Syk han sido descritas (65). La isoforma que se expresa en mayor cantidad contiene un inserto de 23 aminoácidos en la región "linker" o interdominio B y es conocida como Syk, y la isoforma menos abundante, originada por corte y empalme alternativo de Syk, se denomina Syk B, la cual carece de dicho inserto y es por lo tanto más parecida a ZAP-70 (Fig. 4). Algunos estudios demuestran diferencias funcionales entre las dos isoformas: Syk se acopla más eficientemente al receptor FcεRI de mastocitos durante la señalización que Syk B (65). Estas diferencias también correlacionan con una mayor afinidad de unión de Syk a los ITAMs fosforilados comparada con Syk B.

Es conocido que el estado de activación de muchas proteínas se regula por su estado de fosforilación de residuos de tirosina presentes en su estructura. Los residuos de tirosina presentes en la región linker o interdominio B de Syk (Y290, Y317, Y342, Y346 y Y358) son altamente conservados entre especies y pueden ser importantes en la regulación de la

actividad catalítica de la enzima. Se ha demostrado que estos residuos al ser fosforilados permiten que se recluten proteínas como PLC γ 1, Vav y Cbl, es decir pueden mediar interacciones entre Syk y muchas otras moléculas, las cuales a la vez pueden ser sustratos de Syk (66). La fosforilación de algunos residuos de tirosina presentes en la región linker (Y317, Y342 y Y346) es dependiente de Lyn, una cinasa de la familia *Src*. Existen otros residuos de tirosina fuera del interdominio B, uno (Y130) localizado entre ambos dominios SH-2, dos (Y519 y Y520) inmersos en el dominio catalítico y otros dos (Y624 y Y625) al final del extremo carboxilo terminal (64). La fosforilación de los residuos Y130, Y519 y Y520 se lleva a cabo por la propia Syk, es decir son sitios de autofosforilación. Sin embargo la fosforilación de los residuos Y290 y Y358, de la región linker y de los residuos Y624 y Y625 del extremo carboxilo terminal solo ha sido demostrada *in vitro* (67). Aunque algunos residuos de tirosina presentes en Syk son fosforilados por la cinasa Lyn, Syk (a diferencia de ZAP-70) no depende exclusivamente de las cinasas de la familia *Src* para una activación eficiente. Esto puede deberse a la capacidad de Syk de inducir fosforilación de los ITAMs independientemente de cinasas de la familia *Src*, permitiendo con esto que Syk finalmente se una a los ITAMs fosforilados, logre un cambio conformacional en ella y por lo tanto un incremento en su actividad específica (68). La capacidad de Syk para unirse a los ITAMs fosforilados de las cadenas: α de la Ig α del BCR, ζ del TCR, ϵ del CD3, y del Fc ϵ R I, Fc γ RI y Fc γ RIII, sugiere que Syk está involucrada en la transducción de señales de un gran número de receptores en diferentes células hematopoyéticas (69).

Papel de la cinasa de tirosina Syk en la activación celular y en la diferenciación

En el linaje linfoide, Syk se expresa en los estadios de timocitos dobles negativos CD4⁻ CD8⁻ y dobles positivos CD4⁺CD8⁺, sin embargo los niveles de expresión son

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

marcadamente reducidos en los estadios de timocitos simples positivos CD4⁺ y CD8⁺ y células T periféricas.

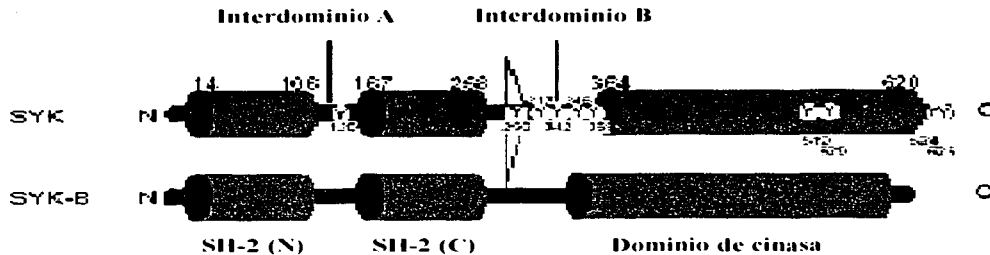


Figura 4. Estructura de Syk. Representación esquemática de las dos isoformas descritas de la cinasa Syk. (Tomado de Referencia 64)

Por el contrario, ZAP-70 se expresa en altos niveles tanto durante el desarrollo de timocitos, como en los linfocitos T periféricos. Estudios previos han sugerido que el desarrollo de algunos linfocitos T $\gamma\delta$ intraepiteliales requiere a Syk (70). Análisis de timo fetal de animales Syk^{-/-} revelaron una deficiencia en el desarrollo de los timocitos $\gamma\delta$ que expresan el gen V γ 3. También se ha observado que células NK fenotípicamente maduras y Syk^{-/-} se desarrollan eficientemente y demuestran una actividad de citotoxicidad natural normal (71). Aunque Syk no es esencial para el desarrollo de ninguna de las subpoblaciones de linfocitos T y células NK, esta puede jugar un papel importante en su sobrevivencia y/o en su expansión. En el caso de los linfocitos B, cuando ratones deficientes de RAG-I son reconstituidos con hígado fetal de embriones deficientes de Syk, se reduce el reservorio de células pre-B formados (72). Esto sugiere que Syk es requerida

para la señalización propia del estadio de pre-BCR, para generar o mantener el reservorio de células pre-B. También se ha observado que ratones deficientes de Syk mueren en el útero o durante el periodo perinatal a causa de hemorragias excesivas (72).

Papel de Syk en células mieloides (diferenciación y activación)

Aún no se ha estudiado ampliamente el papel de Syk en la diferenciación de células mieloides. Un incremento en la fosforilación y actividad catalítica de Syk fue observado durante la diferenciación a granulocitos de células HL-60 por ácido retinóico all-*trans* (73). En mastocitos la ausencia de Syk provoca que el receptor de alta afinidad para la IgE (FcεRI) no active a la PLC impidiendo así la liberación de Ca²⁺ intracelular. Estudios utilizando cultivos de mastocitos murinos establecidos a partir de hígados fetales deficientes de Syk (Syk^{-/-}) demuestran que la degranulación, la producción de leucotrienos y la liberación de citocinas son también dependientes de Syk, así como la activación de NF-AT, la estimulación de Erk y Junk (74). En macrófagos cultivados de hígado fetal de ratones deficientes de Syk (Syk^{-/-}) existe una marcada incapacidad para fagocitar eritrocitos de carnero cubiertos con anticuerpos, así como una deficiencia en la fosforilación en tirosina de una variedad de sustratos después del entrecruzamiento de diferentes tipos de receptores FcγR. La capacidad de producir metabolitos reactivos del oxígeno inducida por los FcγR también está abatida en neutrófilos deficientes de Syk (75).

Los antecedentes descritos anteriormente sobre la participación de Syk en la diferenciación celular (70-73, 75), el papel imprescindible de la cinasa Syk para la señalización a través de los FcγRs (26, 28, 29), la identificación de Syk en la vía de señalización utilizada por las integrinas (76) en células monocíticas (77) y la existencia de una cooperación funcional entre los FcγRs y el CR3 (58-62), nos llevan a preguntarnos si la activación de Syk durante

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

la fagocitosis de microorganismos o partículas cubiertas con diferentes opsoninas (anticuerpos IgG y/o fragmentos del complemento como C3bi) es igual en células monocíticas en distintos estados de diferenciación/maduración.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VITAMINA D3. ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y PAPEL EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MIELOIDES.

El metabolito activo de la vitamina D3, el $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 (VD3), es una potente hormona denominada secoesteroide por su estructura (Fig. 5), que produce una amplia variedad de efectos biológicos en diferentes tejidos blancos. La hormona vitamina D (VD) se sintetiza en la piel, su derivado más potente, el $1\alpha-25$ (OH)₂ vitamina D3 se forma en el riñón y sus órganos diana son: intestino, riñón y hueso. Recientemente se han encontrado receptores específicos para esta hormona en páncreas, cerebro e hipófisis.

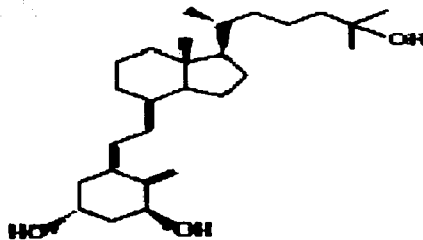


Figura 5. Estructura química de la VD3.

La vitamina D3 es un esteroide, derivado del colesterol donde el anillo B se ha roto (secoesteroide). Esta vitamina se forma por irradiación solar, a partir de un precursor (7-deshidrocolesterol) presente en la piel de los animales. El 7-deshidrocolesterol se convierte en colecalciferol, el cual es transferido al hígado donde es convertido en calciferol (25-hidroxicolecalciferol), que posteriormente viaja a los riñones y se convierte en calcitriol (1,25-dihidro-xico-lecalciferol, que se piensa es la forma más activa) y 24,25-hidroxicolecalciferol (papel fisiológico no determinado).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La VD3 es convertida en 1α -25 (OH)₂ D3 o en 24-25 (OH)₂ D3 por hidroxilación y depende del estado o nivel de vit D y de paratorhormona (PTH), de manera que si existe déficit de vit D la hidroxilación en el carbono 1 aumenta. Cuando no existe déficit de vit D ocurre lo contrario, disminuye la 1-25 (OH)₂ D3 y aumenta la 24-25(OH)₂ D3.

La 1α -25 (OH)₂ D3 es el principal regulador de la homeostasis y de la formación-remodelación de los huesos (78). El efecto de la vit D que aumenta el transporte de calcio en el intestino es inmediato, ocurre a los pocos min de la administración de 1-25 (OH)₂ D3; sin embargo, su acción sobre el hueso es más demorada, necesita que se promueva la diferenciación de promonocitos-monocitos-macrófagos-osteoclastos y estos últimos serían los encargados de realizar la movilización del calcio óseo. Adicional al ampliamente reconocido papel de la VD3 en la homeostasis ósea, la VD3 también tiene propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias, así como un papel regulador en el crecimiento y diferenciación de diferentes tipos celulares y tejidos. (79, 80).

La evaluación del papel de la 1α -25 (OH)₂ D3 durante la hematopoyesis surge debido a las observaciones de que las células hematopoyéticas contienen receptores para la VD3 y además los osteoclastos surgen de la fusión de precursores de células mononucleares circulantes y por lo tanto representan un estadio terminal de diferenciación del fagocito mononuclear (78). Abe y col., demostraron en el ratón que concentraciones nanomolares de 1α -25 (OH)₂ D3 eran suficientes para inducir fusión de macrófagos alveolares. Este mismo grupo demostró que líneas celulares mieloides de ratón (M1), podían ser inducida a diferenciación a linaje macrófago con 1α -25 (OH)₂ D3 (78). Posteriormente se demostró que líneas celulares humanas promielomonocítica (HL-60) y mielomonocítica (U937) podían ser inducidas a diferenciación terminal con 1α -25 (OH)₂ D3 (81, 82). Se han

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

identificado en células mieloides múltiples genes que son regulados positiva o negativamente con el tratamiento con VD3. Tales genes incluyen *c-myc*, *N-ras*, *p53*, *c-fms*, gen de la proteína cinasa *C* y *c-jun* y *junB*. Se reportó también el gen de la interleucina-2 y el gen del factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos (FSC-GM) los cuales son reprimidos transcripcionalmente por el receptor de la VD3. Más recientemente se describe a *c-Fos*, a la bifosfatasa de fructosa 1,6 en células HL-60 como genes inducibles por la VD3 (83-88). Se identificó además al gen *p21^{Cip1/Waf1}* como blanco transcripcional del receptor de la VD3. El producto de este gen inhibe el ciclo celular ya que bloquea a cinasas necesarias para la progresión del ciclo a través de G1 (inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, CKI) (89). Especialmente en la línea celular U937 se logró identificar a varios genes que son modificados por la VD3: para las moléculas receptores de membrana CD11b y CD14, b-zip-HLH (proteína Mad 1) y HoxA10, ciclina A, proteínas ribosomales S4 y L21. También se pudo demostrar que estos genes, están involucrados en el proceso de diferenciación terminal de monocitos U937 a macrófagos (78).

La VD3 actúa a través de un receptor intracelular (predominantemente nuclear) denominado receptor de vitamina D (VDR), el cual pertenece a la superfamilia de receptores nucleares para hormonas (90), o también clasificado como miembro de la superfamilia de factores de transcripción activados por el ligando que incluye a receptores de hormonas esteroides, retinoides y tiroideas (91). Una vez que la VD3 se une a su receptor, el VDR forma un complejo heterodimérico estable, con el receptor de retinoides (RXR) (91). El complejo hormona receptor VD3-VDR/RXR en el núcleo se une a secuencias específicas localizadas en el promotor de diferentes genes hacia el extremo 5', denominadas elementos de respuesta para la VD3 (VDRE). De esta manera logra llevar a cabo sus efectos, modificando la transcripción de genes específicos (Fig. 6) (92). Se ha

sugerido también que la VD3 tiene una gran variedad de acciones no genómicas, mediadas sin el requerimiento de la unión y formación del complejo entre la hormona y el receptor nuclear (79, 92).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

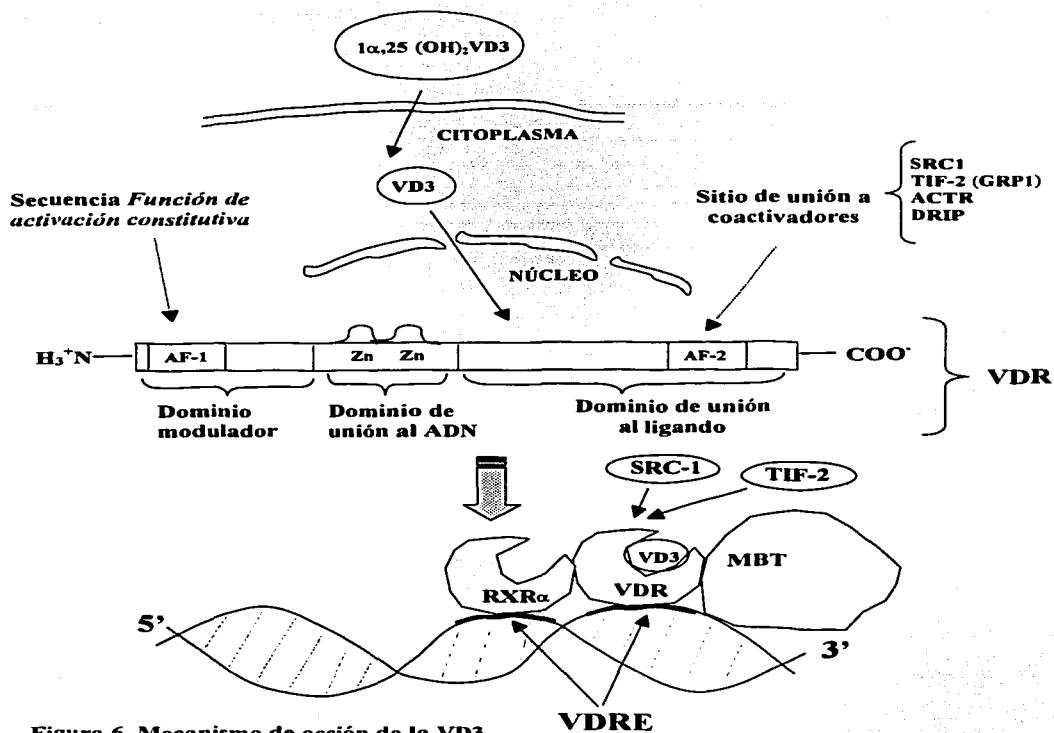


Figura 6. Mecanismo de acción de la VD3.

La VD_3 actúa a través de un receptor intracelular denominado receptor de vitamina D (VDR). Una vez que la VD_3 se une a su receptor, el VDR forma un complejo heterodimérico estable, con el receptor de retinoides (RXR). El complejo hormona receptor VD_3 -VDR/RXR se une a secuencias específicas localizadas en el promotor de diferentes genes hacia el extremo 5'; denominadas elementos de respuesta para la VD_3 (VDRE). Posteriormente se unen coactivadores o corepresores al sitio AF-2 y junto con la maquinaria basal de transcripción (MBT) se activan genes específicos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe una gran similitud estructural y funcional entre los receptores FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIA (8, 9, 93). Además de que los ligandos que reconocen son prácticamente los mismos (19), se ha demostrado que estos receptores contienen motivos ITAM en sus porciones intracelulares. Dado el papel central de los motivos ITAM en la transducción de las señales, no es sorprendente que todos estos receptores utilicen mecanismos similares de transducción de las señales, los cuales involucran fosforilación de los ITAM y activación de cinasas de residuos de tirosina de las familias Src y a la cinasa Syk (26, 29). Estas similitudes tanto en los ligandos reconocidos por ellos, como en los mecanismos bioquímicos de transducción de señales, plantean la pregunta sobre el significado biológico de la existencia de tal diversidad de receptores.

Nuestra hipótesis de trabajo es que cada uno de estos receptores no está invariablemente acoplado a las mismas vías bioquímicas de transducción de señales, sino que la naturaleza misma del mecanismo de transducción permite una cierta plasticidad a los receptores para acoplarse a vías diferentes en circunstancias diferentes. Esta hipótesis surge de la consideración de que al momento de la activación existen en el entorno un conjunto de interacciones o señales coestimuladoras que posiblemente participen, coadyuven o modulen la inducción de señales al interior de la célula.

De acuerdo a esta hipótesis, la composición de los complejos de transducción de señales ensamblados a partir de los ITAM fosforilados puede ser diferente dependiendo de factores como el estado funcional de la célula y/o la estimulación previa o simultánea a través de estos receptores.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La propuesta de que las vías de transducción de señales que se activan dependen del estado funcional de la célula, está basado en que *in vivo*, la capacidad de un dominio SH-2 de una proteína para unirse a una fosfoproteína particular (en este caso a los ITAMs fosforilados) puede depender de la concentración local de proteínas que poseen dicho dominio y tengan la capacidad potencial para participar en la señalización por estos receptores. Cabe recordar que las interacciones entre los motivos ITAM fosforilados y proteínas con dominios SH-2 no son absolutas: en células deficientes de una cinasa de la familia Src, otros miembros de la familia pueden sustituirlas. Se ha demostrado la asociación al FcγRIIA de por lo menos tres diferentes cinasas (94). Esta promiscuidad en las interacciones de los ITAM con cinasas de la familia Src, da al sistema cierta plasticidad, permitiendo al mismo receptor acoplarse a distintas vías de activación. Ejemplos recientemente publicados de estos son los trabajos reportados por C. González y J. Rivera, donde Lyn y Fyn parecen activar vías diferentes dependiendo del nivel de expresión de distintas proteínas capaces de asociarse en el complejo de transducción. Así, estímulos como citocinas y hormonas, al afectar los niveles de expresión de ciertas proteínas, pueden modular indirectamente la activación a través de los FcγRs.

Se sabe que las funciones efectoras mediadas por los receptores FcγR en células del linaje monocito/macrófago pueden ser moduladas positivamente por diversos estímulos como el interferón gamma (INFγ) y el LPS. El aumento en la intensidad de las respuestas no puede explicarse únicamente con base en el incremento del número de receptores que expresa la célula, ya que es posible que también intervengan otras proteínas cuya expresión es modulada por los agentes activadores.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por otro lado, un aspecto de los mecanismos de transducción de señales por receptores de membrana que recientemente ha recibido una atención considerable es la posibilidad de que la activación a través de un receptor particular sea modulada por activación simultánea de otro receptor, sobre todo al ser cada vez más evidente que receptores distintos utilizan vías de activación similares.

Aunque el mecanismo de transducción de señales por el CR3 no se conoce completamente, se ha demostrado que la activación de este receptor induce la activación de la cinasa Syk (26, 29), la cual es esencial en la transducción de señales por los receptores FcγRI y FcγRII. Además se ha postulado que la interacción entre el CR3 y el FcγRIIIB ocurre a nivel de los dominios extracelulares, por lo que en vista de la alta homología en los dominios extracelulares entre los distintos receptores FcγR, es posible que receptores FcγRs distintos del FcγRIIIB interactúen con el CR3 de una manera similar.

Los antecedentes descritos anteriormente sobre la participación de Syk en la diferenciación celular (70-73, 75), el papel imprescindible de la cinasa Syk para la señalización a través de los FcγRs (26, 28, 29), la identificación de Syk en la vía de señalización utilizada por las integrinas β₂ (76) en células monocíticas (77) y la existencia de una cooperación funcional entre los FcγRs y el CR3 (58-62), nos llevan a preguntarnos si la activación de Syk durante la fagocitosis de microorganismos o partículas cubiertas con diferentes opsoninas (anticuerpos IgG y/o fragmentos del complemento como C3bi) es igual en células monocíticas en distintos estados de diferenciación/maduración.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS

La activación de proteínas involucradas en la señalización de monocitos mediada por los receptores FcγRs y CR3 es modulada por el grado de diferenciación celular.

OBJETIVOS:

Objetivo general

Conocer si la agregación de los receptores FcγRI, FcγRII y CR3 durante la diferenciación celular modulan el estado de activación de la proteína cinasa Syk.

Objetivos particulares

1. Determinar el nivel de fosforilación y el estado de activación de la proteína cinasa Syk al estimular células monocíticas THP-1 a través de los receptores FcγRI, FcγRII o CR3.
2. Determinar si la *estimulación simultánea (heteroagregación)* de los receptores FcγRI, FcγRII en células monocíticas THP-1 inducen diferencias en el nivel de fosforilación y activación de la proteína cinasa Syk.
3. Determinar si en *células diferenciadas* la estimulación simultánea de los receptores FcγRI, FcγRII o individual del CR3 inducen diferencias en el nivel de fosforilación y activación de la proteína cinasa Syk.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIALES y MÉTODOS

Reactivos y anticuerpos

El suero fetal bovino (SFB) y las perlas de proteína A-sefarosa fueron comprados a GIBCO (Grand Island, NY). La Vitamina D3 [$1\alpha,25$ -dihidroxi-vitamina D₃ ($1\alpha, 25$ -(OH)₂ D₃)], se compró a CALBIOCHEM (La Jolla, CA). La albúmina de suero bovino (BSA) a Sigma (St. Louis, MO). Los anticuerpos monoclonales anti Fc γ RI (32.2) y anti Fc γ RII (IV.3) humano fueron purificados en nuestro laboratorio a partir de sobrenadantes de los hibridomas correspondientes obtenidos de la ATCC. Los fragmentos Fab fueron preparados de estos anticuerpos utilizando el estuche de reactivos Immunopure® IgG1 Fab y F(ab)₂ (para el 32.2) o el Immobilized Pepsin (para el IV.3), ambos comprados a Pierce. Los anticuerpos anti Syk (SC-573), anti PTP1 (SC-287), anti fosfotirosina PY-20 (SC-508) y anti fosfotirosina conjugado con peroxidasa PY-20-HRP (SC-508-HRP) a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los fragmentos F(ab)₂ de cabra anti IgG de ratón (62-6120) fueron comprados a ZYMED y el anti IgG conjugado con peroxidasa (IgG-HRP) (115-006-072) a Jackson Immuno Research. El anticuerpo monoclonal anti CD11b (2LPM19c-M 0747) se le compró a DAKO Corporation (Carpinteria, CA). Los anticuerpos monoclonales anti DNP 2C5 (IgG₁) y 4F8 (IgG_{2b}) utilizados como controles de isotipo para la citofluorometría, fueron producidos en nuestro laboratorio de los cultivos de sobrenadantes de los hibridomas correspondientes. La proteína básica de la mielina (MBP) fue amablemente donada por la Dra. Janet Oliver de la Universidad de Nuevo México (New Mexico-Albuquerque). El ATP- γ -P³² para los ensayos de cinasa se obtuvo de New England Nuclear (Newton, Massachusetts).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los reactivos para el aislamiento del ARNm y el RT-PCR fueron comprados a GIBCO-BRL, Inc. (Gaithersburg, MD) y Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO). La enzima polimerasa de ADN (Taq) a Perkin-Elmer (Branchburg, NJ).

Citometría de Flujo

Una suspensión de 0.5×10^6 /mL de células THP-1 en PBS, con SFB al 5% y 0.01% de azida de sodio, fue incubada durante 90 min con 10 μ g de los anticuerpos anti Fc γ RI (32.2), anti Fc γ RII (IV.3), anti CD11b/CR3 (2LPM19c), anti DNP IgG₁ (2C5) o IgG_{2b} (4F8) a 4°C. Después de lavarlas lavadas con PBS, se incubaron nuevamente con 0.45 μ g/mL del anticuerpo anti IgG de ratón, conjugado con FITC por 90 min a 4°C, se lavaron, posteriormente fueron fijadas en paraformaldehído al 0.3% por 30 min y lavadas con PBS nuevamente. Las células teñidas fueron analizadas en el citómetro de flujo (FACscan cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA).

Cultivo Celular y diferenciación *in vitro*

La línea celular THP-1 fue obtenida de la ATCC y mantenida en nuestro laboratorio en medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO-BRL) (Grand Island, NY), suplementado con 10% (V/V) de SFB inactivado por calor, 100 mM de piruvato de sodio con medio esencial mínimo (MEM) en solución, 2 mM de aminoácidos no esenciales-MEM, 0.1 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina. Los cultivos fueron mantenidos en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5% a 37°C. La diferenciación fue inducida cultivando a las células THP-1 (3×10^6 células/mL) en presencia de 100 nM de 1 α , 25-(OH)₂ D₃ por 72 h. La diferenciación celular fue determinada por cambios en la morfología celular, el incremento en la expresión del receptor tipo 3 del complemento (CR3) en la membrana y la fagocitosis mediada por receptores Fc γ R.

Estimulación celular e Inmunoprecipitación

Una suspensión de 1×10^7 células THP-1/mL fueron mantenidas en medio RPMI 1640 sin SFB por 10 min a 4°C, posteriormente fueron incubadas con 10 µg/mL de fragmentos de los anticuerpos monoclonales anti receptores FcγRs y/o anti CR3 en hielo. La suspensión celular fue centrifugada a 15,000 x g por 1 min a 4°C, y el sobrenadante fue desechado. Posteriormente, y con el objetivo de inducir la agregación de los FcγRs y/o del CR3, las células fueron resuspendidas en 1 mL de medio fresco e incubada por 3 min a 37°C con 10 µg/mL de fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos anti IgG de ratón. La estimulación fue detenida con 500 µL de amortiguador-salino con TRIS (TBS) frío y el pellet celular fue obtenido por centrifugación. El sobrenadante fue desechado y las células fueron lisadas con 1 mL de amortiguador-salino con TRIS de lisis [Tritón X-100 al 1%, 50 mM de TrisHCL a pH 7.4, 150 mM de NaCl, 5mM de EDTA, 1mM de Na₃VO₄, 1 mM de fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF), 1 µg/mL de pepstatina A, leupeptina y aprotinina y 10 mM de NaF] y mantenidas en hielo durante 15 min. Los lisados fueron clarificados por centrifugación a 15000 x g por 15 min a 4°C.

Para la inmunoprecipitación, los lisados anteriores fueron incubados por un periodo de 3 h a 4°C con los anticuerpos anti Syk que previamente habían sido unidos a las perlas de proteína A sefárosa. Los inmunoprecipitados fueron entonces lavados 3 veces con amortiguador-salino con TRIS de lavado (idéntica composición al amortiguador-salino con TRIS de lisis pero con una concentración de Tritón del 0.1%) y utilizados para los ensayos de cinasa *in vitro* o para electroforesis (SDS-PAGE al 10%) para posteriormente realizar la electrotransferencia e inmuno-detección específica en membranas de nitrocelulosa (blots).

TESIS CON
FALLA DE CRIDEN

Donde se indica, las células fueron incubadas antes de la estimulación en presencia de 100 μM de pervanadato por 15 min a 37°C. El pervanadato fue generado mezclando 1 mL de 20 mM de Na_3VO_4 con 330 μL de H_2O_2 al 30% e incubandolos por 5 min a temperatura ambiente, obteniendo una solución final de 6 mM de pervanadato.

Inmunodetección (blots)

Los inmunoprecipitados o lisados celulares totales fueron separados mediante electroforesis (SDS-PAGE al 10%) y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Estas membranas fueron bloqueadas con BSA al 1% y leche en polvo descremada con bajo contenido de sales al 3% diluida en TBS-Tween 20 (TBS-T) [10 mM de Trisi-HCL (pH 7.4), 100 mM de NaCl, Tween 20 al 0.1%] durante toda la noche a 4°C. Esto fue seguido por la incubación con los anticuerpos primarios: anti fosfotirosina (PY-20), anti Syk o anti SHP-1 en TBS-T/ BSA al 1% a temperatura ambiente durante 90 min. Después de lavar las membranas, estas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP) en TBS-T por 1 h a temperatura ambiente. Para la detección de la señal por quimioluminiscencia (ECL), los blots fueron tratados con el kit para ECL Super Signal (Pierce) (Eugene, OR) de acuerdo a las instrucciones de la hoja técnica y expuestos a las películas de rayos X. Las imágenes digitalizadas de las películas fotográficas utilizadas para capturar las señales de quimioluminiscencia fueron obtenidas con el Gel-Doc System (Bio-Rad) (Hercules, CA) y analizadas con el programa Quantity One de Bio-Rad. Donde se indica, las membranas fueron tratadas con 0.1 M de glicina (pH 2.5) por 1 h a 60°C con el objetivo de eliminar los anticuerpos previamente unidos ("stripping") e incubadas nuevamente con un anticuerpo primario diferente. Después de lavar las membranas, estas fueron bloqueadas (BSA al 1% y leche en polvo descremada con bajo contenido de sales al 3% en TBS-T) durante toda la

noche a 4°C e incubadas con anticuerpos primarios y secundarios y procesadas como fue descrito anteriormente.

Ensayos de cinasa *in vitro*

Los inmunoprecipitados obtenidos como se describió anteriormente, fueron incubados en 50 µL de solución amortiguadora de cinasa [50 mM de hidróxido de sodio-HEPES (pH 8.0), 10 mM de Na₃VO₄, 50 mM de acetato de magnesio, 150 mM de NaCl, 10 µCi de ATP-γ-³²P y 2.5 µg/mL de MBP] por 10 min a 37°C. El sobrenadante se recolectó para electroforesis.

Los inmunoprecipitados se lavaron por separado 3 veces con 1 mL de buffer de cinasa (sin ATP-γ-³²P). Posteriormente, los inmunoprecipitados y el sobrenadante del ensayo de cinasa fueron hervidos en solución amortiguadora de muestra (SDS-PAGE) y sometidos a electroforesis (SDS-PAGE al 12.5%). Los geles una vez secos fueron expuestos a -70°C para visualizar por autoradiografía las bandas en las películas de rayos X (Kodak).

Ensayo de fagocitosis

Eritrocitos de carnero obtenidos comercialmente fueron mantenidos en solución de Alsever: dextrosa (2.05 %), citrato de sodio (0.8 %), NaCl (0.42 %), ácido cítrico (0.055%), agua destilada (100.0 %) a 4°C hasta el momento de ser utilizados. Posteriormente, fueron lavados con DGVB⁺ y sensibilizados con ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfónico (TNBS) (Sodium salt, Kodak). Un mL de eritrocitos de carnero sensibilizados y empaquetados fueron incubados por 10 min a temperatura ambiente con 12.44 mg de TNBS en 7 mL de solución amortiguadora de borato en agitación suave y protegidos de la luz. Los eritrocitos fueron lavados dos veces con DGVB⁺ y una vez con medio RPMI sin suero fetal bovino. Se adicionaron 55 µl de una suspensión de eritrocitos de carnero al 2% en RPMI a cada pocillo

de una placa de ELISA de 96 pozos con fondo en V que contenía 100 µl de una dilución (1:2) del anticuerpo anti-DNP 4F8. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 90 min. El título de hemaglutinación fue expresado como la concentración más baja de anticuerpo monoclonal anti-DNP 4F8 que produjo aglutinación visible. La opsonización de eritrocitos de carnero con IgG anti-DNP fue llevada a cabo incubando una suspensión al 1% de eritrocitos de carnero en RPMI con una dilución sub-hemaglutinante de IgG anti-DNP a temperatura ambiente por 60 min. Los anticuerpos no unidos fueron eliminados por centrifugación. Para el ensayo de fagocitosis, se incubaron 320 µl de una suspensión de células THP-1 a una concentración de 1×10^6 /mL con 60 µl de eritrocitos de carnero opsonizados o no opsonizados con anticuerpos anti-DNP por 2 h a 37°C, en incubadora con ambiente húmedo y 5% de CO₂. Posteriormente, las células fueron lavadas tres veces con PBS para eliminar los eritrocitos no unidos. Los eritrocitos no internalizados fueron lisados con PBS al 0.2% por 30 segundos. Los ensayos de fagocitosis fueron realizados por triplicado. La ingestión de eritrocitos por células THP-1 fue examinada utilizando un microscopio de luz. Los resultados se expresan como el índice fagocítico (número de eritrocitos ingeridos por cada 100 células)

Aislamiento de ARN, transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El ARN total de células THP-1 fue aislado por el método de un solo paso, basado en la extracción con isocianato de guanidina/fenol/cloroformo utilizando TRIzol (Gibco-BRL, Grand Island, NY) (95). La concentración de RNA fue determinada por absorbancia a 260 nm y su integridad fue verificada por electroforesis en geles desnaturizantes de agarosa al 1.1% en presencia de 2.2 M de formaldehído. El RNA total fue transcrito de manera reversa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(RT) para sintetizar una cadena sencilla de ADN complementario (ADNc) (96). Diez μL de la reacción de RT fueron sometidos a PCR con el objetivo de amplificar simultáneamente los genes $\text{Fc}\gamma\text{RI}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIC}$ y actina β . El ARN mensajero del gen de la actina β fue utilizado como un control interno en el proceso de RT-PCR. La secuencia de los oligonucleótidos (templados) específicos utilizados para la amplificación se muestran en la **Tabla 3**. Los 50 μL de la reacción de PCR incluyeron: 10 μL de ADNc previamente sintetizado y 40 μL de una mezcla que contenía 20 mM de Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM de KCL, 1 mM de MgCl_2 , 0.2 mM de cada nucleótido (dNTP), 0.5 μM de cada templado y 2.5 unidades de la enzima polimerasa de ADN Taq. En todos los experimentos se incluyeron controles negativos sin ARN y con ARN no transcrito. Después del paso inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min, se llevaron a cabo 30 ciclos de reacción de PCR. El perfil de los ciclos de amplificación para todos los genes fue de 95°C/1 min, 60°C/1 min y 72°C/1 min. El ciclo final de extensión fue realizado a 72°C por 5 min. El número de ciclos realizados estuvo dentro de la fase exponencial del proceso de amplificación. El producto de los PCR (25 μL) fueron separados en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio. La imagen fue capturada con un transiluminador de luz ultravioleta (UV) y revelada en una placa tipo 665 (Polaroid Co., Cambridge, MA). En cada experimento, la amplificación y el análisis de los productos de cada gen fueron llevados a cabo en paralelo. Las imágenes fueron capturadas con un scanner (Scan Jet 3C, Hewlett-Packard) y la intensidad de cada banda fue cuantificada utilizando el programa Scion Image (Scand Primax 600p, Colorado). Los niveles de expresión de los $\text{Fc}\gamma\text{RI}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ y $\text{Fc}\gamma\text{RIIC}$ fueron normalizados con respecto al nivel de expresión de la actina β .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, seguido por la prueba de Student's. El programa Prisma 2.01 (Graph Pad, CA) fue utilizado para calcular los valores de probabilidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 3. Secuencias de oligonucleótidos (templados) específicos

| Receptor | S: sentido AS: antisentido | Secuencia |
|--|---------------------------------------|---|
| FcγR I | S AS | 5'TGAATACAGGGTGCCAGAGAG 3' 3'AGAAGTAAAGCTTGCAAACCA 5' |
| FcγR IIA | S AS | 5' CACGCTGTTCTCATCCAAG 3' 3' ATCCCCCTCTTTTGTGCATCC 5' |
| FcγR IIB₁ FcγR IIB₂ | S AS | 5' ACAACAATGACAGCGGGGA 3' 3' GGTGCATGAGAAGTGAATAG 5' |
| FcγR IIC | S AS | 5' TCCATCCCACAAGCAAACCA 3' 3' TTTATCATCGTCAGTAGGTGC 5' |

RESULTADOS

1. Cambios en el nivel de expresión en membrana de los receptores FcγRI, FcγRII, FcγRIIIA y CR3 antes y después del tratamiento con VD3.

Para caracterizar los cambios inducidos por la diferenciación *in vitro* con VD3, decidimos primeramente examinar los cambios en el nivel de expresión en membrana de los receptores FcγRI, FcγRII, FcγRIII y CR3 en los monocitos THP-1 antes y después del tratamiento con VD3. Las células THP-1 en medio RPMI 1640 con SFB al 10% fueron incubadas con VD3 (100nM) por 72 h. La expresión de los receptores FcγRI, FcγRII, FcγRIII y CR3 fue evaluada por citofluorometría utilizando los anticuerpos 32.2, IV.3, 3G8 y 2LMP19c específicos para los receptores FcγRI, FcγRII, FcγRIII y CR3, respectivamente. Encontramos que en las células no tratadas los receptores FcγRI y FcγRII se expresan en niveles similares (valores de IRF entre $\sim 10^2$ y $\sim 10^2$) (Fig. 7A, B), mientras que el FcγRIIIA no se expresa de manera constitutiva en estas células (Fig. 7D). El tratamiento con VD3 por 72 h no altera de manera significativa la expresión en membrana de ninguno de estos receptores (Fig. 7A, B, D). Sin embargo, el tratamiento con VD3 aumenta significativamente y dependiente del tiempo el nivel de expresión en la membrana de CR3 (valores de IRF de $\sim 2 \times 10^2$ en células sin tratar a $\sim 7 \times 10^2$ en células tratadas con VD3) (Fig. 7C). Otros cambios morfológicos evidentes tales como la adherencia de las células al plástico también se pueden apreciar después de tratar a las células con VD3 (Fig. 7E).

2. Fosforilación de Syk inducida por el entrecruzamiento individual (homoagregación) de los receptores FcγRI y FcγRII.

La activación de la cinasa Syk es un paso crucial en la cascada bioquímica de señalización iniciada por el entrecruzamiento de los FcγRs. Por lo tanto, examinamos el nivel de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

fosforilación de Syk después de entrecruzar los receptores FcγRI y FcγRII de manera individual con anticuerpos monoclonales anti-receptores. Comparamos el nivel de fosforilación de Syk inducido por la estimulación de los monocitos THP-1 a través de los FcγRI y FcγRII con diferentes concentraciones de fragmentos Fab de los anticuerpos anti FcγRI y anti FcγRII suficientes para saturar a cada uno de los receptores, seguidas por el entrecruzamiento con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos anti IgG de conejo como segundo anticuerpo entrecruzante. Después de la estimulación por los tiempos indicados, las células fueron lisadas, Syk fue inmunoprecipitada con anticuerpos anti Syk de cantidades equivalentes de proteínas de los lisados y los niveles de fosforilación de Syk fueron determinados mediante inmunoblots anti fosfotirosina. Los resultados de la figura 8A y B muestran que 10 μg de los fragmentos Fab de los anticuerpos primarios (anti FcγRI y anti FcγRII) y de los anticuerpos secundarios (fragmentos F(ab)₂ anti IgG) y 3 min de estimulación son las condiciones a las cuales se obtiene el nivel máximo de fosforilación de Syk (Fig. 8A) y del total de las proteínas que se fosforilan en residuos de tirosina después del entrecruzamiento de los receptores FcγRI y FcγRII. Encontramos también que el entrecruzamiento del FcγRII induce niveles más altos de fosforilación de Syk que el entrecruzamiento del FcγRI (Fig. 9A). Las diferencias encontradas en el nivel de fosforilación de Syk en la figura 9A, no obedecieron a diferencias en la cantidad de Syk que fue inmunoprecipitada, ya que las membranas fueron tratadas e incubadas nuevamente con anticuerpos anti Syk para detectar la cantidad de Syk presente en cada carril (Fig. 9B). La figura 9C muestra la relación obtenida de la señal del inmunoblot anti fosfotirosina entre la señal del inmunoblot anti Syk para cada condición.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Efecto de la diferenciación con VD3 en el nivel de fosforilación de Syk, inducido por el entrecruzamiento individual y simultáneo (homo y heteroagregación) de los FcγRI y FcγRII.

Se ha observado que la actividad de Syk puede ser modulada por la diferenciación. Un aumento de su actividad ha sido detectado en células monocíticas HL-60 inducidas a diferenciación *in vitro*. Para determinar si el tratamiento con VD3 afecta los niveles de fosforilación de Syk inducidos por la estimulación a través de los FcγRI y FcγRII, comparamos si el tratamiento con VD3 (100 nM) por 72 h afecta la fosforilación de Syk en células THP-1 estimuladas a través de los FcγRI y FcγRII. Examinamos primero si el tratamiento con la VD3 afecta la cantidad de Syk presente en estas células. Para esto realizamos inmunoblots anti Syk a partir de lisados totales de células no tratadas y tratadas con VD3. Los resultados mostraron un incremento (de aproximadamente 3 veces) en los niveles de Syk dependiente del tiempo, en las células THP-1 tratadas con VD3 (Fig. 10).

Posteriormente, procedimos a examinar la fosforilación de Syk después del entrecruzamiento de los FcγRI y FcγRII. En células no tratadas, el entrecruzamiento del FcγRII induce un nivel de fosforilación mayor que el se observa después del entrecruzamiento del FcγRI (Fig. 8). El entrecruzamiento simultáneo de ambos receptores, induce niveles similares de fosforilación a los inducidos por el entrecruzamiento del FcγRII de forma individual (Fig. 11A, carriles 3 y 4). En los inmunoprecipitados anti Syk de células tratadas con VD3, el tratamiento induce un incremento en los niveles basales de fosforilación de Syk (Fig. 11A, carril 5), mientras que el entrecruzamiento del FcγRI induce solo un ligero incremento de esta fosforilación (Fig. 11A, carril 6). Sorprendentemente, después del entrecruzamiento del FcγRII el nivel de fosforilación de Syk disminuyó de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

forma significativa comparado con el observado en las células no estimuladas y tratadas con VD3 (Fig. 11A, carril 7). En ese mismo experimento el entrecruzamiento simultáneo de ambos receptores FcγRI y FcγRII resultó en un mayor nivel de fosforilación de Syk que el observado por el FcγRII de forma individual en estas células tratadas con VD3 (Fig. 11A, carril 8).

Hasta aquí podemos resumir como los principales hallazgos; i) el tratamiento con VD3 no altera el nivel de expresión en membrana de los receptores FcγRI y FcγRII, sin embargo incrementa significativamente los niveles de CR3, ii) el entrecruzamiento del FcγRII induce niveles de fosforilación de Syk mayores que los detectados después del entrecruzamiento del FcγRI, iii) el tratamiento con VD3 induce un aumento de la fosforilación basal de Syk y iv) en células tratadas con VD3, el entrecruzamiento del FcγRII induce una disminución del nivel de fosforilación de Syk.

Finalmente, y con el objetivo de conocer si existía una correlación entre los cambios en el nivel de fosforilación de Syk y su actividad enzimática, examinamos el nivel de activación de Syk, determinando su actividad de cinasa *in vitro* sobre un sustrato exógeno (MBP), tanto en las células no tratadas como en las tratadas con VD3. Observamos que en las células no tratadas, el entrecruzamiento del FcγRII induce mayores niveles de activación de Syk que el entrecruzamiento del FcγRI o de ambos receptores FcγRI y FcγRII (Fig. 12, carril 2). En las células tratadas y no estimuladas, los niveles de activación basal de Syk fueron mayores que los de las células no tratadas. En estas células, la estimulación a través del entrecruzamiento del FcγRII indujo niveles de activación de Syk menores que los niveles basales de fosforilación detectados en las células no estimuladas (Fig. 12, carriles 5-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8), después del entrecruzamiento del Fc γ RI (Fig. 12, carril 6) o después del entrecruzamiento de ambos receptores Fc γ RI y Fc γ RII (Fig. 12, carril 8).

Por lo tanto, mientras en células THP-1 no diferenciadas ambos receptores Fc γ RI y Fc γ RII inducen fosforilación y activación de Syk, después de la diferenciación inducida por la VD3, la respuesta a la estimulación por el Fc γ RI o el Fc γ RII es significativamente diferente. Mientras que la estimulación a través del Fc γ RI induce niveles de fosforilación y activación de Syk moderadamente mayores que los niveles observados en las células diferenciadas pero no estimuladas, el entrecruzamiento del Fc γ RII induce una disminución importante de dicha fosforilación y activación, comparada igualmente con la de las células diferenciadas pero no estimuladas.

4. La fagocitosis mediada por los Fc γ Rs disminuye en las células THP-1 tratadas con VD3.

Para determinar si la diferenciación con VD3 afecta una de las funciones biológicas mediada por los receptores Fc γ R, evaluamos la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG llevada a cabo por las células THP-1 después del tratamiento con VD3 por 0, 24, 48 y 72 h. El tratamiento con VD3 disminuyó la fagocitosis de células THP-1 en una manera dependiente del tiempo de tratamiento, alcanzando una inhibición de aproximadamente un 35% después de 72 h de tratamiento (Fig. 13).

5. El tratamiento con pervanadato recupera la fosforilación de Syk inducida por el entrecruzamiento del Fc γ RII en las células diferenciadas con VD3.

Como describimos anteriormente, el entrecruzamiento del Fc γ RII en las células tratadas con VD3, resulta en una disminución en el nivel de fosforilación y activación de Syk. Este decremento en su estado de activación, puede ser debido a la activación de una proteína con

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

actividad de fosfatasa de residuos de tirosina, que durante la estimulación de las células diferenciadas a través del FcγRII se active y por lo tanto regule negativamente la activación de Syk. Determinamos entonces el efecto de un inhibidor general de fosfatasas (pervanadato de sodio) sobre este fenómeno. Células no tratadas o tratadas con VD3 fueron incubadas durante 15 min con el inhibidor antes de la estimulación celular a través de los receptores FcγRI y FcγRII. Después de la estimulación, Syk fue inmunoprecipitada y analizada por inmunoblots anti fosfotirosina como fue descrito anteriormente.

En las células tratadas con VD3, el pretratamiento con el inhibidor de fosfatasas previene el decremento en el nivel de fosforilación de Syk observado previamente al estimular las células a través del FcγRII (Fig. 14A, carril 7). La relación de la señal del inmunoblot anti fosfotirosina entre la señal del inmunoblot anti Syk se presenta como el promedio \pm ES de 3 experimentos (Fig. 14B). Con el objetivo de demostrar que el decremento en el nivel de fosforilación de Syk, observado previamente al estimular las células tratadas con VD3 a través del FcγRII es prevenido con el tratamiento con pervanadato presentamos en el mismo experimento a las células diferenciadas con VD3 no tratadas y tratadas con pervanadato y estimuladas a través del receptor FcγRII. Es claro que la fosforilación se recupera después de inhibir globalmente a las fosfatasas (Fig. 14C).

6. La proteína fosfatasa de tirosina SHP-1 se asocia con Syk, la asociación se pierde con el entrecruzamiento del FcγRII y se estabiliza con el tratamiento con VD3.

Existen evidencias de que la fosfatasa de residuos de tirosina SHP-1 interactúa directamente con ZAP-70 en linfocitos T y se relaciona con la regulación negativa de su actividad catalítica (Plas et al., 1996). Por otro lado, se ha reportado una asociación física entre SHP-1 y Syk y que Syk es sustrato de SHP-1 (Dustin et al., 1999). Experimentos de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

inmunoblots encaminados a demostrar si el tratamiento con VD3 afecta la expresión de la fosfatasa SHP-1 en células THP-1 demostraron que la expresión de SHP-1 no se afecta con el tratamiento (Fig. 15A). Con el objetivo de examinar la probable asociación Syk/SHP-1 en células THP-1 no tratadas y tratadas con VD3, determinamos la presencia de SHP-1 en inmunoprecipitados anti Syk. En células THP-1 no estimuladas, hay un cierto grado de coinmunoprecipitación de SHP-1 con Syk (Fig.15B, carril 1). Después del entrecruzamiento del FcγRII, la asociación se reduce de manera significativa (Fig. 15B, carril 2). El tratamiento de las células con VD3 por 72 h disminuye ligeramente el nivel basal de asociación de ambas moléculas (Fig.15C, carril 3). Sin embargo, después del entrecruzamiento del FcγRII, no solo la asociación se mantiene, sino que una cantidad mayor de SHP-1 es coinmunoprecipitada con Syk (Fig. 15B, carril 3 y 15C carril 4). El grado de asociación entre SHP-1 y Syk en células estimuladas a través del FcγRII, parece correlacionar de manera inversa con el nivel de fosforilación de Syk, es decir, en células no tratadas el entrecruzamiento del FcγRII resulta en un alto nivel de fosforilación de Syk (con una muy pequeña asociación con SHP-1), mientras que en las células tratadas con VD3 el nivel de fosforilación de Syk es bajo y su asociación con SHP-1 aumenta (Fig. 15B).

7. Cambios inducidos por el tratamiento con VD3 en el nivel de expresión del ARNm de los receptores FcγRI y FcγRII.

Los resultados descritos anteriormente demostrando que en las células THP-1 tratadas con VD3, el entrecruzamiento del FcγRII resulta en una disminución en el nivel de fosforilación de Syk, y que este efecto pudiera estar mediado por la activación de una proteína con actividad de fosfatasa de residuos de tirosina, pueden ser explicados también por el hecho de que el tratamiento con la VD3 induzca un cambio en la expresión relativa de las

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

isoformas del Fc γ RIIB vs Fc γ RIIA. Es conocido que las isoformas del Fc γ RIIB contienen secuencias ITIM en su estructura y esto le permite tener la capacidad de reclutar a la vecindad de los ITAMs fosforilados a proteínas con actividad de fosfata que contienen dominios SH-2 en su estructura (SHP-1 y SHP-2), así como a fosfatasas de lípidos de inositol (SHIP). Para examinar esta posibilidad utilizamos RT-PCR semicuantitativo para así determinar si el tratamiento con VD3 por 72 h modifica la expresión de alguna de las isoformas del Fc γ RII. Los oligonucleótidos específicos (templados) utilizados para amplificar el ADNc de las diferentes isoformas de los Fc γ RI y Fc γ RII se muestran en la Tabla 3, así como el mapa físico correspondiente a los diferentes transcritos (Fig. 16).

Un producto de la amplificación de 439 pb fue obtenido correspondiente al transcrito del Fc γ RI. No se detectaron cambios en el nivel de expresión del ARNm del Fc γ RI a ninguno de los tiempos examinados (0, 24, 48 y 72 h) (Fig. 17A). Dos productos de la amplificación por PCR, uno de 441 y de 317 pb correspondientes a los transcritos del Fc γ RIIa₁ y al Fc γ RIIa₂ fueron obtenidos. No se observaron diferencias en el nivel de expresión de los ARNm del Fc γ RIIa₁, sin embargo el producto correspondiente al ARNm de la forma soluble del Fc γ RIIa (Fc γ RIIa₂) disminuyó su expresión después de las 48 h (Fig. 17B). Con respecto al Fc γ RIIb fueron amplificados dos productos, de 582 y 520 pb correspondientes a los transcritos de los receptores Fc γ RIIb₁ y Fc γ RIIb₂ respectivamente. Las bandas de 582 y 520 pb mostraron un patrón bifásico en cuanto a su expresión después del tratamiento con la VD3: disminuyendo después de la 24 h de tratamiento y retornando a las 72 h casi al nivel observado en las células sin tratar (0h).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. Fosforilación de Syk inducida por el entrecruzamiento del CR3 antes y después del tratamiento con VD3.

Syk es una de las cinasas que se activa después que las integrinas β_2 (como el CR3) son agregadas durante el proceso de adhesión. Además se sabe que en células deficientes de Syk, la cinasa de adhesión focal Fak muestra incapacidad para activarse después de la agregación de las integrinas β_2 durante la formación de las placas de adhesión focal, esenciales en el proceso de adhesión y migración del monocito durante la inflamación. Examinamos entonces el nivel de fosforilación de Syk inducido por la estimulación del CR3 en monocitos THP-1 antes y después del tratamiento con la VD3. Encontramos que Syk se fosforila después del entrecruzamiento del CR3. Como se mostró anteriormente en los monocitos inducidos a diferenciación con VD3, se observa un incremento significativo y dependiente del tiempo de tratamiento en la expresión en membrana del CR3 (Fig. 18A). En estas mismas células detectamos que el nivel de fosforilación de Syk después del entrecruzamiento del CR3 disminuye comparado con el observado en las células no estimuladas y tratadas con la VD3 (Fig. 18B), teniendo un comportamiento similar al observado después del entrecruzamiento del Fc γ RII en células tratadas con VD3. Examinamos también el nivel de activación de Syk, determinando su actividad de cinasa *in vitro* sobre la MBP, tanto en las células no tratadas como en las tratadas con VD3. Observamos que en las células no tratadas, el entrecruzamiento del CR3 induce activación de Syk, mientras que en las células tratadas y estimuladas a través del entrecruzamiento del CR3, los niveles de activación de Syk disminuyeron (Fig 18C).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9. La proteína fosfatasa de tirosina SHP-1 se asocia con Syk, la asociación se pierde con el entrecruzamiento del CR3 y se estabiliza con el tratamiento con VD3.

Con las evidencias observadas anteriormente sobre la asociación de Syk con la fosfatasa de residuos de tirosina SHP-1 y de considerar la posibilidad de que SHP-1 es la encargada de regular el nivel de fosforilación y activación de Syk durante la diferenciación de los monocitos THP-1, nos enfocamos en determinar si los cambios en la asociación Syk/SHP-1 también ocurren en las células diferenciadas y estimuladas a través del CR3.

Inicialmente tratamos a las células con un inhibidor de fosfatasa (pervanadato de sodio), y encontramos que en células tratadas con VD3 y estimuladas a través del CR3 la fosforilación de Syk se recupera de manera significativa (Fig. 19A).

Como se observó anteriormente la cinasa Syk se asocia a la fosfatasa SHP-1 de manera constitutiva en los monocitos THP-1. El entrecruzamiento del receptor CR3 induce una disminución en el nivel de SHP-1 asociada a los inmunoprecipitados de Syk. En las células inducidas a diferenciación, encontramos que se da una recuperación parcial de la asociación inducida por el tratamiento con la VD3. Sin embargo, al estimular a las células tratadas la asociación Syk/SHP-1 tiende a recuperarse (Fig. 20).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Los receptores FcγRs participan en una amplia variedad de funciones de gran importancia para los mecanismos de defensa. Entre estas funciones efectoras se destacan la fagocitosis de microorganismos patógenos y la eliminación de inmocomplejos de la circulación. Por otro lado, estos receptores sirven de puente para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de células tumorales o infectadas por virus y a través de ellos, distintas células son inducidas a liberar factores con actividad proinflamatoria e inmunomoduladora como citocinas, quimiocinas y moléculas con actividad microbicida. También están involucrados en la modulación del nivel de expresión de proteínas relacionadas con la adhesión célula-célula y la presentación de antígenos (7). Existe una gran similitud estructural y funcional entre los receptores FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIA (8, 9, 93). Además de que los ligandos que reconocen, son prácticamente los mismos (19), se ha demostrado que estos receptores contienen motivos ITAM en sus porciones intracelulares. Dado el papel central de los motivos ITAM en la transducción de las señales, no es sorprendente que todos estos receptores utilicen mecanismos similares de transducción de las señales, los cuales involucran fosforilación de los ITAM y activación de cinasas de residuos de tirosina de las familias Src así como de la cinasa Syk (26, 29).

Varios tipos de opsoninas han sido descritas, los anticuerpos y los fragmentos derivados del complemento son dos de las opsoninas más importantes involucradas en la fagocitosis. En situaciones *in vivo* es probable que un microorganismo o partícula esté cubierto por diferentes tipos de opsoninas, o que el complejo inmune dirigido contra el microorganismo este formado por varios isotipos de anticuerpos de IgG.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El receptor tipo 3 del complemento, CR3 se ha visto involucrado en la agregación homotípica (reconociendo estructuras aún no completamente identificadas en el contrareceptor celular), en la adherencia celular a células endoteliales activadas (vía ICAM-1), y a la matriz extracelular a través de proteínas como fibrinógeno y el factor X de la coagulación. Este receptor de la familia de las integrinas beta 2, también es capaz de mediar fagocitosis de partículas opsonizadas con C3bi, su ligando principal, y es un colaborador importante de los FcγRs en la fagocitosis.

Muchas evidencias han sido descritas demostrando la cooperación funcional entre los receptores FcγRs y el CR3 (58-62). Otras han identificado a la cinasa de tirosina Syk como imprescindible para la señalización a través de los FcγRs (26, 28, 29) y en la vía de señalización utilizada por las integrinas en células monocíticas (76, 77). Aunque el mecanismo de transducción de señales por el CR3 no se conoce completamente, se ha demostrado que la activación de este receptor induce la activación de la cinasa Syk (26, 29), la cual es esencial en la transducción de señales por los receptores FcγRI y FcγRII. Se ha postulado que la interacción entre el CR3 y el FcγRIIIB ocurre a nivel de los dominios extracelulares, por lo que en vista a la alta homología en los dominios extracelulares de los distintos receptores FcγR, es posible que otros receptores FcγRs interactúen con el CR3 de una manera similar.

Los antecedentes anteriores aunados a la participación de Syk en la diferenciación (70-73, 75) de células del linaje mielóide, nos llevaron a investigar como es modulada la activación de Syk durante la fagocitosis de microorganismos o partículas opsonizadas con anticuerpos IgG o fragmentos del complemento como C3bi, en un modelo *in vitro* del proceso de diferenciación de células del linaje monocito/macrófago. *In vivo*, este proceso ocurre en el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

trayecto del monocito desde sangre periférica al tejido periférico en el cual se diferencia y madura a un fenotipo macrófago, producto del estímulo de diferentes citocinas que pueden estar presentes en ese entorno.

Nuestra hipótesis de trabajo por lo tanto fue que la diferenciación celular y la agregación individual de los FcγRs y entre ellos (FcγRI y FcγRII) o la agregación del receptor tipo 3 del complemento (CR3), modulan el grado de activación de proteínas involucradas en la señalización. El metabolito 1α,25-dihidroxitamina D3 (VD3) ha sido utilizado para promover la diferenciación de líneas celulares monocíticas hacia un fenotipo macrófago (93, 94) y nosotros contamos con datos que demuestran que en nuestro sistema la VD3 está induciendo diferenciación.

Determinamos el estado de activación de la proteína cinasa Syk al estimular células monocíticas THP-1 a través de los receptores FcγRI, FcγRII de forma individual o en pares o la agregación individual del CR3 antes y después del tratamiento con 100 nM de VD3 por 72 h.

En nuestro estudio encontramos que las células THP-1 expresan de manera constitutiva los receptores FcγRI, FcγRII y CR3, mientras que el receptor FcγRIIIA no se expresa (Fig 7 A, B y D). En estas mismas células el entrecruzamiento individual del FcγRII (homoagregación) induce mayores niveles de fosforilación de Syk que el entrecruzamiento del FcγRI (Fig. 9A). Sin embargo, el entrecruzamiento simultáneo de ambos receptores, induce niveles similares de fosforilación que el inducido por el entrecruzamiento del FcγRII de forma individual (Fig. 11A, carriles 3 y 4). Estos hallazgos demuestran que en los monocitos THP-1 aunque Syk es activada por ambos receptores (FcγRI y FcγRII) la activación ocurre de manera diferencial.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fleit HB & Kobasiuk CD en 1991, reportaron que los monocitos THP-1 expresan alrededor de 35 000 moléculas de receptores de alta afinidad para la IgG₁ marcada con radiactividad (FcγRI) y 50 000 moléculas de receptores de baja afinidad (FcγRII) utilizando el anticuerpo monoclonal IV.3 marcado radiactivamente (97). Debido a estas diferencias cuantitativas de los receptores en células THP-1, en nuestro sistema no pudimos descartar que durante la estimulación individual de cada receptor, se agregan en la membrana un número diferente de moléculas de cada receptor (FcγRI o FcγRII). Sin embargo, si pudimos garantizar que aunque este fenómeno esté sucediendo, las comparaciones en cuanto al nivel de fosforilación y activación de Syk, se hicieron cuando las condiciones de estimulación individual para cada receptor FcγR lograban inducir el óptimo de señal de fosforilación de Syk. Para realizar el ensayo se utilizaron fragmentos Fab de los anticuerpos anti receptores y fragmentos F(ab)₂ de los anticuerpo anti IgG utilizados para inducir el entrecruzamiento de los receptores en la membrana, básicamente con el objetivo de evitar señal bioquímica de fosforilación en Syk resultante de la unión de la porción Fc de dichos anticuerpos a los receptores FcγR. Para demostrar que en la estimulación celular 10 μg de los anticuerpos primarios (antireceptores) y secundarios (entrecruzantes) nos permiten obtener el máximo nivel de fosforilación de Syk en células THP-1, se realizaron las curvas de dosis respuesta utilizando concentraciones crecientes del segundo anticuerpo anti IgG, manteniendo constante (10 μg) la del primer anticuerpo anti receptor (32.2 o IV.3), garantizando así que independientemente del número de moléculas de cada receptor que se esten agregando en la membrana durante la estimulación individual, las comparaciones realizadas en cuanto al nivel de fosforilación de Syk obtenido fueron con base en el pico de señal de fosforilación de Syk inducido por la estimulación de cada receptor FcγR (Fig. 8A y B).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El tratamiento de células THP-1 con VD3 por 72 h induce múltiples cambios relacionados con la diferenciación, tales como un incremento en la expresión de CD14 (datos no mostrados), del receptor tipo 3 del complemento, CR3 y en la adhesión de las células al plástico (Fig. 7 C y E). Demostramos también que el tratamiento de células THP-1 con VD3 induce un incremento en el nivel de expresión de la proteína cinasa Syk, dependiente del tiempo de tratamiento (Fig. 10). En los inmunoprecipitados anti Syk de células THP-1 tratadas con VD3, el tratamiento *per se* induce un incremento en los niveles basales de fosforilación y activación de Syk (Fig. 11), mientras que el entrecruzamiento del FcγRI induce solo un ligero incremento de esta fosforilación (Fig. 11A) y esto correlacionó también con la actividad catalítica de Syk sobre un sustrato exógeno. Este fenómeno se podría explicar por el hecho de que existen múltiples residuos de tirosina fosforilables en la estructura de Syk que pueden estar involucrados en la regulación de la activación de dicha cinasa. Es conocido también que la VD3 es capaz de activar una variedad de proteínas con actividad de cinasa tales como la PKC, Raf, y MAPK (98, 99, 100) las cuales pudieran estar fosforilando de forma directa o indirecta a Syk durante el proceso de diferenciación inducido por la VD3. Debido a que la molécula de Syk es importante durante el proceso de diferenciación de la célula monocítica, es necesario que aumente su nivel de expresión, y si en estas células cinasas capaces de fosforilar y activar a Syk se encuentran activadas, entonces las nuevas moléculas que se traducen producto de la diferenciación con VD3 se fosforilaran y activaran, reflejándose esto en aumento en el nivel basal de fosforilación. Sorprendentemente, después del entrecruzamiento del FcγRII o del CR3 en las células tratadas con VD3, el nivel de fosforilación de Syk disminuyó de forma significativa comparado con el nivel observado en las células no estimuladas y tratadas con la VD3 (Fig.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11A y 18B). Esto coincidió con una disminución en la actividad catalítica de Syk frente a un sustrato exógeno (Fig. 12 y 18). El entrecruzamiento simultáneo de los receptores FcγRI y FcγRII resultó en un mayor nivel de fosforilación y activación de Syk que el observado por el FcγRII de forma individual en estas células tratadas con VD3 (Fig. 11A y 12). Al observar una disminución en la fosforilación y activación de Syk en las células THP-1, evaluamos el efecto que podría ocasionar esta reducción en la actividad de Syk en una de las funciones biológicas más importantes relacionadas con los receptores FcγRs. Determinamos entonces el efecto del tratamiento con la VD3 en la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG. La fagocitosis de los eritrocitos opsonizados con IgG disminuyó en un 35% (Fig. 13). Es probable que el 65% de la fagocitosis restante, este mediado por moléculas de Syk que se activan dependientes del entrecruzamiento del receptor FcγRI.

La disminución en la fosforilación y activación de Syk nos sugieren que durante el proceso de diferenciación con la VD3 se pudiera estar activando una proteína con actividad de fosfatasa que al momento de entrecruzar el receptor FcγRII se reclutaría al complejo de transducción y estaría desfosforilando a las moléculas de Syk previamente fosforiladas y activadas por el tratamiento con la VD3, regulando por lo tanto el estado de activación de Syk. Este fenómeno explicaría igualmente lo ocurrido para Syk después del entrecruzamiento del receptor CR3 en células diferenciadas con la VD3. Sin embargo para las moléculas de Syk que son activadas a través del FcγRI en las células diferenciadas este fenómeno no sucede. Es decir no hay una regulación negativa de su estado de activación. Esto explica entonces porque cuando heteroagregamos a ambos receptores FcγRI y FcγRII simultáneamente en las células diferenciadas la fosforilación es mayor que la que se

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

observa después de homoagregar el FcγRII en estas células. También explica porque la disminución en la fagocitosis después del tratamiento con VD3 es solo de un 35%.

Múltiples evidencias señalan a la proteína fosfatasa de residuos de tirosina SHP-1 como un regulador negativo de la señal bioquímica de los receptores inmunes que contienen en su estructura motivos ITAM, debido a que actúan sobre cinasas de tirosina de la familia Syk/ZAP 70. SHP-1 se ha visto implicada en la regulación negativa de la actividad de ZAP 70 en linfocitos T (101). También se ha demostrado que en linfocitos B existe una asociación física entre SHP-1 y Syk y que Syk es sustrato para SHP-1 (102). En ratones *me/me*, SHP-1 fue propuesta como la molécula crítica utilizada por el receptor FcγRIIB para regular de manera negativa la señal de activación inducida por el BCR (102). Estudios *in vitro* han demostrado que SHP-1 se puede unir a los motivos ITIM del FcγRIIB (103). Nuestros resultados muestran que la preincubación con un inhibidor general de fosfatasa, previene el decremento en el nivel de fosforilación de Syk, observado al estimular a las células THP-1 tratadas con VD3 a través de los receptores FcγRII o el CR3 (Fig. 14A, C y 19). Observamos también que en células THP-1, la fosfatasa SHP-1 coimmunoprecipita con Syk, y que el grado de coimmunoprecipitación es afectado por el estado de diferenciación de la célula y por el entrecruzamiento de los receptores FcγRII o CR3 (Fig. 15B, C y 18). El grado de asociación entre Syk y SHP-1 en células estimuladas a través de los receptores FcγRII o CR3, parece correlacionar de manera inversa con el nivel de fosforilación de Syk. En células no tratadas el entrecruzamiento de los receptores tanto FcγRII como CR3 resulta de un incremento en el nivel de fosforilación de Syk (con una mínima asociación de Syk con SHP-1), mientras que en células tratadas con VD3 y estimuladas a través de cualquiera de los dos receptores, el nivel de fosforilación de Syk es bajo y su asociación con SHP-1 es

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

muy alta (Fig 15B). Es importante destacar que el nivel de expresión de la fosfatasa SHP-1 no se afecta con el tratamiento de las células THP-1 con la VD3 (Fig. 15A).

Estos resultados contrastan con lo reportado en linfocitos B, que muestran que el entrecruzamiento del receptor para antígenos de células B (BCR) y la subsecuente fosforilación en residuos de tirosina de Syk, no afecta la asociación de Syk con SHP-1 (102). Nuestros hallazgos claramente sugieren que en monocitos THP-1 tratados con VD3, la activación de la cinasa Syk puede ser regulada negativamente por la fosfatasa SHP-1 después del entrecruzamiento de los receptores FcγRII o CR3. Las bases moleculares para la asociación constitutiva entre Syk y SHP-1 en células THP-1 es desconocida. Es posible que SHP-1 interactúe con Syk por un mecanismo independiente de la unión de los dominios SH2 de SHP-1 con los residuos de tirosina fosforilados presentes en Syk. Con respecto a esto se ha reportado que la interacción funcional entre SHP-1 y la cinasa JAK2 es independiente de la fosforilación en tirosina de JAK2 y dicha interacción no requiere de dominios SH-2 funcionales en SHP-1 (104). En monocitos U397 la asociación constitutiva entre SHP-1 y la cinasa de residuos de tirosina Lyn (de la familia Src) es dependiente del dominio SH-3 presente en dicha cinasa (105, 106).

La observación de que los cambios en el nivel de activación de Syk durante la diferenciación con VD3 es similar para la estimulación de monocitos THP-1 tanto a través del FcγRII como del CR3, y sin embargo diferente para la estimulación de estas células a través del FcγRI, se podrían explicar por el hecho de que la cooperatividad funcional durante la fagocitosis que se ha observado entre los FcγRs y el CR3 está establecida principalmente entre los FcγRs de baja afinidad para la IgG (FcγRII y FcγRIII) y el CR3, y no entre el receptor de alta afinidad para la IgG (FcγRI). Gadd et al., reportaron que la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

estimulación intracelular del estallido respiratorio inducida por la estimulación del CR3 en monocitos que habían estado previamente incubados con anticuerpos monoclonales anti Fc γ RII (IV.3) está totalmente bloqueada. Sin embargo, la incubación previa con IgG1 monomérica (ligando para el Fc γ RI) no provoca este mismo efecto sobre el estallido respiratorio en estas células. Esto indica que durante la activación del monocito-macrófago en el foco inflamatorio, la formación de complejos de señalización que involucra la activación de Syk inducidos por la agregación CR3-Fc γ RII a través de partículas o microorganismos opsonizados con IgG y/o fragmentos del complemento es más importante y necesaria que la formación de complejos de señalización inducidos por la agregación CR3-Fc γ RI.

Un mecanismo por el cual la diferenciación con VD3 pudiera estar modificando la interacción física y funcional entre Syk y SHP-1 después del entrecruzamiento del Fc γ RII, comparado con lo que se observa en las células no diferenciadas, es que el tratamiento con VD3 pudiera alterar la expresión relativa de las isoformas del Fc γ RII, induciendo un incremento en la expresión del Fc γ RIIB, el cual promueve el reclutamiento de SHP-1 a las secuencias ITIM de los Fc γ RII agregados. Se ha demostrado que SHP-1 es capaz de unirse a los ITIMs fosforilados (107, 108) y también que es capaz de asociarse al Fc γ RIIB cuando este es coagregado con el receptor tipo I para la IgE en mastocitos derivados de la médula ósea (109).

Observamos que el tratamiento con VD3 induce una disminución transitoria en la expresión del Fc γ RIIb, sin embargo después de 72 h de tratamiento la expresión tanto del Fc γ RIIb₁ como del Fc γ RIIb₂ regresaron al nivel de expresión relativo observado en las células no diferenciadas (Fig. 17B). Aunque este resultado no descarta la posibilidad de que en células

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

diferenciadas con VD3 la fosfatasa SHP-1 logré tener acceso a la vecindad de Syk debido a su reclutamiento hacia el receptor agregado, por medio de los ITIMs del FcγRIIB. Otra posibilidad es que aunque la expresión del FcγRIIB es similar a las 0 y a las 72h de tratamiento, el nivel de fosforilación de sus ITIMs es diferente, siendo mayor en las células diferenciadas, incrementando así su capacidad para reclutar a SHP-1 (103). Aunque en la estructura de la molécula de CR3 no se han identificado secuencias de tipo ITIM, no descartamos la posibilidad de que durante la diferenciación del monocito THP-1 con VD3 otras moléculas que si poseen ITIM o tengan la capacidad de reclutar a SHP-1 pudieran aumentar su nivel de expresión o simplemente sufrir cambios en su estado de activación que permitieran reclutar SHP-1 a la vecindad de Syk.

Los hallazgos experimentales presentados son consistentes con el esquema en el cual, en células no estimuladas y no diferenciadas, el nivel de fosforilación basal de Syk es regulado por SHP-1, la cual está constitutivamente asociada con Syk (asociación independientemente de su nivel de fosforilación). El entrecruzamiento del FcγRII o del CR3 inducen disociación del complejo Syk-SHP-1, lo cual permite que Syk sea reclutada a los ITAMs fosforilados del FcγRII (en el caso por ejemplo de la fagocitosis mediada por los FcγRs) o sea activada en el citosol, para inducir la formación de las placas de adhesión focal mediadas por las integrinas β₂, importantes en la migración y adhesión celular del monocito durante su diferenciación y maduración.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

Nuestros resultados nos permiten concluir, que el tratamiento de células THP-1 con VD3 por 72 h (diferenciación celular) modula el estado de activación de proteínas involucradas en la señalización de monocitos mediada por los receptores FcγRs y CR3. Específicamente la agregación de los receptores FcγRII y CR3 durante la diferenciación celular con VD3 modulan el estado de fosforilación y activación de la proteína cinasa Syk.

El tratamiento con VD3 no altera de manera significativa la expresión en membrana de los receptores FcγRI y FcγRII, ni induce la expresión del receptor FcγRIIIA. Sin embargo aumenta significativamente y dependiente del tiempo el nivel de expresión en la membrana del CR3. En las células THP-1, el entrecruzamiento del FcγRII induce mayores niveles de fosforilación de Syk que el entrecruzamiento del FcγRI. El tratamiento con VD3 induce un incremento en los niveles de Syk dependiente del tiempo, y de su estado de fosforilación y actividad basal. Por el contrario, en las células tratadas el entrecruzamiento del FcγRII disminuye de forma significativa el nivel de fosforilación de Syk comparado con el observado en las células no estimuladas y tratadas con VD3. Además el tratamiento disminuye la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG por células THP-1, dependiente del tiempo y alcanzando una inhibición del 35%.

Los resultados también nos permiten concluir que en células no estimuladas y no diferenciadas, el nivel de fosforilación basal de Syk es regulado por SHP-1, la cual está constitutivamente asociada con Syk (independientemente de su nivel de fosforilación). El entrecruzamiento del FcγRII o del CR3 inducen disociación del complejo Syk-SHP-1. Este hallazgo pudiera explicar el hecho ya conocido de que Syk es reclutada a los ITAMs fosforilados del FcγRII (en el caso por ejemplo de la fagocitosis mediada por los FcγRs) o

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

sea activada en el citosol, para inducir la formación de las placas de adhesión focal mediadas por las integrinas β_2 . Después de la diferenciación con VD3, el entrecruzamiento del Fc γ RII o del CR3 no induce disociación del complejo Syk-SHP-1, todo lo contrario el complejo se hace más estable, reflejándose esto en una disminución en la fosforilación de Syk.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REFERENCIAS

1. Vignola A.M., Gjomarkaj M., Arnoux B., Bousquet J. (1998) Monocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 101:149-152.
2. Patarroyo M. (1994) Adhesion molecules mediating recruitment of monocytes to inflamed tissue. *Immunobiology* 191:474-477.
3. Casey L.C. (2000) Immunologic response to infection and its role in septic shock. *Crit Care Clin.* 16:193-213.
4. Berger M., Wetzler E.M., Welter E., Turner J.R., Tartakoff A.M. (1991) Intracellular sites for storage and recycling of C3b receptors in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:3019-3023.
5. Isolauri E., Pelto L., Nuutila J., Majamaa H., Lilius E.M., Salminen S. (1997) Altered expression of IgG and complement receptors indicates a significant role of phagocytes in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 99:707-713.
6. Hunkapillar T., Hood L. (1989) Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv Immunol.* 44:1-63.
7. Unkeless J.C., Scigliano E., Freedman V.H. (1988) Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol.* 6:251-281.
8. Unkeless J.C., Boros P., Fein M. (1992) Structure, signaling, and function of FcγR. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates* (Editores: Gallin J I, Goldstein I M, Snyderman R); Raven Press, pp 497-510.
9. Ravetch J.V., Kinet J.P. (1991) Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 9:457-492.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10. Cassel D.L., Keller M.A., Surrey S., Schwartz E., Schreiber A.D., Rappaport E.F., McKenzie S.E. (1993) Differential expression of FcγR IIA, FcγR IIB and FcγR IIC in hematopoietic cells: Analysis of Transcripts. *Mol Immunol.* 30:451-460.
11. Daeron M (1997) Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol.* 15: 203-234.
12. Bonnerot C., Daeron M., Varin N., Amigorena S., Hogarth P.M., Even J., Fridman W.H. (1988) Methylation in the 5' region of the murine beta Fc gamma R gene regulates the expression of Fc gamma receptor II. *J Immunol.* 141:1026-1033.
13. Bonnerot C., Choukroun V., Marloie M.A., Fridman WH (1992) Two distinct regions of the mouse beta Fc gamma R gene control its transcription. *Immunobiol.* 185:222-234.
14. Chicheportiche Y., Vassalli P. (1994) Tumor necrosis factor induces a block in the cotranslation of Fc gamma RIIB mRNA in mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem.* 269:20134-20138.
15. te Velde A.A., Huijbens R.J., de Vries J.E., Figdor C.G. (1990) IL-4 decreases Fc gamma R membrane expression and Fc gamma R-mediated cytotoxic activity of human monocytes. *J Immunol.* 144:3046-3051.
16. Pricop L., Redecha P., Teillaud J.L., Frey J., Fridman W.H., Sautes-Fridman C., Salmon J.E. (2001) Differential modulation of stimulatory and inhibitory Fc gamma receptors on human monocytes by Th1 and Th2 cytokines. *J Immunol.* 166:531-537.
17. Looney R.J., Abraham G.N., Anderson C.L. (1986) Human monocytes and U937 cells bear two distinct Fc receptors for IgG. *J Immunol.* 136:1641-1647.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

18. Paquette R.L., Minosa M.R., Verma M.C., Nimer S.D., Koeffler H.P. (1995) An interferon-gamma activation sequence mediates the transcriptional regulation of the IgG Fc receptor type IC gene by interferon-gamma. *Mol Immunol.* 32:841-851.
19. Dijkstra H.M., van de Winkel J.G.J., Kallenberg C.G.M. (2001) Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *TRENDS Immunol.* 22:510-516.
20. Ernst L.K., van de Winkel J.G.J., Ing-Ming C., Anderson C.L. (1992) Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (FcγR I) encode four distinct transcription products. *J Bio Chem.* 267:15692-15700.
21. Mates D.M., Ernst L.K., Chambers W.H., Sulica A., Herberman R.B., Morel P.A. (1998) Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is determined by an allelic polymorphism of the FcγR IIC gene. *Blood.* 91:2369-2380.
22. Cambier J.C. (1995) Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol.* 155:3281-3285.
23. Isakov N. (1997) Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signal cascades. *J Leukoc Biol.* 61:6-16.
24. Reth M.G. (1989) Antigen receptor tail clue. *Nature.* 338:383-84.
25. Daeron M., Latour S., Malbec O., Espinosa E., Pina P., Pasmans S., Fridman W.H. (1995) The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of FcγR IIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity.* 3:635-646.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

26. Ghazizadeh S., Bolen J.B., Fleit H.B. (1994) Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. *J Biol Chem.* 269:8878-8884.
27. Corvaia N., Reischl I.G., Kroemer E., Mudde G.C. (1995) Modulation of Fc gamma receptor-mediated early events by the tyrosine phosphatase CD45 in primary human monocytes. Consequences for interleukin-6 production. *Eur J Immunol.* 25:738-744.
28. Agarwal A., Salem P., Robbins K.C. (1993) Involvement of p72syk, a protein-tyrosine kinase, in Fc gamma receptor signaling. *J Biol Chem.* 268:15900-15905.
29. Wang D., Feng J., Wen R., Marine J.C., Sangster M.Y., Parganas E., Hoffmeyer A., Jackson C.W., Cleveland J.L., Murray P.J., Ihle J.N. (2000) Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity.* 13:25-35.
30. Greenberg S., Chang P., Silverstein S.C. (1994) Tyrosine phosphorylation of the γ subunit of Fc γ receptors, p72 Syk, and paxillin during Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem* 269:3897-3902.
31. Durden D.L., Kim H.M., Calore B., Liu Y. (1995) The Fc γ RI receptor signals through the activation of hck and MAP kinase. *J Immunol.* 154:4039-4047.
32. Galandrini R., Palmieri G., Piccoli M., Frati L., Santoni A. (1996) CD16-mediated p21ras activation is associated with Shc and p36 tyrosine phosphorylation and their binding with Grb2 in human natural killer cells. *J Exp Med.* 183:179-186.
33. Tsitsikov E.N., Fuleihan R., McIntosh K., Scholl P.R., Geha R.S. (1995) Cross-linking of Fc gamma receptors activates HIV-1 long terminal repeat-driven transcription in human monocytes. *Int Immunol.* 7:1665-1670.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

34. Amigorena S., Bonnerot C., Drake J.R., Choquet D., Hunziker W., Guillet J.G., Webster P., Sautes C., Mellman I., Fridman W.H. (1992) Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science*. 256:1808-1812.
35. Tamir I., Dal Porto J.M., Cambier J.C. (2000) Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction. *Curr Opin Immunol*. 12:307-315.
36. Scharenberg A.M., El-Hillal O., Fruman D.A., Beitz L.O., Li Z., Lin S., Gout I., Cantley L.C., Rawlings D.J., Kinet J.P. (1998) Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P₃)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *EMBO J*. 17:1961-1972.
37. Tamir I., Stolpa J.C., Helgason C.D., Nakamura K., Bruhns P., Daéron M., Cambier J.C. (2000) The RasGAP-binding protein p62 dok is a mediator of inhibitory FcγRIIB signals in B cells. *Immunity*. 12:347-358.
38. Binstadt B.A., Billadeau D.D., Jevremovic D., Williams B.L., Fang N., Yi T., Koretsky G.A., Abraham R.T., Leibson P.J. (1998) SLP-76 is a direct substrate of SHP-1 recruited to killer cell inhibitory receptors. *J Biol Chem*. 273:27518-27523.
39. Wagner C., Hansch G.M., Stegmaier S., Denefleh B., Hug F., Schoels M. (2001) The complement receptor 3, CR3 (CD11b/CD18), on T lymphocytes: activation-dependent up-regulation and regulatory function. *Eur J Immunol*. 31:1173-1180.
40. Ross G.D., Vetvicka V. (1993) CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin Exp Immunol*. 92:181-184.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

41. Chihara J., Kakazu T., Higashimoto I., Yamamoto T., Kurachi D., Nakajima S. (1995) Increased eosinophil oxidative metabolism by treatment with soluble intercellular adhesion molecule-1. *Int Arch Allergy Immunol.* 108 Suppl 1:45-47.
42. Arnaout M.A. (1990) Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood.* 75:1037-1050.
43. Sengelov, H. (1995) Complement Receptors in Neutrophils. *Critical Reviews in Immunology.* 15:107-113.
44. Gallin, J.J., Fletcher, M.P., Seligman B.E., Hoffstein S., Cehrsk S., Mounessa N. (1982) Human neutrophil, specific granule deficiency: A model to assess the role of neutrophil-specific granules in the evolution of the inflammatory response. *Blood* 59:1317-1329.
45. Arnaout M.A., Gupta S.K., Pierce M.W., Tenen D.G. (1988) Protein Amino acid sequence of the alpha subunit of human leukocyte adhesion receptor Mo1 (complement receptor type 3). *J Cell Biol.* 106:2153-2158.
46. Chou P.Y., Fasman G.D. (1978) Related Articles Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 47:45-48.
47. Beller D.I., Springer T.A., Schreiber R.D. (1982) Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. *J Exp Med.* 156:1000-1009.
48. Zhou, M.J., Brown, E.J. (1994) CR3 (Mac-1, $\alpha M\beta_2$, CD11b/CD18) and Fc γ RII Cooperate in Generation of a Neutrophil Respiratory Burst: Requirement for Fc γ RII and Tyrosine phosphorylation. *Cell Biol.* 125:1407-1416.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

49. Yalamanchili P., Lu C., Oxvig C., Springer T.A. (2000) Folding and function of I domain-deleted Mac-1 and lymphocyte function-associated antigen-1. *J Biol Chem.* 275:21877-21882.
50. Ross G.D., Cain J.A., Myones B.L., Newman S.L., Lachmann P.J. (1987) Specificity of membrane complement receptor type three (CR3) for beta-glucans. *Complement.* 4:61-74.
51. Moley M., Foster D.L., Mc Grath D.E., Brown S.M., Laroche Y., Meutter J.D., Stanssens P., Bogowitz C.A, Frie V.A., Ely J. A., Soule H.R., Vlasuk G.P. (1994) A hookworm glycoprotein that inhibits neutrophils functions is a ligand of the integrin CD 11b/CD 18. *J Biol Chem.* 269:10008-10015.
52. Rieu P., Sugimori T., Griffith D.L., Arnaout M.A. (1996) Solvent - accessible residues on the metal ion - dependent adhesion site face of integrin CR 3 mediate its binding to the neutrophil inhibitory factor. *J Biol Chem.* 64:1998-2003.
53. Dib K. (2000) BETA 2 integrin signaling in leukocytes. *Front Biosci.* 5:D438-51.
54. Diamond M.S., Staunton D.E., de Fougerolles A.R., Stacker S.A., Garcia-Aguilar J., Hibbs M.L., Springer T.A. (1990) ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol.* 111(6 Pt 2):3129-3139.
55. Diamond M.S., Garcia-Aguilar J., Bickford J.K., Corbi A.L., Springer T.A. (1993) The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol.* 120:1031-1043.
56. Vetvicka V., Thornton B.P., Ross G.D. (1996) Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *J Clin Invest.* 98:50-61.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

57. Petty H.R., Todd R.F. III. (1996) Integrins as promiscuous signal transduction devices. *Immunol Today*. 17, 209-212.
58. Arnaout M.A., Todd R.F. 3rd, Dana N., Melamed J., Schlossman S.F., Colten H.R. (1983) Inhibition of phagocytosis of complement C3- or immunoglobulin G-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte-granulocyte membrane glycoprotein (Mol). *J Clin Invest*. 72:171-179.
59. Galon J., Gauchat J.F., Mazieres N., Spagnoli R., Storkus W., Lotze M., Bonnefoy J.Y., Fridman W.H., Sautes C. (1996) Soluble Fc gamma receptor type III (Fc gammaRIII, CD16) triggers cell activation through interaction with complement receptors. *J Immunol*. 157:1184-1192.
60. Ohkuro M., Ogura Masaki M., Kobayashi K., Sakai M., Takahashi K., Nagasawa S. (1996) Effect of iC3b binding to immune complexes upon the phagocytic response of human neutrophils: Synergetic functions between Fc gamma R and CR 3. *J Immunol*. 157:1184-1192.
61. Poo H., Krauss J.C., Mayo-Bond L., Todd R.F. 3rd, Petty H.R. (1995) Interaction of Fc gamma receptor type IIIB with complement receptor type 3 in fibroblast transfectants: evidence from lateral diffusion and resonance energy transfer studies. *J Mol Biol*. 247:597-603.
62. Kohl S., Loo L.S., Schmalstieg F.S., Anderson D.C. (1986) The genetic deficiency of leukocyte surface glycoprotein Mac-1, LFA-1, p150,95 in humans is associated with defective antibody-dependent cellular cytotoxicity in vitro and defective protection against herpes simplex virus infection in vivo. *J Immunol*. 137:1688-1694.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

63. Hellwig S.M., van Oirschot H.F., Hazenbos W.L., van Spruel A.B., Mooi F.R., van De Winkel J.G. (2001) Targeting to Fc γ receptors, but not CR3 (CD11b/CD18), increases clearance of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis*. 183:871-879.
64. Martin T., et al. (2000) Tyrosine kinase Syk: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today*. 21:148-154.
65. Latour S., Zhang J., Siraganian R.P., Veillette A. (1998) A unique insert in the linker domain of Syk is necessary for its function in immunoreceptor signalling. *EMBO J*. 17:2584-2595.
66. Law C.L., Chandran K.A., Sidorenko S.P., Clark E.A. (1996) Phospholipase C- γ 1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol Cell Biol*. 16:1305-1315.
67. Furlong M.T., Mahrenholz A.M., Kim K.H., Ashendel C.L., Harrison M.L., Geahlen R.L. (1997) Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochim Biophys Acta*. 1355:177-190.
68. Yamashita T., Kairiyama L., Araki M., Nagasawa S. (1998) Evidence for involvement of two isoforms of Syk protein-tyrosine kinase in signal transduction through the high affinity IgE receptor on rat basophilic leukemia cells. *J Biochem (Tokyo)*. 123:1199-1207.
69. Johnson S.A., Pleiman C.M., Pao L., Schneringer J., Hippen K., Cambier J.C. (1995) Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J Immunol*. 155:4596-4603.
70. Mallick-Wood C.A., Pao W., Cheng A.M., Lewis J.M., Kulkarni S., Bolen J.B., Rowley B., Tigelaar R.E., Pawson T., Hayday A.C. (1996) Disruption of epithelial

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

gamma delta T cell repertoires by mutation of the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:9704-9709.

71. Colucci F., Turner M., Schweighoffer E., Guy-Grand D., Di Bartolo V., Salcedo M., Tybulewicz V.L., Di Santo J.P. (1999) Redundant role of the Syk protein tyrosine kinase in mouse NK cell differentiation. *J Immunol.* 163:1769-1774.
72. Turner M., Mee P.J., Costello P.S., Williams O., Price A.A., Duddy L.P., Furlong M.T., Geahlen R.L., Tybulewicz V.L. (1995) Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature.* 378:298-302.
73. Qin S., Yamamura H. (1997) Up-regulation of Syk activity during HL60 cell differentiation into granulocyte but not into monocyte/macrophage-lineage. *Biochem Biophys Res Commun.* 236:697-701.
74. Costello P.S., Turner M., Walters A.E., Cunningham C.N., Bauer P.H., Downward J., Tybulewicz V.L. (1996) Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells. *Oncogene.* 13:2595-2605.
75. Kiefer F., Brumell J., Al-Alawi N., Latour S., Cheng A., Veillette A., Grinstein S., Pawson T. (1998) The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcgamma receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol.* 18:4209-4220.
76. Miranti C.K., Leng L., Maschberger P., Brugge J.S., Shattil S.J. (1998) Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol.* 8:1289-1299.
77. Lin T.H., Rosales C., Mondal K., Bolen J.B., Haskill S., Juliano R.L. (1995) Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells. A possible signaling role for the Syk tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 270:16189-16197.

78. Freedman L.P. (1999) Transcriptional targets of the vitamin D3 receptor-mediated cell cycle arrest and differentiation. *J Nutr.*; 129:581S-586S.
79. Manolagas S.C., Hustmyer F., Yu X.P. (1989) $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 and the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med.* 191:238-245.
80. Bouillon R., Okamura W., Norman A.W. (1995) Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev.* 16:200-257.
81. Collins S.J., Ruscetti F.W., Gallagher R.E., Gallo R.C. (1978) Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75:2458-2462.
82. Olsson I., Gullberg U., Ivhed I., Nilsson K. (1983) Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol. *Cancer Res.* 43:5862-5867.
83. Grosso L.E., Pitot H.C. (1985) Chromatin structure of the c-myc gene in HL-60 cells during alterations of transcriptional activity. *Cancer Res.* 45:5035-5041.
84. Reitsma P.H., Rothberg P.G., Astrin S.M., Trial J., Bar-Shavit Z., Hall A., Teitelbaum S.L., Kahn A.J. (1983) Regulation of myc gene expression in HL-60 leukaemia cells by a vitamin D metabolite. *Nature.* 306:492-494.
85. Sariban E., Mitchell T., Kufe D. (1985) Expression of the c-fms proto-oncogene during human monocytic differentiation. *Nature.* 316:64-66.
86. Obeid L.M., Okazaki T., Karolak L.A., Hannun Y.A. Transcriptional regulation of protein kinase C by $1,25$ -dihydroxyvitamin D3 in HL-60 cells. *J Biol Chem.* 1990;265:2370-2374.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

87. Datta R., Sherman M.L., Stone R.M., Kufe D. (1991) Expression of the jun-B gene during induction of monocytic differentiation. *Cell Growth Differ.* 2:43-49.
88. Candelieri GA, Jurutka PW, Haussler MR, St-Arnaud R. (1996) A composite element binding the vitamin D receptor, retinoid X receptor alpha, and a member of the CTF/NF-1 family of transcription factors mediates the vitamin D responsiveness of the c-fos promoter. *Mol Cell Biol.* 16:584-592.
89. Liu M., Lee M.H., Cohen M., Bommakanti M., Freedman L.P. (1996) Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev.* 10:142-153.
90. Baker A.R., McDonnell D.P., Hughes M., Crip T.M., Mangelsdorf D.J., Haussler M.R. (1988) Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3294-3298.
91. Thompson P.D., Remus L.S., Hsieh J.C., Jurutka P.W., Whitfield G.K., Galligan M.A., Encinas-Dominguez C., Haussler C.A., Haussler M.R. (2001) Distinct retinoid X receptor activation function-2 residues mediate transactivation in homodimeric and vitamin D receptor heterodimeric contexts. *J Mol Endocrinol.* 27:211-227.
92. Norman A.W., Nemere I., Zhou L., Bishop J.E., Lowe K.E., Maiyar A.C., Collins E.D., Taoka T., Sergeev I., Farach-Carson M.C. (1992) 1,25(OH)₂-vitamin D₃, a steroid hormone that produced biologic effects via both genomic and nongenomic pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 41:231-240.
93. Kreuz M., Adressen R. (1990) Induction of human monocyte into macrophage maturation by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Blood.* 76: 2457-2461

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

94. Choudhuri U., Adams J.A., Byrom N., McCarthy D.M., Barrett J. (1990) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces normal mononuclear blood cells to differentiate in the direction of monocyte-macrophages. *Haematologia* 23:9-19.
95. Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.
96. Camacho-Arroyo I., Pasapera A.M., Cerbon M.A.. (1996) Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci Lett.* 214:25-28.
97. Fleit H.B., Kobasiuk C.D. (1991) The human monocyte-like cell line THP-1 expresses Fc gamma RI and Fc gamma RII. *J Leukoc Biol.* 49:556-565.
98. Gniadecki R. (1998) Involvement of Src in the vitamin D signaling in human keratinocytes. *Biochem Pharmacol.* 55:499-503.
99. Kharbanda S., Saleem A., Emoto Y., Stone R., Rapp U., Kufe D. (1994) Activation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinases during monocytic differentiation of human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem.* 269:872-878.
100. Marcinkowska E., Wiedlocha A., Radzikowski C. (1997) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induced activation and subsequent nuclear translocation of MAPK is upstream regulated by PKC in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 241:419-426.
101. Plas D.R., Johnson R., Pingel J.T., Matthews R.J., Dalton M., Roy G., Chan A.C., Thomas M.L. (1996) Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling. *Science.* 272:1173-1176.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

102. Dustin L.B., Plas D.R., Wong J., Hu Y.T., Soto C., Chan A.C., Thomas M.L. (1999) Expression of dominant-negative src-homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 results in increased Syk tyrosine kinase activity and B cell activation. *J Immunol.* 162:2717-24.
103. Lesourne R., Bruhns P., Fridman W.H., Daeron M. (2001) Insufficient phosphorylation prevents Fc gamma RIIB from recruiting the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem.* 276:6327-6336.
104. Jiao H., Berrada K., Yang W., Tabrizi M., Platanias L.C., Yi T. (1996) Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol.* 16:6985-6992.
105. Yoshida K., Kharbanda S., Kufe D. (1999) Functional interaction between SHPTP1 and the Lyn tyrosine kinase in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem.* 274:34663-34668.
106. Somani A.K., Yuen K., Xu F., Zhang J., Branch D.R., Siminovitch K.A. (2001) The SH2 domain containing tyrosine phosphatase-1 down-regulates activation of Lyn and Lyn-induced tyrosine phosphorylation of the CD19 receptor in B cells. *J Biol Chem.* 276:1938-1944.
107. D'Ambrosio D., Fong D.C., Cambier J.C. (1996) The SHIP phosphatase becomes associated with Fc gammaRIIB1 and is tyrosine phosphorylated during 'negative' signaling. *Immunol Lett.* 54:77-82.
108. Sato K., Ochi A. (1998) Superclustering of B cell receptor and Fc gamma RIIB1 activates Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-1. *J Immunol.* 161:2716-2722.

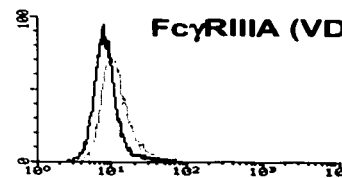
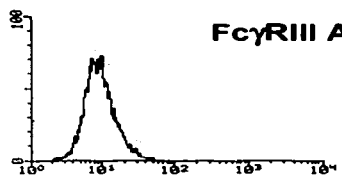
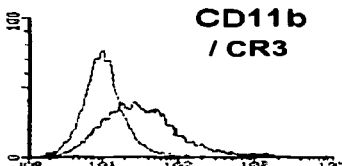
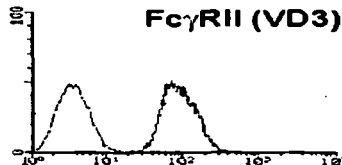
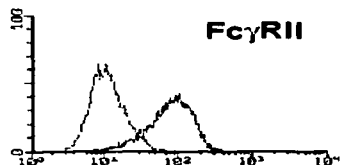
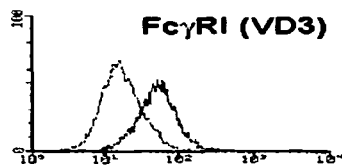
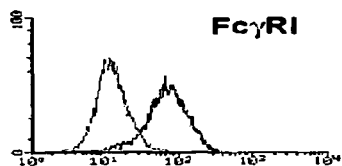
109. Fong D.C., Malbec O., Arock M., Cambier J.C., Fridman W.H., Daeron M. (1996) Selective in vivo recruitment of the phosphatidylinositol phosphatase SHIP by phosphorylated Fc gammaRIIB during negative regulation of IgE-dependent mouse mast cell activation. *Immunol Lett.* 54:83-91.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**Antes de la
diferenciación**

**Después de la
diferenciación**

Número de células



Intensidad de fluorescencia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 7. Efecto inducido por la diferenciación con VD3 en la expresión en membrana de los receptores FcγRI, FcγRII, FcγRIIIA y CR3 en los monocitos THP-1.

A-D) Monocitos THP-1 a una concentración de 0.5×10^6 células en 0.5 ml de PBS, SFB al 5% y NaN_3 al 0.1% fueron incubadas por 60 min a 4°C con 10 μg de los anticuerpos monoclonales 32.2 (anti FcγRI), IV.3 (anti FcγRII), 3G8 (anti FcγRIIIA) o 2LPM19c (anti CD11b) o los respectivos controles de isotipo (IgG1 para el 32.2 y el 2LMP19c, e IgG2b para el IV.3 y 3G8), seguidos por una incubación de 30 min con el anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC). Las células teñidas fueron fijadas en paraformaldehído y evaluadas por citofluorometría. La columna de la izquierda: células THP-1 no diferenciadas. La columna de la derecha: células THP-1 tratadas con 100 nM de VD3 por 72 h. Las líneas oscuras corresponden a la distribución de las células teñidas con anticuerpos específicos. Representativo de cinco experimentos independientes. E) Efecto del tratamiento con VD3 sobre la morfología de las células THP-1.

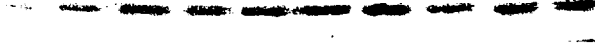
A

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------|---|---|-----|---|---|---|----|----|----|----|
| FcγR II (IV.3-10 μg) | - | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| anti IgG (μg) | 0 | 0 | 0.5 | 1 | 3 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 |

IP anti Syk
Blot: anti - PY

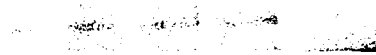


Blot: anti - Syk

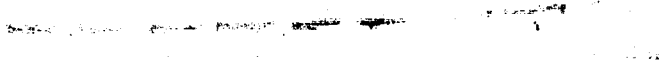


| | | | | | | | | | |
|----------------------|---|-----|---|---|---|----|----|----|----|
| FcγR I (32.2-10 μg) | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| anti IgG (μg) | 0 | 0.5 | 1 | 3 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 |

IP anti Syk
Blot: anti - PY



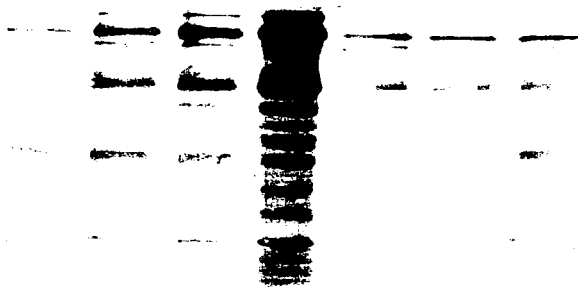
Blot: anti - Syk



TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

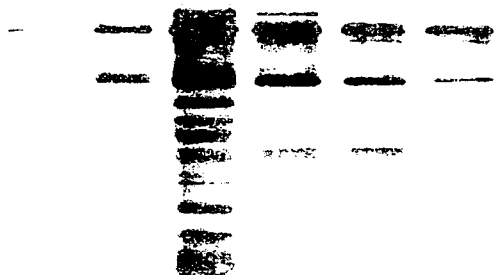
| | | | | | | | |
|------------------------------|----------|----------|------------|----------|----------|-----------|-----------|
| FcγR II (IV.3-10 μg) | - | + | + | + | + | + | + |
| anti IgG (10 μg) | - | + | + | + | + | + | + |
| tiempo (min) | 0 | 1 | 1.5 | 3 | 5 | 10 | 15 |

IP anti PY
Blot: anti - PY



| | | | | | | |
|------------------------------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| FcγR I (32.2 -10 μg) | - | + | + | + | + | + |
| anti IgG (10 μg) | - | + | + | + | + | + |
| tiempo (min) | 0 | 1 | 3 | 5 | 10 | 15 |

IP anti PY
Blot: anti - PY



TESIS CON
FALLA DE CALIBRE

Figura 8. El tiempo de estimulación y la concentración de los anticuerpos anti FcγRs, determinan el nivel de fosforilación de Syk en células THP-1.

(A) Células THP-1 a una densidad de 1×10^7 en 1 ml fueron incubadas con 10 μg de los fragmentos Fab de los anticuerpos anti FcγRII (IV.3) y anti FcγRI (32.2) a 4°C por 10 min, seguidos por una incubación por 3 min a 37°C con diferentes concentraciones (0, 0.5, 1, 3, 5, 10, 15, 20 y 30 μg) de fragmentos F(ab)'₂ del anticuerpo de conejo anti IgG murina. Syk fue inmunoprecipitada con anticuerpos anti Syk. Los inmunoprecipitados se sometieron a electroforesis (SDS-PAGE). Después de transferir las proteínas separadas a membranas de nitrocelulosa, se realizaron inmunoblots anti fosfotirosina (PY) y anti Syk, (B) 1×10^7 células THP-1 en 1 ml de medio fueron incubadas con 10 μg de los fragmentos Fab de los anticuerpos anti FcγRII (IV.3) y anti FcγRI (32.2) a 4°C por 10 minutos, seguidos por una incubación a 37°C por diferentes tiempos (0, 1, 3, 5, 10 y 15 min) con 10 μg de los fragmentos F(ab)'₂ del anticuerpo anti IgG de conejo. Las proteínas fosforiladas fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos antifosfotirosina y posteriormente sometidas a electroforesis (SDS-PAGE). Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y posteriormente se realizó un inmunoblot anti fosfotirosina. Representativo de tres experimentos independientes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

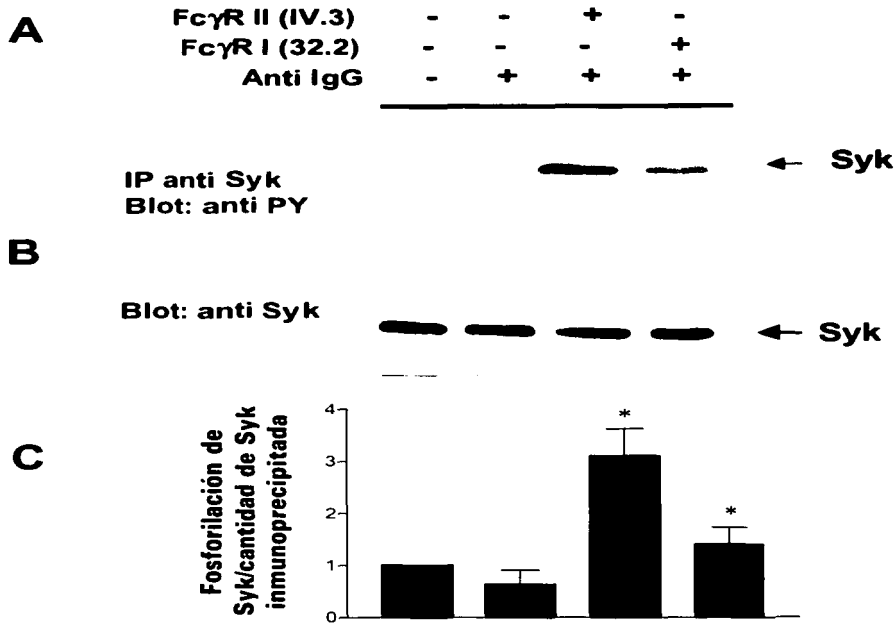


Figura 9. Fosforilación de Syk inducida por la agregación de los receptores FcγRI y FcγRII.

(A y B) Células THP-1 a una densidad de 1×10^7 células en 1 ml, fueron incubadas con $10 \mu\text{g}$ de los fragmentos Fab de los anticuerpos monoclonales 32.2 o IV.3, a 4°C por 10 min, seguidos por una incubación a 37°C por 3 min, con $10 \mu\text{g}$ de los fragmentos F(ab)'_2 de anticuerpo de conejo anti IgG murino. Syk fue inmunoprecipitada con anticuerpos anti Syk y los inmunoblots se realizaron con anticuerpos anti PY. Las membranas fueron tratadas e incubadas nuevamente con anticuerpos anti Syk para detectar la cantidad de Syk presente en cada carril. (C) El nivel de fosforilación de Syk fue calculado de acuerdo al cociente obtenido de la señal del inmunoblot anti fosfotirosina entre la señal del inmunoblot anti Syk. Los resultados representan el promedio \pm ES de 3 experimentos independientes. * indica una diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con las células no estimuladas (carril 1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

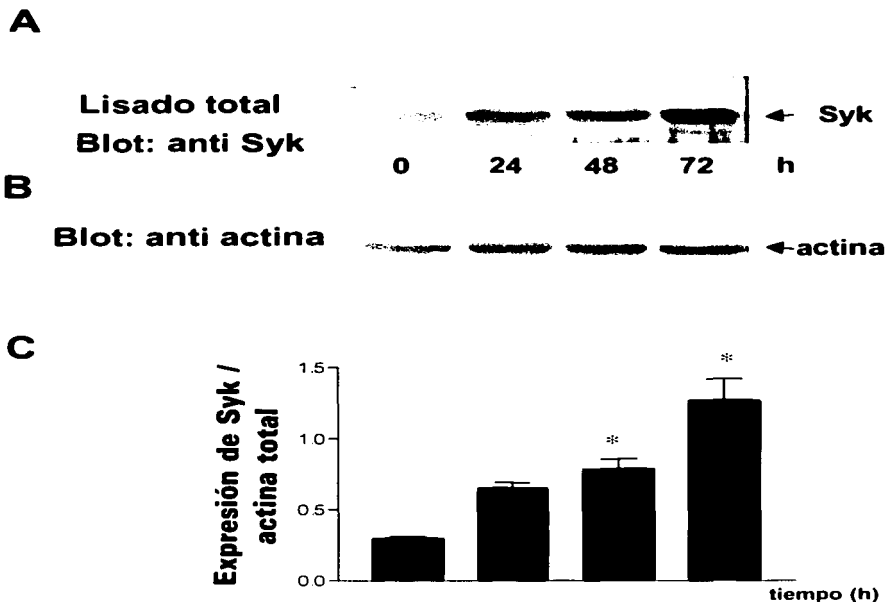


Figura 10. Efecto del tratamiento con VD3 en la expresión de Syk en células THP-1.

(A, B) Células THP-1 a una densidad de 5×10^5 /ml fueron incubadas con 100 nM de VD3 por los tiempos indicados. Después de obtener los lisados celulares, iguales cantidades de proteína por carril se sometieron a electroforesis (SDS-PAGE). Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y secuencialmente se realizaron inmunoblots anti Syk y anti actina con los anticuerpos correspondientes. (C) Los niveles de Syk fueron calculados como la relación entre las intensidades obtenidas en la densitometría de la señal del blot anti Syk con respecto a la obtenida del blot anti actina para cada banda. Los resultados están expresados como el promedio \pm E.S.. $n=3$, * indica una diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con las células no tratadas (0 h).

A.

| | | | | | | | | |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Tratamiento-VD3 | - | - | - | - | + | + | + | + |
| FcγR I(32.2) | - | + | - | + | - | + | - | + |
| FcγR II (IV.3) | - | - | + | + | - | - | + | + |
| anti IgG | - | + | + | + | - | + | + | + |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |

IP anti Syk

Blot: anti PY



← Syk

B.

Blot: anti Syk



← Syk

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

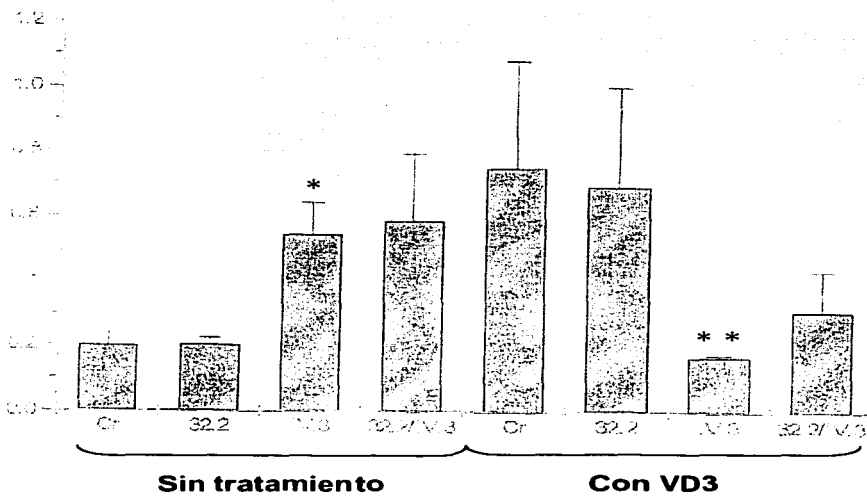
Figura 11. Fosforilación de Syk inducida por la agregación de los receptores FcγRI y FcγRII antes y después del tratamiento con la VD3.

(A) Células THP-1 no tratadas o tratadas con 100 nM de VD3 y a una densidad de 1×10^7 células en 1 ml, fueron incubadas con 10 µg de los fragmentos de los anticuerpos monoclonales 32.2 o IV.3, a 4°C por 10 min, seguidos por una incubación a 37°C por 3 min, con 10 µg de los fragmentos F(ab)'₂ del anticuerpo anti IgG de conejo. Syk fue inmunoprecipitada con anticuerpos anti Syk de los lisados celulares e inmunoblots anti PY fueron realizados. (B) Las membranas fueron tratadas e incubadas nuevamente con anticuerpos anti Syk para detectar la cantidad de Syk presente en cada carril. (C) El nivel de fosforilación de Syk fue calculado de acuerdo a la relación obtenida de la señal del inmunoblot anti fosfotirosina entre la señal del inmunoblot anti Syk. Los resultados representan el promedio ± ES de 3 experimentos independientes. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con las células no estimuladas (carril 1) y ** ($p < 0.05$) comparado con las células no estimuladas y tratadas con VD3 (carril 5).

TESIS CON
FALLA DE CUBREN

C

Fosforilación de Syk/cantidad de Syk
inmunoprecipitada



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

| | | | | | | | |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| tratamiento-VD3 | - | - | - | + | + | + | + |
| FcγR I (32.2) | - | - | + | + | - | - | + |
| FcγR II (IV.3) | - | + | - | + | - | + | - |
| Anti IgG | - | + | + | + | - | + | + |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |



Figura 12. Disminución en la actividad de Syk inducida por la VD3.

Inmunoprecipitados anti Syk fueron obtenidos a partir de los lisados de células THP-1 no tratadas o tratadas con VD3 y estimuladas o no como en la figura 9. Los inmunoprecipitados se utilizaron para ensayos de cinasa *in vitro*, utilizando 0.25 mg/ml de MBP como sustrato. Los productos de la reacción fueron sometidos a SDS-PAGE y posteriormente se obtuvieron autoradiografías. El experimento mostrado es representativo de tres experimentos independientes.

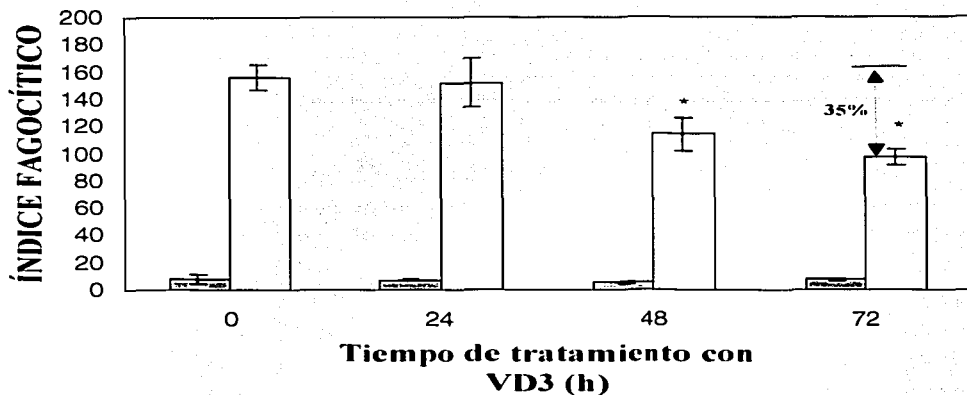
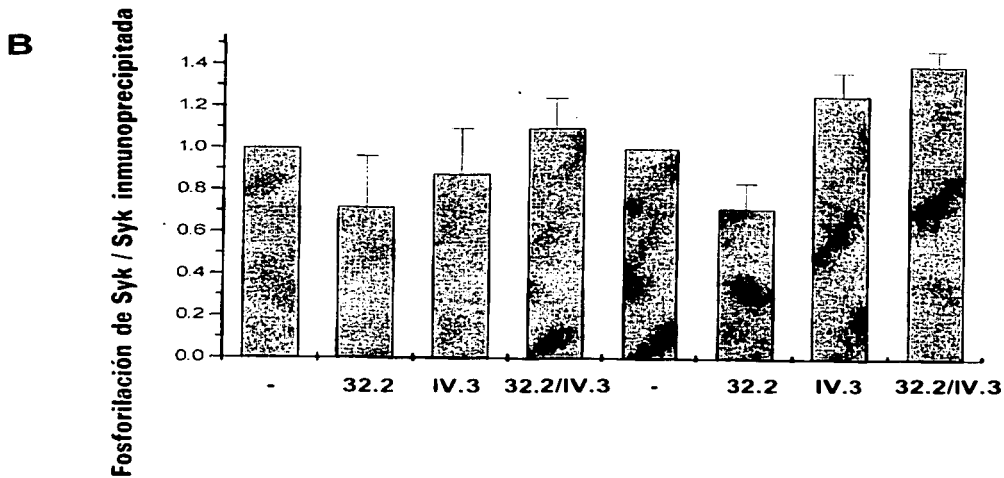
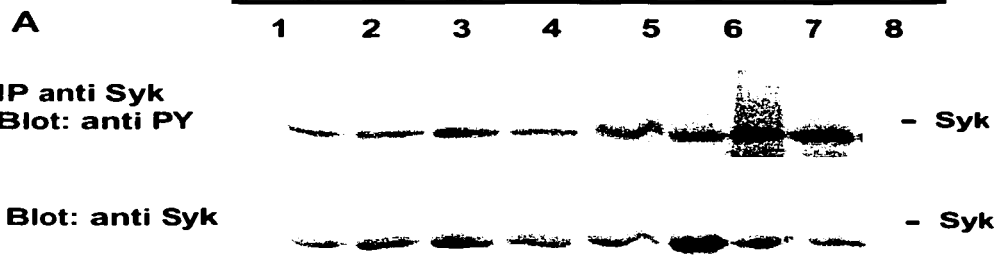


Figura 13. El tratamiento con VD3 disminuye la fagocitosis de células THP-1 mediada por receptores FcγR.

Eritrocitos de carnero fueron opsonizados con anticuerpos IgG anti DNP, como se describió en la sección de materiales y métodos. Para el ensayo de fagocitosis, 320 μ l de una suspensión de células THP-1 a una densidad de 1×10^6 /ml fueron incubados con 60 μ l de una suspensión al 2% de eritrocitos opsonizados (\square) o no opsonizados (\blacksquare) por 2 h a 37°C en incubadora con dióxido de carbono al 5% y en humedad. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS para eliminar los eritrocitos que no lograron unirse. Los eritrocitos que si se unieron pero no fueron internalizados por las células THP-1 fueron lisados con PBS al 0.2% por 30 seg. Los ensayos fueron realizados por triplicado. La ingestión de eritrocitos por las células THP-1 fue examinada mediante microscopía de luz. Los resultados están expresados como el promedio \pm S.D. n = 3. * p < 0.05 comparado con las células no tratadas (0 h).

| | | | | | | | | |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pervanadato | + | + | + | + | + | + | + | + |
| tratamiento-VD3 | - | - | - | - | + | + | + | + |
| FcyR I | - | + | - | + | - | + | - | + |
| FcyR II | - | - | + | + | - | - | + | + |
| anti IgG | - | + | + | + | - | + | + | + |



PEPIS COV
FALLA DE CALIDAD

C

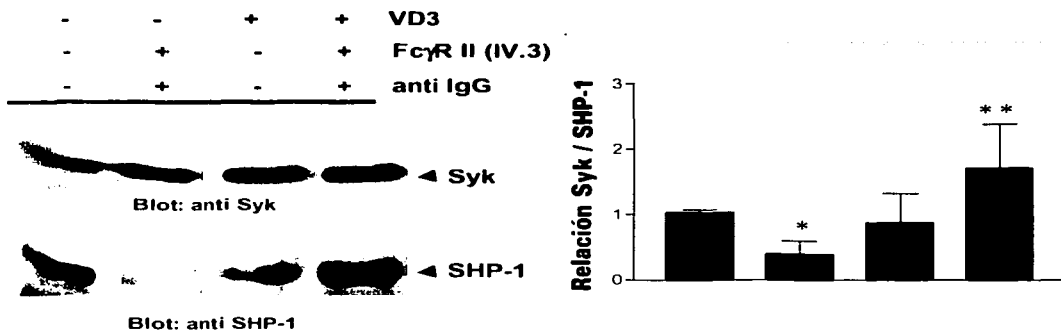


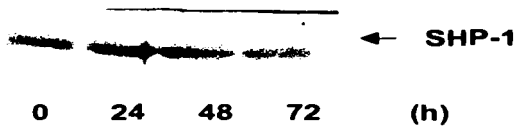
Figura 14. El tratamiento con pervanadato recupera la fosforilación de Syk.

(A) Células THP-1 no tratadas (carriles 1-4) y tratadas (carriles 5-8) con 100 nM de VD3 por 72 h, fueron incubadas previamente con 100 μ M de pervanadato de sodio por 15 min a 37°C. Posteriormente, las células fueron estimuladas a través de los receptores FcγRI y FcγRII como se describió para la figura 9. La cinasa Syk fue inmunoprecipitada de cantidades equivalentes de proteína de los lisados celulares, sometida a SDS-PAGE y transferida a membranas de nitrocelulosa. Los blots fueron tratados secuencialmente con anticuerpos anti PY y anti Syk. (B) Los resultados están expresados como el promedio \pm S.E.M. n=3. (C) Células THP-1 no tratadas (1-2) y tratadas (carriles 3-5) con 100 nM de VD3 fueron estimuladas a través del FcγRII como se describió para la figura 9. Inmunoprecipitados de Syk fueron sometidos a SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Los blots fueron tratados secuencialmente con anticuerpos anti Syk y anti SHP-1. El nivel de fosforilación de Syk fue calculado de acuerdo a la relación obtenida de la señal del inmunoblot anti Syk entre la señal del inmunoblot anti SHP-1. Los resultados representan el promedio \pm ES de 3 experimentos independientes. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con las células tratadas sin tratar y sin estimular (C, carril 1) y ** ($p < 0.05$) comparado con las células sin tratar y estimuladas a través del FcγRII (C, carril 2).

A

lisado total

Blot: anti SHP-1



Blot: anti actina

**B**

| | | | |
|-------------------------|---|---|---|
| Tratamiento-VD3 | - | - | + |
| Fc γ R II (IV.3) | - | + | + |
| anti IgG | - | + | + |

IP anti Syk

Blot anti PY

Syk ▶

Blot anti Syk

SHP-1 ▶

Blot anti SHP-1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

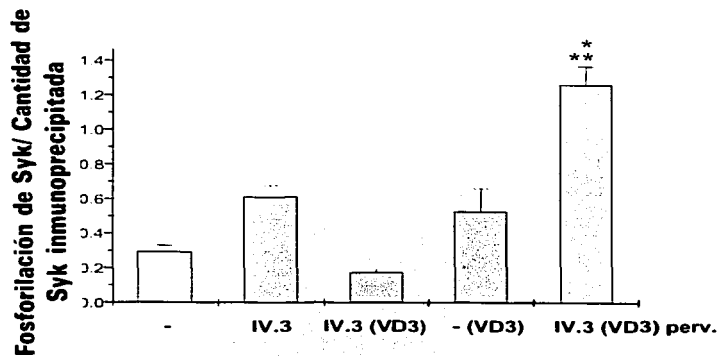
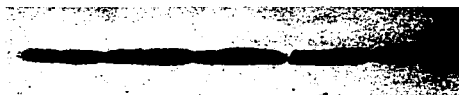
C

| | | | | | |
|------------------------|---|---|---|---|---|
| Pervanadato | - | - | - | - | + |
| tratamiento-VD3 | - | - | + | + | + |
| FcγR II (IV.3) | - | + | + | - | + |
| anti IgG | - | + | + | - | + |

IP anti Syk
Blot anti PY



Blot anti Syk



TESIS CON
FALTA DE
N

Figura 15. El nivel de fosforilación de Syk después de la agregación del FcγRII puede ser modulado por una proteína fosfatasa de residuos de tirosina.

(A) Células THP-1 a un densidad de 5×10^5 /ml fueron incubadas con 100 nM de VD3 por los tiempos indicados. Después de obtener los lisados celulares, iguales cantidades de proteína por carril se sometieron a electroforesis (SDS-PAGE). Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y secuencialmente se realizaron inmunoblots anti SHP-1 y anti actina con los anticuerpos correspondientes. (B) Células THP-1 fueron estimuladas a través del FcγRII como se describió anteriormente. Syk fue inmunoprecipitada de los lisados celulares. Los inmunoprecipitados fueron sometidos a SDS-PAGE, transferidos a nitrocelulosa y las membranas incubadas con anticuerpos anti PY. Las membranas fueron tratadas en dos ocasiones y posteriormente incubadas con anticuerpos anti Syk y anti SHP-1 respectivamente. (C) Las células THP-1 fueron estimuladas a través del FcγRII como se describió anteriormente antes y después de ser tratadas con 6 mM de pervanadato por 5 min. Syk fue inmunoprecipitada y los inmunoprecipitados fueron sometidos a SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Después de tratar la membrana, se realizaron inmunoblots anti PY y anti Syk. La relación obtenida de la señal del inmunoblot anti fosfotirosina entre la señal del inmunoblot anti Syk se presenta en el panel de abajo. El resultado es un promedio \pm ES de 3 experimentos independientes. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con las células sin tratar y sin estimular (C, carril 1) y ** ($p < 0.05$) comparado con las células tratadas con VD3 y estimuladas a través del FcγRII (C, carril 3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

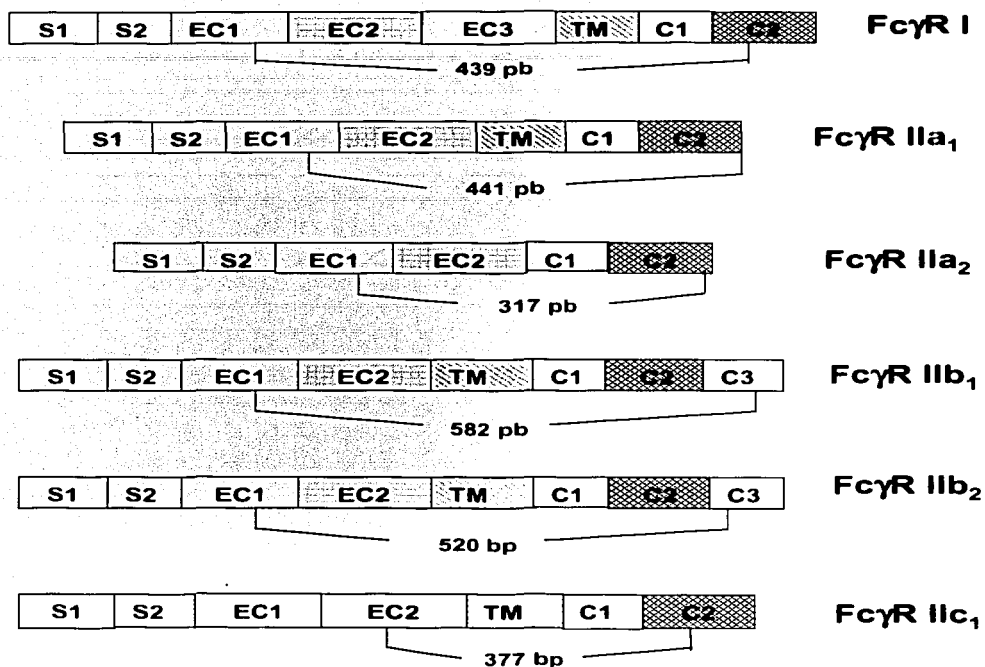
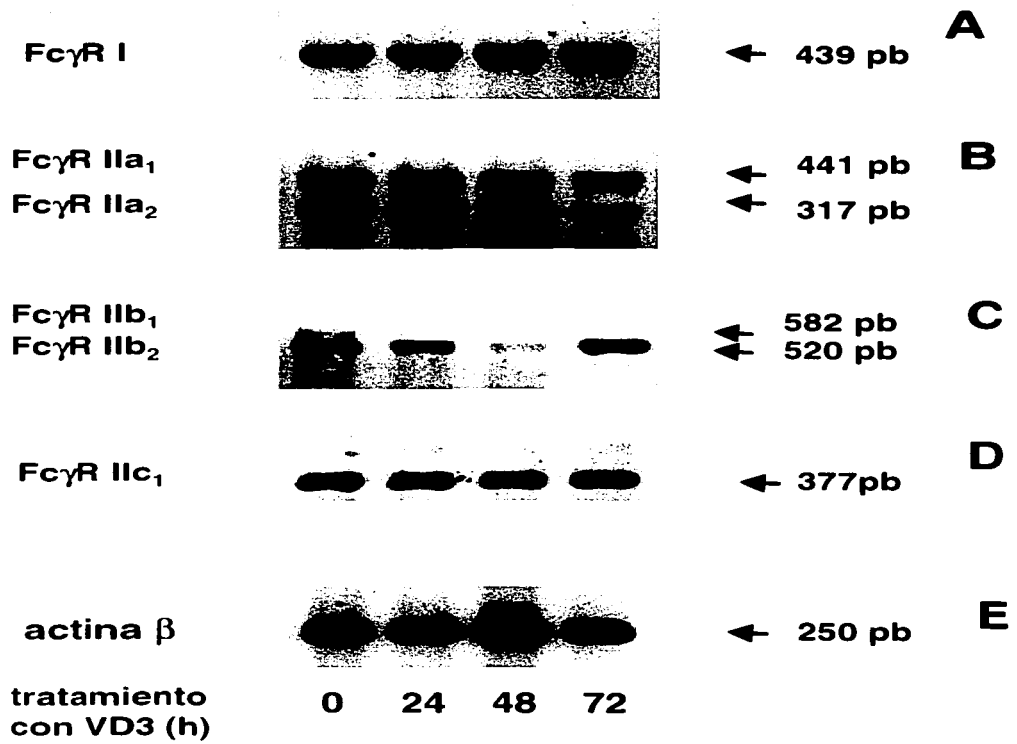
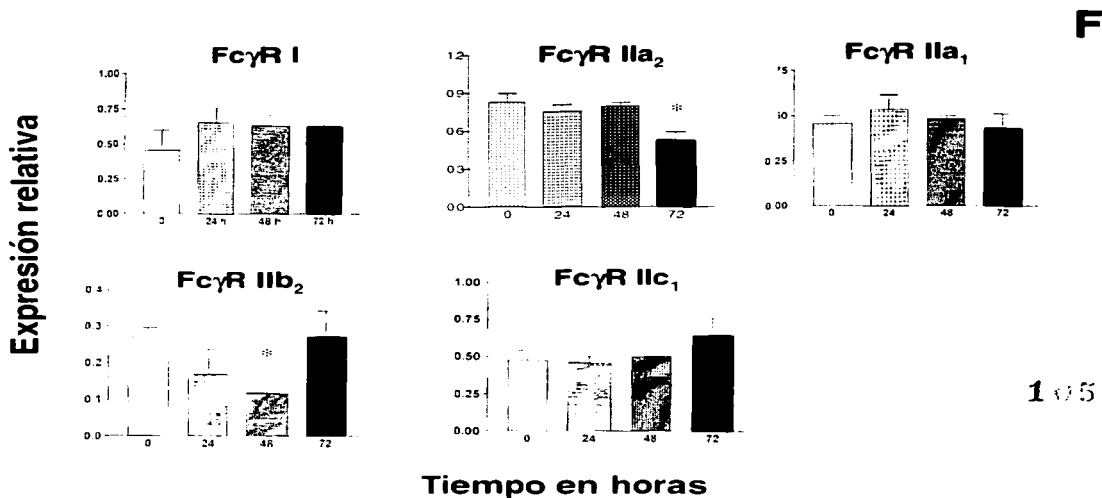


Figura 16. Mapa físico de los transcritos específicos de los FcγR I, IIa, IIb₁, IIb₂, y IIc.

Presentamos la estructura de los ADNc de las isoformas de los receptores FcγR I, IIa, IIb₁, IIb₂, y IIc. Los exones están representados por cuadros donde en su interior se indica el nombre correspondiente: S1 y S2, son los primeros exónes correspondientes a los péptidos señales; EC1, EC2 y EC3: primero, segundo y tercer exónes extracelulares; TM, exón transmembranaral, C1, C2 y C3: primero, segundo y tercer exónes intracitosólicos. Se indican los tamaños de los productos que se esperaba amplificar por RT-PCR.



TESIS CON
 FALLA DE CALIFICACION



105

Figura 17. La expresión de los transcritos de los FcγR IIa₂, FcγR IIb₁ y cγR IIb₂ en células THP-1 es modulada por el tratamiento con VD3.

El ARN total fue aislado de células THP-1 tratadas por 0, 24, 48 y 72 h con VD3. Posteriormente, transcrito de manera reversa y amplificado utilizando los pares de oligonucleótidos específicos indicados en la Tabla 3. Después de la reacción de PCR, los productos fueron analizados en geles de agarosa al 2% y bromuro de etidio (EtBr). (A) isoforma FcγR I; (B) isoformas FcγR IIa₂; (C) isoformas FcγR IIb₁, b₂; (D) isoforma FcγR IIc₁ y (E) actina. Las bandas productos de las reacciones de PCR fueron cuantificadas mediante análisis densitométrico y corregidas utilizando los datos de los valores del ARNm de la actina β-. (F) Los resultados están expresados como el promedio ± S.E.M. n=4; * indica diferencia significativa (p<0.05) comparado con las células tratadas (tiempo 0 h).

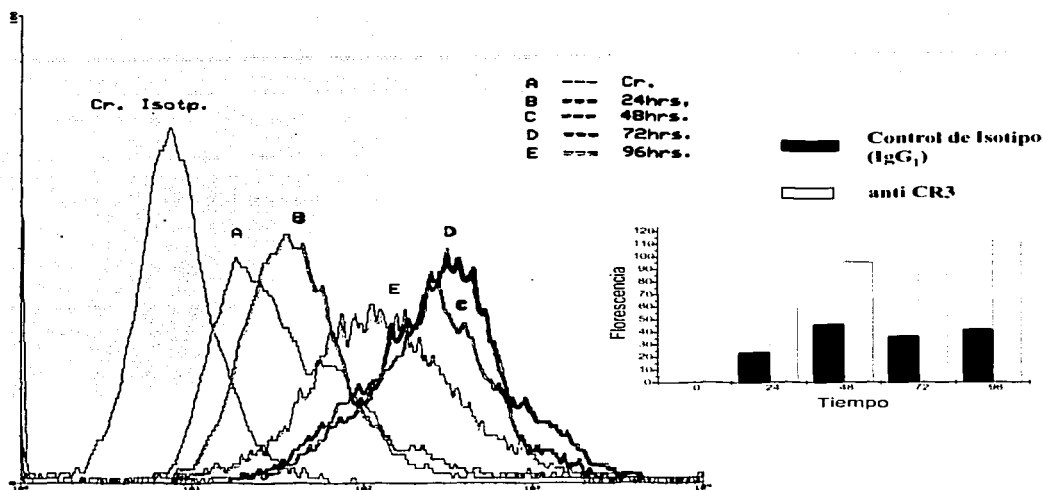


Figura 18A. Efecto en la expresión en membrana del receptor CR3 en los monocitos THP-1 tratados con VD3.

Monocitos THP-1 a una densidad de 0.5×10^6 células en 0.5 ml de PBS, SFB al 5% y NaN_3 al 0.1% fueron incubadas por 60 min a 4°C con $10 \mu\text{g}$ del anticuerpo monoclonal MY904 (anti CD11b) y los respectivos controles de isotipo (IgG1), seguidos por una incubación de 30 min con el anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC). Las células teñidas fueron fijadas en paraformaldehído y evaluadas por citofluorometría. El histograma gris claro representado por la letra **A**: células THP-1 no diferenciadas. El resto de los histogramas se indican en la leyenda.

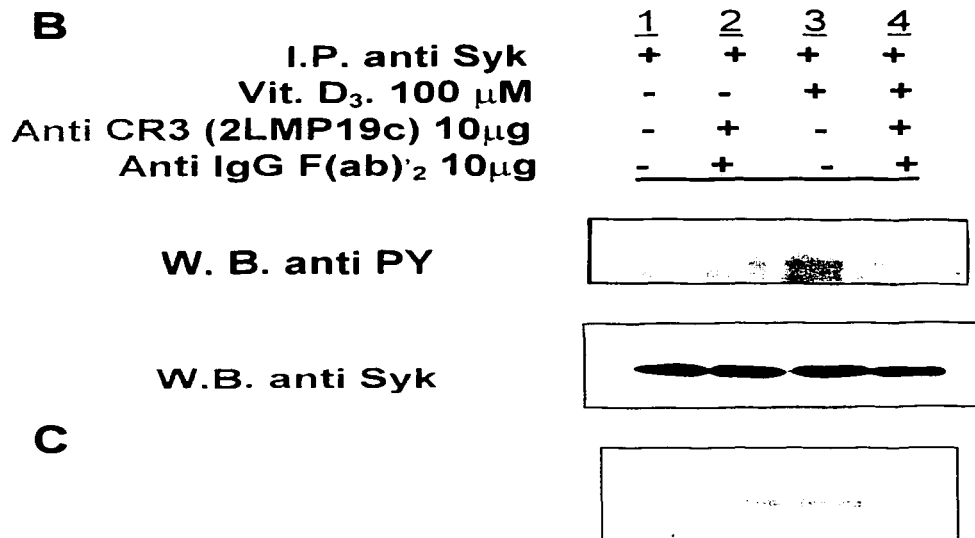


Figura 18 B-C. Fosforilación y activación de Syk inducida por agregación del receptor CR3 antes y después del tratamiento con VD3.

Immunoblots anti PY de los inmunoprecipitados anti Syk de células THP-1 estimuladas a través del receptor CR3. Células THP-1 a una densidad de 10×10^6 en 1.0 ml, fueron incubadas con 10 μg del anticuerpo monoclonal 2LPM19c, a 4°C por 10 min, seguidos por una incubación a 37°C por 3 min con 10 μg de los fragmentos F(ab)₂ del anticuerpo de conejo anti IgG murina. Las membranas fueron tratadas e incubadas nuevamente con anticuerpos anti Syk para detectar la cantidad de Syk presente en cada carril. Inmunoprecipitados anti Syk de lisados de células no tratadas y tratadas con VD3 fueron obtenidos de células THP-1 estimuladas y no estimuladas. Los inmunoprecipitados se utilizaron para ensayos de cinasa in vitro, utilizando 0.25 mg/ml de MBP como sustrato. Los productos de la reacción fueron sometidos a SDS-PAGE y posteriormente se obtuvieron autoradiografías.

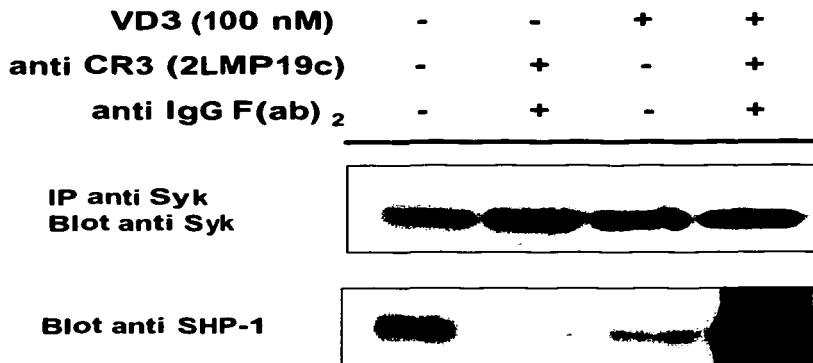


Figura 20. La agregación del CR3 modula la asociación de Syk-SHP-1.

Células THP-1 no tratadas (carriles 1, 2) y tratadas (carriles 3, 4) con 100 nM de VD3 fueron estimuladas a través del receptor CR3 utilizando iguales condiciones experimentales que las descritas para la figura 9. La cinasa Syk fue inmunoprecipitada, sometida a electroforesis (SDS-PAGE) y electrotransferida a membrana de nitrocelulosa. Los blots fueron secuencialmente tratados con anticuerpos anti Syk y anti SHP-1. Representativo de 2 experimentos independientes.

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACIÓN

pervanadato
 Vit. D₃. 100 μM
 CR3 2 LMP 19c/10μg
 Anti IgG F(ab)₂ 10μg

| <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> |
|----------|----------|----------|----------|
| - | - | - | + |
| - | - | + | + |
| - | + | + | + |
| - | + | + | + |

I.P. anti Syk
 W.B. anti PY



W.B. anti Syk



Figura 19. El tratamiento con pervanadato recupera la fosforilación de Syk inducida por CR3.

Células THP-1 no tratadas (carriles 1, 2) y tratadas (carriles 3, 4) con 100 nM de VD₃ por 72 h, fueron incubadas previamente con 100 μM de pervanadato de sodio por 15 minutos a 37°C (carril 4). Posteriormente las células fueron estimuladas a través del receptor CR3 utilizando iguales condiciones experimentales que las descritas para la figura 9, pero utilizando el anticuerpo monoclonal anti CR3 2LMP19c. La cinasa Syk fue inmunoprecipitada, sometida a electroforesis (SDS-PAGE) y transferida a membranas de nitrocelulosa. Los blots fueron secuencialmente tratados con anticuerpos anti PY y anti Syk. Representativo de 2 experimentos independientes.

1 α , 25-Dihydroxy-Vitamin D3 Alters Syk Activation Through Fc γ RII in Monocytic THP-1 Cells

José Agramonte-Hevia,¹ Claudia Hallal,¹ Claudia Garay-Canales,¹ Christian Guerra-Araiza,² Ignacio Camacho-Arroyo,² and Enrique Ortega Soto^{1*}

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., Mexico

²Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., Mexico

Abstract In monocytes and macrophages, activation of the tyrosine kinase Syk is an essential step in the biochemical cascade linking aggregation of receptors for immunoglobulin G (Fc γ R) to initiation of effector functions. An increase in Syk activation during differentiation of myeloid cells by different agents has been reported. We studied the activation state of Syk in response to Fc γ RII crosslinking in monocytic cells before and after *in vitro* differentiation with 1 α , 25-dihydroxy-vitamin D3. We show here that while in undifferentiated THP-1 cells clustering of Fc γ RII induces significant phosphorylation and activation of Syk, in THP-1 cells differentiated *in vitro* by 1 α , 25-dihydroxy-vitamin D3, Fc γ RII crosslinking induced a decrease in Syk activity. *In vitro* differentiation did not induce changes in the expression of Fc γ RII isoforms. The observed effect on Syk activation through Fc γ RII could be mediated by differentiation-induced changes in the expression and basal activation level of Syk, as well as changes in the association of Syk with the tyrosine phosphatase SHP-1. These results suggest that the biochemical signaling pathways induced by Fc γ RII could be dependent on the differentiation state of the cell. *J. Cell. Biochem.* 89: 1056–1076, 2003. © 2003 Wiley-Liss, Inc.

Key words: mononuclear phagocytes; IgG receptors; tyrosine kinase; monocyte differentiation

Macrophages and their blood precursors, monocytes, play important roles in host defense and homeostasis. Monocytes and macrophages express receptors for the Fc portion of immunoglobulin G (Fc γ R), which are members of the immunoglobulin superfamily [Hunkapillar and Hood, 1989]. Three classes of biochemically distinct Fc γ Rs have been described: Fc γ RI, Fc γ RII, and Fc γ RIII [Ravetch and Kinetic, 1991; Unkeless et al., 1992], and each class includes several isoforms. Fc γ RI is a high-affinity receptor that binds monomeric IgG, while Fc γ RII and Fc γ RIII are low-affinity receptors that bind

multimeric immune complexes [Ravetch and Kinetic, 1991; Cassel et al., 1993; Daeron, 1997].

In humans, both Fc γ RI and Fc γ RII are each encoded by three genes (A, B, and C) located at chromosome 1 (q21–23), whereas two genes (A and B) code for Fc γ RIII [Ravetch and Kinetic, 1991; Cassel et al., 1993; Daeron, 1997]. Fc γ RI expressed in the membrane of hematopoietic cells is encoded in the gene A and is a transmembrane receptor with three extracellular Ig-like domains. Genes B and C encode secreted forms of the receptors with only two Ig-like domains [Ernst et al., 1992].

Fc γ RII A, B, and C genes encode transmembrane receptors bearing two highly homologous extracellular domains, but the receptors encoded by Fc γ RIIB differ considerably in their cytoplasmic domains from those encoded by Fc γ RIIA and Fc γ RIIC. Fc γ RIIA originates two transcripts: Fc γ RIIA₁ (which encodes a transmembrane receptor) and Fc γ RIIA₂ (which lacks the transmembrane exon and thus generate soluble IgG-binding factor [Rappaport et al., 1993]. Fc γ RIIB generates three transcripts (Fc γ RIIB₁, Fc γ RIIB₂, and Fc γ RIIB₃) [Cassel

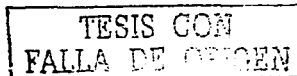
Grant sponsor: CONACYT; Grant number: 31783N; Grant sponsor: DGAPA; Grant number: IN213701.

*Correspondence to: Enrique Ortega Soto, PhD, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, D.F., 04510 México. E-mail: ortosoto@servidor.unam.mx

Received 24 July 2002; Accepted 28 March 2003

DOI 10.1002/jcb.10575

© 2003 Wiley-Liss, Inc.



et al., 1993). FcγRIIC produces four different transcripts (FcγRIIC₁₋₄) in NK cells; of these, FcγRIIC₁ is the form expressed in monocytes and macrophages [Mates et al., 1998]. The cytoplasmic tails of FcγRIIA₁ and FcγRIIC₁ are identical and contain a sequence motif, termed the immunoreceptor-tyrosine-based activation motif (ITAM); consensus sequence: D/EX₂YX₂LX₇₋₁₂YX₂L/D, found in several signaling chains of antigen receptors and immunoglobulin receptors [Reth, 1989], including the γ-chains associated with FcγRI and FcγRIIA [Park et al., 1993; Indik et al., 1994]. FcγRIIB₁ and FcγRIIB₂ are identical except for a 19-amino-acid insert in the cytoplasmic tail of FcγRIIB₁. Both receptors have a 13-mer containing the consensus I/VxYxxL/V sequence found in many inhibitory receptors known as immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) [Daeron et al., 1995; Cambier, 1997]. Coaggregation of the ITIM-containing FcγRIIB molecules with ITAM containing immune receptors such as the BCR, induces phosphorylation of the tyrosines within the ITIM motif. Once phosphorylated, the ITIM motifs can recruit SH2 domain-containing protein phosphatases such as SHP-1 and SHP-2 as well as the phosphatidylinositol 5'-phosphatases SHIP-1 and SHIP-2 [D'Ambrosio et al., 1995, 1996; Ono et al., 1996; Sato and Ochi, 1998]. The recruitment and activation of these phosphatases have been shown to negatively regulate signaling by ITAM-containing receptors.

Crosslinking of FcγRs by immune complexes or IgG-opsonized particles induces phosphorylation of tyrosine residues within the cytoplasmic domains of the receptors or associated subunits [Santana et al., 1996]. The first intracellular enzymes known to be activated after FcγR crosslinking are tyrosine kinases of the Src family [Jouvin et al., 1994]. Src kinase activation results in a rapid and transient phosphorylation of the ITAMs on either the cytoplasmic domain of FcγRIIA or the γ-chains associated with FcγRI and FcγRIIA [Park et al., 1993; Indik et al., 1994, 1995]. FcγRs crosslinking also results in an increase in tyrosine phosphorylation and activation of Syk [Agarwal et al., 1993; Kiener et al., 1993]. Syk is a protein tyrosine kinase of the Syk/ZAP-70 family, composed of two N-terminal Src homology domains and a C-terminal catalytic domain [Bolen and Brugge, 1997; Kiefer et al., 1998]. In monocytes and macrophages, FcγR aggregation induces Syk association with the phosphory-

lated ITAM motifs of the γ-chain of the FcγRI and FcγRIIA and of the cytoplasmic domain of FcγRIIA. Once associated, Syk becomes phosphorylated on tyrosine, is activated, and catalyzes the phosphorylation of multiple substrates, including other FcγRs ITAMs and downstream effectors [Greenberg et al., 1994; Rowley et al., 1995]. Syk activation has been shown to be a crucial step in FcγR mediated signaling, since blocking Syk activation, either by the specific inhibitor piceatannol, or by antisense oligonucleotides, completely abolishes downstream signaling stimulated through FcγRs [Matsuda et al., 1996; Pain et al., 2000].

Syk is not only important in signaling through a variety of receptors in both lymphoid and myeloid cells [Chan et al., 1994; Turner et al., 2000], but it has also been shown to play an essential role in the development of B cells [Cheng et al., 1995; Turner et al., 1995] and a subset of T cells [Turner et al., 1995; Mallick-Wood et al., 1996]. The role of Syk during differentiation of myeloid cells has not been studied in detail. An increase in tyrosine phosphorylation and catalytic activity of Syk has been observed during *in vitro* differentiation of HL-60 cells into granulocytes induced by all-*trans* retinoic acid [Qin and Yamamura, 1997].

Monocyte to macrophage differentiation is a complex process that can follow distinct pathways depending on the signals acting on the cell, thus producing the high degree of functional heterogeneity of mature macrophages. This functional heterogeneity includes almost all macrophage functions: ability as APC, secretion, and effector functions including the responses mediated by FcγRs [Adams and Hamilton, 1992]. Given the essential role of Syk in signaling through FcγRs and the possible involvement of Syk in the differentiation of cells expressing these receptors, we were interested in determining if the differentiation along a particular monocyte-macrophage pathway could affect the activation of Syk in response to FcγR crosslinking. As a model system, we studied the activation of Syk in response to FcγR crosslinking in the human monocytic cell line THP-1, before and after it was induced to differentiate with 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ (VD₃). This metabolite of Vitamin D has multiple effects on the differentiation and function of hematopoietic cells *in vivo* [Bouillon et al., 1995], and has been shown to promote the *in vitro* differentiation of monocytic cell lines into a more macrophage-like

phenotype [Choudhuri et al., 1990; Kreutz and Andreesen, 1990; Schwende et al., 1996].

We found that in undifferentiated THP-1 cells, FcγRII crosslinking induces significant Syk activation. However, in THP-1 cells differentiated by VD3, the phosphorylation level and activation state of Syk following FcγRII crosslinking was greatly reduced. The changes that we found in the expression of FcγRII isoforms do not seem to be related to this effect. However, we found that differentiation with VD3 induces changes in the association of Syk with the protein phosphatase SHP-1, and this can explain the inhibition of Syk activation after FcγRII crosslinking.

These results demonstrate that the biochemical signaling pathways induced by crosslinking of FcγRII are dependent on the differentiation status of the cell.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Antibodies

Fetal bovine serum (FBS) and Protein A-Sepharose beads were purchased from Gibco Laboratories (Grand Island, NY). The 1- α ,25-dihydroxy-vitamin D₃ (1 α , 25-(OH)₂ VitD₃), VD3 was from CALBIOCHEM (La Jolla, CA). Bovine serum albumin (BSA) was from Sigma (St. Louis, MO). 2,4,6-Trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) for sensitization of sheep erythrocytes was from Eastman Kodak Co. Murine monoclonal anti-human FcγRI (32.2) and FcγRII (IV.3) mAbs were purified in our laboratory from supernatants of the corresponding hybridomas obtained from ATCC. Fab fragments were prepared from the purified antibody with Immobilized Pepsin (Pierce), following the manufacturer's instructions. Murine monoclonal anti-human FcγRIIIA (3G8) was from Zymed (San Francisco, CA). Anti-Syk (SC-573), anti-SHP-1 (SC-287), and anti-phosphotyrosine antibodies (PY-20, SC-508, and PY-20-HRP, SC-508HRP) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Goat anti-rabbit IgG F(ab)₂ was from Zymed (62-6120); goat anti-mouse IgG-HRP was from Jackson Immuno Research (Amish, PA). Anti-CD11b monoclonal antibody (2LPM19c) (M 0747) was from DAKO Corporation (Carpinteria, CA). Mouse monoclonal DNP-specific antibodies 2C5 (IgG₁) and 4F8 (IgG_{2b}) used as isotype controls for cytofluorometry and as opsonizing antibodies in the phagocytosis assay

were produced in our laboratory from culture supernatants of the corresponding hybridomas. Goat anti-mouse IgG-FITC was from Zymed. Myelin basic protein (MBP) was kindly donated by Dr. Janet Oliver (University of New Mexico, Albuquerque, NM). γ -³²P-ATP was from New England Nuclear (Beverly, MA).

Reagents for RNA isolation and RT-PCR were purchased from Gibco-BRL, Inc. (Gaithersburg, MD) and Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO). Taq DNA polymerase was purchased from Perkin-Elmer (Branchburg, NJ).

Flow Cytometry

THP-1 cell suspensions (0.5×10^6 cells/ml) in PBS with 5% FBS and 0.01% sodium azide were incubated with 10 μ g/ml of one of the following primary murine monoclonal antibodies: anti-FcγRI (32.2), anti-FcγRII (IV.3), anti-FcγRIIIA (3G8), anti-CD11b (2LPM19c), anti-DNP IgG₁ (2C5), or anti-DNP IgG_{2b} (4F8) for 60 min at 4°C. After washing, cells were incubated in the dark for 90 min with 0.45 μ g/ml FITC-labeled goat anti-mouse IgG at 4°C. After washing, the cells were fixed for 30 min in 0.3% paraformaldehyde, followed by three washes with PBS. The stained cells were analyzed in a FACscan cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Cell Culture and In Vitro Differentiation

The monocytic cell line THP-1 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The cells were cultured in RPMI-1640 medium (GIBCO-BRL) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS, 1 mM MEM Sodium pyruvate solution, 2 mM MEM non-essential amino acids solution, 0.1 mM of L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. Cultures were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. Differentiation was induced by culturing THP-1 cells (3×10^6 cells/ml) in the presence of 100 nM of 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃ for 72 h. Cell differentiation was confirmed by changes in cell morphology, as well as increases in membrane expression of complement receptor type 3 (CR3). Microscopic phase-contrast images of undifferentiated and VD3-differentiated cells were obtained in an Axiovert 25 (Carl Zeiss) inverted microscope attached to a photographic camera.

Cell Stimulation and Immunoprecipitation

THP-1 cell suspensions (1×10^7 cells/ml) were maintained in serum-free RPMI-1640 medium

for 10 min on ice, previous to the incubation with 10 μg/ml of Fab fragments of mouse anti-FcγRI (32.2) or anti-FcγRII (IV.3) mAb, for 10 min on ice. The cell suspension was then centrifuged at 15,000g for 1 min at 4°C, and the supernatant was discarded. To induce FcγR aggregation, the cells were resuspended in 1.0 ml of fresh medium (without FBS) containing 10 μg/ml of F(ab)₂ fragments of rabbit anti-mouse IgG, for the indicated times at 37°C. Stimulation was stopped by addition of 500 μl of ice-cold TBS (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.4) and the cells were pelleted by centrifugation at 4°C. The supernatant was discarded and the cells were lysed in 1 ml of lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenyl-methyl sulfonyl fluoride, 1 mM NaF and 1 μg/ml of Pepstatin A, Leupeptin and Aprotinin) and kept on ice for 15 min. Lysates were clarified by centrifugation at 15,000g for 15 min at 4°C. Protein concentration in cell lysates was determined by the DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA), following the manufacturer's instructions. For immunoprecipitation, the clarified lysates were incubated for 3 h at 4°C with anti-Syk antibodies prebound to protein A-Sepharose beads. Immunoprecipitates were washed three times with washing buffer (of identical composition as lysis buffer but with 0.1% Triton X-100), and used for *in vitro* kinase assays, or they were boiled in Laemmli sample buffer and separated on 10% SDS-PAGE for immunoblotting.

Where indicated, cells were incubated before stimulation with 100 μM pervanadate for 5 min at 37°C. Pervanadate was generated by mixing 1 ml of 20 mM Na₃VO₄ with 330 μl of 30% H₂O₂ and incubating for 5 min at room temperature, obtaining a solution of 6 mM pervanadate.

Immunoblotting

Immunoprecipitates or whole cell lysates were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 1% BSA and 3% non-fat dry milk in low-salt Tween-20-Tris-buffered saline (T-TBS) (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20) overnight at 4°C. This was followed by incubation with primary antibody (anti-phosphotyrosine (PY-20), anti-Syk or anti-SHP-1) for 90 min at room temperature. After washing, the membranes were incubated with a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase in T-TBS for 1 h

at room temperature. For chemiluminiscent detection, blots were treated with Super Signal ECL kit (Pierce) according to the manufacturer's instructions, and exposed to X-ray films. Digitalized images of the developed films used to capture the chemiluminiscent signals were obtained with the Gel-Doc 2000 System (Bio-Rad) and analyzed with the Bio-Rad Quantity One software. Where indicated, membranes were stripped and reblotted with a different primary antibody. For stripping, membranes were incubated in 0.1 M glycine (pH 2.5) for 1 h at 60°C. After washing, the membranes were blocked and incubated with primary and secondary antibodies and processed as described above.

In Vitro Kinase Assays

The washed immunoprecipitates obtained as described above, were incubated in 50 μl of kinase buffer (50 mM HEPES-sodium hydroxide pH 8.0, 10 mM Na₃VO₄, 50 mM manganese acetate, 150 mM NaCl, 10 μCi [γ-³²P]-ATP, and 2.5 μg/ml MBP) for 10 min at 37°C. After washing three times with 1 ml of kinase buffer (without [γ-³²P]-ATP), the immunoprecipitates were boiled in SDS-PAGE sample buffer and resolved on 12.5% SDS-PAGE gels. The dried gels were exposed at -70°C on X-ray films.

Phagocytosis Assay

Sheep RBC were kept at 4°C in Alsever's solution for a maximum of 4 weeks until used. They were washed in DGVB⁺ and derivatized with 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid, sodium salt (TNBS) by incubating 1.0 ml of packed SRBC with 12.44 mg of TNBS in 7 ml of borate buffer with gentle shaking and protected from light for 10 min at room temperature. The sensitized RBC were washed two times with DGVB⁺ and once with RPMI medium without FBS. Fifty microliters of a 2% suspension of sensitized RBC in RPMI were added to each well of a 96-well V-bottom plate containing 100 μl of serial 1:2 dilutions of anti-DNP 4F8 antibody. The plates were incubated at room temperature for 90 min. The hemagglutination titer was determined as the lowest concentration of anti-DNP monoclonal 4F8 antibody that produced visible RBC agglutination. Opsonization of RBC with anti-DNP IgG was carried out by incubating a 1% suspension of sensitized RBC in RPMI with a sub-hemagglutination dilution of anti-DNP IgG at room temperature for 60 min. The

unbound antibodies were removed by centrifugation. For the phagocytosis assay, 320 μ l of a suspension of THP-1 cells (1×10^6 /ml) was incubated with 60 μ l of anti-DNP opsonized or non-opsonized RBC for 2 h at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. The cells were then washed three times with PBS to remove unbound RBCs. Non-internalized RBCs were lysed with 0.2% PBS for 30 s. Phagocytosis assays were performed in triplicate. RBC ingestion by THP-1 cells was examined by light microscopy by an observer who was blind to the treatment conditions. The results are expressed as the phagocytic index (number of ingested RBC by 100 cells).

RNA Isolation, Reverse Transcription (RT) and PCR

Total RNA was isolated from THP-1 cells by the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction using TRIzol (Gibco-BRL, Inc.) [Chomczynski and Sacchi, 1987]. RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm and its integrity was verified by electrophoresis on 1.1% denaturing agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde. Total RNA was reverse transcribed to synthesize single strand cDNA as previously described [Camacho-Arroyo et al., 1996]. Ten microliters of RT reaction were subjected to PCR in order to simultaneously amplify Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIC, and β -actin genes, the latter used as an internal control. The sequences of the specific primers used for amplification are given in Table I. The 50 μ l PCR reaction included: 10 μ l of previously synthesized cDNA and 40 μ l of a mixture containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 μ M of each primer, and 2.5 units of Taq DNA

polymerase. Negative controls without RNA and with non-retrotranscribed RNA were included in all the experiments. After the initial denaturation step at 95°C for 5 min, 30 cycles were carried out for PCR amplification. The cycle profile for all genes amplification was: 95°C, 1 min; 60°C, 1 min; and 72°C, 1 min. A final extension cycle was performed at 72°C for 5 min. The number of cycles performed was within the exponential phase of the amplification process. Twenty-five microliters of PCR products were separated on 2% agarose gels and stained with ethidium bromide. The image was captured under a UV transilluminator on Type 665 negative film (Polaroid Co., Cambridge, MA). In each experiment, the amplification and analysis of the products of each gene were carried out in parallel. The images were captured in a Scan Jet 3C scanner (Hewlett-Packard) and the intensities of the individual bands were quantified using a Scand Primax 600p (Colorado), and Scion Image software. To get a semi-quantitative estimation of the mRNAs for each Fc γ R isoform, the intensity of the band corresponding to the amplification product was normalized to the intensity of the β -actin band. Thus, the relative expression level of each Fc γ R isoform is expressed as the ratio of intensities of its corresponding band to β -actin band.

Statistical Analysis

Data were analyzed by using a one way analysis of variance (ANOVA) followed by a Student's *t*-test. Prism 2.01 program (Graph Pad, CA) was used for calculating probability values.

RESULTS

VD3-Induced Differentiation of THP-1 Cells does not Alter Membrane Expression of Fc γ R5

In vitro treatment of THP-1 cells with the active metabolite of Vitamin D3 has been shown to induce some differentiation related changes [Kreutz and Andresen, 1990; Schwende et al., 1996]. To determine whether VD3 treatment modulates the surface expression of Fc γ R5 in THP-1 monocytic cells, cells were incubated in RPMI-1640—10% FBS for 72 h with or without 100 nM of VD3. Surface expression of CD11b/CD18 (CR3), Fc γ RI, Fc γ RII, and Fc γ RIII was evaluated by cytofluorometry using mAbs 2LP-M19c, 32.2, IV.3, and 3G8 specific for CD11b, Fc γ RI, Fc γ RII, and Fc γ RIII, respectively. VD3

TABLE I. Sequences of Fc γ RI and Fc γ RII-Specific Primers for RT-PCR

| Receptor | S, sense; AS, antisense | Sequence |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Fc γ RI | S | 5'TGAATACAGGGTGGCCAGAGAG 3' |
| | AS | 3'AGAAGTAAAGCTTGCAAACCA 5' |
| Fc γ RIIA | S | 5'CAGCCGCTTCATCCAAAG 3' |
| | AS | 3'ATCCGCTCTTTCGTCATCC 5' |
| Fc γ RIIB ₁ | S | 5'ACACAAATGACAGGGGA 3' |
| Fc γ RIIB ₂ | S | 3'GGTGCATGAGAAGTGAATAG 5' |
| Fc γ RIIC | S | 5'TCCATCCCAAGCAACCA 3' |
| | AS | 3'TTATCATCGTCAGTAGGTCG 5' |

treatment induced differentiation-associated changes, such as changes in morphology and adherence of the cells to the culture flasks, as well as an increase in CD11b/CD18 surface expression. In contrast, treatment with VD3 for 72 h did not significantly alter membrane expression of Fc γ RI, Fc γ RII, or Fc γ RIII (Fig. 1).

Fc γ RII Crosslinking Induces Syk Phosphorylation

Activation of the tyrosine kinase Syk is an essential step in the biochemical cascade initiated by Fc γ R crosslinking [Kiener et al., 1993; Durden and Liu, 1994]. To measure the level of Syk phosphorylation induced after crosslinking Fc γ RII in THP-1 cells, the cells were first incubated at 4°C with saturating amounts of Fab fragments of anti-Fc γ RII mAb for 10 min, followed by crosslinking of the cell bound fragments with increasing concentrations of F(ab) $_2$ fragments of rabbit anti-mouse IgG at 37°C. After the stimulation, cells were lysed, Syk was immunoprecipitated from equivalent amounts of total protein lysates with anti-Syk antibodies, and the level of tyrosine phosphorylation of Syk was assessed by anti-phosphotyrosine immunoblotting (Fig. 2A). To account for possible differences in the amount of Syk immunoprecipitated, the same blot was stripped and reprobed with anti-Syk antibody. The results show that Fc γ RII crosslinking induces a significant increase in the level of Syk phosphorylation. In the experimental conditions used, Syk phosphorylation increases as the amount of secondary antibody is increased, reaching a maximum at 10 μ g/ml of secondary antibodies (Fig. 2A). The maximal increase in tyrosine phosphorylated proteins after Fc γ RII crosslinking is seen at 3 min of stimulation as shown in Figure 2B. Using these experimental conditions, we performed experiments in which THP-1 cells were stimulated by crosslinking Fc γ RII and the level of phosphorylation of Syk was determined by immunoprecipitating Syk, resolving the immunoprecipitates in SDS-PAGE, transferring the resolved proteins to nitrocellulose membranes, and sequentially blotting the membranes with anti-PY and anti-Syk antibodies. Figure 2C shows a representative experiment and Figure 2D shows the average of three independent experiments in which the level of Syk phosphorylation for each condition was determined as the ratio of anti-PY signal to anti-Syk signal of the relevant bands.

Effect of VD3-Induced Differentiation on Syk Phosphorylation Levels After Fc γ R Crosslinking

It has been reported that the activity of Syk can be modulated during the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells [Qin and Yamamura, 1997]. To determine whether differentiation of THP-1 cells induced by VD3 treatment has any effect on the amount of Syk in the cells, we performed anti-Syk immunoblots in lysates of cells treated with VD3 for 0, 24, 48, and 72 h. The blot was stripped and re-probed with anti-actin antibody and the results are expressed as the ratio of the anti-Syk to the anti-actin band for each sample. The results showed a time-dependent increase in Syk levels in THP-1 cells treated with 100 nM VD3 (Fig. 3).

To determine whether differentiation affects Syk activation after Fc γ RII crosslinking, we compared the level of Syk phosphorylation induced through Fc γ RII in THP-1 cells treated or not with VD3 (100 nM) for 72 h. Both non-treated and VD3-treated THP-1 cells were stimulated through Fc γ RII as described above. After stimulation, cells were lysed and the levels of Syk phosphorylation were compared in anti-Syk immunoprecipitates. In untreated cells, Fc γ RII crosslinking induced a significant increase in phosphorylation of Syk (Fig. 4A, lanes 1 and 2). VD3 treatment by itself induced an increase in the basal level of Syk phosphorylation (Fig. 4A, lane 3). Surprisingly, in VD3 treated cells the level of Syk phosphorylation after Fc γ RII crosslinking was significantly lower than that observed in unstimulated VD3-treated cells (Fig. 4A, compare lanes 3 and 4). The lower panel of Figure 4A shows the results of three independent experiments performed on different batches of THP-1 cells. The level of Syk activation induced by Fc γ RII crosslinking in VD3-treated and untreated cells was also assessed by determining the *in vitro* kinase activity of immunoprecipitated Syk on an exogenous substrate (MBP). In untreated cells, Fc γ RII crosslinking induced an increase in Syk activity (Fig. 4B, lane 2). Similar to what was observed in the level of Syk phosphorylation, VD3 treatment increased the basal level of Syk activity, and this basal level of activity decreased after Fc γ RII crosslinking (Fig. 4B compare lanes 3 and 4). Thus, while in undifferentiated THP-1 cells Fc γ RII crosslinking induces Syk phosphorylation and activation, after differentiation induced by VD3 the response to Fc γ RII

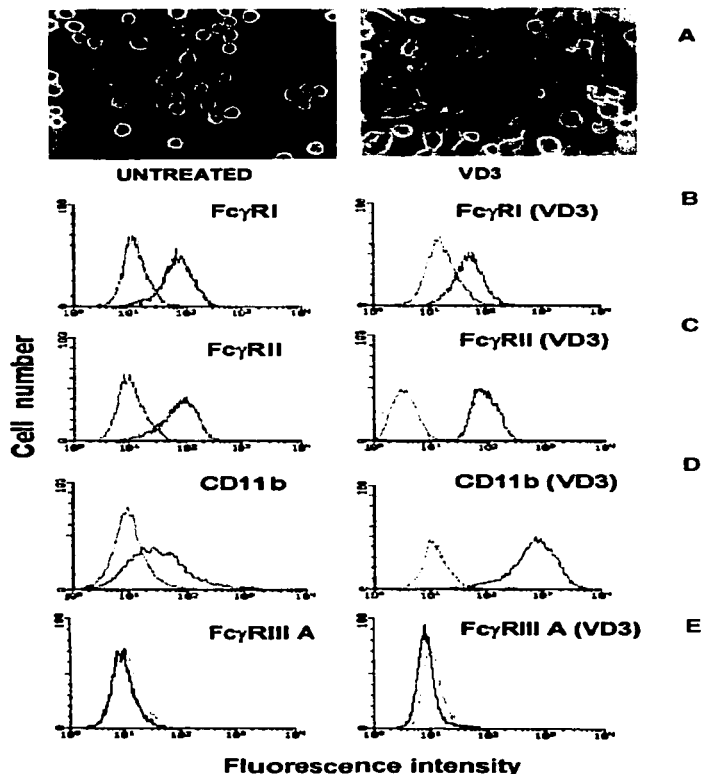


Fig. 1. Effect of VD3-induced differentiation on the morphology and the surface expression of Fc γ R and CD11b/CD18 receptors in THP-1 cells. A: THP-1 cells (5×10^5 /ml) were incubated in plastic culture flasks with or without 100 nM VD3 for 72 h. Microscopic phase-contrast images of the cells in the culture bottles were obtained in an Axiovert 25 (Carl Zeiss) inverted microscope attached to a photographic camera. B, C, D, E: Untreated or VD3-treated (100 nM, 72 h) THP-1 cells (0.5×10^6) in 0.5 ml of PBS; 5% FBS; 0.1% NaN₃ were incubated for 60 min at 4°C with 10 μ g of mAbs 32.2 (anti-Fc γ RI), IV.3 (anti-Fc γ RIII), 3G8 (anti-Fc γ RIIIA) or 2LPM19c (anti-CD11b) or

the respective isotype controls (IgG1 for 2LPM19c, 32.2, 3G8 and IgG2b for IV.3). After washing, the cells were stained for 30 min at 4°C with FITC-anti-mouse IgG. The stained cells were washed, fixed in paraformaldehyde and examined by cytofluorometry in a FACScan. **Left column:** undifferentiated THP-1 cells. **Right column:** THP-1 cells treated with VD3. The darker traces are the fluorescence distributions of cells stained with the specific antibodies. Similar results have been observed in numerous experiments performed during the course of the studies reported here.

crosslinking is different, decreasing both the phosphorylation in tyrosine residues and the kinase activity of Syk. To determine if this effect was also observed after crosslinking FcγRI, we performed similar experiments inducing FcγRI

crosslinking with anti-FcγRI Fab fragments and secondary antibodies. As expected, in undifferentiated THP-1 cells, FcγRI crosslinking induces Syk phosphorylation and activation (Fig. 5A). VD3 treatment by itself increased

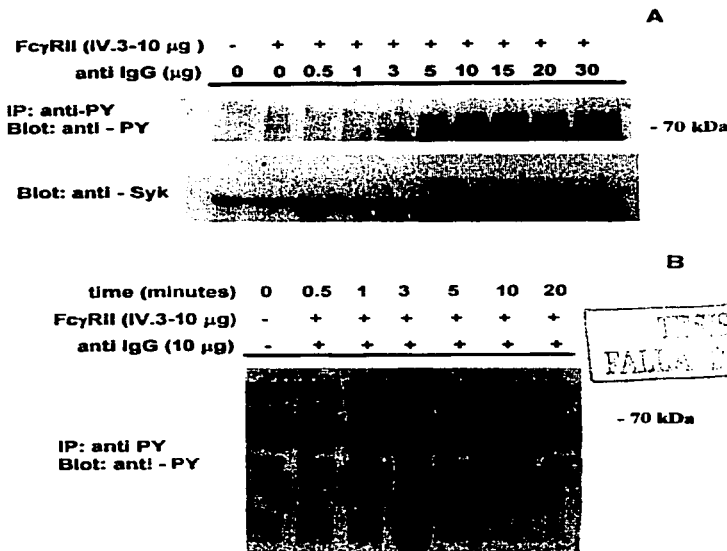


Fig. 2. Tyrosine phosphorylation of Syk induced by FcγRII crosslinking. **A:** THP-1 cells (1×10^7 in 1.0 ml) were incubated with 10 μg of Fab fragments of mAb IV.3 at 4°C for 10 min, centrifuged and resuspended in 1.0 ml RPMI containing the indicated amounts of Fab₂ fragments of rabbit anti-mouse IgG for 3 min at 37°C. Stimulation was halted by the addition of 500 μl of ice-cold TBS to each tube, the tubes were centrifuged and the pelleted cells were lysed in lysis buffer. Equivalent amounts of total protein from each lysate were used for immunoprecipitations with anti-Syk antibodies bound to protein A-Sepharose beads to immunoprecipitate Syk. After washing, the immunoprecipitates were boiled in Laemmli sample buffer and resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The blot was developed with anti-phosphotyrosine (anti-PY) antibodies as described in Materials and Methods. The same membrane was acid-stripped and reprobed with anti-Syk polyclonal antibodies. **B:** THP-1 cells (1×10^7 in 1.0 ml) were incubated with 10 μg of Fab fragments of mAb IV.3 at 4°C for 10 min. After centrifugation, the cells were resuspended in 1.0 ml RPMI containing 10 μg of Fab₂ fragments of rabbit anti-mouse IgG and incubated at 37°C

for the indicated times. The cells were lysed and the phosphorylated proteins were immunoprecipitated from equivalent amounts of total protein, and resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The blot was developed with anti-phosphotyrosine antibody conjugated to HRP and chemiluminescent detection. **C:** THP-1 (1×10^7 in 1.0 ml) cells were incubated for 10 min at 4°C with RPMI alone or with 10 μg of Fab fragments of mAb IV.3. After centrifugation, the cells were incubated at 37°C for 3 min with 10 μg of Fab₂ fragments of anti-mouse IgG in 1.0 ml of RPMI medium. Cells were lysed and Syk was immunoprecipitated with anti-Syk antibodies bound to Protein A-Sepharose beads. Immunoprecipitates were resolved as in A, and the blot was sequentially developed with anti-PY and anti-Syk polyclonal antibodies. **D:** The phosphorylation level of Syk was calculated as the ratio of the densitometric intensities of the anti-PY signal to the anti-Syk signal of the respective bands in three independent experiments as shown in C. Results are the mean ± SEM, n = 3. *P < 0.05 compared with unstimulated cells (lane 1).

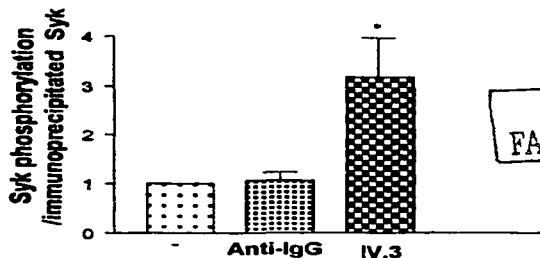
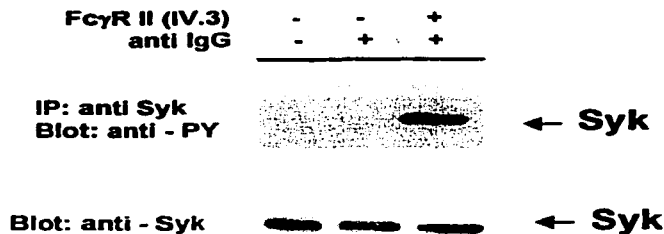


Fig. 2. (Continued)

the basal level of Syk phosphorylation, but crosslinking of FcγRI in VD3 treated cells was still able to cause an increase in Syk phosphorylation (Fig. 5B). Thus, VD3 induces an increase in both total level and basal phosphorylation state of Syk, and the cells' response in terms of Syk activation induced by FcγRI or FcγRII crosslinking is differentially affected by differentiation.

Effect of VD3 Treatment on FcγR-Mediated Phagocytosis in THP-1 Cells

To determine if VD3 differentiation affects an FcγR-mediated function, we examined the phagocytosis of IgG opsonized erythrocytes by THP-1 cells after VD3 treatment for 0, 24, 48, and 72 h. VD3 treatment for 48 and 72 h decreased THP-1 phagocytosis in a time-dependent manner reaching an inhibition of about 35% after

72 h (Fig. 6). VD3 treatment for 24 h did not result in any significant decrease in phagocytosis (0 vs. 24 h).

Pervanadate Treatment Restores Syk Phosphorylation Induced by FcγRII Crosslinking in VD3-Treated Cells

To determine if the decrease in the phosphorylation state of Syk induced by FcγRII crosslinking in VD3-differentiated cells is mediated by a protein-tyrosine phosphatase activity induced by FcγRII crosslinking, we examined if this effect could be prevented by a general phosphatase inhibitor (sodium pervanadate). VD3 treated cells were incubated in the presence of sodium pervanadate for 5 min before stimulation by FcγRII crosslinking as above. After stimulation of VD3 treated or untreated cells, Syk

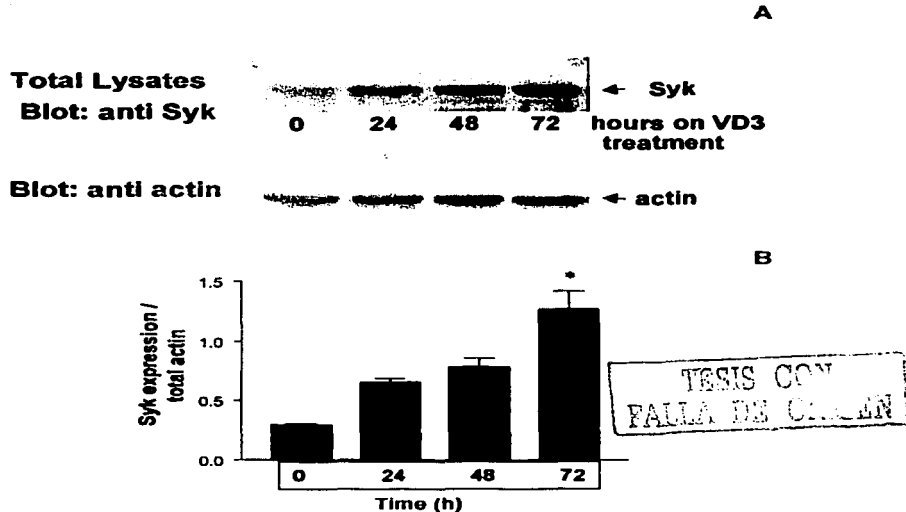


Fig. 3. Effect of VD3 on the expression of Syk in THP-1 cells. **A:** THP-1 cells (5×10^5 /ml) were incubated with 100 nM VD3 in RPMI-10% FBS for the indicated times. Cells were washed, lysed in lysis buffer and equivalent amounts of total protein from each lysate were separated by SDS-PAGE. The resolved proteins were transferred to nitrocellulose membranes and sequentially devel-

oped with anti-Syk and anti-actin antibodies. **B:** The Syk level was calculated as the ratio of the densitometric intensities of the anti-Syk signal to the anti-actin signal in each lane in three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SEM, $n = 3$. * $P < 0.05$ compared with untreated cells (0 h).

phosphorylation was analyzed by anti-PY/anti-Syk immunoblotting as described above. In VD3-treated cells, pretreatment with the phosphatase inhibitor prevented the previously observed decrease in Syk phosphorylation induced by FcγRII crosslinking (Fig. 7A compare lanes 3 and 5). These results suggest that in VD3-treated cells (but not in undifferentiated THP-1 cells) a protein tyrosine phosphatase is involved in regulation of the Syk phosphorylation level after FcγRII crosslinking.

Interaction Between Syk and SHP-1 is Modulated by VD3

SHP-1 is a protein tyrosine phosphatase, which has been shown to interact directly with ZAP-70 in T cell lines and in heterologous expression systems. Based on this, it has been

suggested that SHP-1 is involved in the negative regulation of the catalytic activity of ZAP-70 [Plas et al., 1996]. The physical association of SHP-1 and Syk has also been reported, and it has been shown that Syk is a substrate for SHP-1 [Dustin et al., 1999]. To determine if VD3 treatment modulates SHP-1 expression, we analyzed by immunoblotting the levels of SHP-1 in cells treated with VD3 for different times. The results showed that VD3 treatment did not significantly affect the expression of SHP-1 (Fig. 7B). In order to assess the possible association of SHP-1 with Syk in THP-1 cells and if this association could be modulated by VD3 treatment, we determined by immunoblotting the presence of SHP-1 in anti-Syk immunoprecipitates from VD3 treated and untreated cells before and after FcγRII crosslinking. To obtain a

quantitative assessment of the degree of coimmunoprecipitation of SHP-1 with Syk, the ratio of the densitometric signals of SHP-1 to Syk was calculated. In undifferentiated, non-stimulated THP-1 cells, a certain degree of SHP-1 coimmunoprecipitation with Syk was observed (Fig. 7C, lane 1, ratio = 1.0). Upon Fc γ RII crosslinking,

this association was significantly reduced (Fig. 7C, lane 2). Treatment of the cells with VD3 for 72 h slightly diminished the level of basal association of both molecules (Fig. 7C, lane 3, ratio = 0.80). However, upon Fc γ R II crosslinking, a significantly higher amount of SHP-1 was coimmunoprecipitated with Syk (Fig. 7C,

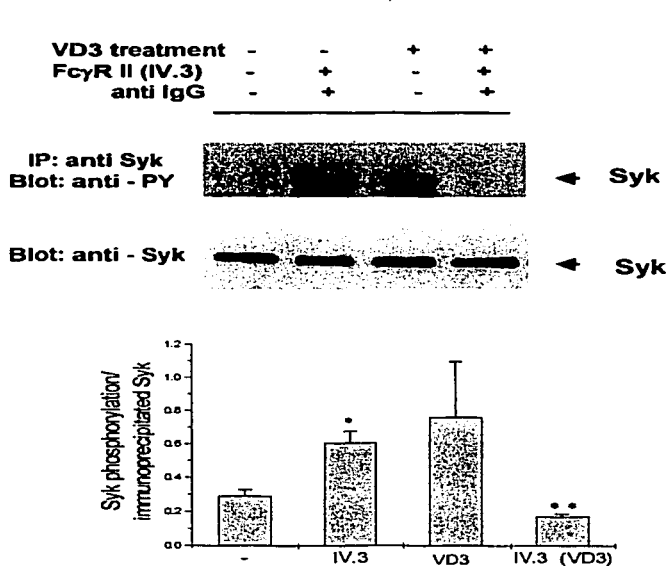


Fig. 4. VD3 treatment of THP-1 cell prevents Syk phosphorylation induced by Fc γ RII crosslinking. A: Tyrosine phosphorylation of Syk in VD3-treated and untreated THP-1 cells. THP-1 cells were left untreated (lanes 1 and 2) or were treated with 100 nM of VD3 for 72 h (lanes 3 and 4). Treated or untreated THP-1 cells (10^7 /ml) were incubated in RPMI medium with 10 μ g of Fab fragments of mAb IV.3 (lanes 2 and 4) at 4°C for 10 min, followed by further incubation at 37°C for 3 min, with 10 μ g of Fab γ_2 fragments of rabbit anti-mouse IgG. The cells were lysed in lysis buffer and Syk was immunoprecipitated with anti-Syk antibodies bound to Protein A-Sepharose beads from equivalent amounts of cell lysates. The immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The blot was developed with anti-phosphotyrosine (anti-PY) antibodies as described in Materials and Methods. The same membrane was acid-stripped and reprobed with anti-Syk polyclonal antibodies.

The phosphorylation level of Syk was calculated as the ratio of the densitometric intensities of the anti-PY signal to the anti-Syk signal of the respective bands. The graph shows the results from three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SEM, n = 3; * P < 0.05 compared with unstimulated and untreated cells (lane 1) and ** P < 0.05 compared with unstimulated and VD3 treated cells (lane 3). B: VD3 treatment blocks Syk activation induced by Fc γ RII crosslinking. Anti-Syk immunoprecipitates from lysates of equivalent number of VD3 treated and untreated cells were obtained from unstimulated or stimulated cells as in A. The immunoprecipitates were resuspended in kinase buffer (with 0.25 Ci of γ - 32 P-ATP), and used for in vitro kinase assays using 0.25 mg/ml of MBP as substrate. The reaction products were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The experiment shown is representative of three independent experiments.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

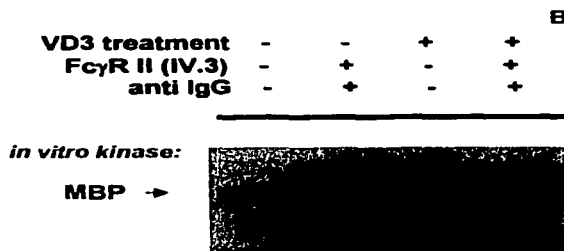


Fig. 4. (Continued)

lane 4, ratio = 1.70). The degree of Syk phosphorylation in cells stimulated through FcγRII seems to inversely correlate with the level of Syk-SHP-1 association: in non-treated cells FcγRII cross-linking results in an increase in Syk phosphorylation (and barely detectable association with SHP-1), whereas in VD3 treated cells the level of Syk phosphorylation is low and its association with SHP-1 is highest (Fig. 7D).

Modulation of FcγRII mRNA Levels by VD3 Treatment in THP-1 Cells

The above results suggest that in VD3-treated THP-1 cells, FcγRII crosslinking results in a decrease in the level of Syk phosphorylation, and that this effect could be mediated by modulation of the association of SHP-1 with Syk. A possible mechanism involved in this effect is that VD3 treatment could induce changes in the relative expression of FcγRII isoforms, since one of the FcγRII isoforms, FcγRIIB, is an ITIM-containing receptor which has been shown to recruit SH2-containing protein tyrosine phosphatases (SHP-1 and SHP-2) as well as the phosphatidylinositol 5'-phosphatase SHIP to the vicinity of phospho-ITAMs [Dustin et al., 1999]. Therefore, an increase in the relative levels of FcγRIIB versus FcγRIIA could provide a mechanism to recruit more SHP-1 to the aggregates. To test this possibility, we used a semiquantitative RT-PCR to determine if VD3 modifies the expression of FcγRII isoforms. The primers pairs used to specifically amplify cDNA for FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB₁, FcγRIIB₂, and FcγRIIC are shown in Table I, and the results of a single experiment as well as the graphs of the

combined results of four independent experiments are shown in Figure 8. A PCR product of 439 bp corresponding to the FcγRIa transcript, and two PCR products of 441 and 317 bp, corresponding to FcγRIIA₁ and FcγRIIA₂ transcripts were obtained using the FcγRI and FcγRIIA specific primers, respectively. No differences in the level of FcγRI and FcγRIIA₁ mRNAs were observed after VD3 treatment, while a significant decrease in the level of the 317 bp band (FcγRIIA₂) was observed after 48 and 72 h of VD3 treatment (Fig. 8A,B).

Two PCR products were amplified with the use of the FcγRIIB-specific primers: a weak band at 582 bp corresponding to FcγRIIB₁ and a fragment of 520 bp corresponding to FcγRIIB₂. However, the 582 bp fragment was clearly visible only in one out of four independent experiments and even in that experiment the intensity of this band was very faint. In contrast, the 520 bp fragment (FcγRIIB₂) was always clearly detected. This band reproducibly showed a biphasic pattern after VD3 treatment: it decreases after 24 h of treatment and becomes almost undetectable at 48 h. However, after 72 h FcγRIIB₂ expression returned to the levels observed in non-treated cells (Fig. 8C).

Analysis of FcγRIIC mRNAs by RT-PCR showed a band corresponding to 377 bp. No significant changes in the level of expression of this band were detected after VD3 treatment (Fig. 8D). The expression of β-actin was not modified by VD3 treatment (Fig. 8E). The RT-PCR for the actin mRNA was included as an internal control and to normalize the levels of FcγRs mRNAs among the different experiments.

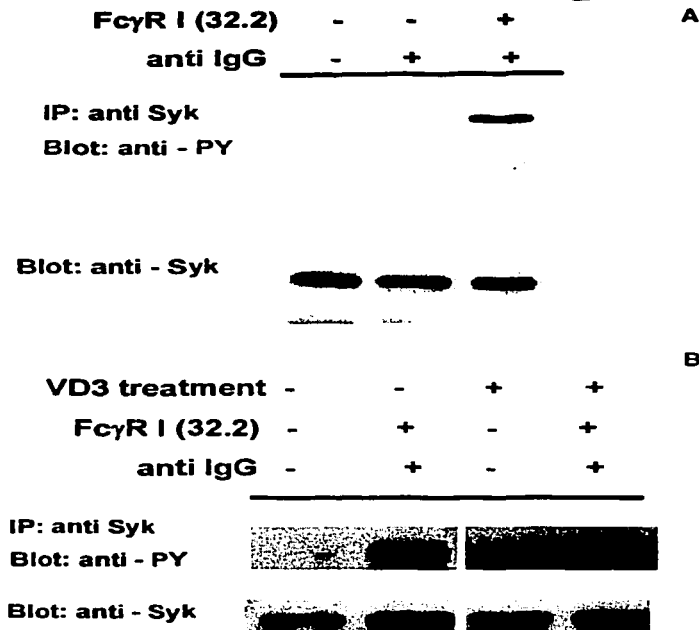


Fig. 5. VD3 treatment of THP-1 does not block Syk phosphorylation induced by FcγRI crosslinking. **A:** THP-1 cells (1×10^7 in 1.0 ml) were incubated in RPMI medium alone or with 10 μg of Fab fragments of mAb 32.2, at 4°C for 10 min, followed by further incubation at 37°C for 3 min, with 10 μg of F(ab)′₂ fragments of rabbit anti-mouse IgG. The cells were lysed in lysis buffer and equivalent amounts of total protein from each lysate were used to immunoprecipitate Syk. The immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The blot was developed with anti-phosphotyrosine (anti-PY) antibodies as described in Materials and Methods. The same membrane was acid-stripped and reprobed with anti-Syk

polyclonal antibodies. **B:** THP-1 cells were left untreated (lanes 1 and 2) or were treated with 100 nM of VD3 for 72 h (lanes 3 and 4). Treated or untreated THP-1 cells (10^7 /ml) were stimulated as in A. The cells were lysed in lysis buffer and Syk was immunoprecipitated with anti-Syk antibodies bound to Protein A-Sepharose beads from equivalent amounts of cell lysates. The immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The blot was developed with anti-phosphotyrosine (anti-PY) antibodies as described in Materials and Methods. The same membrane was acid-stripped and reprobed with anti-Syk polyclonal antibodies.

DISCUSSION

Receptors for the Fc portion of IgG are expressed on the surface of almost all hematopoietic cells. Binding of antigen-antibody complexes or IgG-opsonized particles to these receptors triggers a variety of effector responses.

These include phagocytosis, production of cytokines and chemokines, release of cytotoxic and microbicidal molecules, and changes in the expression of cell-surface proteins involved in cell-cell adhesion and antigen presentation [Ravetch and Kinet, 1991]. In this way, FcγRs allow the humoral and cellular aspects of immunity to

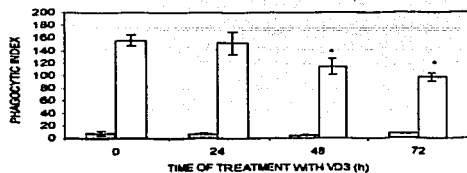


Fig. 6. VD3 treatment decrease Fc γ R-mediated phagocytosis in THP-1 cells. Sheep RBC were opsonized with anti-DNP IgG as described in Materials and Methods. For the phagocytosis assay, 320 μ l of THP-1 cells suspension (1×10^6 /ml) were incubated with 60 μ l of a 2% suspension of opsonized (empty bars) or non-opsonized (gray bars) RBC for 2 h at 37°C in a 5% carbon dioxide humidified incubator. The cells were then washed three times with PBS to remove unbound RBCs. Non-internalized RBCs were lysed with 0.2% PBS for 30 s. RBC ingestion by THP-1 cells was examined by light microscopy by an observer who was blind to treatment conditions. All assays were performed in triplicate. The results are expressed as the phagocytic index (number of ingested RBC by 100 cells). Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$, * $P < 0.05$ compared with the untreated cells (0 h).

communicate and cooperate in expanding, sustaining, and regulating immune responses.

Numerous studies have identified a variety of molecular participants and biochemical events involved in signal transduction through Fc γ Rs [Daeron, 1997; Ravetch and Bolland, 2001]. Less attention has been given to study how the biochemical pathways initiated by individual types of Fc γ Rs can be affected by the differentiation/activation state of the cell expressing the Fc γ R. The aim of this study was to determine if the biochemical events initiated by aggregating Fc γ RII on monocytic cells are affected by the differentiation state of the cell.

Syk is known to play a central role in the signaling pathways activated by Fc γ Rs [Agarwal et al., 1993; Kiener et al., 1993; Pan et al., 1999]. Once activated, Syk can stimulate various biochemical pathways involved in the cell's response. Because of its central role, we decided to study the effect of cell differentiation on signal transduction by Fc γ RII by focusing on the level of phosphorylation and activation of Syk after aggregation of Fc γ RII in a monocytic human cell line that can be differentiated in vitro. The metabolite 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D3 (VD3) has been shown to promote differentiation of monocytic cell lines towards a macrophage-like phenotype [Choudhuri et al., 1990; Kreutz and Andresen, 1990]. Treatment of THP-1 cells for 72 h with VD3 induces several

differentiation-related changes, such as an increase in CD14 and CD11b/CD18 (CR3) expression, and an increased adherence to plastic surfaces. We showed here that in vitro treatment of THP-1 cells with VD3 also induces a time-dependent increase in Syk levels (Fig. 3A). The basal (unstimulated) level of tyrosine phosphorylation of Syk was also increased after VD3 treatment. This results from a two to three fold increase in the amount of immunoreactive phosphotyrosine on Syk, as determined by comparing the ratio of the anti-phosphotyrosine signal with the anti-Syk signals in Syk immunoprecipitated from cells before and after treatment with VD3 for 72 h (Fig. 4A). Thus, during VD3 induced differentiation of THP-1 cells, along with an increase in the total amount of Syk, there is a definite increase in the basal phosphorylation of Syk.

The increase in the levels of tyrosine phosphorylation induced by VD3 correlate with an increase in the catalytic activity of Syk against an exogenous substrate in in vitro kinase assays (Fig. 4B, lane 3). It is interesting that a similar increase in tyrosine phosphorylation and catalytic activity of Syk has also been reported during differentiation of HL-60 promyelocytic cells into granulocytes [Qin and Yamamura, 1997]. Syk has different tyrosines which can be phosphorylated/dephosphorylated and some of these have been implicated in regulation of its catalytic activity. It is also known that VD3 activates a variety of proteins with kinase activity, such as protein kinase C, Raf, and mitogen-activated protein (MAP) kinases [Kharbanda et al., 1994; Marcinkowska et al., 1997; Gniadecki, 1998], involved in the differentiation process and that can potentially phosphorylate Syk tyrosine residues. At this time, the mechanism and functional significance of the increase in tyrosine phosphorylation and activity of Syk induced by differentiation (by VD3 in THP-1 cells, by retinoic acid in HL-60 cells) is unknown, and also if other differentiation inducing agents have similar effect.

As has been reported, in undifferentiated THP-1 cells, Fc γ RII crosslinking induced a dose-dependent increase in the level of Syk tyrosine phosphorylation. Surprisingly, in VD3-treated cells Fc γ RII crosslinking not only failed to induce an increase in Syk phosphorylation, but it actually induced a decrease in Syk phosphorylation to levels lower than those observed in unstimulated cells. As a read out

assay to evaluate the effect of the decrease in Syk phosphorylation on an FcγR mediated signal, we determined if VD3 treatment would inhibit FcγR-mediated phagocytosis of IgG-coated SRBC. The phagocytosis of IgG-coated RBC decreased only about 35% with VD3

treatment (Fig. 6). However, it should be noted that during IgG-mediated phagocytosis Syk activation induced by FcγRI is still taking place. As we show in Figure 5, Syk phosphorylation induced by FcγRI is not affected by the VD3 treatment, and thus can partially compensate

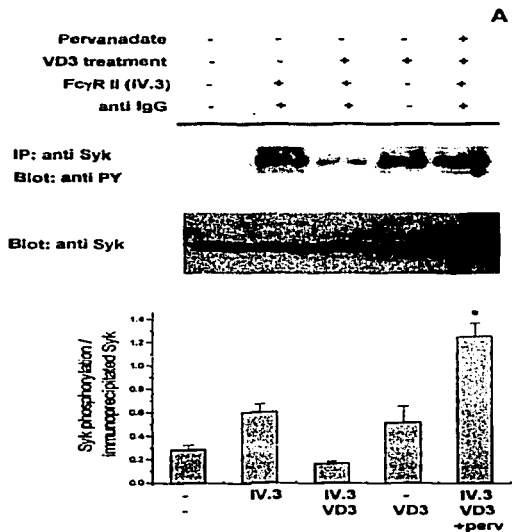


Fig. 7. Syk phosphorylation level after FcγRII crosslinking could be modulated by a protein tyrosine phosphatase. **A:** THP-1 cells were left untreated (lanes 1 and 2) or were treated with 100 nM of VD3 for 72 h (lanes 3–5). Just before stimulation a sample of VD3 treated cells (lane 5) was incubated with 100 μM sodium pervanadate for 5 min at 37°C. The cells were then stimulated through FcγRII or left unstimulated as described in legend to Figure 2C. Syk was immunoprecipitated from equivalent amounts of cell lysates and the immunoprecipitates were separated on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The blots were sequentially probed with anti-PY and anti-Syk antibodies. The graph shows the results of three independent experiments expressed as the mean ± SEM. $n = 3$, $*P < 0.05$ compared with FcγRII stimulated and VD3 treated cell (lane 3). **B:** Effect of VD3 on expression of SHP-1. THP-1 cells ($5 \times 10^7/ml$) were incubated with 100 nM VD3 for the indicated times. Lysates were prepared and equivalent amounts of total protein from each lysate were separated by SDS-PAGE. The resolved proteins were transferred to nitrocellulose membranes and sequentially developed with anti-SHP-1 and anti-actin

antibodies. The graph shows the average of three independent experiments. **C:** Coimmunoprecipitation of SHP-1 and Syk. VD3-treated (lanes 3 and 4) or untreated (lanes 1 and 2) THP-1 cells were stimulated through FcγRII as described in legend to Figure 2C. Anti-Syk immunoprecipitates were prepared from equivalent amounts of cell lysates. The immunoprecipitated proteins were separated on SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and probed with anti-Syk and anti-SHP-1 antibodies. The graph shows the mean ± SEM of three independent experiments; $*P < 0.05$ compared with untreated and unstimulated cells (lane 1) and $**P < 0.05$ compared with stimulated, untreated cells (lane 2). **D:** Syk-SHP-1 association inversely correlates with the level of Syk phosphorylation. VD3-treated (lane 3) or untreated (lanes 1 and 2) THP-1 cells were stimulated through FcγRII as described in legend to Figure 2. Syk was immunoprecipitated from the cell lysates and the immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE. The resolved proteins were transferred to nitrocellulose membranes which were sequentially probed with anti-PY, anti-Syk, and anti-SHP-1 antibodies. Results are representative of three independent experiments.

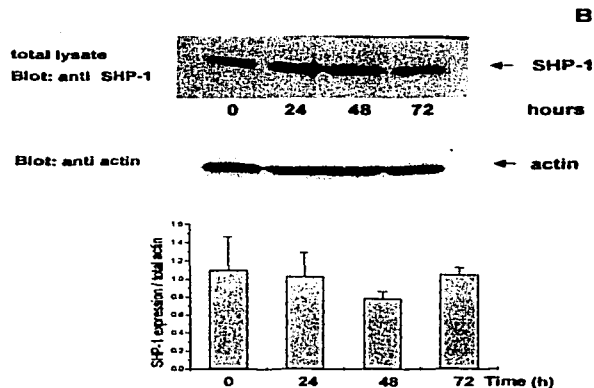


Fig. 7. (Continued)

the deficient Syk activation induced by FcγRII in cells differentiated by VD3.

The possibility that this decrease in Syk phosphorylation is mediated by the FcγRII crosslinking-induced activation of a protein phosphatase was suggested by the fact that this effect was eliminated by previous treatment of the cells with sodium pervanadate, a general phosphatase inhibitor. This suggests that a phosphatase activity, which is affected by FcγRII crosslinking, is involved in regulating the state of Syk phosphorylation. Several lines of evidence have pointed to the protein tyrosine phosphatase SHP-1 as a negative regulator of signaling through ITAM-containing immunoreceptors by acting on tyrosine kinases of the Syk/ZAP-70 family. SHP-1 has been implicated in the negative regulation of the activity of ZAP-70 in T lymphocytes [Plas et al., 1996]. It has also been shown that in B cells there is a physical association of SHP-1 with Syk and that Syk is a substrate for SHP-1 [Dustin et al., 1999]. In *me/me* mice, SHP-1 was proposed to be a critical molecule used by FcγRIIB for down-regulation of BCR signaling [Dustin et al., 1999]. In vitro studies have shown that SHP-1 can bind to the ITIM motif of FcγRIIB [Leosurne et al., 2001]. Our results showed that in THP-1 cells, SHP-1 can be shown to coimmunoprecipitate with Syk, and that the degree of coimmunopre-

cipitation is affected by the differentiation state of the cell and by FcγRII crosslinking. It is important to note that SHP-1 expression level was not altered by treatment with VD3 (Fig. 7B). In resting, undifferentiated cells, a small but definite amount of SHP-1 is reproducibly found in anti-Syk immunoprecipitates. Since in these conditions Syk is not phosphorylated to detectable levels, the molecular basis for this constitutive association in THP-1 cells is unknown. It is possible that SHP-1 interacts with Syk by a mechanism independent of the binding of SH2 domains of SHP-1 to phosphorylated tyrosine residues in Syk. In this respect, it has been reported that the functional interaction between SHP-1 and JAK2 is independent of tyrosine phosphorylation of JAK2, and does not require the functional SH2 domains of SHP-1 [Jiao et al., 1996]. In U937 cells the constitutive association of SHP-1 and Lyn has been reported to be dependent on Lyn SH3 domain [Yoshida et al., 1999; Somani et al., 2001].

The constitutive association of Syk and SHP-1 in undifferentiated cells is lost upon FcγRII crosslinking, concomitant with the increase in Syk tyrosine phosphorylation. These results are in contrast with reports in B cells showing that BCR engagement and subsequent Syk tyrosine phosphorylation does not affect the association of Syk and SHP-1 [Dustin et al., 1999].

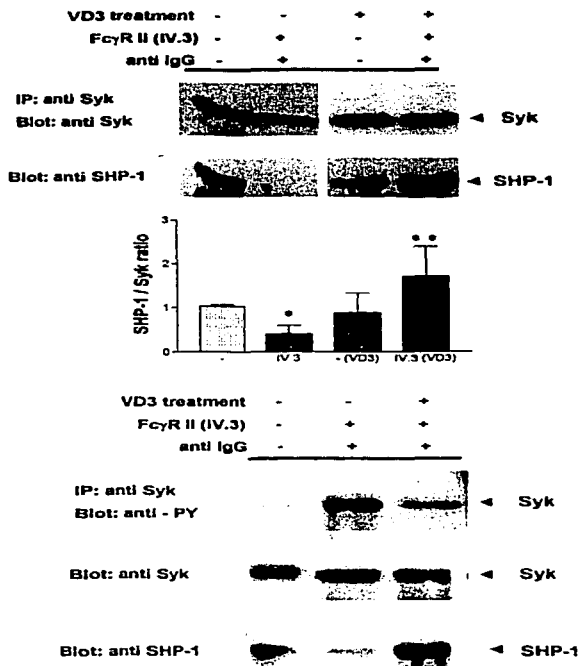


Fig. 7. (Continued)

Differentiation for 72 h induced by VD3 slightly diminished the level of basal association of Syk and SHP-1 (Fig. 7C). In contrast to undifferentiated cells, Fc γ RII crosslinking induced a significant increase in the amount of SHP-1 that coimmunoprecipitates with Syk and a significant decrease in the level of Syk phosphorylation (Fig. 7C,D). Taken together, these observations suggest that in VD3 treated monocytic cells, Syk could be negatively regulated by SHP-1 mediated dephosphorylation after Fc γ RII crosslinking.

A possible mechanism by which differentiation by VD3 might modify the physical and

functional interaction between Syk and SHP-1 after Fc γ RII crosslinking with respect to undifferentiated cells, is that VD3 treatment alters the relative expression of Fc γ RII isoforms, inducing an increase in the expression of Fc γ RIIb, thus promoting SHP-1 recruitment to the Fc γ RII aggregates by binding to the Fc γ RIIb ITIMs. SHP-1 has been shown to bind to Fc γ RIIb phosphorylated ITIMs [D'Ambrosio et al., 1996; Sato and Ochi, 1998], and also to associate with Fc γ RIIb when it is co-aggregated with the type I Fc ϵ R in bone marrow derived mast cells [Fong et al., 1996]. We observed that VD3 induced a transient decrease in Fc γ RIIb expression, but

after 72 h of VD3 treatment expression of FcγRIIb₁ and FcγRIIb₂ returned to the level observed in non-differentiated cells (Fig. 8C). Although this does not rule out the possibility that in VD3-differentiated cells SHP-1 gains access to the vicinity of Syk due to its recruitment to the receptor aggregates by interacting with FcγRIIB ITIMs, it does indicate that the differences in Syk-SHP-1 interactions observed between differentiated and undifferentiated cells are regulated by factors other than differentiation-induced changes in expression of FcγRII isoforms. Another possibility is that although the expression of FcγRIIB does not change in VD3 differentiated cells, the level of phosphorylation of its ITIM motif is higher, enhancing its ability

to recruit SHP-1 [Leosurne et al., 2001]. Differentiation-regulated changes in SHP-1 activation have been previously reported in myeloid cells [Uesugi et al., 1999, 2000].

Our findings are consistent with a scheme in which, in undifferentiated resting cells, the basal phosphorylation level of Syk is regulated by SHP-1, which is constitutively associated to Syk in a phosphorylation independent way. FcγRII crosslinking induces dissociation of SHP-1-Syk complexes, and causes Syk to be recruited to the phosphorylated FcγRII ITAMs and activated. Differentiation by VD3 modifies the interplay between Syk and SHP-1 such that the basal phosphorylation level of Syk increases, and FcγRII crosslinking promotes both

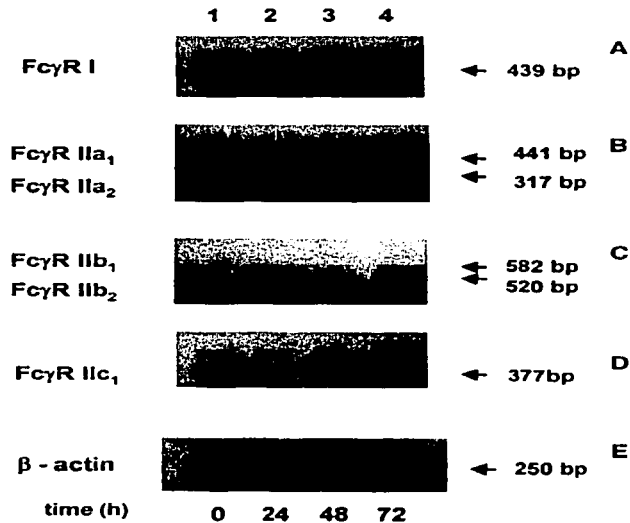


Fig. 8. Effect of VD3 treatment of THP-1 cells on the expression of transcripts for FcγRI isoforms. RNA was isolated from THP-1 cells treated for 0, 24, 48, and 72 h with VD3 and was reverse transcribed and PCR amplified with the FcγRII A, B, and C specific primer pairs indicated in Table I. After the PCR reaction, the products were analyzed on a 2% agarose gel containing EtBr. A: FcγRI; (B) FcγRII a₁, a₂ isoforms; (C) FcγRII b₁, b₂ isoforms; (D) FcγRII c₁ isoform; and (E) β-actin. Specific bands with the

expected sizes for each primer pair were detected in each panel. PCR products were quantified by densitometric analysis and their expression is presented as relative to the data of β-actin mRNA densitometric values. The graphs (F) show the relative levels of FcγRI isoform-specific transcripts after 0, 24, 48, and 72 h of VD3 treatment obtained from four independent experiments (mean ± SEM of four independent experiments; *P < 0.05 compared with untreated cells, 0 h).

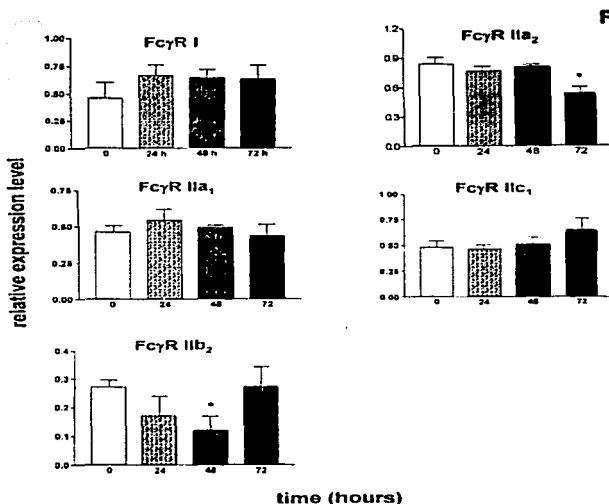


Fig. 8. (Continued)

SHP-1 activation and a decrease in the level of Syk phosphorylation and activity. Surely, other molecules might be participating in the differentiation related changes in regulation of Syk activity; further studies are necessary to dissect the mechanisms involved in this effect.

Analysis of the effect of VD3 on the expression of FcγRII isoforms showed a significant decrease in FcγRIIa₂ mRNA after 72 h of treatment. The FcγRIIa₂ is a soluble form of FcγRIIa lacking the transmembrane exon [Rappaport et al., 1993]. Transcripts encoding this form of FcγRIIa were identified in megakaryocyte-like human cell lines and platelets [Rappaport et al., 1993], and in Langerhans cells [Astier et al., 1994]. Our results show that this form of FcγRIIa is also produced by the monocytic cell line THP-1, and that its expression is modulated by differentiation with VD3. Although soluble FcγRIIa₂ might be important *in vivo* in modulating interaction of immune complexes with FcγRs, its expression in our experimental system could not influence our results as soluble FcγR forms

would be eliminated by washing before the stimulation.

Our findings have established that the effect of FcγRII crosslinking on Syk tyrosine phosphorylation and activation differs between undifferentiated and VD3-differentiated THP-1 cells. This effect is not mediated by changes in the expression of FcγR isoforms. Other studies have shown a switch in FcγRI signaling pathways upon monocyte differentiation by IFN-γ, mediated by a switch in the accessory molecule recruited by FcγRI, which lacks its own intrinsic signaling motif [Melendez et al., 1998]. Together, these findings illustrate that the biochemical pathways resulting from crosslinking of a particular FcγR do not depend solely on the particular FcγR isoform that is aggregated, or on the cell type, but that they are also highly dependent on the differentiation state of the cell, which *in vivo* is subjected to the action of a variety of stimuli. Understanding the mechanism by which the cell can modulate the transduction pathways induced by the large family of FcγRs could help to

understand the biological significance of the heterogeneity found in this family of receptors that respond to the same ligand, IgG immune complexes or IgG opsonized particles.

ACKNOWLEDGMENTS

During the course of these studies, José Agramonte, MD, was recipient of a scholarship from DGEP-UNAM. We thank Dr. Gloria Soldevila and Dr. Julio Cesar Carrero for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

Adams DO, Hamilton TA. 1992. Molecular basis of macrophage activation: Diversity and its origins. In: Lewis CE, Mc Gee JO'D, editors. *The macrophage*. New York: Oxford University Press, p 77-103.

Agarwal A, Salem P, Robbins KC. 1993. Involvement of p72^{Syk}, a protein-tyrosine kinase, in Fcγ receptor signaling. *J Biol Chem* 268:15900-15905.

Astier A, de la Salle H, de la Salle C, Bieber T, Esposito-Farese ME, Freund M, Cazenave JP, Fridman WH, Teillaud JL, Hanau D. 1994. Human epidermal Langerhans cells secrete a soluble receptor for IgG (Fc gamma RI/CD32) that inhibits the binding of immune complexes to Fc gamma R1-cells. *J Immunol* 152:201-212.

Bolen JB, Brugge JS. 1997. Leukocyte protein tyrosine kinases: Potential targets for drug discovery. *Annu Rev Immunol* 15:371-404.

Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. 1995. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 16:200-256.

Camacho-Arroyo I, Pasanpera AM, Cerbón MA. 1996. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci Lett* 214:25-28.

Cambier JC. 1997. Inhibitory receptors abound? *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5993-5995.

Cassal DL, Keller MA, Surrey S, Schwartz E, Schreiber AD, Rappaport EF, McKenzie SE. 1993. Differential expression of FcγR IIA, FcγR IIB and FcγR IIC in hematopoietic cells: Analysis of transcripts. *Mol Immunol* 30:451-460.

Chan AC, van Oers NS, Tran A, Turka L, Law CL, Ryan JC, Clark EA, Weiss A. 1994. Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J Immunol* 152:4758-4765.

Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T. 1995. Syk tyrosine kinase is required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 378:303-306.

Chomezynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.

Choudhuri U, Adams JA, Byrom N, McCarthy DM, Barrett J. 1990. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces normal mononuclear blood cells to differentiate in the direction of monocyte-macrophage. *Hematologia* 23:9-19.

D'Ambrosio D, Hippen KL, Hainskoff SA, Mellman I, Pani G, Siminovich KA, Cambier JC. 1995. Recruitment and activation of PTPIC in negative regulation of antigen receptor signaling by FcγR IIB1. *Science* 268:293-297.

D'Ambrosio D, Fong DC, Cambier JC. 1996. The SHIP phosphatase becomes associated with FcγR IIB1 and is tyrosine phosphorylated during "negative" signaling. *Immunol Lett* 54:77-82.

Daeron M. 1997. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 15:203-234.

Daeron M, Latour S, Malbec O, Espinosa E, Pina P, Pasmans S, Fridman WH. 1995. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of FcγR IIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity* 3:635-646.

Durden DL, Liu YB. 1994. Protein-tyrosine kinase p72syk in Fc gamma RI receptor signaling. *Blood* 84:2102-2108.

Dustin LB, Plus DR, Vong J, Hu YF, Soto C, Chan AC, Thomas ML. 1993. Expression of dominant-negative src-homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 results in increased Syk tyrosine kinase activity and B cell activation. *J Immunol* 162:2717-2724.

Ernst LK, van de Winkel JGJ, Ing-Ming C, Anderson CL. 1992. Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (FcγR I) encode four distinct transcription products. *J Biol Chem* 267:15692-15700.

Fong DC, Malbec O, Arock M, Cambier JC, Fridman WH, Daeron M. 1996. Selective in vivo recruitment of the phosphatidylinositol phosphatase SHIP by phosphorylated Fc gammaRIIB during negative regulation of IgE-dependent mouse mast cell activation. *Immunol Lett* 54:83-91.

Gniadocki R. 1998. Involvement of Src in the vitamin D signaling in human keratinocytes. *Biochem Pharmacol* 55:499-503.

Greenberg A, Chang P, Silverstein SC. 1994. Tyrosine phosphorylation of the γ subunit of Fcγ receptors, p72 Syk, and paxillin during Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem* 269:3897-3902.

Hunkapiller T, Hood L. 1989. Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv Immunol* 44:1-63.

Indik ZK, Hunter S, Huang MM, Pan XQ, Chien F, Kelly C, Levinson AJ, Kimberly RP, Schreiber AD. 1994. The high affinity Fc gamma receptor (CD 64) induces phagocytosis in the absence of its cytoplasmic domain: The gamma subunit of Fc gamma R IIIA impart phagocytic function to Fc gamma R I. *Exp Hematol* 22:599-606.

Indik ZK, Park JG, Hunter S, Mantaring M, Schreiber AD. 1995. Molecular dissection of Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *Immunol Lett* 44:133-138.

Jiao H, Berrada K, Yang W, Tabrizi M, Platanias LC, Yi T. 1996. Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol* 16:6985-6992.

Jouvin MH, Adamczewsky M, Numberof R, Letourneur O, Valle A, Kinet JP. 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* 269:5918-5925.

Kharbanda S, Saleem A, Emoto Y, Stone R, Rapp U, Kufe D. 1994. Activation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinases during monocytic differentiation of human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 269:872-878.

Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S, Pawson T. 1998. The Syk protein

- tyrosine kinase is essential for Fc γ receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol* 18:4209-4220.
- Kiener PA, Rankin BM, Burkhardt AL, Schieven GL, Gilliland LK, Rowley RB, Bolen JB, Lodbetter JA. 1993. Cross-linking of Fc γ receptor I (Fc γ R I) and receptor II (Fc γ R II) on monocyte cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase. *J Biol Chem* 268:24442-24448.
- Kreutz M, Andressen R. 1990. Induction of human monocyte into macrophage maturation by α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$. *Blood* 76:2457-2461.
- Leosurue R, Bruhns P, Fridman WH, Daeren M. 2001. Insufficient phosphorylation prevents Fc gamma RIIIB from recruiting the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem* 276:6327-6336.
- Mallick-Wood CA, Pao W, Cheng AM, Lewis JM, Kulkarni S, Bolen JB, Rowley B, Tigelaar RE, Pawson T, Hayday AC. 1996. Disruption of epithelial γ 5 T cell repertoires by mutation of the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9704-9709.
- Marcinkowska E, Wiedlocha A, Radzikowsky C. 1997. 1, 25-Dihydroxyvitamin D $_3$ induced activation and subsequent nuclear translocation of MAPK is upstream regulated by PKC in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 241:419-426.
- Mates DM, Ernst LK, Chambers WH, Sulica A, Herberman RB, Morel PA. 1998. Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is determined by an allelic polymorphism of the Fc γ R IIc gene. *Blood* 91: 2369-2380.
- Matsuda M, Park JG, Wang DC, Hunter S, Chien P, Schreiber AD. 1996. Abrogation of the Fc gamma receptor IIA-mediated phagocytic signal by stem-loop Syk antisense oligonucleotides. *Mol Biol Cell* 7:1095-1106.
- Melendez A, Floto RA, Cameron AJ, Gillooly DJ, Harnett MM, Allen JM. 1998. A molecular switch changes the signalling pathway used by the Fc gamma RI antibody receptor to mobilize calcium. *Curr Biol* 8: 210-221.
- Ono M, Bolland S, Tempst P, Ravetch JV. 1996. Role of the inositol phosphatase SH1P1 in negative regulation of the immune system by the receptor Fc γ R IIB. *Nature* 383:263-266.
- Pain S, Falet H, Saei A, Bachelot-Loza C, Rendu F. 2000. Tyrosine phosphorylation and association of Fc gamma RII and p72 (Syk) are not limited to the Fc gamma RII signalling pathway. *Cell Signal* 12:165-171.
- Pan XQ, Darby C, Indik ZK, Schreiber AD. 1999. Activation of three classes of nonreceptor tyrosine kinases following Fc gamma receptor crosslinking in human monocytes. *Clin Immunol* 90:55-64.
- Park JG, Murray RK, Chien P, Darby C, Schreiber AD. 1993. Conserved cytoplasmic tyrosine residues of the gamma subunit are required for a phagocytic signal mediated by Fc gamma R IIIA. *J Clin Invest* 92:2073-2079.
- Pias DR, Johnson R, Pingel JT, Matthews RJ, Dalton M, Roy G, Chan AC, Thomas ML. 1996. Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling. *Science* 272:1173-1176.
- Qin S, Yamamura H. 1997. Up-regulation of Syk activity during HL60 cell differentiation into granulocyte but not into monocyte/macrophage-lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 263:697-701.
- Rapaport EF, Cassel DL, Walterhouse DO, McKenzie SE, Surrey S, Keller MA, Schreiber AD, Schwartz E. 1993. A soluble form of the human Fc receptor Fc gamma R IIA: Cloning, transcript analysis and detection. *Exp Hematol* 21:689-696.
- Ravetch JV, Bolland S. 2001. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19:275-290.
- Ravetch JV, Kinest JP. 1991. Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 9:457-492.
- Reth M. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature* 338:383-384.
- Rowley RB, Burkhardt AL, Chao HG, Matsueda GR, Bolen JB. 1995. Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig α /Ig β immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J Biol Chem* 270:11590-11594.
- Santana C, Noris G, Espinosa B, Ortega E. 1996. Protein tyrosine phosphorylation in leukocyte activation through receptors for IgG. *J Leukoc Biol* 60:433-440.
- Sato K, Cchi A. 1998. Superclustering of B cell receptor and Fc γ R IIB1 activates Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-1. *J Immunol* 161:2716-2722.
- Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P. 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$. *J Leukoc Biol* 59:555-561.
- Somani AK, Yuen K, Xu F, Zhang J, Branch DR, Siminovich KA. 2001. The SH2 domain containing tyrosine phosphatase-1 down-regulates activation of Lyn and Lyn-induced tyrosine phosphorylation of the CD19 receptor in B cells. *J Biol Chem* 276:1938-1944.
- Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL, Tybulewicz VL. 1995 Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 378:298-302.
- Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo JP, Tybulewicz VL. 2000. Tyrosine kinase SYK: Essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today* 21:148-154.
- Uesugi Y, Fuse I, Toba K, Kishi K, Furukawa T, Koike T, Aizawa Y. 1999. Involvement of SH1P-1, a phosphotyrosine phosphatase, during myeloid cell differentiation in acute promyelocytic leukemia cell lines. *Eur J Haematol* 62:239-245.
- Uesugi Y, Fuse I, Toba K, Kishi K, Hashimoto S, Furukawa T, Narita M, Takahashi M, Aizawa Y. 2000. Inhibition of ATRA-induced myeloid differentiation in acute promyelocytic leukemia by a new protein tyrosine phosphatase inhibitor, 3,4-diphosphatin. *J Exp Clin Cancer Res* 19:363-366.
- Unkles JC, Boros P, Fein M. 1992. Structure, signaling, and function of Fc γ R. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, editors: *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press. p 497-510.
- Yoshida K, Kharbanda S, Kufe D. 1999. Functional interaction between SHPTP1 and the Lyn tyrosine kinase in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem* 274:34663-34668.