



11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Caracterización de la vía de activación de integrinas  
secundario a la estimulación de receptores Fc $\gamma$

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA  
MED. CIR. ALEJANDRO ORTIZ STERN

DIRECTOR DE TESIS  
DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA



INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES  
BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F.

2005

m345865



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Caracterización de la vía de activación de integrinas  
secundario a la estimulación de receptores Fcγ

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alejandro Ortiz Stern

FECHA: 13/06/05

FIRMA: [Firma]

Alejandro Ortiz Stern

Médico Cirujano

Dr. Carlos Rosales Ledezma

Tutor Principal

## RESUMEN

Los mecanismos involucrados en la inducción de la activación de integrinas secundarias a la estimulación de otros receptores aún no están bien definidos. Nosotros hemos investigado el papel de los receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas G (receptores Fc $\gamma$ ) en la activación de integrinas en el neutrófilo humano. El entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIA produjo un incremento de integrinas  $\beta$ 2 sobre la superficie celular, mientras que no tuvo ningún efecto sobre las integrinas  $\beta$ 1. De manera contrastante, el entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIB, no sólo aumentó las integrinas  $\beta$ 2 en la superficie celular, sino que también produjo activación de integrinas  $\beta$ 1. Dicha activación se hizo evidente por un aumento de unión a fibronectina y por la aparición de un epítipo de activación reconocido por el anticuerpo monoclonal 15/7. El aumento de integrinas  $\beta$ 2 inducido por el entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIB requirió de las cinasas de la familia Src, de la cinasa Syk y de la enzima fosfatidilinositol 3-cinasa, dado que los inhibidores específicos correspondientes PP2, Piceatannol y LY 294002 bloquearon este aumento por completo. Por el contrario, la activación de integrinas  $\beta$ 1 secundaria a la estimulación del receptor Fc $\gamma$ RIIB no fue bloqueada por PP2 ni por LY 294002. Sin embargo, la activación de integrinas  $\beta$ 1 secundaria a la estimulación del Fc $\gamma$ RIIB fue aumentada por Piceatannol. Posterior al entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIB, el receptor Fc $\gamma$ RIIB y las integrinas  $\beta$ 1 activas colocalizan en la membrana del neutrófilo. Estos datos muestran por primera vez, que el entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIB induce activación de integrinas  $\beta$ 1. Esta activación es independiente de las cinasas de la familia de Src, fosfatidilinositol 3-cinasa, y puede estar dada en parte por la interacción del receptor Fc $\gamma$ RIIB con las integrinas  $\beta$ 1.

## ABSTRACT

The mechanisms involved in receptor-induced integrin activation are still poorly defined. We have investigated the role of receptors for the Fc portion of immunoglobulin G molecules, Fc $\gamma$ R, on activation of integrins in human neutrophils. Cross-linking of Fc $\gamma$ RIIA induced an increase in surface expression of  $\beta$ 2 integrins but had no effect on  $\beta$ 1 integrins. In contrast, cross-linking of Fc $\gamma$ RIIIB not only increased  $\beta$ 2 integrins on the cell surface, but also induced  $\beta$ 1 integrin activation, as indicated by an increase in binding to fibronectin and the appearance of an activation epitope detected by the monoclonal antibody 15/7. The Fc $\gamma$ RIIIB-induced increase of  $\beta$ 2 integrins required Src-family tyrosine kinases, Syk kinase and phosphatidylinositol 3-kinase, since the corresponding specific inhibitors PP2, Piceatannol and LY294002 completely blocked it. Contrary to this, Fc $\gamma$ RIIIB-induced  $\beta$ 1 integrin activation was not blocked by PP2 or LY294002. It was however enhanced by Piceatannol. After Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking, colocalization of Fc $\gamma$ RIIIB and active  $\beta$ 1 integrins was detected on the neutrophil membrane. These data show, for the first time, that cross-linking of Fc $\gamma$ RIIIB induces  $\beta$ 1 integrin activation. This activation is independent of Src-family kinases, PI 3-K, and may be induced in part by interaction of Fc $\gamma$ RIIIB with  $\beta$ 1 integrins.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Carlos Rosales Ledezma el haberme permitido realizar mis estudios en su laboratorio, una experiencia de aprendizaje única.

El apoyo brindado por los miembros de mi comité tutorial, los doctores Fernando López Casillas y Vianney Ortiz Navarrete. A éste último añado mi gratitud por haberme iniciado en el campo de la inmunología.

A la maestra Nancy Mora Pérez, sin su apoyo durante todo este trabajo, hubiera sido casi imposible salir adelante.

El apoyo brindado por los doctores Gloria Soldevilla, Eduardo García, Carlos Larralde, Edmundo Lamoyi, José Moreno, Enrique Ortega, Horacio Merchant, Rafael Saavedra, Yvonne Rosenstein, Alejandro Zentella y Maria Ibarra. Todos ellos me han apoyado de manera incondicional durante el doctorado.

A los doctores Ted Yednock, Mark Ginsberg y Pavel Isa, la donación de reactivos para que los estudios mencionados en este trabajo pudieran ser terminados de manera exitosa.

A todos los demás miembros del laboratorio por haber compartido la experiencia.

A mi familia Gabriela, Javier, Bernardo y Adriana.

A mis amigos Mauricio, Juan, Gloria, Claudía, Alejandro, Gerardo. Ustedes saben lo que significan para mí.

A los amigos encontrados en Biomédicas: Paula, Karen, Paula, Ingrid, Iliana, Selma, Ana, Diana, Eileen, Nancy, Fernanda, Paco, ustedes se merecen una mención especial por haberme permitido sacarles sangre en más de una ocasión.

Y a Mariana, por acompañarme al final de este camino.



## CONTENIDO

Resumen	2
Abstract	3
Agradecimientos	4
Contenido	6
Abreviaturas	8
Introducción	10
1.    Receptores Fc	13
2.    Integrinas	17
3.    Interacciones entre receptores Fc e integrinas	20
Planteamiento del problema e Hipótesis	26
Resultados y Discusión	28
1.    Modificación de anticuerpos monoclonales	28
2.    Efecto de la estimulación de receptores Fc $\gamma$ sobre Integrinas $\beta$ 2	39
3.    Efecto de la estimulación de receptores Fc $\gamma$ sobre Integrinas $\beta$ 1	56
Conclusiones y Perspectivas	95
Referencias	96
Apéndices	101
Materiales y metodología	101
1.    Materiales	101
2.    Buffers	102
3.    Purificación mAb	111
4.    Digestión mAb	113

5.	Biotinilación mAb	114
6.	Marcado mAb con iFITC	115
7.	Purificación PMN	116
8.	Estimulación PMN	117
9.	Citometría de flujo	118
10.	Índices de Activación	119
11.	Geles SDS	120
12.	Western blotting	123
13.	Microscopía Confocal	126
14.	Flujos de Calcio	127
15.	Purificación GstFn9-11	130

Artículos publicados

## ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo.
ERK	Cinasa Regulada Extracelularmente.
Fab	Fracción de unión al antígeno.
Fc	Fracción cristalizable.
FcR	Receptor Fc.
PI 3-K	Fosfatidilinositol-tres cinasa.
FITC	5(6)-isothiocianato de Fluoresceína.
Fn	Fibronectina.
g	Gramo.
GPI	Glicosidilfosfatidilinositol.
GST	Glutation S Transferasa.
Ig	Inmunoglobulina.
ITAM	Motivo de activación de inmunoreceptor basado en tirosinas.
ITIM	Motivo de inhibición de inmunoreceptor basado en tirosinas.
l	Litro.
m	Mili.
M	Molar.
$\mu$	Micro.
mAb	Anticuerpo monoclonal.
MFCy	Fluorescencia promedio en el canal de Cy-chrome.

n	Nano.
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos.
PKA	Proteína cinasa A.
PKC	Proteína cinasa C.
PMA	Forbol miristato acetato.
SH2	Dominio Homólogo de Src 2.
Stv	Estreptavidina.
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1.

## INTRODUCCIÓN

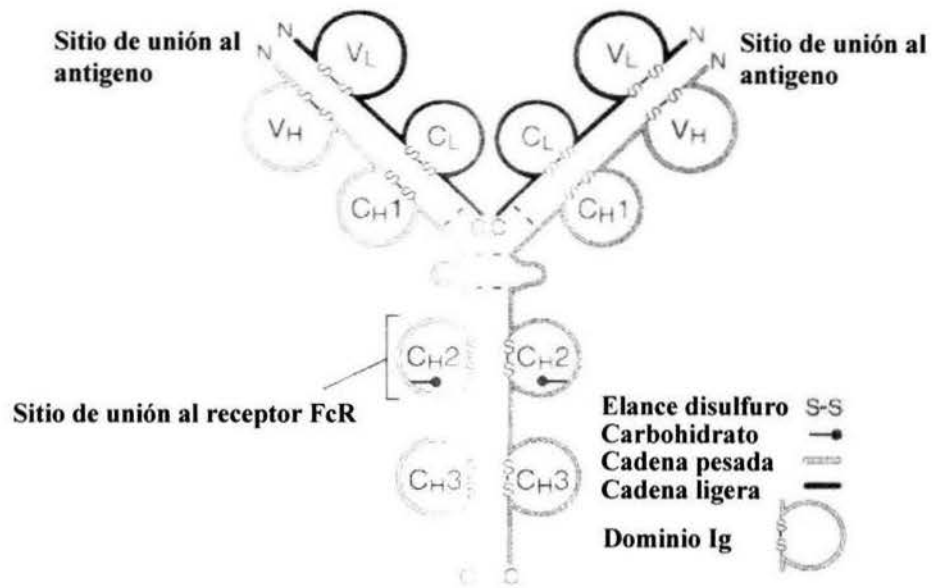
En un universo de cosas extrañas, el sistema inmunológico está encargado de defender al organismo de lo "no propio", de lo ajeno [1]. Para ello utiliza una plétora de mecanismos, tanto para el reconocimiento de lo "propio" y lo "no propio", como para la eliminación de lo "no propio". Entre los mecanismos que utiliza el sistema inmunológico para reconocer y eliminar lo no propio, existen los mecanismos específicos y los mecanismos no específicos. Los mecanismos no específicos reconocen y eliminan patógenos de manera general, mientras los mecanismos específicos lo hacen de manera particular [1]. Los mecanismos no específicos del sistema inmunológico incluyen a los péptidos antibacterianos de las secreciones mucosas, el sistema del complemento y los recientemente descritos receptores de patrones moleculares asociados a patógenos, encargados de reconocer patrones moleculares ausentes en el organismo, pero comunes a familias o grupos de patógenos. Existen además, mecanismos no específicos de defensa del organismo, como las barreras físicas de la piel y las mucosas, y las barreras químicas como el pH del ácido gástrico, que no se consideran parte del sistema inmunológico. Por su parte, los mecanismos específicos del sistema inmunológico reconocen un solo elemento "no propio", contra el cual se monta una respuesta que se encarga no sólo de proteger al organismo, sino también de evitar que dicho elemento "no propio" vuelva a atacar en ocasiones subsecuentes [1].

Los mecanismos de la respuesta inmunológica están compuestos por tres fases. Una primera de reconocimiento, una segunda de activación y una tercera de respuesta [1]. Durante la primera fase, el sistema inmunológico reconoce que existe un elemento "no propio" en el organismo. Durante la fase de activación, se ponen en marcha los

mecanismos encargados de dirigir y amplificar la respuesta contra el elemento "no propio" que será eliminado durante la fase de respuesta. Durante la fase de respuesta, también llamada efectora, el sistema inmunológico se encarga de eliminar el elemento previamente reconocido como "no propio". Una vez que el elemento "no propio" ha sido reconocido y eliminado, el organismo se encuentra protegido contra ataques subsecuentes por el mismo elemento "no propio". Se dice entonces que el organismo es inmune a dicho elemento "no propio".

Dentro de los mecanismos de la respuesta efectora específica existen una respuesta humoral y una respuesta celular. La respuesta celular se denominó de esta manera dado que era posible transferir el efecto protector a un animal no inmune utilizando las células de un animal previamente inmunizado. Las células encargadas de transferir una respuesta celular protectora se reconocieron posteriormente como linfocitos. La respuesta humoral se denominó de esta forma dado que era posible transferir el efecto protector a un animal no inmune utilizando suero de un animal previamente inmune. Los elementos del suero encargados de la respuesta humoral fueron denominados anticuerpos, y posteriormente caracterizados como proteínas.

Los anticuerpos (Ab) contienen en su estructura dos fracciones con funciones distintas. La fracción variable (Fab) y la fracción cristalizable (Fc) [1] (Fig. 1). La fracción variable, o de unión al antígeno, cambia de anticuerpo a anticuerpo y es la responsable de la especificidad de dicho anticuerpo. La fracción cristalizable es común a una clase de inmunoglobulinas, y es responsable de la interacción del anticuerpo con receptores celulares específicos. Existen cinco clases de anticuerpos según la fracción cristalizable que presentan. IgG, IgA, IgD, IgE e IgM [1].



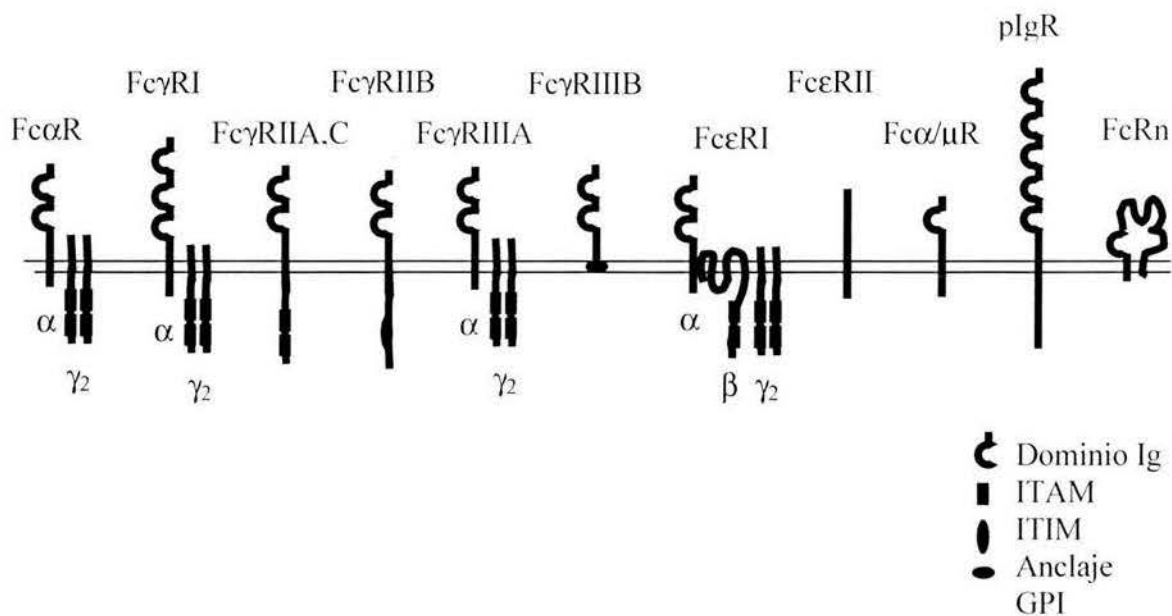
**Figura 1.** Representación esquemática de una inmunoglobulina. Se observan las regiones variables de unión al antígeno o Fab y la región constante, sitio de unión a receptores FcR. Adaptado de Abbas, A.K. y A.H. Lichtman, *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. 2003, Philadelphia: Saunders. 562.

## Receptores Fc

Cada clase de inmunoglobulina (Ig) es reconocida por un receptor celular específico (FcR) (Fig. 2). Los FcRs son denominados de acuerdo al tipo de inmunoglobulina que unen [2]. Por ejemplo, el receptor para IgA se llama Fc $\alpha$ R y el receptor para IgM, que además es capaz de unir IgA, se llama Fc $\alpha$ / $\mu$ R. Hasta la fecha se han identificado tres tipos de receptores para IgG [3], dos tipos de receptores para IgE [4], uno para IgA [5], uno para IgM [6] y uno para IgD [7]. Se han descrito otros dos tipos de receptores Fc no clásicos, el receptor polyIg [8] y el receptor FcnR [9] (Fig. 2).

Cada tipo de receptor presenta una estructura característica. Los receptores Fc $\alpha$ R, Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIIIA tienen una estructura muy similar [2, 5]. Están conformados por una cadena  $\alpha$  transmembranal con dominios Ig en la porción extracelular y por dos cadenas  $\gamma$  asociadas de manera no covalente con la cadena  $\alpha$ . La cadena  $\alpha$  está encargada de la interacción con la porción Fc de las inmunoglobulinas, mientras las cadenas  $\gamma$  son responsables de las capacidades de señalización de dichos receptores. Esta capacidad de señalización se debe a la presencia en las cadenas  $\gamma$  de una secuencia de aminoácidos llamada motivo de activación de inmunoreceptor basado en tirosinas (ITAM por sus siglas en inglés) [10, 11]. El receptor Fc $\epsilon$ RI contiene además de las cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$  una cadena  $\beta$  que también tiene motivos ITAM [2]. El receptor Fc $\epsilon$ RII es una lectina del tipo C, sin cadenas asociadas [12]. Los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIC contienen una sola cadena  $\alpha$  en la cual se encuentran embebidas las secuencias ITAM [2]. El receptor Fc $\gamma$ RIIB también cuenta únicamente con una cadena  $\alpha$ , pero en lugar de contener ITAMs, contiene ITIMs, motivos inhibidores [13]. El receptor Fc $\gamma$ RIIIB está unido a la membrana a través de un enlace glicofosfatidilinositol [2]. Dicho receptor no





**Figura 2. Representación esquemática de los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas (Ig).** La mayoría de los receptores Fc (FcR) contienen dominios Ig en la porción extracelular de su cadena  $\alpha$ . Por ello, pertenecen a la superfamilia Ig, con la excepción de FcεRII and FcRn. FcαR, FcγRI, FcγRIIA.C, FcγRIIA y FcεRI, señalizan al interior de la célula a través de un motivo de activación de inmunoreceptor basado en tirosinas (ITAM). FcγRIIB contiene un motivo de inhibición de inmunoreceptor basado en tirosinas (ITIM). FcγRIIB se expresa sólo en neutrófilos y está anclado a la membrana por un enlace glicosidilfosfatidilinositol (GPI). El mecanismo de activación de los receptores FcγRIIB, FcεRII, Fcα/μR, pIgR y FcRn no está claro hasta la fecha.

contiene cadenas asociadas. El receptor Fcα/μR es una proteína transmembranal que carece de ITAMs o ITIMs y no tiene cadenas asociadas [6]. El receptor FcRn es estructuralmente parecido a las moléculas de histocompatibilidad de clase I y requiere a la  $\beta$ 2-microglobulina para su función [9]. Hasta la fecha la estructura del receptor para IgD se desconoce y aún existe cierta controversia acerca de su existencia [7].

La gran mayoría de estos receptores son de baja afinidad y únicamente reconocen a los anticuerpos con los que interactúan cuando estos se encuentran agregados, como es el caso de los complejos inmunes, o durante el recubrimiento con anticuerpos de bacterias

y virus. Los anticuerpos, al interactuar con sus receptores, los entrecruzan y generan señales que viajan al interior de la célula produciendo una gran variedad de respuestas celulares encaminadas a la eliminación del agente "no propio". La naturaleza de las respuestas depende del tipo celular, de su estado de maduración y del medio ambiente en que se generan. Entre estas respuestas se encuentran la activación de integrinas, la síntesis de mediadores inflamatorios, la respuesta oxidativa, la fagocitosis, la citotoxicidad mediada por anticuerpos, y la degranulación.

Los mecanismos de señalización mediante los cuales los receptores Fc activan estas respuestas celulares no están del todo claros aún. Los receptores Fc $\alpha$ R, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIIIA y Fc $\epsilon$ RI, utilizan un mecanismo de señalización similar. Al interactuar con sus ligandos, los receptores Fc son entrecruzados y las cadenas  $\alpha$  o  $\gamma$  asociadas son fosforiladas por cinasas de la familia Src en tirosinas específicas dentro de las secuencias ITAM. Tras la fosforilación de dichas tirosinas, el receptor puede interactuar con proteínas que contienen dominios SH2 que propagan la señal al interior de la célula [10, 11]. Para el receptor Fc $\gamma$ RIIB, la diferencia radica en que las tirosinas se encuentran dentro de un ITIM, que recluta fosfatasas que regulan negativamente la señalización que surge de los receptores con ITAMs [14]. La señalización del receptor Fc $\gamma$ RIIB se desconoce, pero se ha postulado que pudiera servirse de otros receptores en la membrana del neutrófilo para llevar a cabo sus funciones [15-17]. Los mecanismos de señalización de los demás receptores Fc se desconocen por el momento.

Aunque los mecanismos de señalización de los receptores Fc parecen muy similares, cada uno es capaz de generar respuestas celulares distintas. Esto se debe a que las secuencias ITAM de los distintos receptores son diferentes, por lo que pueden reclutar

proteínas con dominios SH2 distintos. Además, cada célula tiene un juego de proteínas determinadas distinto, que pertenecen a distintas cascadas de señalización en un momento dado.

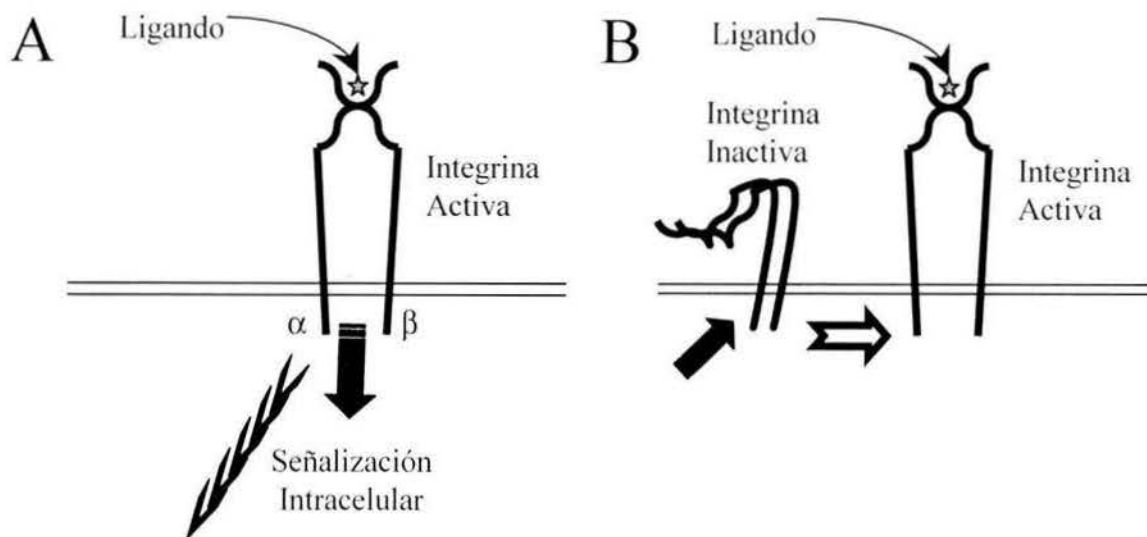
Es importante recalcar, que los componentes celulares del sistema inmunológico son móviles, requieren migrar a través de órganos linfoides y estar disponibles para responder prácticamente en cualquier parte del organismo. Esto significa que el reclutamiento de células de la sangre y la migración a través del espacio extravascular deben ser procesos finamente regulados. Las moléculas encargadas de permitir el arresto celular y la migración en el espacio extracelular son las integrinas [18, 19].

## **Integrinas**

Las integrinas son una familia de receptores celulares cuya principal función es la adhesión celular. A la fecha se han descrito 24 miembros de dicha familia de receptores [18]. Cada integrina es un heterodímero formado por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ . Las integrinas se nombran de acuerdo a las cadenas que contienen,  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$ , etc., y se agrupan por subfamilias de acuerdo a la cadena  $\beta$  particular que presentan. Conforme se ha avanzado en el estudio de las integrinas, ha quedado claro que además de actuar como mediadores de la adhesión celular, son capaces de señalar al interior de la célula. Dicha señalización regula procesos que controlan el crecimiento celular, la diferenciación y la sobrevivencia celular [20-22] (Fig. 3A).

Además de su capacidad para señalar al interior de la célula, las integrinas tienen la capacidad de modular la afinidad por su ligando, de tal modo que únicamente se unen al ligando con alta afinidad cuando están "activas" [23]. Esta capacidad de las integrinas de estar "inactivas" o "activas" le permite a la célula modular su adhesividad y su capacidad migratoria en respuesta a estímulos celulares específicos [19]. La activación de las integrinas parece depender de la interacción de las porciones intracitoplasmáticas de las integrinas con proteínas intracelulares. Dichas interacciones modifican la unión entre las porciones intracelulares de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  [24], con lo que la cara extracelular de la integrina parece cambiar de conformación, exponiendo el sitio de unión al ligando [25](Fig. 3B).

Uno de los estímulos que produce activación de integrinas es la estimulación a través de receptores Fc. Sin embargo, las interacciones entre los receptores para



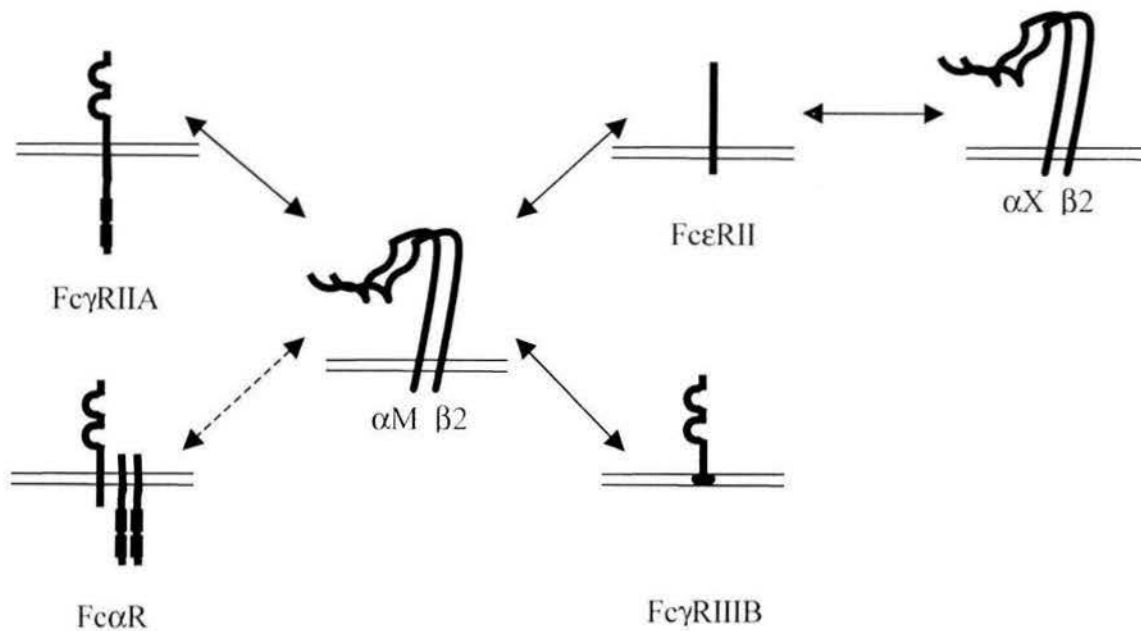
**Figura 3. Señalización de Integrinas.** A) Las integrinas activadas interactúan con su ligando. Una vez que interactúan con el ligando, generan señales que viajan al interior de la célula (flecha gruesa), regulando funciones como el crecimiento celular, la diferenciación y la supervivencia. Las integrinas también sirven de puntos de anclaje al citoesqueleto. B) Las integrinas en su estado inactivo se activan en respuesta a señales provenientes del interior de la célula (flecha gruesa). El mecanismo final de esta activación parece involucrar la separación de las porciones intracelulares y el desenrollamiento de la porción extracelular de la integrina. De esta manera, la integrina se vuelve competente para interactuar con su ligando.

anticuerpos y las integrinas parecen ser más complejas. Al parecer, tanto los receptores Fc como las integrinas pueden modular las respuestas uno del otro, en lo que se ha caracterizado como "cross-talk" o "plática-cruzada"[26].

### **Interacciones entre receptores Fc e integrinas**

A la fecha se han descrito tres mecanismos por los cuales los receptores Fc y las integrinas se relacionan. La primera es la interacción física sobre la membrana celular, la segunda es la activación de integrinas secundaria a la estimulación de receptores Fc, y la tercera es la modulación de las respuestas generadas por receptores Fc debidas a la estimulación de integrinas.

Se sabe que al menos tres receptores Fc, y se sospecha que un cuarto receptor Fc, son capaces de interactuar con integrinas en la superficie celular [27-30] (Fig. 4). Con la utilización de estudios de transferencia energética fluorescente, una técnica capaz de definir si dos moléculas se encuentran a menos de 7 nm de distancia, se encontró que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB y la integrina  $\alpha$ M $\beta$ 2 son capaces de interactuar en la superficie del neutrófilo humano [27]. Además, una forma soluble del receptor Fc $\gamma$ RIIIB también interacciona con la integrina  $\alpha$ M $\beta$ 2 en la superficie del neutrófilo humano[31]. Se piensa que esta interacción es responsable, al menos en parte, de la señalización del receptor Fc $\gamma$ RIIIB [32-34], aunque la evidencia a favor de este hecho no es del todo concluyente, dado que las respuestas generadas por la estimulación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB no son idénticas a las generadas por la estimulación de integrinas  $\beta$ 2 [35, 36]. Otro receptor capaz de interactuar con las integrinas  $\beta$ 2 es el receptor Fc $\gamma$ RIIA [37]. Este hecho está apoyado tanto en estudios de transferencia energética fluorescente como en estudios de complementación funcional [28, 38]. El tercer receptor que interactúa con integrinas en la superficie celular, es el receptor de baja afinidad para IgE, Fc $\epsilon$ RII. Dicho receptor produce activación celular cuando interactúa con ciertos miembros de la

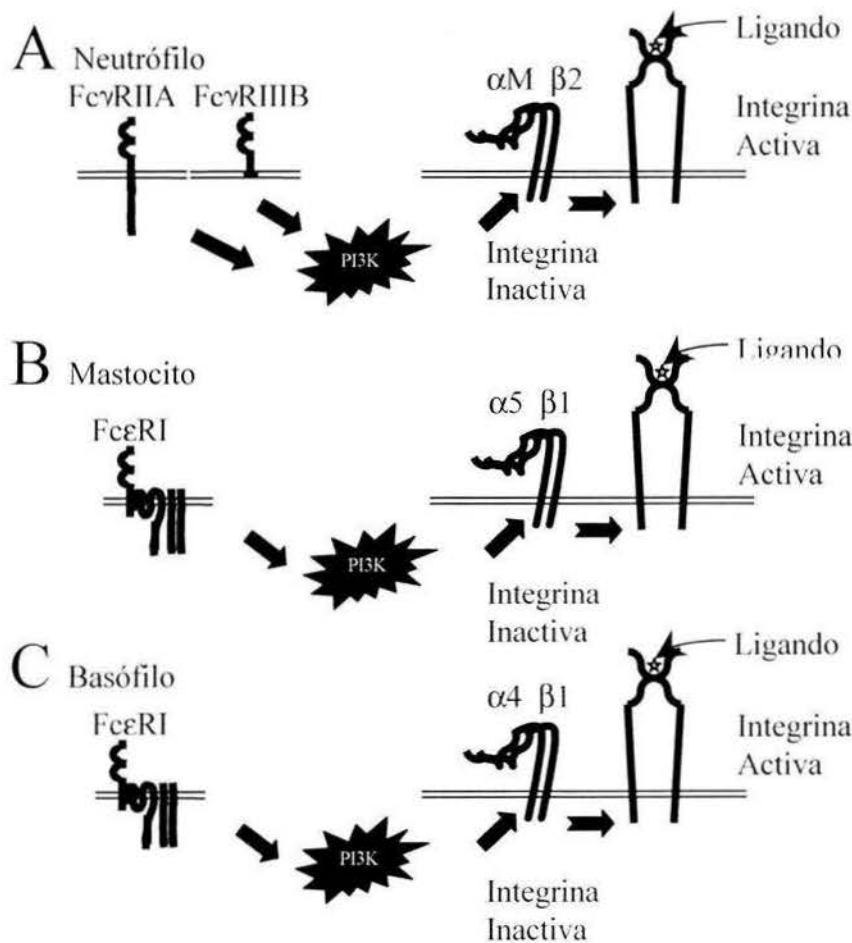


**Figura 4. Interacciones entre los receptores Fc y las integrinas sobre la membrana celular.** Las integrinas  $\beta 2$  se sabe interactúan con receptores Fc en la superficie de la célula. Tanto Fc $\gamma$ RIIA como Fc $\gamma$ RIIB interactúan con  $\alpha M\beta 2$ , pero su modo de interacción es diferente. El Fc $\gamma$ RIIB interactúa mediante uniones tipo lectina, mientras el Fc $\gamma$ RIIA no. La naturaleza de la interacción del Fc $\gamma$ RIIA con  $\alpha M\beta 2$  se desconoce. Se ha demostrado que el Fc $\epsilon$ RII puede interactuar con  $\alpha M\beta 2$  y con  $\alpha X\beta 2$ . Aún cuando la interacción entre el Fc $\alpha$ R y  $\alpha M\beta 2$  no ha sido directamente evaluada, evidencia indirecta sugiere que esta interacción existe.

subfamilia de las integrinas  $\beta 2$  [29]. Finalmente, se sospecha que el receptor Fc $\alpha$ R también es capaz de interactuar con la integrina  $\alpha M\beta 2$ , aun cuando dicha interacción no se ha comprobado completamente [30].

Se desconoce por el momento si integrinas de otras subfamilias que no sean  $\beta 2$  son capaces de interactuar con receptores Fc, pero existe el antecedente de integrinas de la familia  $\beta 1$  que interactúan con otros receptores en la superficie celular [39]. Por lo tanto, teóricamente es factible que las interacciones físicas entre receptores Fc e integrinas sean más frecuentes que las actualmente descritas.

En cuanto a la activación de integrinas secundaria a la estimulación de receptores Fc, se sabe que la estimulación de algunos receptores para IgG y para IgE es capaz de producir activación de integrinas (Fig. 5). Esta activación de integrinas secundaria a la estimulación de receptores Fc parece ser básica para ciertas respuestas mediadas por inmunoglobulinas como son la adhesión a complejos inmunes, la citotoxicidad mediada por anticuerpos y la producción de ciertas citocinas [40]; otras respuestas, como la generación de flujos de calcio y la producción de superóxido, parecen ser independientes de dicha activación [41]. La estimulación de receptores Fc $\gamma$ R parece activar integrinas de la subfamilia  $\beta$ 2, mientras que la estimulación de receptores Fc $\epsilon$ R parece activar integrinas de la subfamilia  $\beta$ 1 [42, 43].



**Figura 5. Vías de activación secundarias a la estimulación de receptores Fc.**

A) En el neutrófilo humano la estimulación del Fc $\gamma$ RIIA o el Fc $\gamma$ RIIIB lleva a la activación de  $\alpha$ M $\beta$ 2 a través una vía que requiere de Fosfatidilinositol 3-Cinasa (PI3-K).

B) En mastocitos, Fc $\epsilon$ RI activa a la integrina  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 y esta vía de activación requiere PI3-K.

C) En el basófilo humano, Fc $\epsilon$ RI activa  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 a través de una vía dependiente de PI3-K.



Las respuestas secundarias a la estimulación de receptores  $Fc\gamma R$  que requieren de la activación de integrinas parecen consistir de dos fases. Una primera, independiente de la activación de integrinas, y una segunda, dependiente de dicha activación [44]. Por ejemplo, la adhesión temprana, durante los primeros diez minutos, a complejos inmunes es independiente de integrinas. Sin embargo, la adhesión que se da después de los diez minutos requiere de la activación de integrinas  $\beta 2$  [41].

Todas las vías de activación de integrinas  $\beta 2$ , secundaria a la estimulación de receptores  $Fc\gamma R$ , descritas hasta el momento involucran la participación de la enzima fosfatidilinositol 3-cinasa (PI 3-K) [43, 44]. La inactivación de dicha enzima evita la activación de integrinas  $\beta 2$  secundaria a la estimulación de receptores  $Fc\gamma R$ . Al igual que la activación de integrinas  $\beta 2$  secundaria a la estimulación de receptores  $Fc\gamma R$ , la activación de integrinas  $\beta 1$  secundaria a la estimulación de receptores  $Fc\epsilon R$  también depende de la enzima PI 3-K. Por lo anterior, esta enzima parece ser central a los procesos de activación de integrinas secundarios a la estimulación de receptores Fc [43, 44].

En cuanto a la modulación de las respuestas generadas por receptores Fc secundarias a la estimulación de integrinas, se han descrito dos fenómenos. El primero es que la estimulación de integrinas  $\beta 2$  previo a la estimulación de receptores  $Fc\gamma R$  produce un aumento en la fagocitosis [45]. En contraste, el segundo fenómeno descrito es que la estimulación de integrinas  $\beta 1$  parece inhibir ciertas respuestas de receptores  $Fc\gamma RIII A$  en células NK [46].

Al menos tres tipos de receptores Fc,  $Fc\gamma R$ ,  $Fc\epsilon R$  y  $Fc\alpha R$ , parecen interactuar de alguna manera con integrinas de las subfamilias  $\beta 1$  y  $\beta 2$ . Queda clara, además, la

importancia de dichas interacciones para el adecuado funcionamiento de las respuestas efectoras del organismo encaminadas a la eliminación de lo "no-propio". Dada la amplia variedad de receptores Fc y de integrinas, el potencial para otras interacciones es enorme. Así, conforme se vayan detallando la naturaleza de estas y otras interacciones, seremos capaces de entender cómo la célula responde a su entorno integrando la información que recibe a través de sus distintos receptores y cómo modula sus respuestas de acuerdo a dicha información.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tras conocer todas las posibilidades de interacción que existen entre los receptores Fc y las integrinas, es importante examinar estas posibilidades, a fin de comprender de manera más clara la regulación que ejercen los receptores Fc sobre diferentes integrinas en distintos tipos celulares.

El neutrófilo humano es una de las principales líneas de defensa del organismo. Las enfermedades que afectan las funciones normales del neutrófilo [47], en particular las disfunciones de las integrinas  $\beta 2$  [48], son letales en los primeros años de la vida, lo que resalta la importancia de estas células y de las integrinas en sus respuestas celulares.

Un estímulo importante para la activación del neutrófilo es la interacción con complejos inmunes [11]. El reconocimiento de los complejos inmunes por parte del neutrófilo se da a través de dos receptores Fc para la IgG, el receptor Fc $\gamma$ RII y el receptor Fc $\gamma$ RIIIB [2]. Como se mencionó en el capítulo anterior, dichos receptores tienen una estructura diferente, y el mecanismo mediante el cual generan respuestas celulares no es claro.

La estimulación de cualquiera de los receptores Fc $\gamma$  del neutrófilo, produce un incremento en el número de moléculas de integrinas de la familia  $\beta 2$  en la superficie de la célula, además de promover un cambio de afinidad en estas mismas integrinas [49]. En ambos casos, el aumento de integrinas en la superficie de la célula y su activación requieren de la participación de la enzima PI 3-K [49]. Se ha observado que esta activación de integrinas  $\beta 2$  le permite al neutrófilo el arresto celular y la migración fuera del torrente sanguíneo en respuesta a complejos inmunes [50]. Sin embargo, el neutrófilo humano posee integrinas de otras familias, principalmente de la familia  $\beta 1$  [51] y de la

familia  $\beta 3$ . Dentro de las integrinas de la familia  $\beta 1$  que son expresadas por el neutrófilo humano están  $\alpha 2\beta 1$  [52],  $\alpha 4\beta 1$  [53],  $\alpha 5\beta 1$  [53] y  $\alpha 9\beta 1$ [54], que sirven como receptores para proteínas de matriz extracelular como colágena, VCAM-1, fibronectina y fibrina. La regulación de la activación de dichas integrinas secundaria a la estimulación de receptores Fc en neutrófilos humanos es completamente desconocida. Es interesante especular entonces, que la estimulación de receptores Fc $\gamma$ R en el neutrófilo también tenga un efecto activador sobre las integrinas  $\beta 1$  y facilite de esta manera la migración en el espacio extracelular.

Las preguntas concretas que busca contestar este trabajo son:

¿Es la estimulación de los distintos Fc $\gamma$ R capaz de promover la activación de las integrinas  $\beta 1$  en el neutrófilo humano?

¿Cuál es mecanismo mediante el que se da la activación de las integrinas  $\beta 1$ ?

¿Es igual al mecanismo de activación de las integrinas  $\beta 2$ ?

Para responder estas preguntas, estudié las respuestas de las integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 2$  en respuesta a la estimulación selectiva de los receptores Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIIIB en el neutrófilo humano.

## **HIPOTESIS**

Las integrinas  $\beta 1$  se activan en respuesta a la estimulación de receptores Fc $\gamma$  en neutrófilos humanos y el mecanismo por el cual se lleva a cabo dicha activación es idéntico al mecanismo de activación de integrinas  $\beta 2$ .

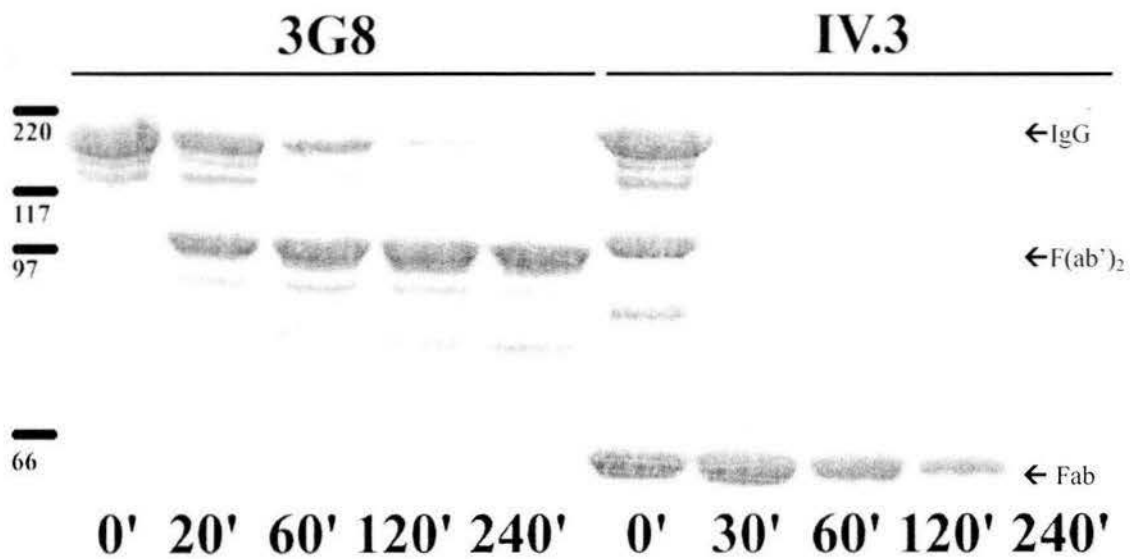
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Modificación de anticuerpos monoclonales

Los receptores  $Fc\gamma RII$  y  $Fc\gamma RIIB$  reconocen el mismo ligando, complejos inmunes compuestos por IgG, por lo que la utilización de complejos inmunes para estimular a los neutrófilos no permite diferenciar los efectos de estimulación celular que producen cada uno de estos receptores. Por este motivo es necesaria la utilización de anticuerpos monoclonales (mAb) que reconocen a cada uno de estos receptores. El mAb IV.3 reconoce a los receptores  $Fc\gamma RII$ , tipos A, B y C, pero el neutrófilo humano únicamente expresa el receptor tipo A. El anticuerpo 3G8 reconoce a los receptores  $Fc\gamma RIIB$ , tipos A y B, pero el neutrófilo humano únicamente expresa el tipo B.

La utilización de mAb para estimular células que tienen receptores Fc es delicada, puesto que aun cuando los receptores no unen estos ligandos monovalentes, las células recubiertas de anticuerpos pueden estimular indiscriminadamente cualquiera de estos receptores. Para evitar este problema, es necesario eliminar la fracción cristalizable de dichos mAb.

Para eliminar la fracción cristalizable de los mAb, se realizaron digestiones con pepsina de dichos anticuerpos. Es necesario ajustar los tiempos de digestión para cada anticuerpo dado que se sabe que la digestión con pepsina es diferente para distintos isotipos de IgG. El mAb IV.3 es extremadamente sensible a la digestión con pepsina, y únicamente se obtienen fragmentos Fab de dicho anticuerpo con tiempos de digestión cortos, ente 30 y 45 minutos [55] (Fig. 6). Al contrario de esto, la digestión del anticuerpo 3G8 requiere entre 4 y 5 hrs. (Fig. 6). Se realizaron además digestiones del

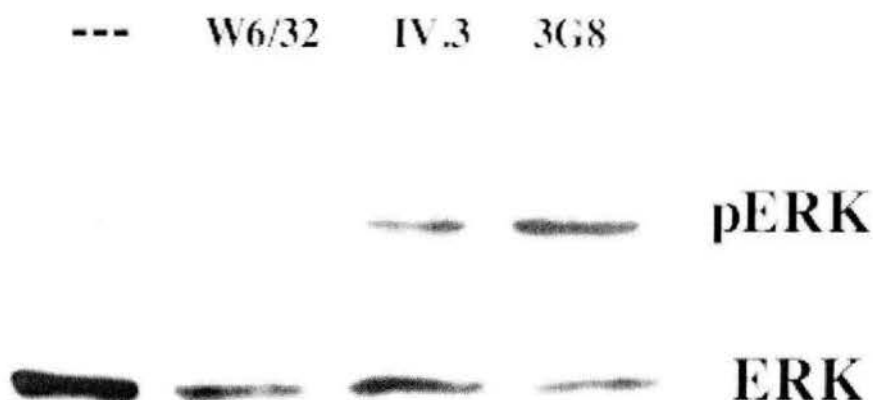


**Figura 6. Digestión de los mAb 3G8 y IV.3 con pepsina.** 2 mg/ml de cada anticuerpo monoclonal fueron incubados a 37 °C durante los tiempos indicados con 25 µg/ml de pepsina. En el caso del anticuerpo 3G8 se observa la desaparición progresiva del anticuerpo completo, y la aparición de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. En el caso del anticuerpo IV.3 se observa la desaparición tanto de los anticuerpos completos como de los F(ab')<sub>2</sub> dada la susceptibilidad del anticuerpo a la digestión con pepsina, por lo que sólo quedan fragmentos Fab.

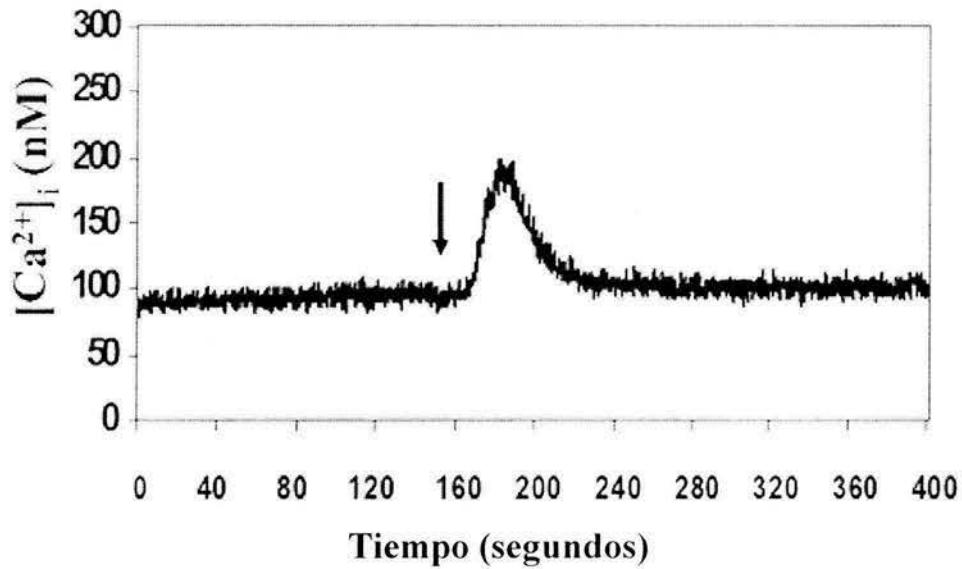
mAb W6/32 que reconoce moléculas de histocompatibilidad de clase I para utilizarse como control de especificidad.

Es importante cerciorarse que la digestión de los anticuerpos no afecte su capacidad de estimular a las células [56]. Para dicho efecto realicé dos pruebas funcionales distintas. La primera fue detectar la estimulación celular evaluando fosforilación de ERK, una enzima que se fosforila en respuesta a la estimulación de los dos tipos de receptores Fcγ del neutrófilo [57]. Tanto el entrecruzamiento del receptor FcγRIIA con los Fab del mAb IV.3, como el entrecruzamiento del receptor FcγRIIB con los F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 produjeron una fuerte fosforilación de ERK. Contrario a esto, los F(ab')<sub>2</sub> del mAb W6/32 no produjeron fosforilación de ERK. (Fig. 7). La segunda prueba funcional fue la liberación de calcio intracelular secundaria a la estimulación de los

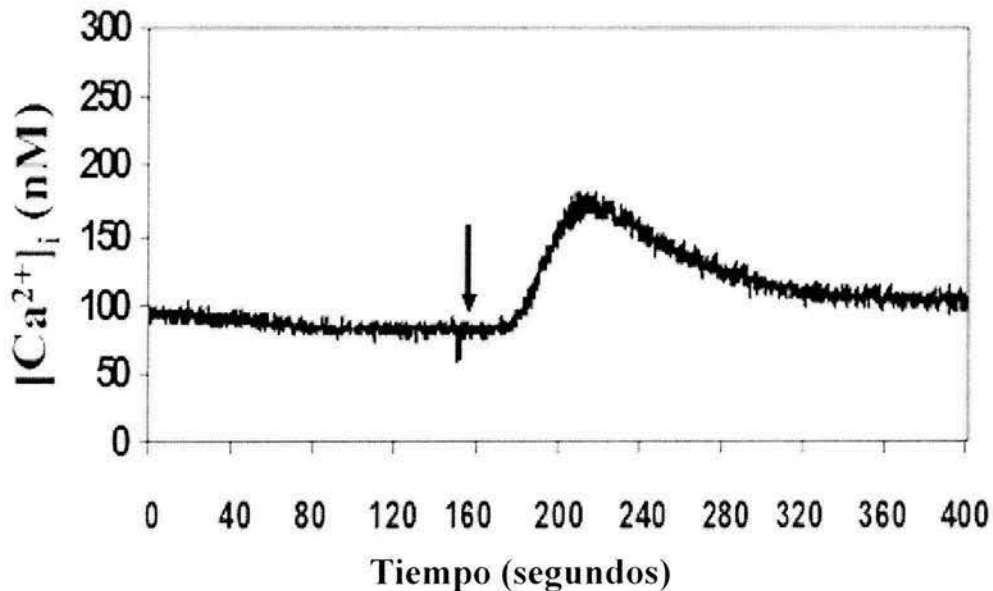
receptores Fc $\gamma$  del neutrófilo. Al igual que la fosforilación de ERK, se ha reportado que el entrecruzamiento de cualquiera de los receptores Fc $\gamma$  del neutrófilo es capaz de producir liberación de calcio intracelular [16, 17, 58]. Tanto el entrecruzamiento de los receptores Fc $\gamma$ RIIA con Fab del mAb IV.3 y de los receptores Fc $\gamma$ RIIIB con los F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 produce un rápido y corto aumento de los niveles de calcio intracelular (Fig. 8 y 9). Estos resultados, al igual que los resultados de la fosforilación de ERK, indican que los fragmentos obtenidos después de la digestión con pepsina de los mAb IV.3 y 3G8 son funcionales. Además que demuestran que ambos receptores son capaces de generar respuestas celulares cuando son entrecruzados de manera individual.



**Figura 7. El entrecruzamiento de cualquiera de los dos Fc $\gamma$ R del neutrófilo humano activa ERK.** Cinco millones de neutrófilos en PBS fueron estimulados con el entrecruzamiento de moléculas MHC clase I con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del mAb W6/32, el entrecruzamiento del Fc $\gamma$ RII con fragmentos Fab del mAb IV.3 o el entrecruzamiento del Fc $\gamma$ RIIIB con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8. Los lisados celulares fueron separados en geles SDS, y transferidos a membranas PVDF. Se realizaron Western blots para detectar la forma fosforilada activa de ERK (p-ERK). El panel inferior es un Western blot de ERK que muestra cantidades equivalentes de proteína en cada carril. Datos representativos de tres experimentos distintos.



**Figura 8. El entrecruzamiento del FcγRII del neutrófilo humano genera flujo de calcio.** Neutrófilos cargados con Fura-2 fueron incubados con fragmentos Fab del mAb IV.3 a 4°C. Los FcγRII fueron entrecruzados con la adición de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de IgG de cabra anti-ratón (flecha). Los cambios de la fluorescencia de Fura-2 fueron monitoreados y convertidos a la concentración de intracelular de calcio ([Ca<sup>2+</sup>]). Datos representativos de tres experimentos independientes.



**Figura 9. El entrecruzamiento del FcγRIIIB del neutrófilo humano estimula flujo de calcio.** Neutrófilos cargados con Fura-2 fueron incubados con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 a 4°C. Los FcγRIIIB fueron entrecruzados con la adición de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de IgG de cabra anti-ratón (flecha). Los cambios de la fluorescencia de Fura-2 fueron monitoreados y convertidos a la concentración de intracelular de calcio ([Ca<sup>2+</sup>]). Datos representativos de tres experimentos independientes.

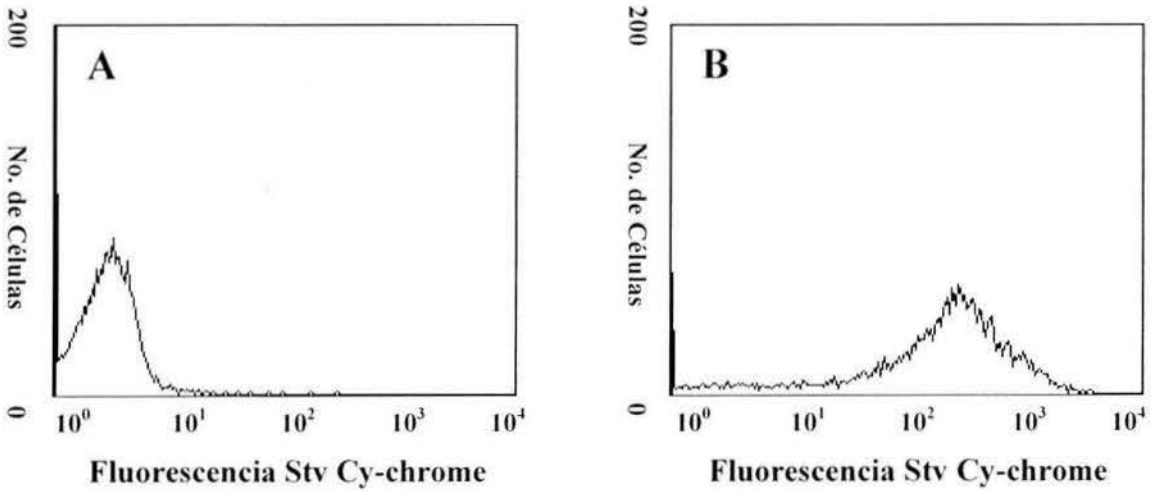


Para poder detectar cambios en el comportamiento de las integrinas sobre la superficie celular, es necesario poder discriminar la presencia de los mAb utilizados para la estimulación celular de los mAb utilizados para caracterizar los cambios en las integrinas utilizando citometría de flujo. Para dicho efecto, los mAb utilizados para la detección del comportamiento de las integrinas (IB4 para integrinas  $\beta 2$  totales, CBRM1/5 para integrinas  $\beta 2$  activadas y 15/7 para integrinas  $\beta 1$  activadas) en la superficie celular fueron biotinilados, y su detección se llevó a cabo con estreptavidina Cy-chrome (el anticuerpo MAR4 para integrinas  $\beta 1$  totales esta directamente marcado con Cy-chrome). Únicamente los anticuerpos biotinilados fueron detectados por la estreptavidina Cy-chrome (Fig. 10). Adicionalmente la estimulación celular no provocó ningún cambio en la unión de la estreptavidina al neutrófilo humano (Fig. 11), por lo que los cambios de fluorescencia detectados en el citómetro de flujo, sólo pueden ser atribuidos a la unión de los mAb biotinilados.

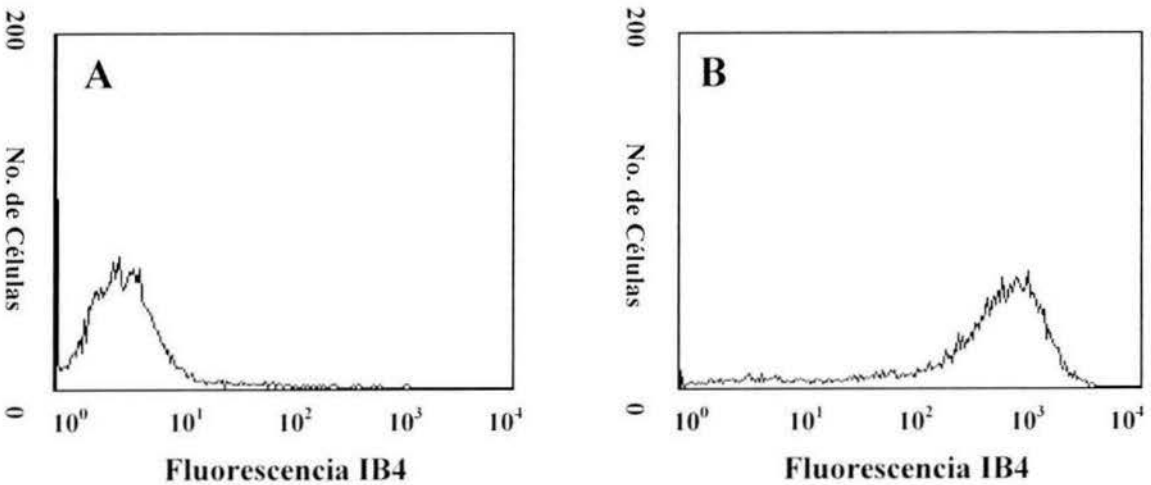
Finalmente, para detectar dos fluorescencias diferentes por microscopía confocal, fue necesario fluoresceinar los anticuerpos con los que se estimularon las células. Para ello los Fab del mAb IV.3 y los  $F(ab')_2$  del mAb 3G8 fueron fluoresceinados, y su capacidad funcional fue evaluada utilizando citometría de flujo. Tanto la estimulación con los Fab del mAb IV.3 como con los  $F(ab')_2$  del mAb 3G8, resultaron en aumento del número total de integrinas  $\beta 2$  en la superficie del neutrófilo humano (Figs. 12 y 13). Este resultado indica que fluoresceinar los Fab del mAb IV.3 y los  $F(ab')_2$  del mAb 3G8 no afectó su capacidad para estimular neutrófilos humanos.

Los resultados anteriores, demuestran que las modificaciones realizadas a los distintos mAb no afectan su capacidad funcional, y permiten un sistema limpio de

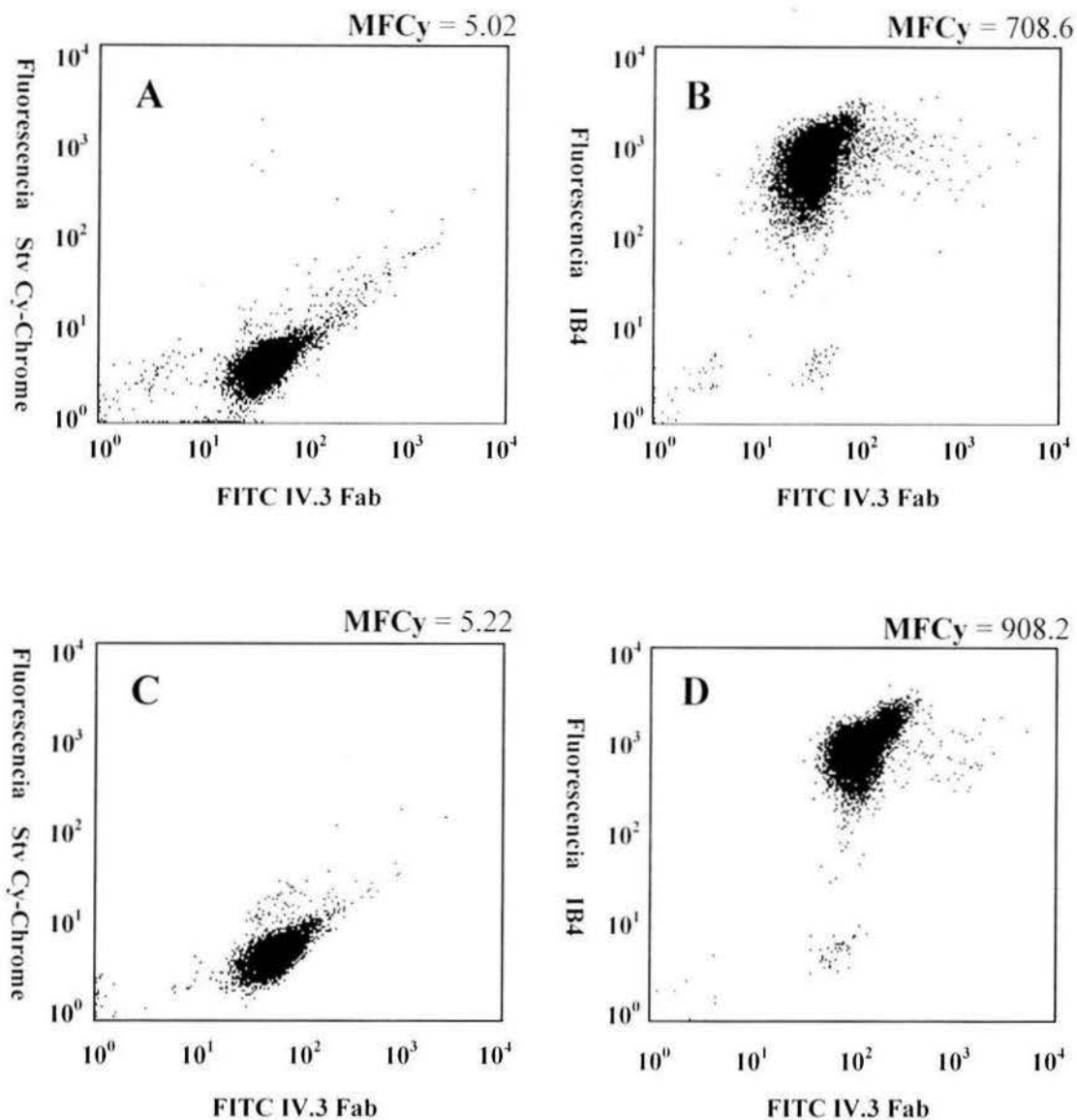
detección del comportamiento de las integrinas en la superficie celular, ya sea utilizando citometría de flujo o microscopía confocal.



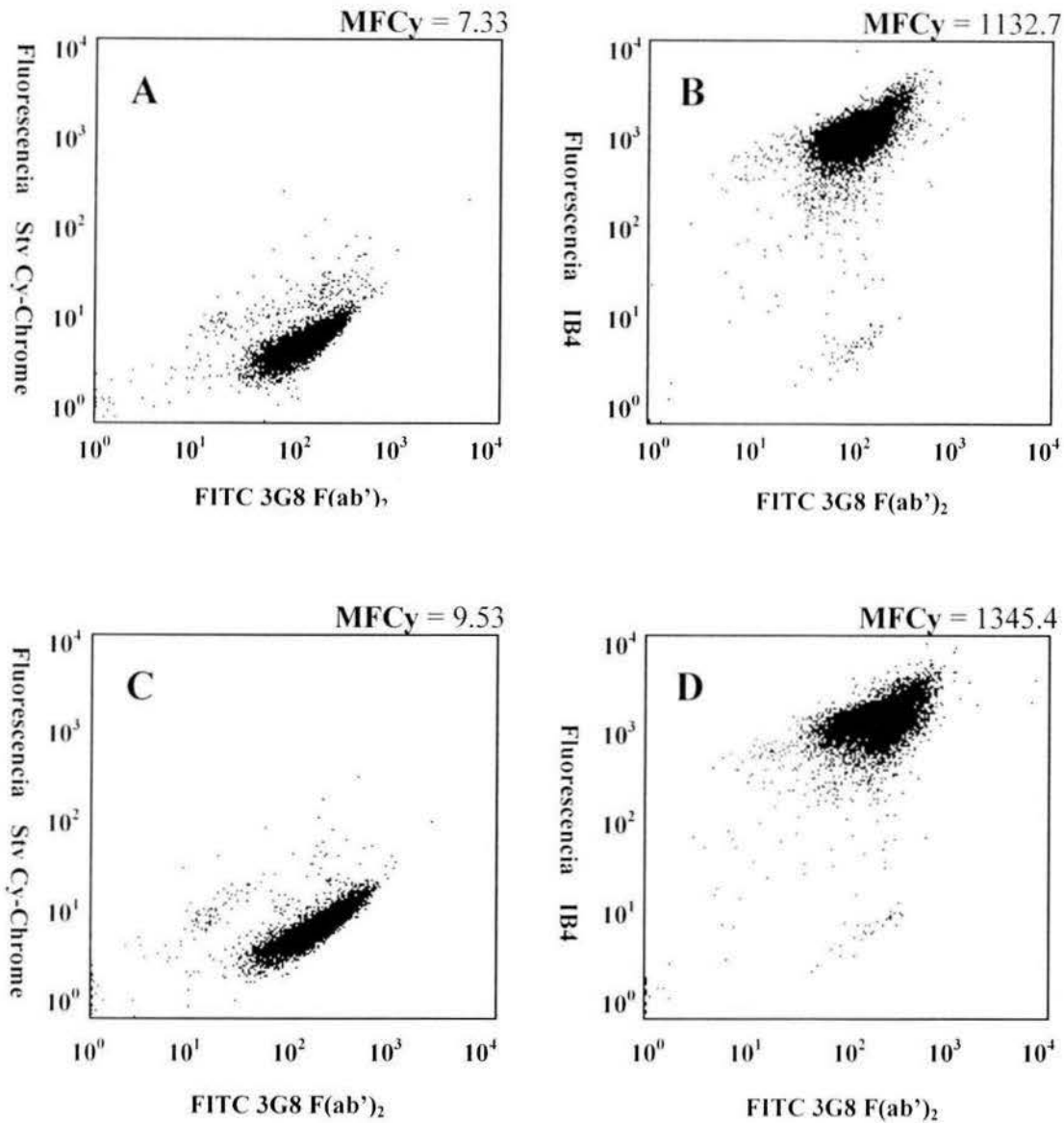
**Figura 10. Sólo los anticuerpos biotinilados son detectados por la unión de la estreptavidina Cy-chrome.** Un millón de neutrófilos humanos fueron incubados durante 45 minutos a 4 °C con 5 mg/ml del mAb IB4 sin biotinilar (A) o biotinilado (B). Posteriormente se lavaron las células para eliminar el excedente de anticuerpo y se incubaron con estreptavidina Cy-chrome (Stv Cy-chrome) durante 30 minutos a 4 °C. Se lavaron las células nuevamente y se fijaron con 1 % paraformaldehído en PBS. Se analizó la fluorescencia de las células por citometría de flujo. Datos representativos de al menos 4 mAb distintos.



**Figura 11. La estimulación celular no afecta la unión de la estreptavidina Cy-chrome.** Un millón de neutrófilos humanos estimulados previamente durante 10 minutos a 37 °C con 100 ng/ml de PMA fueron incubados durante 45 minutos a 4 °C con 5 mg/ml del mAb IB4 sin biotinilar (A) o biotinilado (B). Posteriormente se lavaron las células para eliminar el excedente de anticuerpo y se incubaron con estreptavidina Cy-chrome (Stv Cy-chrome) durante 30 minutos a 4 °C. Se lavaron las células nuevamente y se fijaron con 1 % paraformaldehído en PBS. Se analizó la fluorescencia de las células por citometría de flujo. Datos representativos de al menos 4 mAb distintos.



**Figura 12. Fluoresceinar los Fab del mAb IV.3 no afecta su capacidad para estimular a los neutrófilos humanos.** Un millón de células fueron incubadas durante una hora a 4 °C con FITC-Fab del mAb IV.3 (A, B, C y D) y estimuladas por la adición de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo de cabra anti-ratón durante 10 minutos a 37 °C (C y D). Las células fueron incubadas durante 45 minutos a 4 °C con el mAb IB4 biotinilado (B y D) o sin anticuerpo (A y C). Posterior a los lavados las células fueron teñidas con Stv Cy-chrome durante 30 minutos a 4 °C y lavadas nuevamente. Las células fueron fijadas en 1 % paraformaldehído en PBS y analizadas por citometría de flujo. Datos representativos de al menos tres experimentos. MFCy = Fluorescencia promedio en el canal de Cy-chrome.



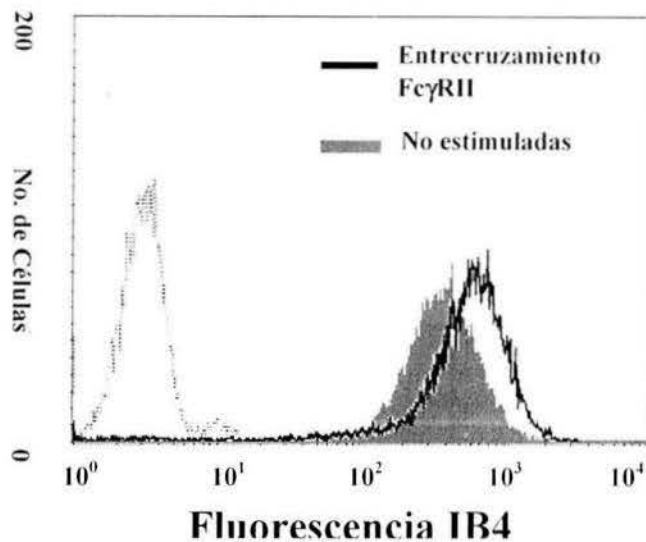
**Figura 13. Fluoresceinar los F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 no afecta su capacidad para estimular a los neutrófilos humanos.** Un millón de células fueron incubadas durante una hora a 4 °C con FITC-F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 (A, B, C y D) y estimuladas por la adición de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo de cabra anti-ratón durante 10 minutos a 37 °C (C y D). Las células fueron incubadas durante 45 minutos a 4 °C con el mAb IB4 biotinilado (B y D) o sin anticuerpo (A y C). Posterior a los lavados las células fueron teñidas con Stv Cy-chrome durante 30 minutos a 4 °C y lavadas nuevamente. Las células fueron fijadas en 1 % paraformaldehído en PBS y analizadas por citometría de flujo. Datos representativos de al menos tres experimentos. MFCy = Fluorescencia promedio en el canal de Cy-chrome.

## **Efecto de la estimulación de receptores Fc $\gamma$ sobre Integrinas $\beta$ 2**

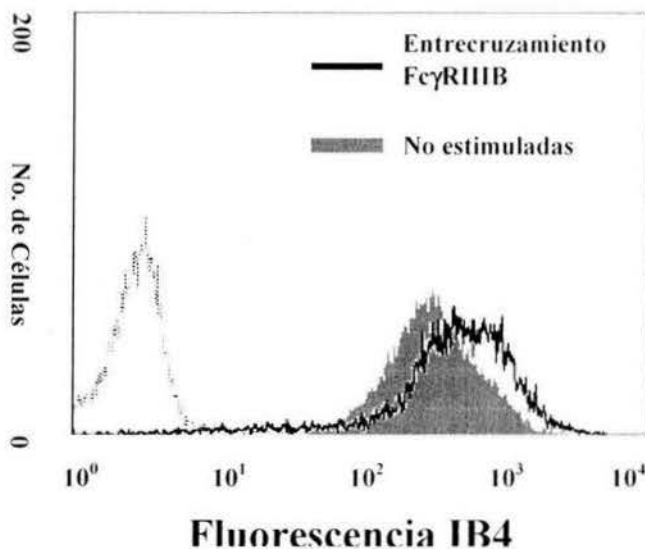
Una vez que me cercioré que los Fab del mAb IV.3 y los F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 retenían sus capacidades funcionales, me di a la tarea de estudiar los efectos de la estimulación selectiva de los receptores Fc $\gamma$ IIA y Fc $\gamma$ RIIB del neutrófilo humano sobre el comportamiento de las integrinas  $\beta$ 2.

Se ha reportado que el entrecruzamiento selectivo de los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIB produce aumento en el número de integrinas  $\beta$ 2 en la superficie del neutrófilo humano [49], así como promueve la aparición de epítomos de activación de las mismas integrinas  $\beta$ 2 [49]. Para comprobar estos resultados, utilicé el mAb IB4, que reconoce la cadena  $\beta$ 2 de las integrinas  $\beta$ 2, y el mAb CBRM 1/5 que reconoce a la integrina  $\alpha$ M $\beta$ 2 cuando se encuentra en estado activado. Tanto el entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIA, como el entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIB promovieron un aumento en la expresión de integrinas  $\beta$ 2 en la superficie celular (Figs. 14 y 15). El aumento de las integrinas  $\beta$ 2 en la superficie celular secundario al entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIB es evidente desde los cinco minutos posteriores al entrecruzamiento y se mantiene más allá de 30 minutos después de la estimulación (Fig. 16).

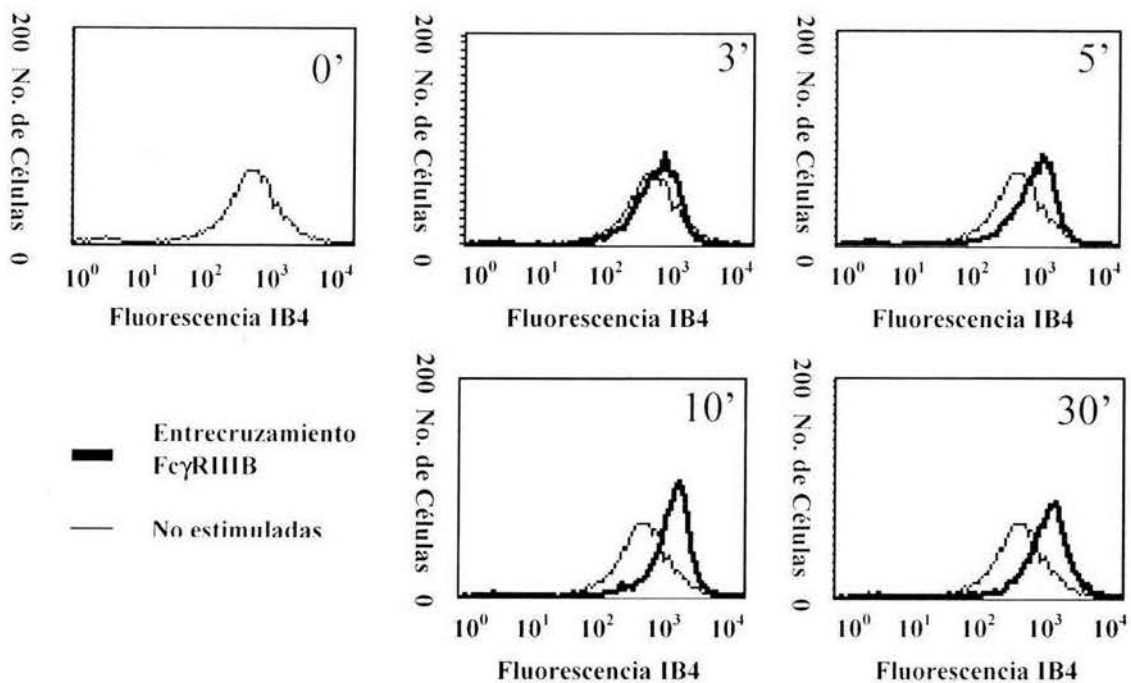
Estos resultados sugieren que el aumento de integrinas  $\beta$ 2 secundario a la estimulación, tanto del receptor Fc $\gamma$ RII como del receptor Fc $\gamma$ RIIB, se deben a la degranulación de vesículas preformadas que contienen en su interior integrinas  $\beta$ 2, debido a que la síntesis proteica a tiempos tan cortos es prácticamente imposible. Adicionalmente, la presencia de integrinas  $\beta$ 2 en vesículas preformadas en el neutrófilo humano ya ha sido descrita con anterioridad [59].



**Figura 14. El entrecruzar el Fc $\gamma$ RII en la superficie del neutrófilo produce un aumento en la expresión de integrinas  $\beta$ 2.** Neutrófilos humanos fueron estimulados 10 minutos por el entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RII. Posteriormente,  $1 \times 10^6$  células fueron marcadas con el mAb anti-integrinas  $\beta$ 2 IB4 y fueron analizadas por citometría de flujo. La línea punteada es el control negativo. El área gris es la expresión de integrinas  $\beta$ 2 en las células no estimuladas, y la línea gruesa la expresión de las integrinas  $\beta$ 2 después del entrecruzamiento de los receptores Fc. Datos representativos de tres experimentos independientes.

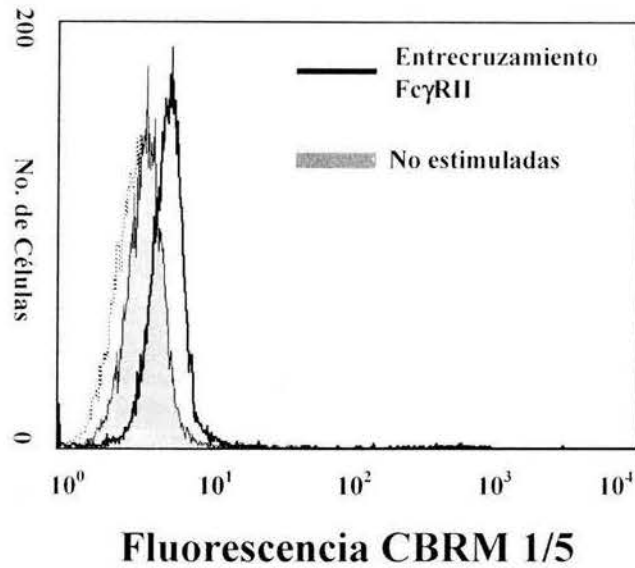


**Figura 15. El entrecruzar el Fc $\gamma$ RIIB en la superficie del neutrófilo produce un aumento en la expresión de integrinas  $\beta$ 2.** Neutrófilos humanos fueron estimulados 10 minutos por el entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RIIB. Posteriormente,  $1 \times 10^6$  células fueron marcadas con el mAb anti-integrinas  $\beta$ 2 IB4 y fueron analizadas por citometría de flujo. La línea punteada es el control negativo. El área gris es la expresión de integrinas  $\beta$ 2 en las células no estimuladas, y la línea gruesa la expresión de las integrinas  $\beta$ 2 después del entrecruzamiento de los receptores Fc. Datos representativos de tres experimentos independientes.

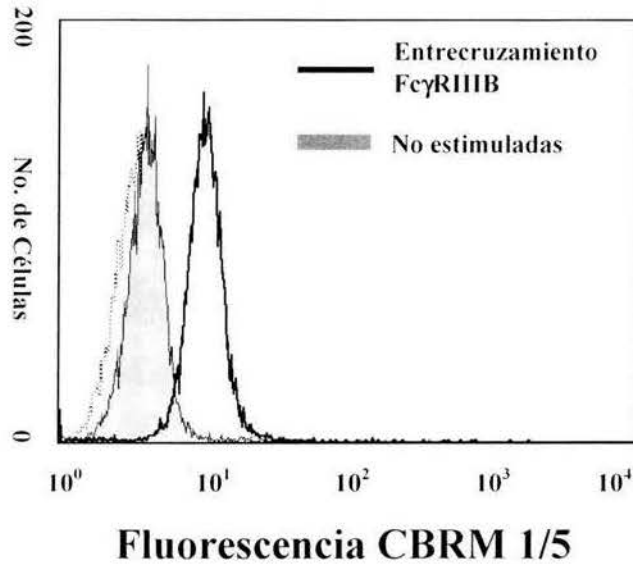


**Figura 16. Cinética del aumento de integrinas  $\beta 2$  sobre la superficie celular secundaria al entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma RIIIB$ .** Neutrófilos humanos fueron estimulados a través del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  durante los tiempos indicados en cada panel y posteriormente analizados para la expresión de integrinas  $\beta 2$  por citometría de flujo. La línea delgada representa a las células no estimuladas. La línea gruesa representa a las células estimuladas a través del  $Fc\gamma RIIIB$ . Datos representativos de tres experimentos independientes.

Al evaluar la activación de integrinas  $\beta 2$  se observó que el entrecruzamiento de cualquiera de los dos receptores  $Fc\gamma$  del neutrófilo humano produjo un aumento en la presencia del epítipo de activación detectado por el mAb CBRM 1/5 (Figs. 17 y 18). Nuestros resultados apoyan otros resultados previos [44, 49], y refuerzan la noción de que la estimulación selectiva de los receptores  $Fc\gamma RIIA$  y los receptores  $Fc\gamma RIIIB$  produce tanto el aumento en el número de integrinas  $\beta 2$  totales sobre la superficie del neutrófilo humano como la activación de las mismas.



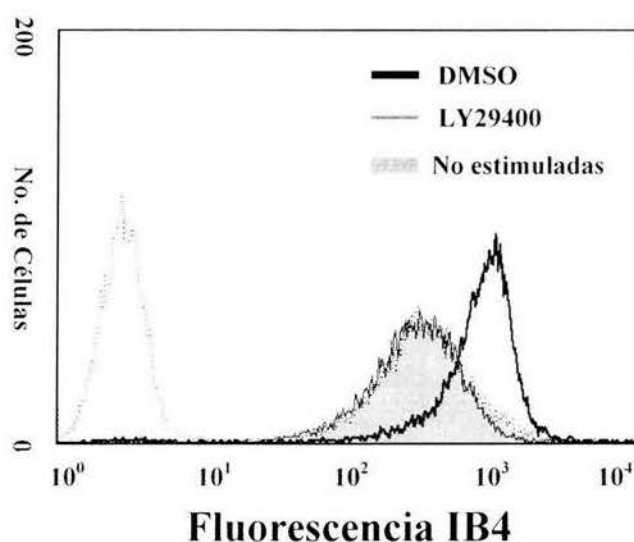
**Figura 17. El entrecruzar el Fc $\gamma$ RII en la superficie del neutrófilo produce activación de integrinas  $\beta$ 2.** Neutrófilos humanos fueron estimulados 10 minutos por el entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RII. Posteriormente,  $1 \times 10^6$  células fueron marcadas con el mAb anti-integrinas  $\beta$ 2 activas CBRM1/5 y fueron analizadas por citometría de flujo. La línea punteada es el control negativo. El área gris es la activación de integrinas  $\beta$ 2 en las células no estimuladas, y la línea gruesa la activación de las integrinas  $\beta$ 2 después del entrecruzamiento de los receptores Fc. Datos representativos de tres experimentos independientes.



**Figura 18. El entrecruzar el Fc $\gamma$ RIIB en la superficie del neutrófilo produce activación de integrinas  $\beta$ 2.** Neutrófilos humanos fueron estimulados 10 minutos por el entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RIIB. Posteriormente,  $1 \times 10^6$  células fueron marcadas con el mAb anti-integrinas  $\beta$ 2 activas CBRM1/5 y fueron analizadas por citometría de flujo. La línea punteada es el control negativo. El área gris es la activación de integrinas  $\beta$ 2 en las células no estimuladas, y la línea gruesa la activación de las integrinas  $\beta$ 2 después del entrecruzamiento de los receptores Fc. Datos representativos de tres experimentos independientes.



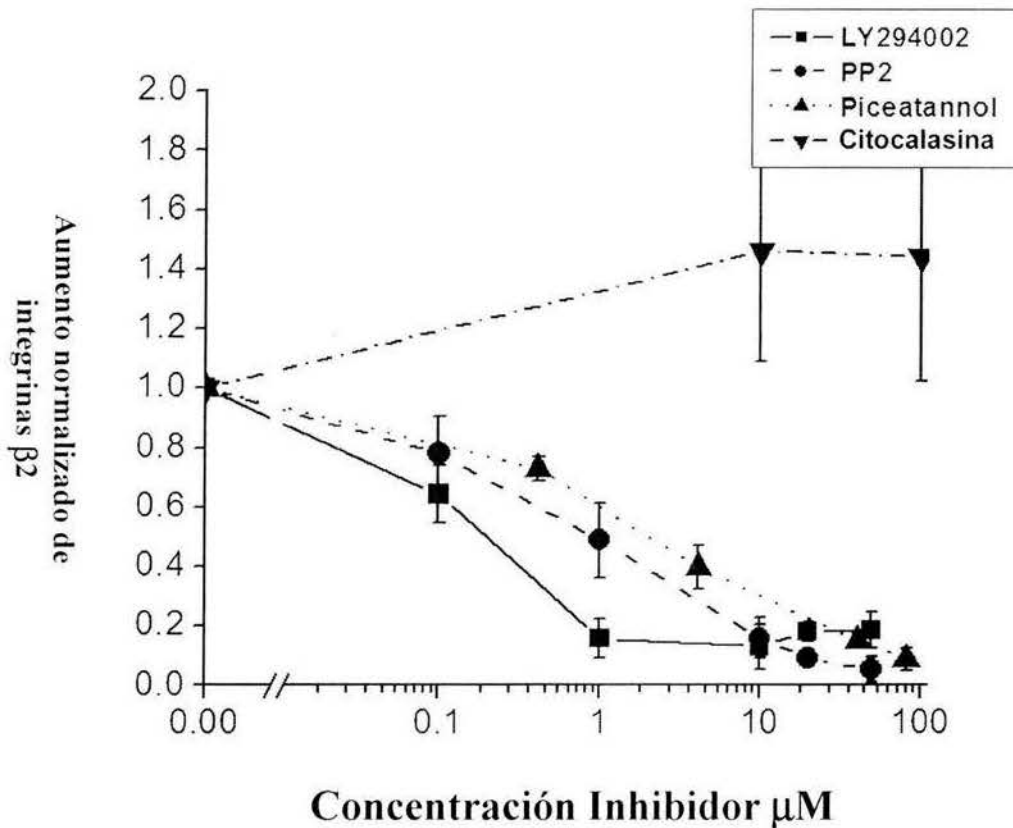
Se ha reportado que tanto el aumento de integrinas  $\beta 2$  sobre la superficie del neutrófilo humano, como la activación de integrinas  $\beta 2$  secundaria a la estimulación de receptores  $Fc\gamma$ , dependen de la participación de la enzima PI 3-K [44, 49]. Con el propósito de corroborar dichos resultados, estudié el papel de dicha enzima en el aumento de integrinas  $\beta 2$  totales secundario a la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$ . El aumento de integrinas  $\beta 2$  sobre la superficie del neutrófilo humano secundario a la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  desapareció en presencia del inhibidor selectivo de la enzima PI 3-K, LY294002 (Fig. 19). Los mismos resultados se obtuvieron utilizando otro inhibidor de PI 3-K, wortmanina.



**Figura 19. El aumento de integrinas  $\beta 2$  secundario al entrecruzamiento de  $Fc\gamma RIIIB$  depende de PI 3-K.** Neutrófilos humanos fueron estimulados 10 minutos mediante el entrecruzamiento de  $Fc\gamma RIIIB$ , en presencia de dimetil sulfóxido (DMSO; línea gruesa) o en presencia de 50  $\mu M$  LY294002 (línea delgada) o no estimuladas (área gris).  $1 \times 10^6$  células fueron marcadas con el mAb IB4 para análisis por citometría de flujo. La línea punteada es el control negativo. Datos representativos de tres experimentos independientes.

El resto de la vía bioquímica que lleva al aumento de integrinas  $\beta 2$  en respuesta a la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  se desconoce. Uno de los mecanismos postulados para la señalización del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  es la utilización de la maquinaria del receptor  $Fc\gamma RIIA$  [17]. Dicha maquinaria de señalización está basada en la fosforilación de las secuencias ITAM de la cadena  $\alpha$  del receptor  $Fc\gamma RIIA$  por cinasas de la familia Src, y el posterior reclutamiento de la cinasa Syk. Dado que tanto la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIA$  como el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  producen un aumento en el número de integrinas  $\beta 2$  sobre la superficie celular, era posible que compartieran una misma vía de activación. Para probar esta hipótesis, utilicé inhibidores farmacológicos de las cinasas de la familia Src, el inhibidor PP2, y de la cinasa Syk, el inhibidor Piceatannol, para evaluar su efecto en el aumento de integrinas  $\beta 2$  secundario a la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$ . El aumento de integrinas  $\beta 2$  secundario a la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  disminuyó de manera progresiva ante dosis cada vez mayores de los inhibidores PP2 y Piceatannol (Fig. 20).

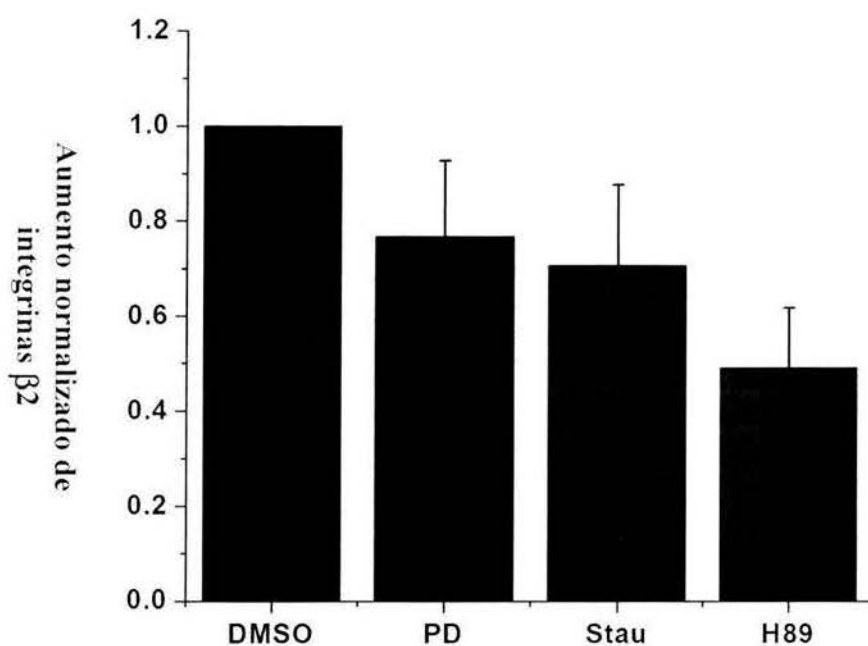
Estos resultados sugieren que además de la participación de la enzima PI 3-K, la vía de señalización que produce un aumento en el número de integrinas  $\beta 2$  en la superficie celular secundario a la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  requiere la participación de cinasas de la familia de Src y de Syk. Estos resultados apoyan el hecho que el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  pudiera utilizar la maquinaria del receptor  $Fc\gamma RIIA$  para ciertos eventos de señalización intracelular.



**Figura 20.** El aumento de integrinas  $\beta 2$  secundario al entrecruzamiento de  $Fc\gamma RIIB$  depende de PI 3-K, de cinasas de la familia de Src y de Syk. Neutrófilos humanos fueron pretratados con dimetil sulfóxido (DMSO), o con concentraciones crecientes de LY294002, PP2, Piceatannol o Citocalasina, antes de ser estimulados 10 minutos mediante el entrecruzamiento de  $Fc\gamma RIIB$ . Las células se tiñeron con el mAb IB4. El cálculo del incremento normalizado se describe en la metodología. Los datos son el promedio  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes.

Además de la participación de estas enzimas, investigué la posible participación de otros mediadores en la señalización que produce aumento de integrinas  $\beta 2$  secundario a la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIB$ . Los inhibidores de proteína cinasa C (PKC), staurosporina, y de proteína cinasa A (PKA), H89, produjeron una disminución cercana al 50% en el aumento de integrinas  $\beta 2$  posterior a la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIB$  (Fig. 21). Por el contrario, la inhibición de la MEK, con el inhibidor PD98059, no tuvo

ningún efecto sobre el aumento de integrinas  $\beta 2$  (Fig. 21). Estos datos sugieren que la señalización a partir de la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  se diversifica al interior de la célula, generando distintas respuestas celulares. Por ejemplo, aún cuando el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  es capaz de señalar la activación de ERK (Fig. 7), un evento regulado por MEK, el inhibidor PD98059 no tiene ningún efecto sobre el aumento de integrinas  $\beta 2$  en la superficie celular.



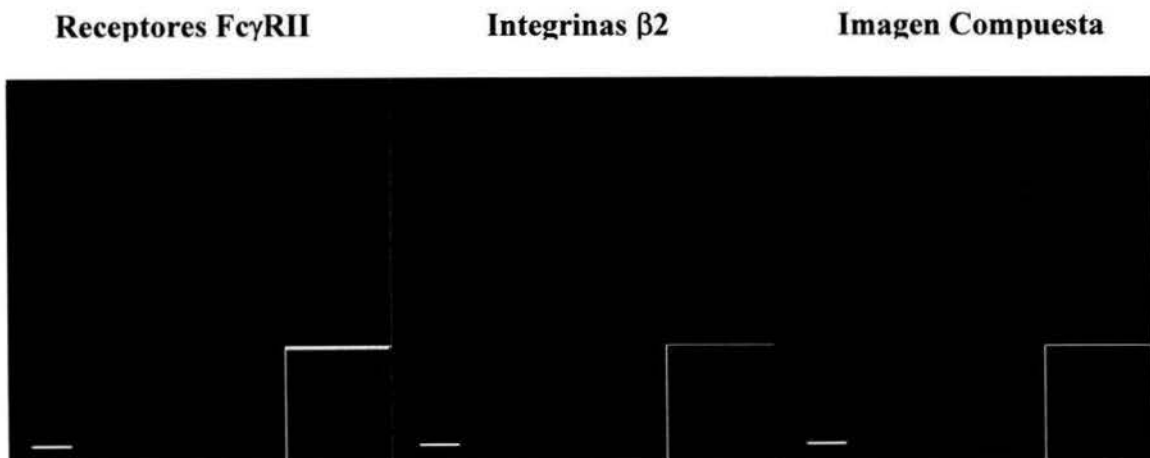
**Figura 21. El aumento de integrinas  $\beta 2$  secundario al entrecruzamiento de  $Fc\gamma RIIIB$  depende parcialmente de PKA y PKC, y es independiente de ERK.** Neutrófilos humanos fueron pretratados con 30  $\mu M$  PD98059 (PD), 10 nM Staurosporine (Stau), 10  $\mu M$  H89 y luego estimulados 10 minutos mediante el entrecruzamiento de  $Fc\gamma RIIIB$ . El cálculo del incremento normalizado se describe en la metodología. Los datos son el promedio  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes.

Se ha reportado además, que los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB del neutrófilo humano son capaces de interactuar con las integrinas  $\beta$ 2 en la membrana celular [37, 60]. Los estudios que sugieren dicha interacción, utilizaron transferencia energética para determinar que ambos tipos de receptores Fc $\gamma$  podían localizarse a menos de 7 nm de distancia de las integrinas  $\beta$ 2, cuando ambos eran transfectados en fibroblastos. Hasta qué punto estos hallazgos reflejan lo que sucede en la membrana del neutrófilo no es claro dado que ningún estudio se había realizado hasta ahora que observara directamente la interacción de dichos receptores sobre la membrana del neutrófilo humano. Para estudiar la distribución de los receptores Fc $\gamma$  sobre la superficie del neutrófilo, los Fab del mAb IV.3 y los F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 fueron marcados con fluoresceína y las células estimuladas con estos fragmentos fueron examinadas por microscopía confocal. En las células no estimuladas, tanto el receptor Fc $\gamma$ RIIA como el receptor Fc $\gamma$ RIIIB se encuentran distribuidos uniformemente sobre la membrana celular (Figs. 22 y 24). Posterior al entrecruzamiento de los receptores, agregados de receptores aparecen sobre la superficie celular (Figs. 23 y 25).

La integrinas  $\beta$ 2, al igual que los receptores Fc $\gamma$ , se encuentran uniformemente distribuidas sobre la superficie celular en las células no estimuladas (Figs. 22 y 24). Adicionalmente las integrinas  $\beta$ 2 no colocalizan con ninguno de los dos receptores Fc $\gamma$  en las células no estimuladas (Figs. 22 y 24). El entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIA produjo agregación de las integrinas  $\beta$ 2 sobre la superficie del neutrófilo humano, sin embargo, en ningún momento se observó colocalización del Fc $\gamma$ RII y las integrinas  $\beta$ 2 (Fig. 23). Por el contrario, la estimulación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB produjo no sólo la agregación de integrinas  $\beta$ 2, sino que también se observó la colocalización del receptor

Fc $\gamma$ RIIIB con las integrinas  $\beta$ 2 (Fig. 25). Estos resultados confirman la capacidad del receptor Fc $\gamma$ RIIIB para interactuar con las integrinas  $\beta$ 2 en la superficie del neutrófilo humano, pero únicamente después de la estimulación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB.

Todos estos resultados en su conjunto indican que, aún cuando bioquímicamente las vías de señalización que producen un aumento en la expresión de integrinas  $\beta$ 2 sobre la superficie del neutrófilo humano secundario a la estimulación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB son muy parecidas a la vía clásica de activación por ITAMs del receptor Fc $\gamma$ RIIA, los receptores Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIIIB son capaces de interactuar de maneras diferentes sobre la superficie celular con las integrinas  $\beta$ 2. Esto sugiere que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB puede tener capacidades de señalización distintas a las del receptor Fc $\gamma$ RIIA. Como se verá más adelante, este parece ser el caso, dado que sólo el receptor Fc $\gamma$ RIIIB es capaz de activar integrinas  $\beta$ 1.

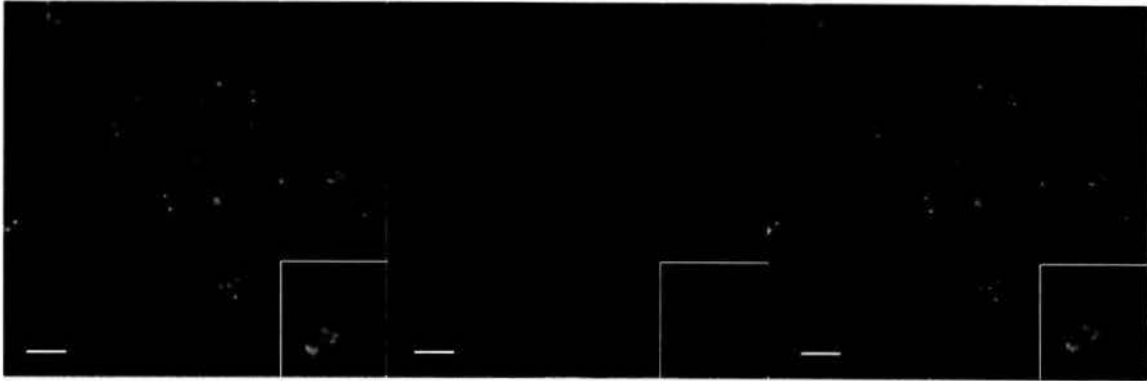


**Figura 22. Fc $\gamma$ RII no colocaliza con integrinas  $\beta$ 2 en neutrófilos no estimulados.** Neutrófilos humanos incubados con fragmentos FITC-Fab del mAb IV.3. Las células se tiñeron posteriormente con el mAb IB4 biotinilado y estreptavidina Cy-chrome para detectar integrinas  $\beta$ 2. Los recuadros muestran el detalle a nivel celular. Las imágenes sobrepuestas se encuentran en la columna derecha. Más de 100 células fueron analizadas para cada condición en al menos dos experimentos independientes. La barra de escala representa 10  $\mu$ m. Se muestran imágenes representativas.

Receptores Fc $\gamma$ RII

Integrinas  $\beta$ 2

Imagen compuesta

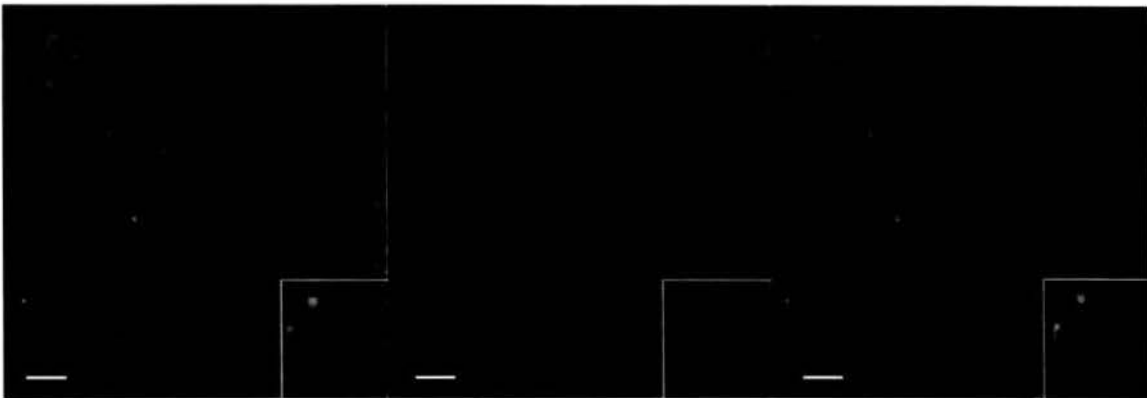


**Figura 23. Fc $\gamma$ RII no colocaliza con integrinas  $\beta$ 2 en neutrófilos estimulados.** Neutrófilos humanos incubados con fragmentos FITC-Fab del mAb IV.3 y estimulados 10 minutos a 37 °C con la adición de un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón. Las células se tiñeron posteriormente con el mAb IB4 biotinilado y estreptavidina Cy-chrome para detectar integrinas  $\beta$ 2. Los recuadros muestran el detalle a nivel celular. Las imágenes sobrepuestas se encuentran en la columna derecha. Más de 100 células fueron analizadas para cada condición en al menos dos experimentos independientes. La barra de escala representa 10  $\mu$ m. Se muestran imágenes representativas.

Receptores Fc $\gamma$ RIIIB

Integrinas  $\beta$ 2

Imagen compuesta

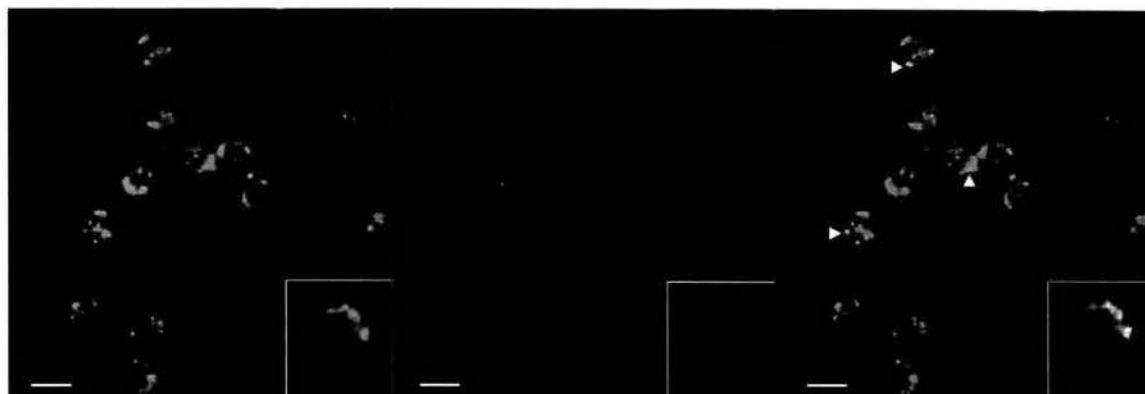


**Figura 24. Fc $\gamma$ RIIIB no colocaliza con integrinas  $\beta$ 2 en neutrófilos no estimulados.** Neutrófilos humanos incubados con fragmentos FITC-F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8. Las células se tiñeron con el mAb IB4 biotinilado y estreptavidina Cy-chrome para detectar integrinas  $\beta$ 2. Las imágenes sobrepuestas se encuentran en la columna derecha. Los recuadros muestran el detalle a nivel celular. Más de 100 células fueron analizadas para cada condición en al menos dos experimentos independientes. La barra de escala representa 10  $\mu$ m. Se muestran imágenes representativas.

Receptores FcγRIIIB

Integrinas β2

Imagen compuesta



**Figura 25. FcγRIIIB colocaliza con integrinas β2 después de su entrecruzamiento.** Neutrófilos humanos incubados con fragmentos FITC-F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8. Las células fueron estimuladas 10 minutos con la adición de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> IgG de cabra anti-ratón. Las células se tiñeron con el mAb IB4 biotinilado y estreptavidina Cy-chrome para detectar integrinas β2. Las imágenes sobrepuestas se encuentran en la columna derecha. Las puntas de flecha muestran colocalización de FcγRIIIB con integrinas β2 después del entrecruzamiento. Los recuadros muestran el detalle a nivel celular. Más de 100 células fueron analizadas para cada condición en al menos dos experimentos independientes. La barra de escala representa 10 μm. Se muestran imágenes representativas.

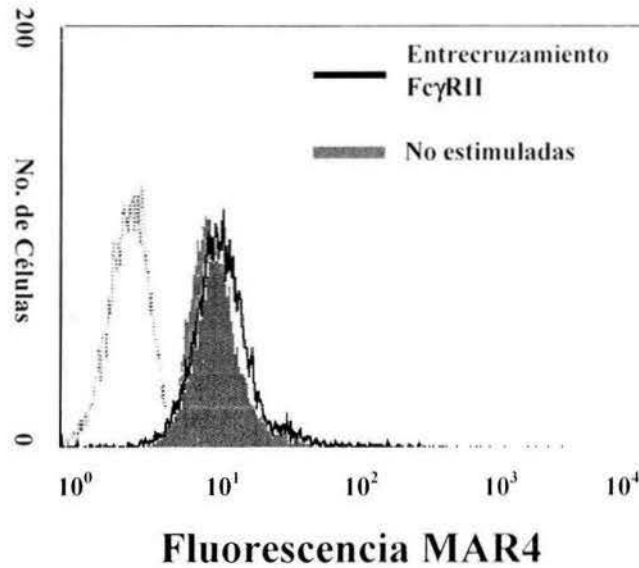


## **Efecto de la estimulación de receptores Fc $\gamma$ sobre Integrinas $\beta$ 1**

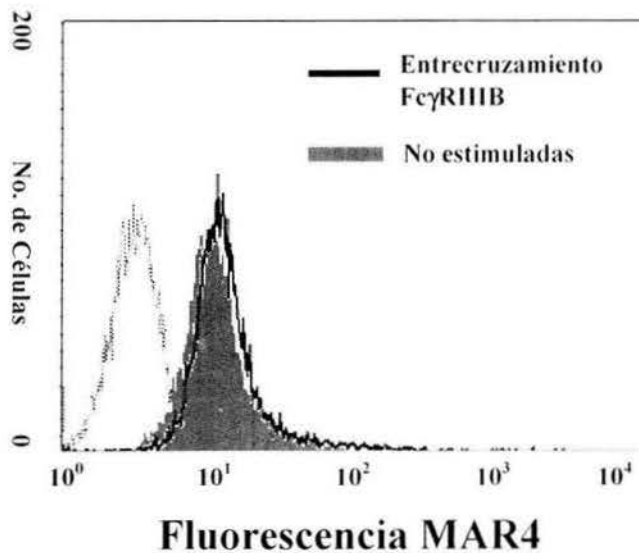
Hasta el presente estudio no se había realizado ningún trabajo que detallara los efectos de la estimulación de los receptores Fc $\gamma$  del neutrófilo sobre el comportamiento de las integrinas  $\beta$ 1. Para el estudio de las integrinas  $\beta$ 1 en el neutrófilo humano seguí la misma estrategia que para el estudio de las respuestas de las integrinas  $\beta$ 2 secundario a la estimulación de receptores Fc $\gamma$ R, utilizando el mAb MAR 4 para detectar integrinas  $\beta$ 1 totales, y el mAb 15/7 para detectar un epítipo de activación de integrinas  $\beta$ 1.

Al estimular selectivamente los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB, contrario a lo que sucede con las integrinas  $\beta$ 2, ningún cambio en la expresión de las integrinas  $\beta$ 1 pudo ser detectado en la superficie celular (Figs. 26 y 27). Esto sugiere que las vesículas preformadas que contienen a las integrinas  $\beta$ 2 [59] y que aparecen en la superficie de manera secundaria a la degranulación mediada por receptores Fc $\gamma$ , no contienen integrinas  $\beta$ 1.

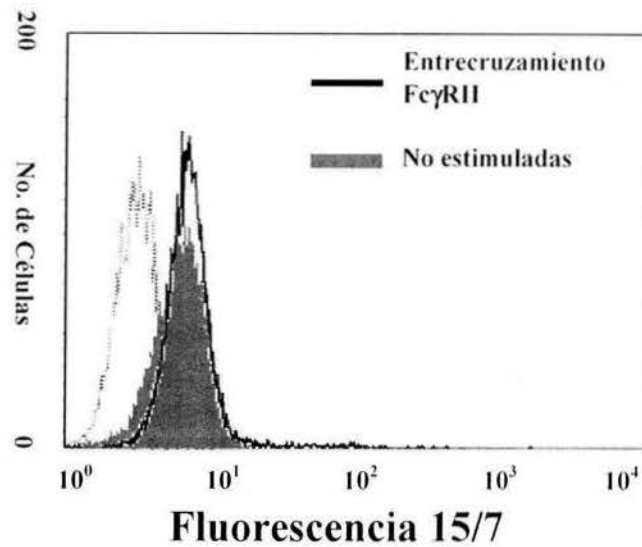
Era posible sin embargo, que aún cuando la estimulación de los receptores Fc $\gamma$ R del neutrófilo no produjera cambios en el número de integrinas  $\beta$ 1, pudiera provocar activación de las mismas. Para identificar integrinas activas, utilicé el mAb 15/7 que detecta un epítipo de activación de integrinas  $\beta$ 1 [61]. La estimulación del receptor Fc $\gamma$ RIIA no produjo ningún cambio en la expresión del epítipo de activación detectado por el mAb 15/7 (Fig. 28). Sin embargo, la estimulación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB produjo un claro aumento en la expresión del epítipo que detecta el mAb 15/7 (Fig. 29). La activación de las integrinas  $\beta$ 1 secundaria a la estimulación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB, es



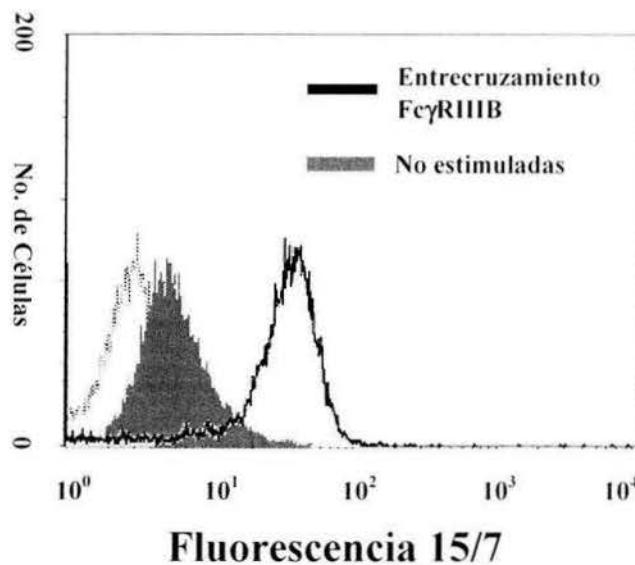
**Figura 26. El entrecruzar Fc $\gamma$ RII en la superficie del neutrófilo no produce un aumento en la expresión de integrinas  $\beta$ 1.** Neutrófilos humanos fueron estimulados 10 minutos por el entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RII. Posteriormente,  $1 \times 10^6$  células fueron marcadas con el mAb anti-integrinas  $\beta$ 1 MAR4 y fueron analizadas por citometría de flujo. La línea punteada es el control negativo. El área gris es la expresión de integrinas  $\beta$ 1 en las células no estimuladas, y la línea gruesa la expresión de las integrinas  $\beta$ 1 después del entrecruzamiento de los receptores Fc. Datos representativos de tres experimentos independientes.



**Figura 27. El entrecruzar Fc $\gamma$ RIIB en la superficie del neutrófilo no produce un aumento en la expresión de integrinas  $\beta$ 1.** Neutrófilos humanos fueron estimulados 10 minutos por el entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RIIB. Posteriormente,  $1 \times 10^6$  células fueron marcadas con el mAb anti-integrinas  $\beta$ 1 MAR4 y fueron analizadas por citometría de flujo. La línea punteada es el control negativo. El área gris es la expresión de integrinas  $\beta$ 1 en las células no estimuladas, y la línea gruesa la expresión de las integrinas  $\beta$ 1 después del entrecruzamiento de los receptores Fc. Datos representativos de tres experimentos independientes.

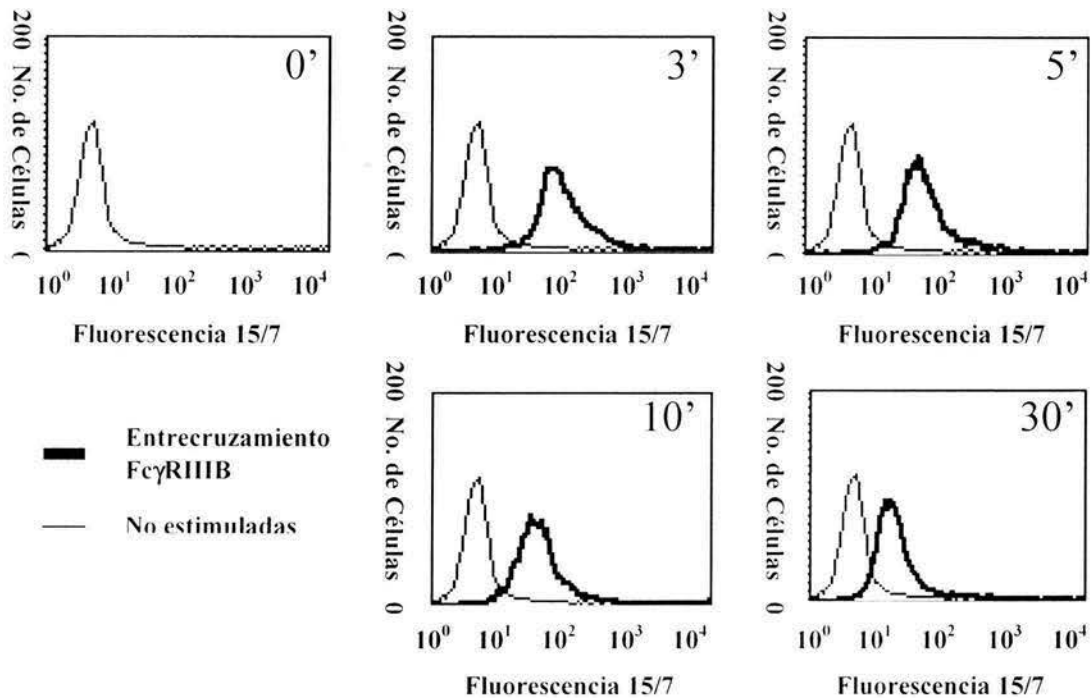


**Figura 28. El entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RII en el neutrófilo humano no produce activación de integrinas  $\beta$ 1.** Neutrófilos humanos fueron estimulados 10 minutos por el entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RII. Posteriormente,  $1 \times 10^6$  células fueron marcadas con el mAb anti-integrinas activadas 15/7 y fueron analizadas por citometría de flujo. La línea punteada es el control negativo. El área gris es la expresión de integrinas  $\beta$ 1 activas en las células no estimuladas, y la línea gruesa el de las integrinas  $\beta$ 1 activas después del entrecruzamiento de los receptores Fc. Datos representativos de tres experimentos independientes.



**Figura 29. El entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIB en el neutrófilo humano produce activación de integrinas  $\beta$ 1.** Neutrófilos humanos fueron estimulados 10 minutos por el entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RIIB. Posteriormente,  $1 \times 10^6$  células fueron marcadas con el mAb anti-integrinas activadas 15/7 y fueron analizadas por citometría de flujo. La línea punteada es el control negativo. El área gris es la expresión de integrinas  $\beta$ 1 activas en las células no estimuladas, y la línea gruesa el de las integrinas  $\beta$ 1 activas después del entrecruzamiento de los receptores Fc. Datos representativos de tres experimentos independientes.

evidente después de 3 minutos de activación, pero decae a partir de los 30 minutos posteriores a la estimulación (Fig. 30).

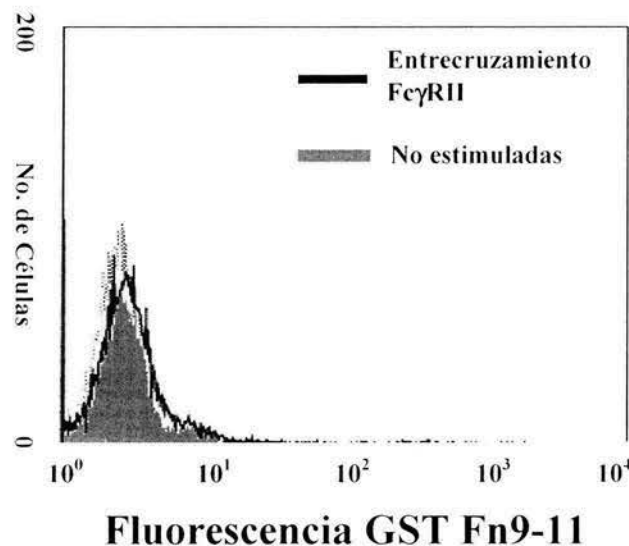


**Figura 30. Cinética de la activación de integrinas  $\beta$ 1 sobre la superficie celular secundario al entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIIB.** Neutrófilos humanos fueron estimulados a través del receptor Fc $\gamma$ RIIIB durante los tiempos indicados en cada panel y posteriormente analizados para la expresión de integrinas  $\beta$ 1 activadas por citometría de flujo. La línea delgada representa a las células no estimuladas. La línea gruesa representa a las células estimuladas a través del Fc $\gamma$ RIIIB. Datos representativos de tres experimentos independientes.

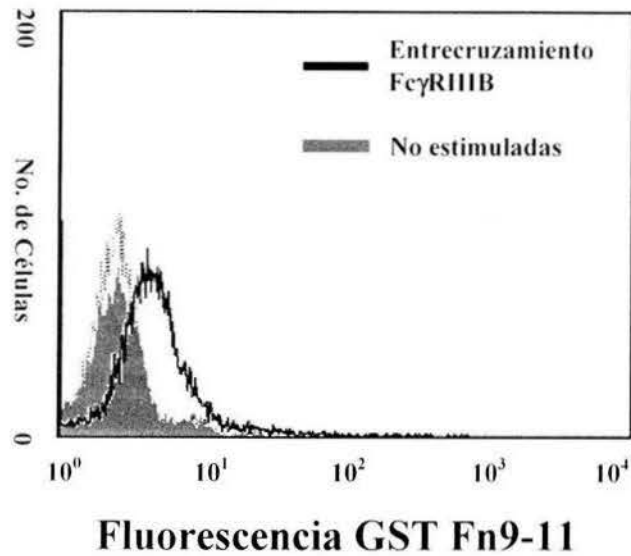
Para confirmar de otra manera la activación de las integrinas  $\beta$ 1, evalué funcionalmente la activación de integrinas secundaria a la estimulación de receptores Fc $\gamma$ RIIIB. Para ello utilicé el fragmento de fibronectina recombinante acoplada a GST, GSTFn9-11, uno de los ligandos naturales de las integrinas  $\beta$ 1 [62]. Este fragmento de fibronectina se une a las integrinas  $\beta$ 1 sólo cuando estas se encuentran activadas.

La estimulación del receptor Fc $\gamma$ RII no produjo ningún cambio en la adhesión del fragmento de fibronectina GSTFn9-11 (Fig. 31), confirmando que dicha estimulación no

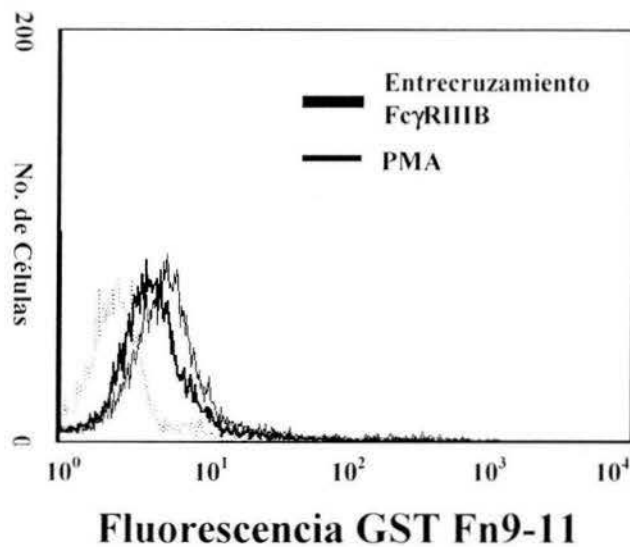
tiene ningún efecto sobre la activación de integrinas  $\beta 1$ . Por el contrario, la estimulación a través del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  produjo un aumento en la unión del fragmento de fibronectina GSTFn9-11 (Fig. 32). La magnitud de la unión de fibronectina a las integrinas  $\beta 1$  activadas por la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  es semejante en magnitud al aumento que se da cuando se estimulan las células con PMA (Fig. 33). Esta unión del fragmento de fibronectina GSTFn9-11, depende de la presencia de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , dado que la ausencia de estos cationes evita la unión del fragmento (Fig. 34). Tanto la aparición del epítipo de activación de integrinas  $\beta 1$  que es reconocido por el mAb 15/7, como el aumento en la unión del fragmento de fibronectina GSTFn9-11 indican que la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  es capaz de activar integrinas  $\beta 1$ .



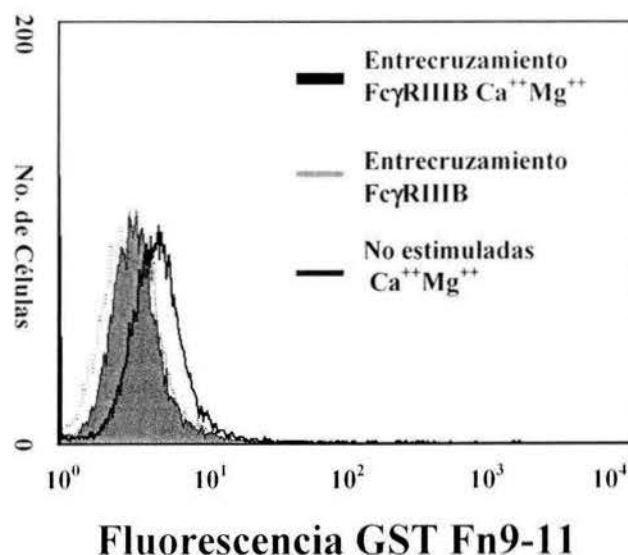
**Figura 31. El entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma RII$  en el neutrófilo humano no produce activación de integrinas  $\beta 1$ .** Neutrófilos humanos fueron estimulados 10 minutos por el entrecruzamiento de  $Fc\gamma RII$ . Posteriormente,  $1 \times 10^6$  células fueron marcadas con el fragmento de fibronectina GST Fn9-11 y fueron analizadas por citometría de flujo. La línea punteada es el control negativo. El área gris es la unión de GST Fn9-11 en las células no estimuladas, y la línea gruesa es la unión después del entrecruzamiento de los receptores Fc. Datos representativos de tres experimentos independientes.



**Figura 32. El entrecruzamiento del receptor FcγRIIIB en el neutrófilo humano produce activación de integrinas β1.** Neutrófilos humanos fueron estimulados 10 minutos por el entrecruzamiento de FcγRIIIB. Posteriormente,  $1 \times 10^6$  células fueron marcadas con el fragmento de fibronectina GST Fn9-11 y fueron analizadas por citometría de flujo. La línea punteada es el control negativo. El área gris es la unión de GSTFn9-11 en las células no estimuladas, y la línea gruesa es la unión después del entrecruzamiento de los receptores Fc. Datos representativos de tres experimentos independientes.



**Figura 33. El entrecruzamiento del receptor FcγRIIIB en el neutrófilo humano produce activación de integrinas β1 equivalente a la producida por la estimulación con PMA.** Neutrófilos humanos fueron estimulados 10 minutos por el entrecruzamiento del FcγRIIIB (línea gruesa) o PMA 100 ng/ml (línea delgada). Posteriormente,  $1 \times 10^6$  células fueron marcadas con el fragmento de fibronectina GST Fn9-11 y fueron analizadas por citometría de flujo. La línea punteada es el control negativo. Datos representativos de tres experimentos independientes.



**Figura 34. Ca y Mg se necesitan para la unión del GST Fn9-11 secundario a la estimulación del Fc $\gamma$ RIIIB.** Neutrófilos humanos fueron incubados con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 en presencia (línea gruesa) o en ausencia (área gris clara) de 2 mM Ca<sup>++</sup> y 2 mM Mg<sup>++</sup>. Los Fc $\gamma$ RIIIB fueron entrecruzados con la adición de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de IgG de cabra anti-ratón. Posteriormente las células fueron incubadas con el fragmento de fibronectina GST Fn9-11 para ser analizadas por citometría de flujo. La línea punteada son las células no teñidas, el área gris oscura es la unión del fragmento en células no estimuladas, el área gris clara es la unión del fragmento en células estimuladas en ausencia de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> la línea gruesa es la unión del fragmento en células estimuladas en presencia de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

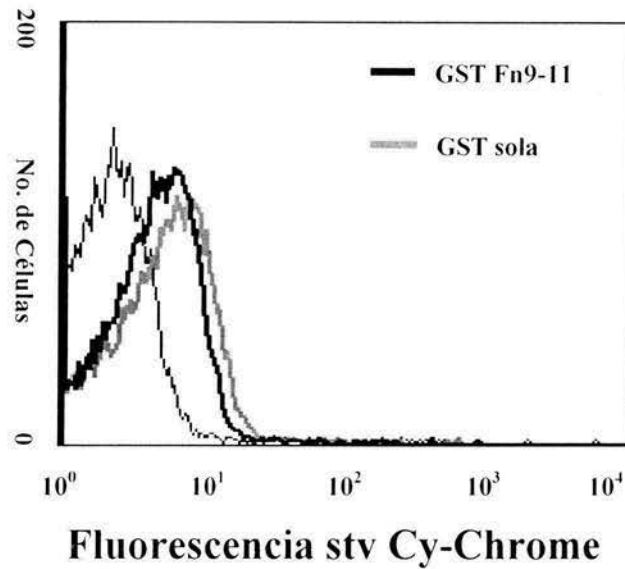
Aún cuando la evidencia que aportan los datos anteriores es muy sugerente de una activación de las integrinas  $\beta$ 1, era importante descartar dos posibilidades alternas. La primera era que la unión del fragmento GSTFn9-11 no se debiera a la presencia del dominio central de unión a fibronectina presente en dicha construcción, sino que se debiera a la unión por parte del componente GST. La segunda posibilidad a descartar era que la unión del fragmento GSTFn9-11 se debiera a la activación de integrinas  $\beta$ 2 y no de las integrinas  $\beta$ 1.

Para descartar la primera opción, purifiqué la proteína recombinante GST y la biotinilé siguiendo el mismo protocolo utilizado para la proteína GSTFn9-11.

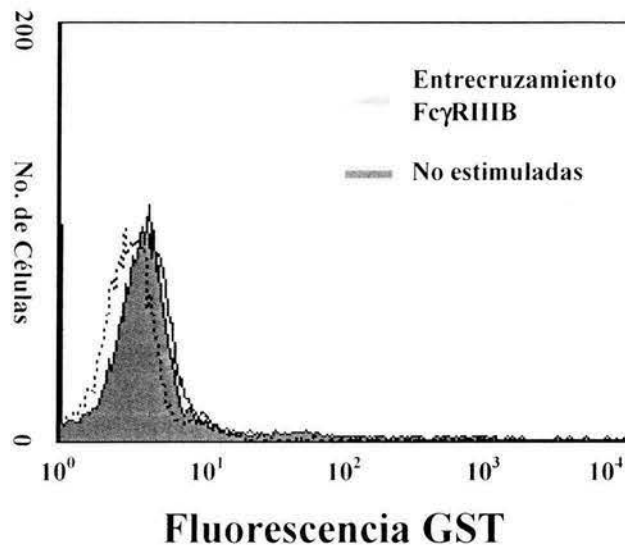
Posteriormente evalué la unión de estas dos proteínas a perlas de sefarosa acopladas a Glutation. Estas perlas unen a ambas proteínas por su porción GST. Tanto la proteína GST, como la construcción GSTFn9-11 se unen de igual manera a la sefarosa acoplada a Glutation (Fig. 35), lo que sugiere que la cantidad de fluorescencia en ambas proteínas es equivalente. Posteriormente evalué la unión de la proteína GST biotinilada a neutrófilos humanos estimulados a través del Fc $\gamma$ RIIIB. La estimulación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB no produjo ningún aumento en la unión de la proteína recombinante GST (Fig. 36), lo cual indica que la unión de la proteína GSTFn9-11 al neutrófilo estimulado se debe al dominio central de unión de la fibronectina.

Para descartar el hecho de que la unión de la proteína GSTFn9-11 se debiera a la activación de las integrinas  $\beta$ 2 y no las integrinas  $\beta$ 1 realicé experimentos de bloqueo de cada una de dichas integrinas. Los neutrófilos estimulados a través del receptor Fc $\gamma$ RIIIB fueron incubados con cantidades excesivas (20 $\mu$ g/ml) de anticuerpos anti-integrinas  $\beta$ 2 o anticuerpos anti-integrinas  $\beta$ 1 antes de evaluar la unión del fragmento de fibronectina GSTFn9-11. El bloqueo de las integrinas  $\beta$ 2 no tuvo ningún efecto en la unión del fragmento GSTFn9-11 (Fig. 37), mientras que el bloqueo de las integrinas  $\beta$ 1 completamente abolió la unión de dicho fragmento (Fig. 38). Estos experimentos confirman que la unión del fragmento GSTFn9-11 a los neutrófilos estimulados a través de su Fc $\gamma$ RIIIB se debe a activación de las integrinas  $\beta$ 1 y a la interacción de estas con el dominio central de unión de la fibronectina.

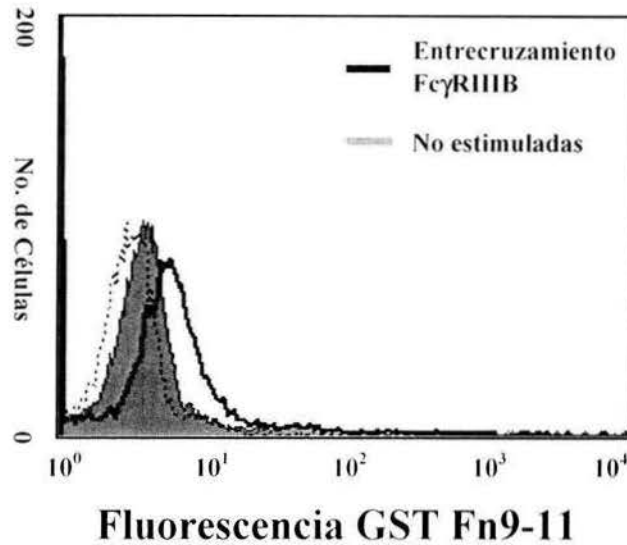




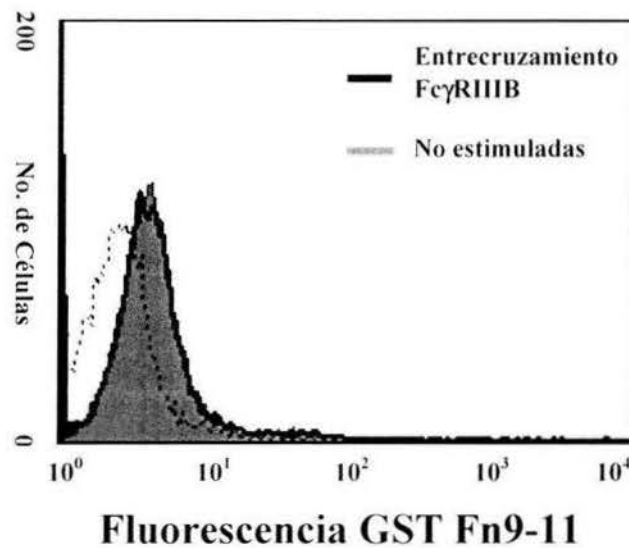
**Figura 35. El nivel de biotilación es comparable entre GST Fn9-11 y GST sola.** Perlas de Glutation sepharosa fueron incubadas con 5  $\mu\text{g/ml}$  de GST Fn9-11 biotilada (línea negra gruesa) o GST sola biotilada (línea gruesa gris), lavadas e incubadas con estreptavidina Cy-chrome 1/500. Las perlas fueron lavadas nuevamente y analizadas por citometría de flujo. La línea delgada representa a las perlas expuestas directamente a la estreptavidina y fueron usadas como el control de pegado inespecífico. Datos representativos de tres experimentos independientes.



**Figura 36. No hay unión de GST sola secundario a la estimulación del Fc $\gamma$ RIIIB.** Neutrófilos humanos fueron incubados con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 (área gris clara) o no estimulados (área gris oscura). Los Fc $\gamma$ RIIIB fueron entrecruzados con la adición de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de IgG de cabra anti-ratón. Posteriormente las células fueron incubadas con la proteína recombinante GST sola para ser analizadas por citometría de flujo. La línea punteada son células no teñidas. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

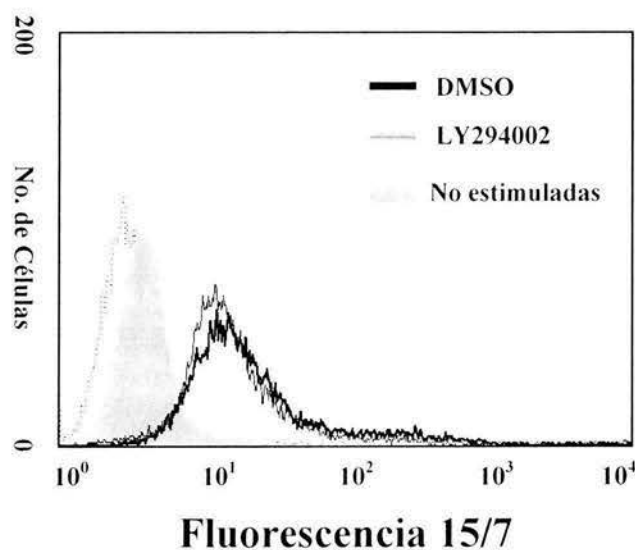


**Figura 37. La unión de GST Fn9-11 secundario a la estimulación del Fc $\gamma$ RIIIB no depende de integrinas  $\beta$ 2.** Neutrófilos humanos fueron incubados con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 (línea negra) o no estimulados (área gris oscura). Los Fc $\gamma$ RIIIB fueron entrecruzados con la adición de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de IgG de cabra anti-ratón. Posteriormente las células fueron incubadas con un exceso (20  $\mu$ g/ml) del anticuerpo monoclonal IB4 dirigido contra integrinas  $\beta$ 2 antes de ser analizadas por citometría de flujo para evaluar la unión del fragmento GST Fn9-11. La línea punteada son células no teñidas. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

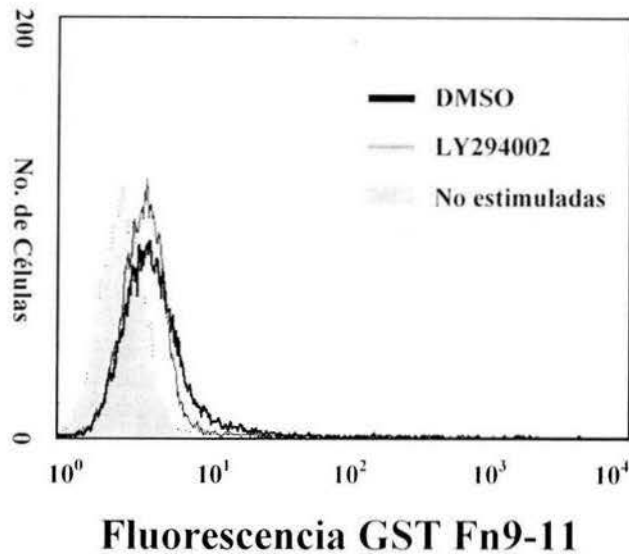


**Figura 38. La unión de GST Fn9-11 secundario a la estimulación del Fc $\gamma$ RIIIB depende de integrinas  $\beta$ 1.** Neutrófilos humanos fueron incubados con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 (línea negra) o no estimulados (área gris oscura). Los Fc $\gamma$ RIIIB fueron entrecruzados con la adición de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de IgG de cabra anti-ratón. Posteriormente las células fueron incubadas con un exceso (20  $\mu$ g/ml) del anticuerpo monoclonal TS2/16 dirigido contra integrinas  $\beta$ 1 antes de ser analizadas por citometría de flujo para evaluar la unión del fragmento GST Fn9-11. La línea punteada son células no teñidas. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

Para tratar de identificar posibles mediadores de la vía de señalización que produce activación de integrinas  $\beta 1$  en respuesta a la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$ , traté a las células con inhibidores farmacológicos de moléculas implicadas en la señalización por receptores Fc. Todos los fenómenos de activación de integrinas secundarios a la estimulación de receptores Fc, incluyendo el aumento de integrinas  $\beta 2$  en respuesta a la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  requieren la participación de la enzima PI 3-K [42-44]. Sorpresivamente la inhibición farmacológica de esta enzima, con LY294002, no produjo ningún cambio en la activación de integrinas  $\beta 1$  secundaria a la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  (Figs. 39 y 40), mientras que el aumento de integrinas  $\beta 2$  secundario a este mismo estímulo fue completamente abolido (Fig. 19).

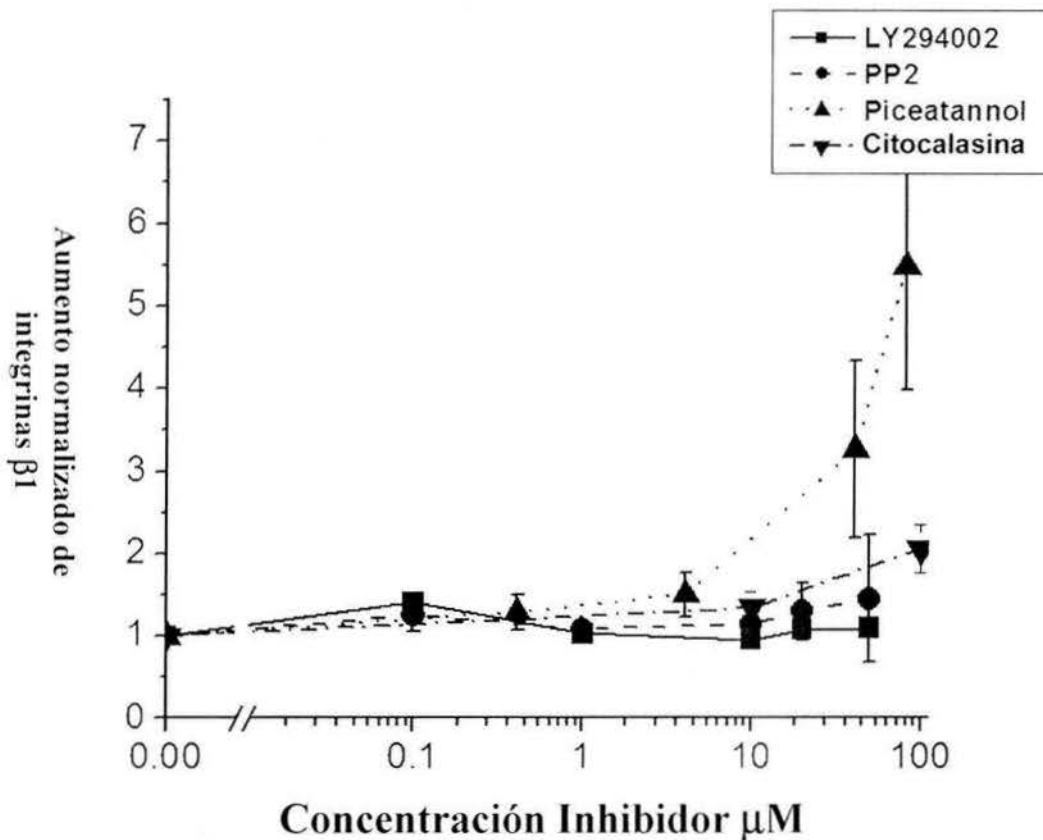


**Figura 39. La activación de integrinas  $\beta 1$  secundario al entrecruzamiento de  $Fc\gamma RIIIB$  es independiente de PI 3-K.** Neutrófilos humanos fueron estimulados 10 minutos mediante el entrecruzamiento de  $Fc\gamma RIIIB$ , en presencia de solo dimetil sulfóxido (DMSO; línea gruesa) o en presencia de 50  $\mu M$  LY294002 (línea delgada) o no estimuladas (área gris). Posteriormente,  $1 \times 10^6$  células fueron marcadas con el mAb 15/7 y analizados por citometría de flujo. La línea punteada es el control negativo. Datos representativos de tres experimentos independientes.



**Figura 40. La activación de integrinas  $\beta 1$  secundario al entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RIIIB es independiente de PI 3-K.** Neutrófilos humanos fueron estimulados 10 minutos mediante el entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RIIIB, en presencia de solo dimetil sulfóxido (DMSO; línea gruesa) o en presencia de 50  $\mu$ M LY294002 (línea delgada), o no estimuladas (área gris). Posteriormente,  $1 \times 10^6$  células fueron marcadas con el fragmento de fibronectina GSTFn9-11 para análisis por citometría de flujo. La línea punteada es el control negativo. Datos representativos de tres experimentos independientes.

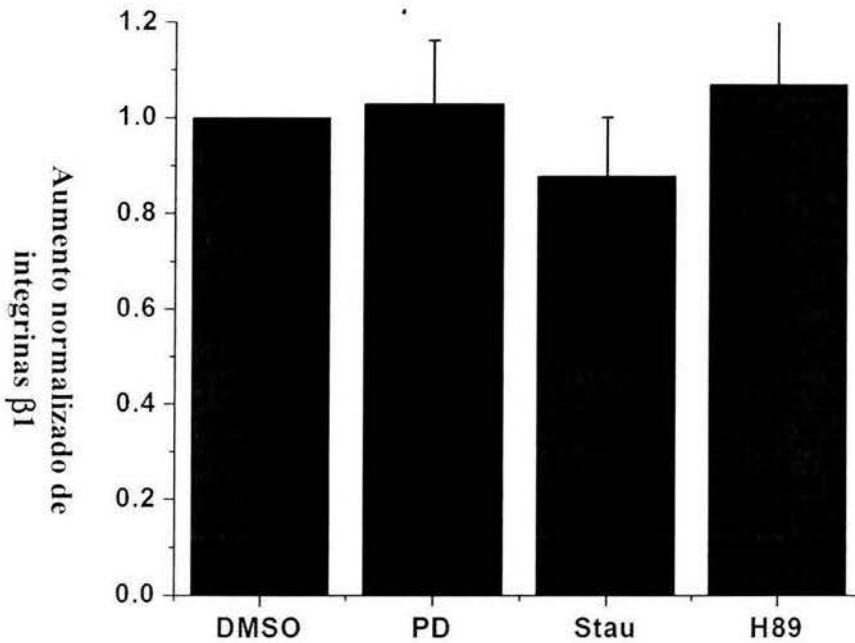
Debido a que la inhibición farmacológica de PI 3-K no produjo cambios en la activación de integrinas  $\beta 1$ , buscamos determinar si otras moléculas implicadas en la señalización por receptores Fc estaban implicadas en este fenómeno. La inhibición farmacológica de las cinasas de Src con PP2, tampoco produjo ningún cambio en la activación de integrinas  $\beta 1$  secundaria a la estimulación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB (Fig. 41). Adicionalmente, la inhibición farmacológica de las enzimas PKA, PKC, y ERK, no tuvo ningún efecto en esta activación de integrinas  $\beta 1$  (Fig. 42). Estos resultados sugieren fuertemente que el mecanismo de activación de las integrinas  $\beta 1$  secundario a la estimulación del Fc $\gamma$ RIIIB, es distinto al mecanismo que promueve el aumento de integrinas  $\beta 2$  en la superficie del neutrófilo humano secundario a la estimulación del mismo receptor.



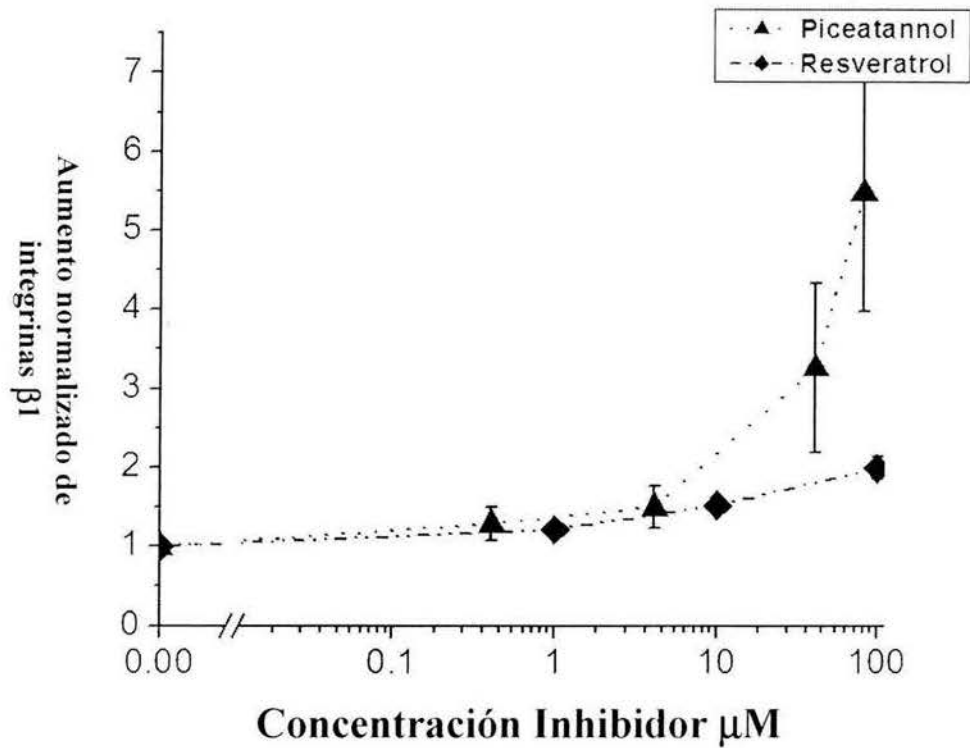
**Figura 41. La activación de integrinas β1 secundario al entrecruzamiento de FcγRIIIB es independiente de PI 3-K y de cinasas de la familia de Src, pero parece negativamente regulada por Syk.** Neutrófilos humanos fueron pretratados con dimetil sulfóxido (DMSO), o con concentraciones crecientes de LY294002, PP2, Piceatannol o Citocalasina, antes de ser estimulados 10 minutos mediante el entrecruzamiento de FcγRIIIB. Las células se tiñeron con el mAb 15/7. El cálculo de la activación normalizada se describe en la metodología. Los datos son el promedio ± error estandar de tres experimentos independientes.

Sorprendentemente, el inhibidor de la cinasa Syk, Piceatannol, produjo una potenciación del efecto activador de integrinas β1 dependiente de la estimulación del receptor FcγRIIIB (Fig. 41). Llegando a ser este efecto potenciador casi cinco veces mayor que el observado en ausencia del inhibidor cuando se utilizaron las dosis máximas de Piceatannol (Fig. 41). Para determinar que el efecto potenciador observado al utilizar Piceatannol se debe a su efecto sobre Syk y no a un efecto inespecífico, repetimos los experimentos en presencia de Resveratrol, un análogo de Piceatannol pero sin actividad

sobre Syk [63]. El tratamiento de los neutrófilos con Resveratrol no produjo un efecto potenciador como el observado con Piceatannol (Fig. 43), lo que sugiere fuertemente que Syk es responsable de la regulación negativa de la activación de las integrinas  $\beta 1$  secundaria a la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$ .



**Figura 42. La activación de integrinas  $\beta 1$  secundario al entrecruzamiento de  $Fc\gamma RIIIB$  es independiente de la activación de PKC, de PKA y de ERK.** Neutrófilos humanos fueron pretratados con 30  $\mu M$  PD98059 (PD), 10 nM Staurosporine (Stau), 10  $\mu M$  H89 y luego estimulados 10 minutos mediante el entrecruzamiento de  $Fc\gamma RIIIB$ . Posteriormente, las células se tiñeron con el mAb 15/7. El cálculo de la activación normalizada se describe en la metodología. Los datos son el promedio  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes.



**Figura 43. La activación de integrinas β1 secundario al entrecruzamiento de FcγRIIIB parece negativamente regulada por Syk.** Neutrófilos humanos fueron pretratados con Piceatannol o con un Resveratrol, un análogo sin actividad sobre Syk, antes de ser estimulados 10 minutos mediante el entrecruzamiento de FcγRIIIB. Las células se tiñeron con el mAb 15/7. El cálculo de la activación normalizada se describe en la metodología. Los datos son el promedio ± error estándar de tres experimentos independientes.

Debido a que la activación de las integrinas  $\beta 1$  secundario a la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  no parecía depender de una cascada bioquímica clásica, y con el antecedente que el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  es capaz de interactuar con otros receptores sobre la superficie celular posterior a su estimulación, incluyendo la interacción con las integrinas  $\beta 2$  reportada en este estudio (Fig. 25), decidí evaluar la posibilidad de que la activación de integrinas  $\beta 1$  que observé se debiera a una interacción sobre la superficie celular.

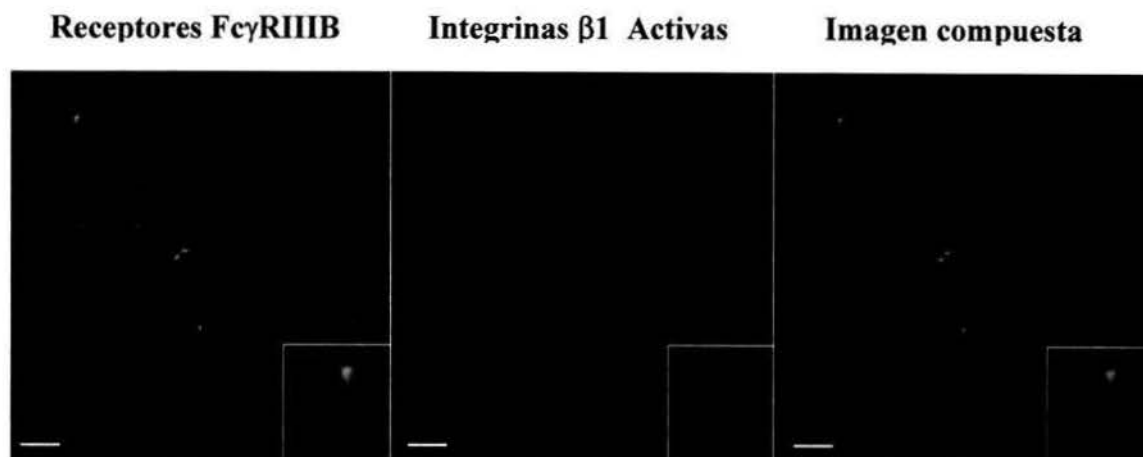
De manera análoga al estudio del comportamiento de las integrinas  $\beta 2$  secundario a la estimulación de los receptores  $Fc\gamma$ , las células fueron estimuladas con los  $F(ab')_2$  del mAb 3G8 marcados con fluoresceína, y busqué la localización del epítipo de activación que es detectado por el mAb 15/7.

En las células no estimuladas no hay unión del anticuerpo 15/7, reflejando que no hay integrinas  $\beta 1$  activadas (Fig. 44). Sin embargo, el entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  produce la aparición de pequeñas zonas de fluorescencia debidas a la presencia del epítipo de activación de las integrinas  $\beta 1$  (Fig. 45). Todos los sitios de unión del mAb 15/7 colocalizan con sitios de unión de los  $F(ab')_2$  del mAb 3G8 marcados con fluoresceína (Fig. 45). Esto sugiere que un posible mecanismo de activación de las integrinas  $\beta 1$  secundario a la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  sea la interacción de estos receptores sobre la membrana del neutrófilo humano.

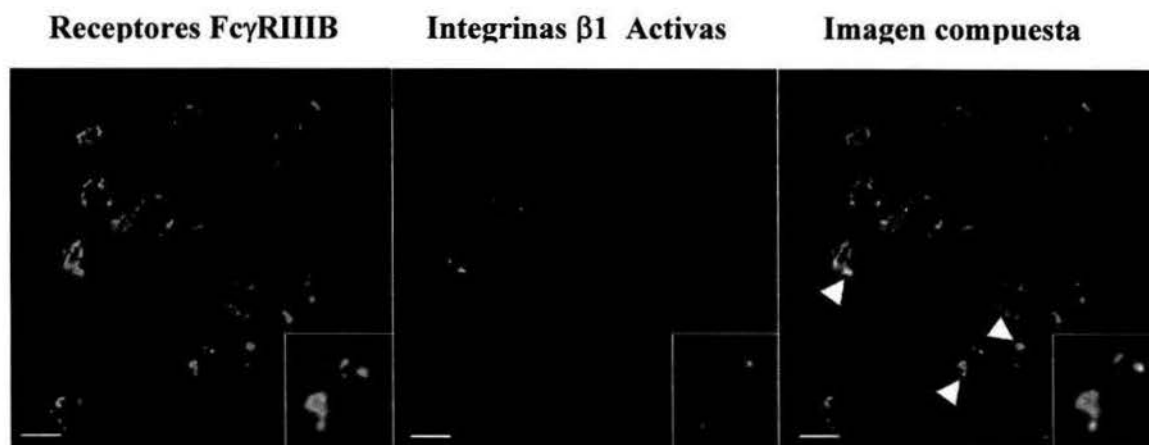
Dado que el Piceatannol produce una potenciación de la activación de integrinas  $\beta 1$  secundario a la estimulación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$ , observamos en el microscopio confocal el comportamiento de integrinas  $\beta 1$  en células tratadas con Piceatannol. El tratamiento con Piceatannol de células no estimuladas no produce ninguna unión del mAb 15/7 (Fig. 46). Sin embargo, y de manera análoga a lo demostrado en el citómetro



de flujo, el tratamiento de las células con Piceatannol produjo un claro aumento de la unión del mAb 15/7 (Fig. 47).



**Figura 44. No hay integrinas  $\beta 1$  activadas detectables en neutrófilos no estimulados.** Neutrófilos humanos fueron incubados con fragmentos con FITC- $F(ab')_2$  del mAb 3G8. Las células fueron teñidas con el mAb 15/7 biotinilado y estreptavidina Cy-chrome. La columna de la derecha muestra las imágenes sobrepuestas. Los recuadros muestran el detalle a nivel celular. Más de 100 células fueron analizadas para cada condición en al menos dos experimentos independientes. La barra de escala representa 10  $\mu m$ . Se muestran imágenes representativas.



**Figura 45. Las integrinas  $\beta 1$  activadas colocalizan con el receptor  $Fc\gamma RIIB$  después de su estimulación.** Neutrófilos humanos fueron incubados con fragmentos con FITC- $F(ab')_2$  del mAb 3G8. Las células fueron estimuladas 10 minutos con la adición de fragmentos  $F(ab')_2$  IgG de cabra anti-ratón. Posteriormente, las células fueron teñidas con el mAb 15/7 biotinilado y estreptavidina Cy-chrome. La columna de la derecha muestra las imágenes sobrepuestas. Las flechas denotan zonas amarillas de colocalización. Los recuadros muestran el detalle a nivel celular. Más de 100 células fueron analizadas para cada condición en al menos dos experimentos independientes. La barra de escala representa 10  $\mu m$ . Se muestran imágenes representativas.

Receptores Fc $\gamma$ RIIIB  
Piceatannol

Integrinas  $\beta$ 1 Activas

Imagen compuesta

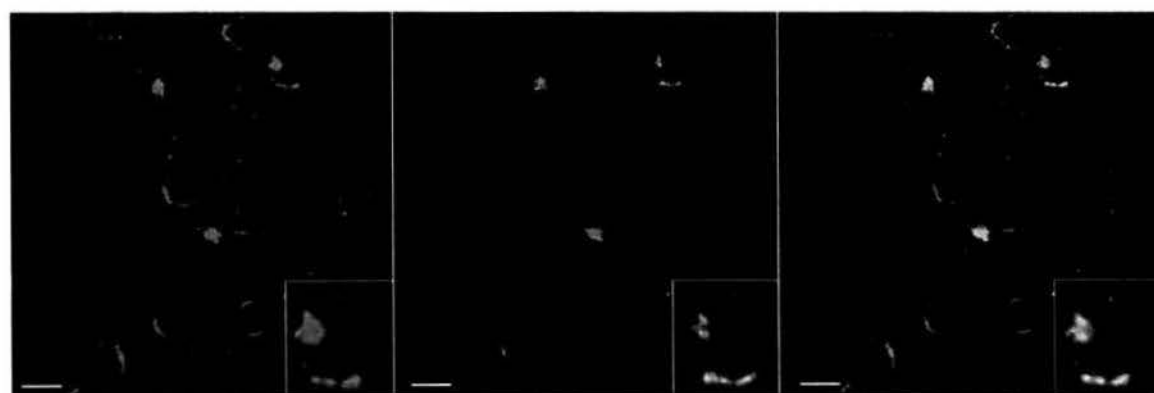


**Figura 46. No hay integrinas  $\beta$ 1 activadas detectables en neutrófilos no estimulados tratados con Piceatannol.** Neutrófilos humanos fueron incubados con fragmentos con FITC-F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 y tratados con 40 $\mu$ M Piceatannol. Las células fueron teñidas con el mAb 15/7 biotinilado y estreptavidina Cy-chrome. La columna de la derecha muestra las imágenes sobrepuestas. Los recuadros muestran el detalle a nivel celular. Más de 100 células fueron analizadas para cada condición en al menos dos experimentos independientes. La barra de escala representa 10  $\mu$ m. Se muestran imágenes representativas.

Receptores Fc $\gamma$ RIIIB  
Piceatannol

Integrinas  $\beta$ 1 Activas

Imagen compuesta



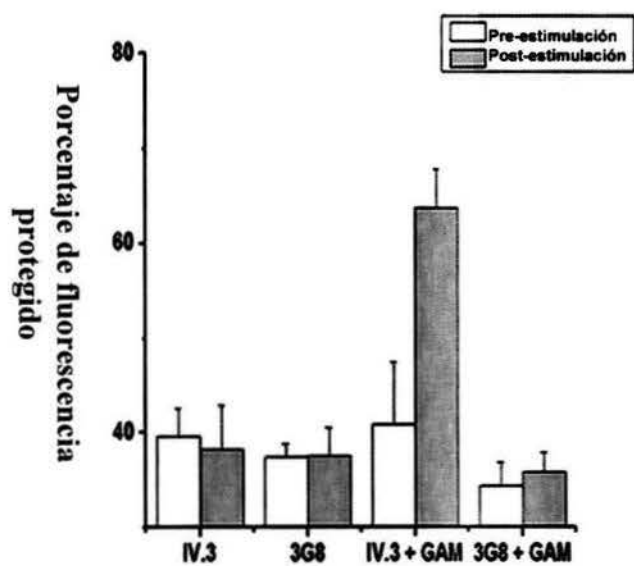
**Figura 47. La colocalización de integrinas  $\beta$ 1 activadas con el receptor Fc $\gamma$ RIIIB después de su estimulación aumenta en presencia de Piceatannol.** Neutrófilos humanos fueron incubados con fragmentos con FITC-F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 y tratados con 40 $\mu$ M Piceatannol. Las células fueron estimuladas 10 minutos con la adición de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> IgG de cabra anti-ratón. Posteriormente, las células fueron teñidas con el mAb 15/7 biotinilado y estreptavidina Cy-chrome. La columna de la derecha muestra las imágenes sobrepuestas. Los recuadros muestran el detalle a nivel celular. Más de 100 células fueron analizadas para cada condición en al menos dos experimentos independientes. La barra de escala representa 10  $\mu$ m. Se muestran imágenes representativas.

Todos estos datos sugieren que la activación de las integrinas  $\beta 1$  secundaria a la estimulación del receptor Fc $\gamma$ RIIB es independiente de una cascada bioquímica clásica, y depende de la interacción de los receptores en la membrana celular. Los resultados también sugieren que esta interacción pudiera ser negativamente regulada por la cinasa Syk.

Dado que las integrinas  $\beta 1$  y el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  colocalizan sobre la membrana del neutrófilo, era posible imaginar que si dicha interacción fuese lo suficientemente fuerte y el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  era internalizado, entonces ambos receptores serían internalizados. Para evaluar esta posibilidad realicé experimentos que permiten observar el grado de internalización de los receptores  $Fc\gamma R$  del neutrófilo en condiciones basales o de manera secundaria al entrecruzamiento de los mismos. Para ello el receptor  $Fc\gamma RII$  fue marcado con FITC-Fab del mAb IV.3 y el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  con FITC-F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 y se estudió la resistencia de la fluorescencia a ser extinguida con Azul de Tripano, un colorante incapaz de penetrar al interior de las células vivas [64]. Cuando las células son puestas a 37°C pero no son estimuladas, el porcentaje de fluorescencia que es protegido de la acción del Azul de Tripano es el mismo que en células que nunca fueron puestas a 37°C (Fig. 48), lo cual indica que el nivel de internalización de los receptores no se alteró por la simple tinción con los anticuerpos. Sin embargo, cuando las células son estimuladas mediante la adición de F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-ratón, existe una clara internalización del receptor  $Fc\gamma RII$ , fenómeno que no se observa para el receptor  $Fc\gamma RIIIB$ .

Para corroborar estos resultados utilicé un sistema de estimulación alternativo para evaluar si el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  era sujeto de cualquier tipo de internalización. Para ello las células fueron estimuladas con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> biotinilados del mAb 3G8 y estimuladas mediante el entrecruzamiento con streptavidina Cy-chrome. Una vez estimuladas las células, fueron teñidas con la subunidad B de la toxina del cólera acoplada a FITC para revelar las zonas ricas en enlaces GPI sobre la superficie de la célula y los PMN fueron analizados por microscopía confocal. En ninguna célula se

evidenció internalización del receptor, el cual se observó siempre sobre la superficie celular y en colocalización con la subunidad B de la toxina del cólera (Fig. 49). Estos resultados sugieren que no hay internalización del receptor FcγRIIIB secundario a su estimulación y, por ende, la interacción con integrinas β1 sólo puede ser evidenciada en la superficie celular.



**Figura 48. El receptor FcγRII es internalizado posterior a su entrecruzamiento mientras el FcγRIIIB no.** Neutrófilos humanos fueron teñidos con fragmentos Fab del mAb IV.3 o F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 marcados con FITC. Las células fueron puestas a 4°C durante 45 minutos, al término de este tiempo, la mitad de las células fueron incubadas a 37°C (barras grises) con o sin la adición de F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo entrecruzador (GAM). Al final de este tiempo la fluorescencia de la mitad de cada una de las condiciones fue apagada con Azul de Tripano. La cantidad de fluorescencia protegida del Azul de Tripano fue calculada en función de la fracción a la que no se le agregó Azul de Tripano. Los datos son el promedio ± error estandar de tres experimentos independientes.

CTB FITC                      Cy-chrome FcγRIIIB                      Imagen compuesta



**Figura 49. El receptor FcγRIIIB colocaliza con la Toxina B del cólera después de su estimulación.** Neutrófilos humanos fueron incubados con fragmentos biotinilados F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8. Las células fueron estimuladas 10 minutos con la adición de eustraptavidina Cy-chrome. Posteriormente, las células fueron teñidas con la Toxina B del cólera acoplada a FITC. La columna de la derecha muestra las imágenes sobrepuestas. Más de 100 células fueron analizadas para cada condición en al menos dos experimentos independientes. La barra de escala representa 10 μm. Se muestran imágenes representativas.

En los últimos años se ha especulado que la organización de la capa externa de la membrana celular tiene propiedades particulares que son relevantes para la señalización intracelular. Una de estas propiedades en particular es la de formar zonas discretas ricas en colesterol y proteínas ancladas por enlaces GPI. Estas regiones de la membrana se conocen como balsas lipídicas. Dichas balsas lipídicas parecen ser fundamentales para procesos de señalización como los mediados por el TCR y otros receptores [65]. Debido a que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB está anclado por un enlace GPI a la membrana y además colocaliza con la subunidad B de la toxina del cólera, un marcador clásico de las balsas lipídicas, es posible especular que las balsas lipídicas pudieran jugar un papel importante en la activación de las integrinas  $\beta$ 1 secundario a la estimulación del Fc $\gamma$ RIIIB.

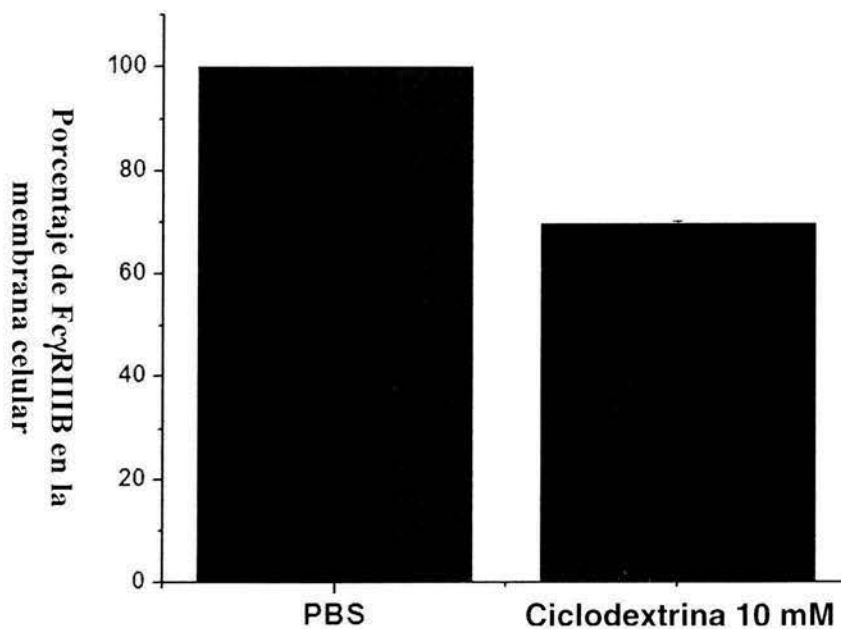
Para evaluar dicha posibilidad, los neutrófilos fueron tratados con Metil- $\beta$ -ciclodextrina, un agente capaz de extraer colesterol de la membrana, interfiriendo así con la funcionalidad de las balsas lipídicas. Se ha reportado que el uso de Metil- $\beta$ -ciclodextrina produce desprendimiento de las moléculas ancladas por enlaces GPI de la superficie celular [66]. Debido a que el Fc $\gamma$ RIIIB es una molécula anclada por un enlace GPI decidí evaluar la magnitud del desprendimiento del Fc $\gamma$ RIIIB posterior al tratamiento con Metil- $\beta$ -ciclodextrina. Al igual que ha sido reportado para otros receptores anclados por enlaces GPI [66], el Fc $\gamma$ RIIIB disminuyó 30% en las células tratadas (Fig. 50).

Sin embargo el tratamiento con Metil- $\beta$ -ciclodextrina no tuvo ningún efecto sobre la capacidad del receptor Fc $\gamma$ RIIIB para activar a las integrinas  $\beta$ 1 (Fig. 51).

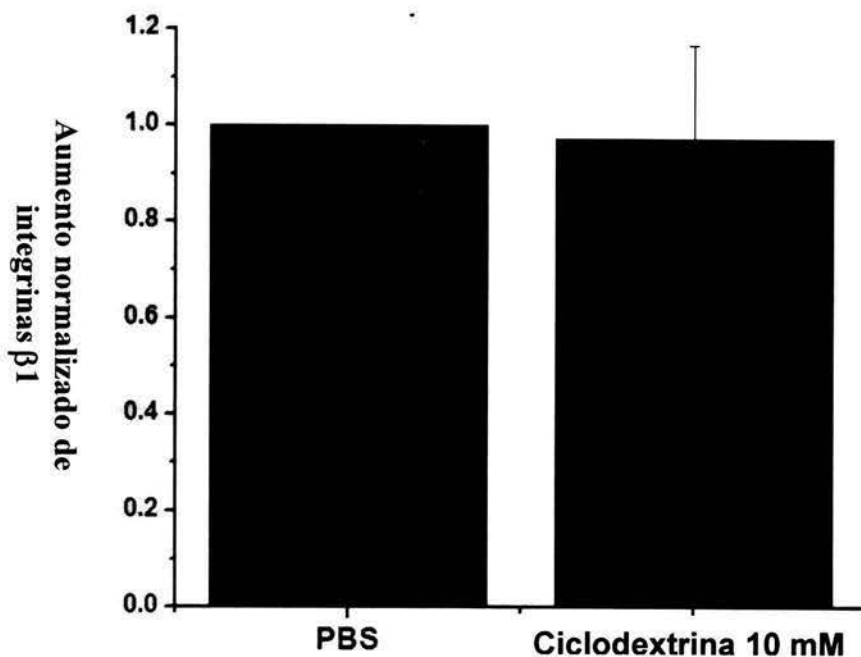
Finalmente decidí evaluar si la colocalización del receptor Fc $\gamma$ RIIIB y las integrinas activadas se veía afectada por el tratamiento con Metil- $\beta$ -Ciclodextrina. El tratamiento de los PMN con Metil- $\beta$ -ciclodextrina no afectó la colocalización del

Fc $\gamma$ RIIIB con las integrinas  $\beta$ 1 (Fig. 52), sin embargo la distribución de ambas moléculas sobre la superficie de la célula sí se vio alterada por el tratamiento. Mientras las células no tratadas presentan una distribución en parches tanto del receptor Fc $\gamma$ RIIIB entrecruzado (Fig. 45) como de los sitios de colocalización con las integrinas  $\beta$ 1, la distribución en las células depletadas de colesterol es mucho más difusa y no se encuentra localizada en parches discretos (Fig. 52).

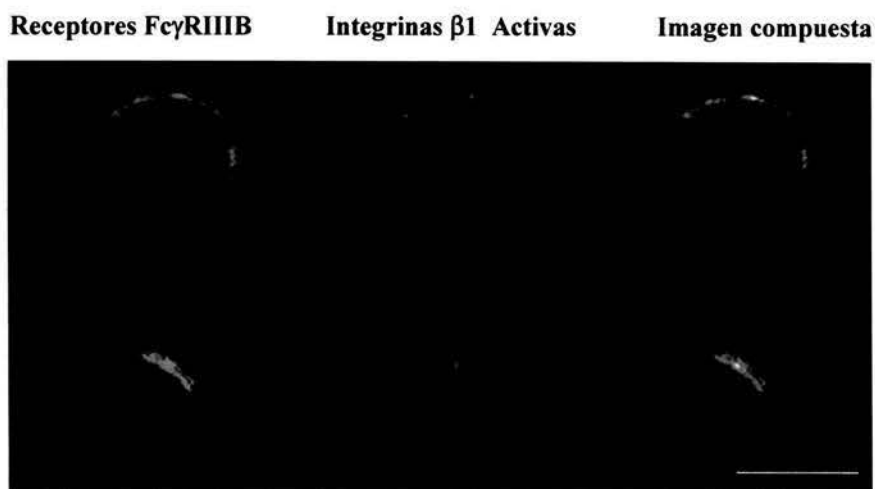
Estos resultados sugieren que las balsas lipídicas no son indispensables para la activación de integrinas  $\beta$ 1 secundario a la estimulación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB, sin embargo estos datos pueden ser difíciles de interpretar de manera simplista, dado que la depleción de colesterol con Metil- $\beta$ -ciclodextrina produce degranulación, polimerización de actina [66] y activación de distintas cinasas intracelulares en PMNs [67].



**Figura 50. El tratamiento de los neutrófilos con metil- $\beta$ -ciclodextrina produce desprendimiento del Fc $\gamma$ RIIIB de la superficie de la membrana celular.** Neutrófilos humanos fueron teñidos con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del mAb 3G8 marcados con FITC en presencia o en ausencia de 10 mM metil- $\beta$ -ciclodextrina y analizados por citometría de flujo. Los datos son el promedio  $\pm$  error estandar de tres experimentos independientes.



**Figura 51. El tratamiento de los neutrófilos con metil- $\beta$ -ciclodextrina no afecta la activación de integrinas  $\beta 1$  secundaria a la estimulación del Fc $\gamma$ RIIIB.** Neutrófilos humanos fueron pretratados con 10 mM metil- $\beta$ -ciclodextrina y luego estimulados 10 minutos mediante el entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RIIIB. Posteriormente, las células se tiñeron con el mAb 15/7. El cálculo de la activación normalizada se describe en la metodología. Los datos son el promedio  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes.



**Figura 52. El tratamiento de los neutrófilos con metil- $\beta$ -ciclodextrina no afecta la colocalización de integrinas  $\beta 1$  activadas con el Fc $\gamma$ RIIIB posterior a la estimulación.** Neutrófilos humanos fueron pretratados con 10 mM metil- $\beta$ -ciclodextrina y luego estimulados 10 minutos mediante el entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RIIIB. Posteriormente, las células se tiñeron con el mAb 15/7. La columna de la derecha muestra las imágenes sobrepuestas. Más de 100 células fueron analizadas para cada condición en al menos dos experimentos independientes. La barra de escala representa 10  $\mu$ m. Se muestran imágenes representativas.



De acuerdo con los resultados expuestos en esta tesis es posible imaginar que después del entrecruzamiento del Fc $\gamma$ RIIIB, este se asocia con las integrinas  $\beta$ 1 promoviendo su activación. Esta activación sería regulada por la interacción de Syk con la integrina. Cuando Piceatannol bloquea la actividad de Syk, las interacciones entre el receptor Fc $\gamma$ RIIIB y las integrinas  $\beta$ 1 ya no son reguladas, lo que permite una mayor activación de las integrinas  $\beta$ 1. La actividad de Syk requerida para mantener a las integrinas  $\beta$ 1 reguladas sería mínima, dado que sólo grandes dosis de Piceatannol promueven la deregulación de la activación de las integrinas  $\beta$ 1. Aunque altamente especulativo, este modelo provee una hipótesis de trabajo para la activación de las integrinas  $\beta$ 1 secundaria a la estimulación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB. Una demostración clara de este modelo se dará cuando seamos capaces de inmunoprecipitar al receptor Fc $\gamma$ RIIIB para poder estudiar si este está directamente asociado con las integrinas  $\beta$ 1. Sin embargo, este experimento no se ha podido realizar, debido a la dificultad de recuperar el Fc $\gamma$ RIIIB de los lisados celulares utilizando los reactivos de los que actualmente disponemos en el laboratorio.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los receptores Fc $\gamma$  del neutrófilo humano son capaces de generar respuestas celulares distintas de manera independiente cuando son estimulados selectivamente. Tanto el receptor Fc $\gamma$ RIIA como el receptor Fc $\gamma$ RIIIB son capaces de generar flujos de calcio, fosforilación de ERK y aumento y activación de integrinas  $\beta$ 2. Sin embargo, únicamente el receptor Fc $\gamma$ RIIIB es capaz de activar a las integrinas  $\beta$ 1. Esta activación no depende de un aumento de integrinas  $\beta$ 1 sobre la superficie celular.

El receptor Fc $\gamma$ RIIIB es capaz de activar dos vías de señalización distintas. La primera aumenta el número de integrinas  $\beta$ 2 sobre la superficie celular y depende de la participación de las cinasas de la familia Src, de PI 3-K, de la cinasa Syk, y parcialmente de PKC y de PKA. La segunda promueve la activación de integrinas  $\beta$ 1 de manera independiente de la actividad enzimática de las cinasas de la familia de Src, de PI 3-K, de PKC y de PKA. Esta activación parece deberse a la interacción entre el receptor Fc $\gamma$ RIIIB y las integrinas  $\beta$ 1 en la membrana celular, y pudiera estar regulada negativamente por Syk.

Será importante en el futuro detallar la naturaleza bioquímica de la interacción entre el receptor Fc $\gamma$ RIIIB y las integrinas  $\beta$ 1, así como la forma en la que Syk pudiera regular negativamente esta interacción.

## REFERENCIAS

1. Abbas, A.K. y A.H. Lichtman, *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. 2003. Philadelphia: Saunders. 562.
2. Ravetch, J.V. y J.P. Kinet, *Fc receptors*. *Annu Rev Immunol*, 1991. **9**: p. 457-92.
3. Ravetch, J.V. y S. Bolland, *IgG Fc receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 275-90.
4. Novak, N., S. Kraft, y T. Bieber, *IgE receptors*. *Curr Opin Immunol*, 2001. **13**(6): p. 721-6.
5. Monteiro, R.C. y J.G. Van De Winkel, *IgA Fc receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 177-204.
6. Shibuya, A., N. Sakamoto, Y. Shimizu, K. Shibuya, M. Osawa, T. Hiroyama, H.J. Eyre, G.R. Sutherland, Y. Endo, T. Fujita, T. Miyabayashi, S. Sakano, T. Tsuji, E. Nakayama, J.H. Phillips, L.L. Lanier, y H. Nakauchi, *Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(5): p. 441-6.
7. Tamma, S.M. y R.F. Coico, *IgD-receptor-positive human T lymphocytes. II. Identification and partial characterization of human IgD-binding factor*. *J Immunol*, 1992. **148**(7): p. 2050-7.
8. Krajci, P., D. Kvale, y P. Brandtzaeg, *Cloning, chromosomal localization, and linkage analysis of the gene encoding human transmembrane secretory component (the poly-Ig receptor)*. *Adv Exp Med Biol*, 1995: p. 617-23.
9. Ghetie, V. y E.S. Ward, *Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 739-66.
10. Isakov, N., *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades*. *J Leukoc Biol*, 1997. **61**(1): p. 6-16.
11. Sanchez-Mejorada, G. y C. Rosales, *Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors*. *J Leukoc Biol*, 1998. **63**(5): p. 521-33.
12. Kijimoto-Ochiai, S., *CD23 (the low-affinity IgE receptor) as a C-type lectin: a multidomain and multifunctional molecule*. *Cell Mol Life Sci*, 2002. **59**(4): p. 648-64.
13. Clynes, R., J.S. Maizes, R. Guinamard, M. Ono, T. Takai, y J.V. Ravetch, *Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors*. *J Exp Med*, 1999. **189**(1): p. 179-85.
14. Aman, M.J., A.C. Tosello-Tramont, y K. Ravichandran, *Fc gamma RIIB1/SHIP-mediated inhibitory signaling in B cells involves lipid rafts*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(49): p. 46371-8.
15. Zhou, M.J., D.M. Lublin, D.C. Link, y E.J. Brown, *Distinct tyrosine kinase activation and Triton X-100 insolubility upon Fc gamma RII or Fc gamma RIIB ligation in human polymorphonuclear leukocytes. Implications for immune complex activation of the respiratory burst*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(22): p. 13553-60.
16. Rosales, C. y E.J. Brown, *Signal transduction by neutrophil IgG Fc receptors: Dissociation of [Ca<sup>2+</sup>] rise from IP<sub>3</sub>*. *J. Biol. Chem.*, 1992. **267**(March 15): p. 5265-5271.

17. Chuang, F.Y., M. Sassaroli, y J.C. Unkeless, *Convergence of Fc $\gamma$ receptor IIA and Fc $\gamma$ receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 350-60.
18. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
19. van Kooyk, Y. y C.G. Figdor, *Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(5): p. 542-7.
20. Giancotti, F.G. y E. Ruoslahti, *Integrin signaling*. Science, 1999. **285**(5430): p. 1028-32.
21. Martin, K.H., J.K. Slack, S.A. Boerner, C.C. Martin, y J.T. Parsons, *Integrin connections map: to infinity and beyond*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1652-3.
22. Schwartz, M.A. y M.H. Ginsberg, *Networks and crosstalk: integrin signalling spreads*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(4): p. E65-8.
23. Hughes, P.E. y M. Pfaff, *Integrin affinity modulation*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(9): p. 359-64.
24. Lu, C., J. Takagi, y T.A. Springer, *Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14642-8.
25. Takagi, J. y T.A. Springer, *Integrin activation and structural rearrangement*. Immunol Rev, 2002. **186**: p. 141-63.
26. Ortiz-Stern, A. y C. Rosales, *Cross-talk between Fc receptors and integrins*. Immunol Lett, 2003. **90**(2-3): p. 137-43.
27. Kindzelskii, A.L., Z. Yang, G.J. Nabel, R.F. Todd, 3rd, y H.R. Petty, *Ebola virus secretory glycoprotein (sGP) diminishes Fc $\gamma$ RIIB-to-CR3 proximity on neutrophils*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 953-8.
28. Petty, H.R., R.G. Worth, y R.F. Todd, 3rd, *Interactions of integrins with their partner proteins in leukocyte membranes*. Immunol Res, 2002. **25**(1): p. 75-95.
29. Lecoanet-Henchoz, S., J.F. Gauchat, J.P. Aubry, P. Graber, P. Life, N. Paul-Eugene, B. Ferrua, A.L. Corbi, B. Dugas, C. Plater-Zyberk, y et al., *CD23 regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b-CD18 and CD11c-CD18*. Immunity, 1995. **3**(1): p. 119-25.
30. Van Spriel, A.B., J.H. Leusen, H. Vile, y J.G. Van De Winkel, *Mac-1 (CD11b/CD18) as accessory molecule for Fc alpha R (CD89) binding of IgA*. J Immunol, 2002. **169**(7): p. 3831-6.
31. Galon, J., J.F. Gauchat, N. Mazieres, R. Spagnoli, W. Storkus, M. Lotze, J.Y. Bonnefoy, W.H. Fridman, y C. Sautes, *Soluble Fc $\gamma$ receptor type III (Fc $\gamma$ RIII, CD16) triggers cell activation through interaction with complement receptors*. J Immunol, 1996. **157**(3): p. 1184-92.
32. Coxon, A., X. Cullere, S. Knight, S. Sethi, M.W. Wakelin, G. Stavrakis, F.W. Luscinskas, y T.N. Mayadas, *Fc $\gamma$ RIII mediates neutrophil recruitment to immune complexes. a mechanism for neutrophil accumulation in immune-mediated inflammation*. Immunity, 2001. **14**(6): p. 693-704.
33. Barabe, F., C. Gilbert, N. Liao, S.G. Bourgoin, y P.H. Naccache, *Crystal-induced neutrophil activation VI. Involvement of Fc $\gamma$ RIIB (CD16) and CD11b in response to inflammatory microcrystals*. Faseb J, 1998. **12**(2): p. 209-20.

34. Poo, H., J.C. Krauss, L. Mayo-Bond, R.F. Todd, 3rd, y H.R. Petty, *Interaction of Fc $\gamma$ R type IIIB with complement receptor type 3 in fibroblast transfectants: evidence from lateral diffusion and resonance energy transfer studies.* J Mol Biol, 1995. **247**(4): p. 597-603.
35. Zhou, M. y E.J. Brown, *CR3 (Mac-1,  $\alpha$ M $\beta$ 2, CD11b/CD18) and Fc $\gamma$ RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: Requirement for Fc $\gamma$ RII and tyrosine phosphorylation.* J. Cell. Biol., 1994. **125**(6): p. 1407-1416.
36. Durand, V., Y. Renaudineau, J.O. Pers, P. Youinou, y C. Jamin, *Cross-linking of human Fc $\gamma$ RIIIb induces the production of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by polymorphonuclear neutrophils.* J Immunol, 2001. **167**(7): p. 3996-4007.
37. Annenkov, A., S. Ortlepp, y N. Hogg, *The beta 2 integrin Mac-1 but not p150,95 associates with Fc gamma RIIA.* Eur J Immunol, 1996. **26**(1): p. 207-12.
38. Worth, R.G., L. Mayo-Bond, M.K. Kim, J.G. van de Winkel, R.F. Todd, 3rd, H.R. Petty, y A.D. Schreiber, *The cytoplasmic domain of Fc gamma RIIA (CD32) participates in phagolysosome formation.* Blood, 2001. **98**(12): p. 3429-34.
39. Tarui, T., N. Andronicos, R.-P. Czekay, A.P. Mazar, K. Bdeir, G.C. Parry, A. Kuo, D.J. Loskutoff, D.B. Cines, y Y. Takada, *Critical Role of Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 in Urokinase (uPA)/Urokinase Receptor (uPAR, CD87) Signaling.* J. Biol. Chem., 2003. **278**(32): p. 29863-29872.
40. Gresham, H.D., I.L. Graham, D.C. Anderson, y E.J. Brown, *Leukocyte adhesion-deficient neutrophils fail to amplify phagocytic function in response to stimulation. Evidence for CD11b/CD18-dependent and -independent mechanisms of phagocytosis.* J Clin Invest, 1991. **88**(2): p. 588-97.
41. Graham, I.L., J.B. Lefkowitz, D.C. Anderson, y E.J. Brown, *Immune complex-stimulated neutrophil LTB4 production is dependent on  $\beta$ 2 integrins.* J Cell Biol, 1993. **120**(6): p. 1509-17.
42. Kinashi, T., T. Asaoka, R. Setoguchi, y K. Takatsu, *Affinity modulation of very late antigen-5 through phosphatidylinositol 3-kinase in mast cells.* J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2850-7.
43. Andrews, R.P., C.L. Kepley, L. Youssef, B.S. Wilson, y J.M. Oliver, *Regulation of the very late antigen-4-mediated adhesive activity of normal and nonreleaser basophils: roles for Src, Syk, and phosphatidylinositol 3-kinase.* J Leukoc Biol, 2001. **70**(5): p. 776-82.
44. Jones, S.L., U.G. Knaus, G.M. Bokoch, y E.J. Brown, *Two signaling mechanisms for activation of  $\alpha$ M  $\beta$ 2 avidity in polymorphonuclear neutrophils.* J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10556-66.
45. Pettit, E.J. y M.B. Hallett, *Neutrophil activation and priming during engagement of CD11b/CD18 integrins.* Biochem Soc Trans, 1994. **22**(3): p. 327S.
46. Milella, M., A. Gismondi, P. Roncaioli, G. Palmieri, S. Morrone, M. Piccoli, L. Frati, M.G. Cifone, y A. Santoni, *Beta 1 integrin cross-linking inhibits CD16-induced phospholipase D and secretory phospholipase A2 activity and granule exocytosis in human NK cells: role of phospholipase D in CD16-triggered degranulation.* J Immunol, 1999. **162**(4): p. 2064-72.
47. Gaborilovich, D.I., *The neutrophils : new outlook for old cells.* 1999, London River Edge, NJ: Imperial College Press ;

Distributed by World Scientific Pub. xiv, 362.

48. Hawkins, H., S. Heffelfinger, y D. Anderson. *Leukocyte adhesion deficiency: clinical and postmortem observations*. *Pediatr. Pathol.*, 1992. **12**(1): p. 119-30.
49. Kocher, M., M.E. Siegel, J.C. Edberg, y R.P. Kimberly, *Cross-linking of Fc $\gamma$ RIIa and Fc $\gamma$ RIIIb induces different proadhesive phenotypes on human neutrophils*. *J Immunol*, 1997. **159**(8): p. 3940-8.
50. Tang, T., A. Rosenkranz, K.J. Assmann, M.J. Goodman, J.C. Gutierrez-Ramos, M.C. Carroll, R.S. Cotran, y T.N. Mayadas, *A role for Mac-1 (CD11b/CD18) in immune complex-stimulated neutrophil function in vivo: Mac-1 deficiency abrogates sustained Fc $\gamma$  receptor- dependent neutrophil adhesion and complement-dependent proteinuria in acute glomerulonephritis*. *J Exp Med*, 1997. **186**(11): p. 1853-63.
51. Loike, J.D., L. Cao, S. Budhu, E.E. Marcantonio, J. El Khoury, S. Hoffman, T.A. Yednock, y S.C. Silverstein, *Differential regulation of  $\beta$ 1 integrins by chemoattractants regulates neutrophil migration through fibrin*. *J Cell Biol*, 1999. **144**(5): p. 1047-56.
52. Werr, J., J. Johansson, E.E. Eriksson, P. Hedqvist, E. Ruoslahti, y L. Lindbom, *Integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (VLA-2) is a principal receptor used by neutrophils for locomotion in extravascular tissue*. *Blood*, 2000. **95**(5): p. 1804-9.
53. Werr, J., X. Xie, P. Hedqvist, E. Ruoslahti, y L. Lindbom,  *$\beta$ 1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue In vivo*. *J Exp Med*, 1998. **187**(12): p. 2091-6.
54. Taooka, Y., J. Chen, T. Yednock, y D. Sheppard, *The integrin  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1*. *J Cell Biol*, 1999. **145**(2): p. 413-20.
55. Strohmeier, G.R., B.A. Brunkhorst, K.F. Seetoo, T. Meshulam, J. Bernardo, y E.R. Simons, *Role of the Fc $\gamma$ R subclasses Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIII in the activation of human neutrophils by low and high valency immune complexes*. *J Leukoc Biol*, 1995. **58**(4): p. 415-22.
56. Lamoyi, E. y A. Nisonoff, *Preparation of F(ab')<sub>2</sub> fragments from mouse IgG of various subclasses*. *J Immunol Methods*, 1983. **56**(2): p. 235-43.
57. Coxon, P.Y., M.J. Rane, D.W. Powell, J.B. Klein, y K.R. McLeish, *Differential mitogen-activated protein kinase stimulation by Fc $\gamma$ RIIa and Fc $\gamma$ RIIIb determines the activation phenotype of human neutrophils*. *J Immunol*, 2000. **164**(12): p. 6530-7.
58. Edberg, J.C., J.J. Moon, D.J. Chang, y R.P. Kimberly, *Differential regulation of human neutrophil Fc $\gamma$ RIIa (CD32) and Fc $\gamma$ RIIIb (CD16)-induced Ca<sup>2+</sup> transients*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(14): p. 8071-9.
59. Borregaard, N., L. Kjeldsen, H. Sengelov, M.S. Diamond, T.A. Springer, H.C. Anderson, T.K. Kishimoto, y D.F. Bainton, *Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators*. *J Leukoc Biol*, 1994. **56**(1): p. 80-7.
60. Zhou, M., R.F. Todd, 3rd, J.G. van de Winkel, y H.R. Petty, *Cocapping of the leuko adhesion molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-*

- associated antigen-1 with Fc gamma receptor III on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions.* J Immunol, 1993. **150**(7): p. 3030-41.
61. Yednock, T.A., C. Cannon, C. Vandever, E.G. Goldbach, G. Shaw, D.K. Ellis, C. Liaw, L.C. Fritz, y L.I. Tanner,  *$\alpha 4\beta 1$  integrin-dependent cell adhesion is regulated by a low affinity receptor pool that is conformationally responsive to ligand.* J Biol Chem, 1995. **270**(48): p. 28740-50.
62. Hughes, P.E., B. Oertli, M. Hansen, F.L. Chou, B.M. Willumsen, y M.H. Ginsberg, *Suppression of integrin activation by activated Ras or Raf does not correlate with bulk activation of ERK MAP kinase.* Mol Biol Cell, 2002. **13**(7): p. 2256-65.
63. Cavallaro, A., T. Ainis, C. Bottari, y V. Fimiani, *Effect of resveratrol on some activities of isolated and in whole blood human neutrophils.* Physiol Res, 2003. **52**(5): p. 555-62.
64. Sahlin, S., J. Hed, y I. Rundquist, *Differentiation between attached and ingested immune complexes by a fluorescence quenching cytofluorometric assay.* J Immunol Methods, 1983. **60**(1-2): p. 115-24.
65. Balamuth, F., D. Leitenberg, J. Unternaehrer, I. Mellman, y K. Bottomly, *Distinct patterns of membrane microdomain partitioning in Th1 and th2 cells.* Immunity, 2001. **15**(5): p. 729-38.
66. Ilangumaran, S. y D.C. Hoessli, *Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane.* Biochem J, 1998. **335 ( Pt 2)**: p. 433-40.
67. Fessler, M.B., P.G. Arndt, S.C. Frasch, J.G. Lieber, C.A. Johnson, R.C. Murphy, J.A. Nick, D.L. Bratton, K.C. Malcolm, y G.S. Worthen, *Lipid rafts regulate lipopolysaccharide-induced activation of Cdc42 and inflammatory functions of the human neutrophil.* J Biol Chem, 2004. **279**(38): p. 39989-98.

## APÉNDICES

### MATERIALES Y METODOLOGÍA

#### **Materiales**

Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-ERK IgG policlonal de conejo (Catálogo no. sc-94) y anti-fosfo ERK (pERK) IgG policlonal de conejo (Catálogo no. sc-7383) de Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA). Anti-integrina  $\beta 2$  (mAb IB4) fue donado por el Dr. Eric J. Brown (University of California, San Francisco, CA). Anti-Fc $\gamma$ RII (mAb IV.3), anti-Fc $\gamma$ RIII (mAb 3G8), y anti-MHC clase I (mAb W6/32) se obtuvieron del ATCC (Manassas, VA). Anti-integrina  $\beta 1$  (mAb MAR4) acoplado a Cy-chrome se obtuvo de BD Pharmingen (Torrey Pines, CA). El anti-integrina  $\beta 1$  activada (mAb 15/7) fue un regalo del Dr. Ted Yednock; Elan Pharmaceuticals, Inc. (San Francisco, CA). Los inhibidores específicos de PI 3-K, wortmannin and LY294002, y el inhibidor específico de Syk, Piceatannol, se obtuvieron de Calbiochem (San Diego, CA). El inhibidor de las cinasas de la familia de Src, PP2, se obtuvo de Upstate Biotech (Charlottesville, VA). La proteína de fusión GST-Fn9-11 clonada en el plásmido pGEX, fue un regalo del Dr. Mark Ginsberg, Scripps Research Institute (La Jolla, CA). La Proteína G Sefarosa y la columna de Glutation Sefarosa se obtuvieron de Amersham-Pharmacia (Uppsala, Sweden). Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> cabra anti-ratón IgG fueron de ICN/Cappel (Costa Mesa, CA), el Fura-2/AM se obtuvo de Calbiochem (San Diego, CA), la Sulfo-NHS-biotina y la estreptavidina Cy-chrome se obtuvieron de Pierce (Rockford, IL). Todos los demás reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).



## Buffers

### PBS

9 g NaCl.

795 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

144 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Disueltos en un litro de agua pH 7.2-7.4.

Esterilizar en autoclave 121 °C 15 minutos.

### Flow Buffer

0.5 % Albúmina.

1 % Sucrosa.

en PBS.

Esterilizar por filtración.

### Dextrán al 6%

6 % Dextrán T500.

en PBS.

Esterilizar por filtración.

### Solución hipotónica para lisar eritrocitos

0.2 % NaCl.

1 % Albúmina.

20 mM Hepes.

pH 7.4.

Esterilizar por filtración.

Solución hipertónica (para equilibrar la osmolaridad después del choque hipotónico)

1.6 % NaCl.

1 % Albúmina.

20 mM Hepes.

pH 7.4.

Esterilizar por filtración.

### Buffer Ripa Modificado

150 mM NaCl.

1 % NP-40.

0.5 % DOC (Deoxycolato, sal de sodio).

5 mM EDTA.

50 mM Hepes.

pH 7.5.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Esterilizar por filtración.

#### Bradford

0.01 % Coomassie, 100 mg Coomassie brilliant blue G-250 disueltos en 50 ml 95 % etanol (4.7 % etanol final).

100 ml 85 % (v/v) ácido fosfórico (8.5 % ácido fosfórico final).

Diluir hasta un litro con agua destilada.

#### Buffer electrodo

3 g Tris base.

14.4 g Glicina.

10 ml 10 % SDS.

Completar a un litro con agua destilada.

#### Resolving Buffer

4.78 ml 37.25% HCl.

36.3 g Tris base.

pH 8.9.

Completar 100 ml con agua destilada.

#### Spacer Buffer

5.98 g Tris base.

pH 6.7.

Completar 100 ml con agua destilada.

### Sample Buffer

5 ml Spacer buffer.

10 ml 10 % SDS.

4 ml glicerol.

0.4 ml 0.5% azul bromofenol.

0.6 ml agua.

Para geles reductores añadir  $\beta$ -mercaptoetanol para 5 % o 1/5 volumen 1 M DTT.

### Acilamida (37.5:1) Stock

40%:

38.96 g Acilamida.

1.04 g bis-Acilamida.

Completar a 100 ml con agua destilada.

Filtrar.

### Buffer de transferencia

3.94 g Tris HCl.

14.43 g Glicina.

200 ml metanol.

pH 8.3.

Completar un litro con agua destilada.

Se puede extraer el gas o dejar semi-abierto overnight.

Mantener frío.

#### Buffer de desnudamiento

1 % SDS.

62.5 mM Tris.

100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol.

#### Coomasie

1.25 g Coomasie brilliant blue R-250.

250 ml metanol.

50 ml ácido acético glacial.

200 ml agua destilada.

#### Desteñidor de Coomasie

400 ml metanol.

100 ml ácido acético glacial.

500 ml agua destilada.

## Soluciones para teñir con plata

A) 150 ml metanol.

150 ml agua destilada.

300  $\mu$ l HCHO (37%).

B) 2.5 mg DTT.

500 ml agua destilada.

C) 0.2 g nitrato de plata.

200 ml agua destilada.

D) 12 g carbonato de sodio.

400 ml agua destilada.

180  $\mu$ l HCHO.

E) 44.18 g ácido cítrico.

100 ml agua.

#### Buffer de fijación para microscopía confocal

50 % glicerol.

10 % DABCO.

en PBS.

#### Buffer de fijación FACS

1 % Paraformaldehido.

en PBS.

#### Rojo Ponceau S

Preparar un stock de 2 mg/ml de Ponceau diluidos en una solución de 30 % ácido tricloroacético (wt/v).

Diluir el stock 10 veces en 1 % ácido acético.

#### Buffer de Bloqueo I

5 % Leche.

1 % Albúmina.

0.5 % Tween.

en PBS.

### Buffer de Bloqueo II

3 % Albúmina.

0.5 % Tween.

en PBS.

### SOB

950 ml Agua destilada.

20 g Triptona.

5 g Extracto de levadura.

0.5 g de NaCl.

Disolver.

Añadir 10 ml de una solución 250 mM de KCl.

Esterilizar en autoclave.

Añadir 5 ml de una solución 2 M de  $MgCl_2$  previamente esterilizada.

### LB

20 g Medio LB.

Diluir en un litro de agua.

Esterilizar por autoclave.



Buffer de Glutation reducido

50 mM Tris HCl.

10 mM Glutation reducido.

pH 8.0.

## **Purificación mAb**

### A) Precipitación de IgG con ácido octanóico

Medir la cantidad de plasma, suero o ascitis que se va a utilizar (valor de x).

Llevar la muestra a un pH de 4.8 utilizando ácido acético 2M.

Calcular la cantidad de ácido octanóico necesario utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad por añadir} = 7.56x / 100$$

Añadir ácido octanóico gota a gota.

Agitar 30 minutos a temperatura ambiente (la solución se torna turbia).

Centrifugar a 15 000 rpm 20 minutos a temperatura ambiente.

Filtrar a través de 2 hojas de papel Whatman #1 (se puede realizar dos veces).

Filtrar con jeringa a través de un filtro de 45 µm.

Dializar contra el buffer requerido para remover el ácido acético (PBS varios cambios).

## B) Purificación de IgG con proteína G sefarosa

Tener el anticuerpo en PBS.

Centrifugar a 4000 rpm 20 minutos.

Filtrar con jeringa a través de un filtro 0.22  $\mu\text{m}$ .

Colocar la proteína G sefarosa en una columna y lavarla con PBS.

Pasar la solución del anticuerpo a través de la columna a 0.7 ml/min.

Lavar la columna hasta que desaparezca toda la proteína (chechar con Bradford los lavados).

Eluir la columna con una solución de Glicina 0.1 M pH 2.9.

Colectar las fracciones sobre Tris base 1 M.

Juntar las fracciones positivas y dializar contra PBS.

Lavar la columna con suficiente PBS y preservar con PBS Azida de Sodio 0.1%.

## **Digestión mAb**

Digestión con pepsina para preparar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>

IgG en PBS de preferencia en una concentración superior a 2 mg/ml.

Añadir 1/10 del volumen de una solución 1 M de Citrato de Sodio pH 3.5.

Comprobar que el pH sea 3.5 de ser necesario ajustar con HCl.

Añadir pepsina para obtener una concentración final de 25 µg/ml, a partir de una solución de 1 mg/ml en 0.1 M Citrato de Sodio pH 3.5.

Incubar a 37 °C el tiempo necesario (cambia para cada anticuerpo y puede variar desde 45 min hasta 6 u 8 hrs).

Añadir 1/10 del volumen de 3 M Tris pH 8.6.

Dializar contra PBS.

## **Biotinilación mAb**

Utilizando Biotina Succimida

Disolver proteína a 1 mg/ml.

Dializar toda la noche contra 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.2-8.6.

Disolver la Biotina Succimida en DMSO justo antes de usar a una concentración de 1 mg/ml.

Añadir 60 µl de Biotina en DMSO por cada ml de proteína.

Mezclar y mantener en una rueda giratoria 4 horas a temperatura ambiente.

Dializar contra PBS.

Utilizando NHS-Sulfo-Biotina

De una solución de 10 mg/ml de NHS-Sulfo-Biotina.

Añadir suficiente NHS-Sulfo-Biotina para conseguir un exceso molar de (20:1, biotina:proteína) de acuerdo con la siguiente formula:

mg de biotina por añadir = mmoles de proteína \* 20 \* 556

Incubar a temperatura ambiente 30 minutos.

Dializar contra PBS.

### **Marcado mAb con iFITC**

A la proteína disuelta en PBS, añadir 1/10 del volumen de una solución de NaHCO<sub>3</sub> pH 9.

Añadir de una solución de iFITC de 10 mg/ml en DMSO la cantidad necesaria de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\mu\text{l de la solución} = ((\text{mg/ml de proteína} * \text{volumen en ml}) / \text{Peso molecular de la proteína}) * 389 * 100 * 40$$

Agitar la reacción a temperatura ambiente protegida de la luz.

Dializar contra PBS.

## Purificación PMN

Añadir 2 ml de Dextrán 6% y 25  $\mu$ l de heparina (1000 unidades/ml) a 10 ml sangre periférica.

Mezclar invirtiendo varias veces, eliminar burbujas y dejar reposando 45 min a temperatura ambiente.

Tomar la capa superior (plasma rico en leucocitos) y colocar sobre 5 ml de Ficoll-Paque formando una capa superior.

Centrifugar 1600 rpm 20 minutos a 4 °C.

Descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 10 ml de PBS frío.

Centrifugar a 1200 rpm 5 minutos a 4 °C.

Lisar los eritrocitos (opcional).

Resuspender la pastilla en 5 ml de solución hipotónica para lisar eritrocitos fría.

Mezclar un minuto.

Equilibrar con 5 ml de solución hipertónica y mezclar.

Contar y resuspender los PMN a la concentración deseada en PBS o PBS con 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  y 2mM  $\text{Mg}^{2+}$ .

## **Estimulación PMN**

Resuspender PMN a 10 millones por ml en PBS con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .

Añadir los fragmentos  $\text{F(ab')}_2$  o Fab de los distintos anticuerpos monoclonales a una concentración final de 5  $\mu\text{g/ml}$  y dejar incubando una hora en hielo agitando las células cada 15 o 20 minutos. Añadir inhibidores durante esta incubación.

Centrifugar un minuto a 6000 rpm y retirar el sobrenadante.

Resuspender en PBS con el anticuerpo secundario (  $\text{F(ab')}_2$  Goat anti-mouse IgG) a la concentración deseada (las concentraciones pueden variar desde 10 hasta 40  $\mu\text{g/ml}$ ).

Colocar a 37 °C el tiempo deseado.

Detener la estimulación con PBS frío.



## **Citometría de Flujo**

Un millón de neutrófilos estimulados se resuspenden en 100  $\mu$ l de Flow Buffer, que contiene 5  $\mu$ g/ml del anticuerpo primario (puede estar biotinilado, no marcado o directamente conjugado al fluoróforo).

Colocar 45 minutos en hielo.

Lavar 3 veces con Flow Buffer.

Resuspender en 20  $\mu$ l de Flow Buffer que contiene una dilución 1/500 de estreptavidina Cychrome o 1/10 de anticuerpo secundario fluorescente en caso de usar anticuerpos primarios no marcados.

Colocar 30 minutos en hielo.

Lavar 3 veces con Flow Buffer.

Fijar con 300  $\mu$ l de 1 % paraformaldehído en PBS.

## **Indices de Activación**

Para los experimentos con inhibidores enzimáticos, el incremento normalizado de integrinas  $\beta 2$  y la activación normalizada de integrinas  $\beta 1$  fueron calculados de acuerdo con la siguiente fórmula:

Valor normalizado =  $(MFSI-MFI)/(MFS-MF)$ , donde

MFSI es el promedio de fluorescencia de las células estimuladas tratadas con el inhibidor, MFI es el promedio de fluorescencia de las células no estimuladas tratadas con el inhibidor, MFS es el promedio de fluorescencia de células estimuladas tratadas con DMSO y MF es el promedio de fluorescencia de células no estimuladas tratadas con DMSO. Las mismas células fueron marcadas para la unión del mAb IB4 o del mAb 15/7 en cada experimento.

## **Geles SDS**

### Gel espaciador

1.25 ml Spacer Buffer.

0.75 ml 40 % Acrilamida .

100  $\mu$ l 10 % SDS.

7.8 ml Agua destilada.

100  $\mu$ l 10 % Persulfato de Amonio.

10  $\mu$ l TEMED.

### Gel de corrida 7.5 %

1.25 ml Resolving Buffer.

1.875 ml 40 % Acrilamida.

100  $\mu$ l 10 % SDS.

6.67 ml Agua destilada.

100  $\mu$ l 10 % Persulfato de Amonio.

10  $\mu$ l TEMED.

Gel de corrida 10 %

1.25 ml Resolving Buffer.

2.5 ml 40 % Acrilamida.

100  $\mu$ l 10 % SDS.

6.04 ml Agua destilada.

100  $\mu$ l 10 % Persulfato de Amonio.

10  $\mu$ l TEMED.

Colocar 4 ml de gel de corrida para un gel pequeño o 30 ml para un gel grande.

Cubrir el gel de corrida con butanol durante la polimerización.

Retirar el butanol, colocar el peine y completar con gel de separación.

Tinción con Coomasie

Colocar el gel en Coomasie de 30 a 60 minutos (30 a 60 segundos para teñir membranas).

Retirar el Coomasie.

Lavar con agua.

Colocar en desteñidor de Coomasie.

Añadir un papel que absorba el colorante.

Lavar nuevamente con agua y secar.

## Tinción con plata

Fijar de 30 minutos a toda la noche en solución A.

Rehidratar 30 minutos en solución B.

Teñir 30 minutos en solución C.

Lavar 2 veces rápidamente con agua destilada.

Añadir la mitad de la solución reveladora D.

Descartar cuando se ponga amarilla.

Añadir la mitad restante de la solución reveladora D.

Esperar a que las bandas aparezcan en el gel.

Detener la reacción con 10 ml de la solución E.

Secar.

## Secado de geles

Colocar el gel sobre papel filtro previamente humedecido o,

Colocar gel entre dos capas de celofan para secado de geles previamente humedecidas.

Colocar en el aparato entre el papel filtro y la cubierta de Mylar.

Para geles secados sobre papel filtro colocar una cubierta extra con cualquier plástico (egapack).

Temperatura 80 grados 30 minutos.

Vacío 40 minutos.

Retirar el gel y apagar el aparato.

### **Western blotting**

Transferencia de proteínas

Preparar la membrana de PVDF colocándola un minuto en metanol.

Retirar el metanol.

Rehidratar con agua destilada.

Retirar el agua y colocar la membrana en Buffer de transferencia.

Ensamblar el aparato de transferencia de la siguiente manera:

En un recipiente con suficiente Buffer de transferencia.

Colocar la cara negra del sandwich de sostén en la parte inferior.

Colocar esponja y verificar que no queden burbujas.

Colocar dos hojas de papel filtro y verificar que no queden burbujas.

Colocar el gel.

Colocar la membrana de PVDF y verificar que no queden burbujas.

Colocar 2 hojas de papel filtro.

Colocar esponja y verificar que no queden burbujas.

Cerrar el sandwich evitando la presencia de burbujas.

Colocar el sandwich en la cámara de transferencia verificando que la cara negra del sandwich este del lado de la cara negra de la cámara.

Transferir a 500 mAmp 1 hora 30 minutos cambiando el hielo cada 45 minutos.

Checar la transferencia con rojo Ponceau S

Incubar la membrana 2 minutos en rojo Ponceau S.

Lavar con agua suficiente.

Continuar con el protocolo de detección

Bloquear la membrana con Buffer de bloqueo I (o II para detectar fosfotirosinas) dos horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C.

Lavar una vez con 0.5 % Tween en PBS.

\* Incubar una hora a temperatura ambiente con una dilución de 1 µg/ml de anticuerpo primario en buffer de bloqueo II.

Lavar 5 veces con 100 ml de 0.5 % Tween en PBS.

\* Incubar 45 minutos a temperatura ambiente con una dilución de 1/5000 del anticuerpo secundario en buffer de bloqueo II.

Lavar 5 veces con 100 ml de 0.5 % Tween en PBS.

Incubar con 4 o 6 ml del sustrato quimioluminiscente 5 minutos.

Retirar el exceso del sustrato secando sobre un papel absorbente.

Colocar en el plástico protector.

\* Colocar la placa fotográfica sobre la membrana y exponer un minuto.

Revelar.

Los puntos marcados con \* deben ser determinados empíricamente para los distintos anticuerpos utilizados con el fin de optimizar la señal quimioluminiscente.



## **Microscopía Confocal**

Un millón de neutrófilos estimulados con fragmentos de anticuerpos fluoresceinados, se resuspenden en 100  $\mu$ l de Flow Buffer, que contiene 5  $\mu$ g/ml del anticuerpo primario biotinilado.

Colocar 45 minutos en hielo.

Lavar 3 veces con Flow Buffer.

Resuspender en 20  $\mu$ l de Flow Buffer que contiene una dilución 1/500 de estreptavidina Cy-chrome.

Colocar 30 minutos en hielo.

Lavar 3 veces con Flow Buffer.

Fijar con 300  $\mu$ l de 1 % paraformaldehído en PBS.

Dejar asentar toda la noche.

Remover el sobrenadante.

Resuspender en 10  $\mu$ l de Buffer de fijación para microscopía confocal.

Montar en portaobjetos y cubrir.

Fijar el cubreobjeto con barniz de uñas.

## Flujo de calcio

Cargar a las células con Fura-2

Resuspender los PMN a 100 millones/ml en PBS con 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  y 1.5 nM  $\text{Mg}^{2+}$ .

Calentar 37 °C 5 minutos.

Añadir Fura-2 10  $\mu\text{M}$ .

Incubar 5 minutos a 37 °C.

Diluir 10 veces con PBS  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  a 37 °C.

Incubar 20 minutos a 37 °C.

Lavar las células con PBS  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  a 37 °C.

Resuspender en el mismo volumen con PBS  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  a 37 °C.

Incubar 15 minutos mas a 37 °C.

Lavar nuevamente y resuspender a 2.5 millones por ml.

Mantener en hielo.

Leer flujo de calcio

Colocar 5 millones de PMN (2 ml de la suspensión celular) en una cubeta con mosca magnética para agitación.

Iniciar la recolección de datos y ajustar la escala de la gráfica.

Añadir el estímulo.

Permitir que las células recuperen el nivel basal de calcio.

Lisar con 1 % Tritón 100x.

Esperar a que el nivel de calcio se equilibre.

Quelar el calcio con EDTA 0.25 M.

Convertir a  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando el software adecuado.

## Purificación GSTFn9-11

Transformación de bacterias

Tomar 20  $\mu$ l de bacterias *E. Coli* competentes de la cepa DH5 $\alpha$  descongeladas en hielo.

Agregar 1  $\mu$ l del plásmido que contiene la construcción GSTFn9-11.

Incubar 30 minutos a 4 °C.

Dar un choque térmico 60 segundos a 42 °C.

Poner en hielo 2 minutos.

Completar a un mililitro con medio SOB 20 mM Glucosa.

Agitar 1 hora a 37 °C en un agitador.

Plaquear 100  $\mu$ l de la transformación en media placa.

Centrifugar los 900  $\mu$ l restantes, descartar el sobrenadante y plaquear la otra mitad de la placa.

Incubar toda la noche a 37 °C.

Checar el plásmido de varias colonias positivas haciendo minipreps y digestiones pertinentes.

## Purificación de la proteína recombinante

Para determinar las mejores condiciones de cultivo

Tomar una colonia positiva e incubar en 5 ml de medio de cultivo LB toda la noche a 37 °C.

Crece 2 ml del cultivo en 200 µl hasta que la  $A_{600}$  sea entre 0.5 y 1.

Inducir la expresión de la proteína añadiendo 1 mM IPTG durante 2 o 4 hrs.

Centrifugar las bacterias 10 min 8000 rpm y resuspender en 1.25 ml de PBS.

Lisar por ultrasonido 1 minuto, 6 pulsos de 40 Amp.

Centrifugar 5 minutos a 14 000 rpm recuperar el sobrenadante y congelar a -80 °C así como la pastilla.

Tomar 20 µg de proteína de cada muestra y correr en un gel acrilamida al 10 %.

Repetir el protocolo y precipitar la misma cantidad de proteína de distintas condiciones de crecimiento y estimulación con Sefarosa glutation 10 minutos lavando la precipitación 3 veces con PBS.

## Preparación a gran escala

Crece 500 ml de bacterias hasta 0.5  $A_{600}$ .

Inducir 2 hrs con 1 mM IPTG.

Resuspender en 5 ml de PBS.

Lisar por ultrasonido 1 minuto, 6 pulsos de 40 Amp.

Recuperar el sobrenadante y filtrar con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ .

Pasar dos veces por una columna de Sefarosa Glutathione.

Lavar la columna hasta que no haya más proteína.

Eluir con Buffer de Glutathione reducido y recuperar las fracciones positivas.

Comprobar la pureza de la proteína en un gel de acrilamida.

Dializar contra PBS.

# Fc $\gamma$ RIIB stimulation promotes $\beta$ 1 integrin activation in human neutrophils

Alejandro Ortiz-Stern and Carlos Rosales<sup>1</sup>

Immunology Department, Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City

**Abstract:** The molecular stimuli involved in receptor-induced integrin activation are still poorly defined. We have investigated the role of receptors for the Fc portion of immunoglobulin G molecules (Fc $\gamma$ R) on activation of integrins in human neutrophils. Cross-linking of Fc $\gamma$ RIIA induced an increase in surface expression of  $\beta$ 2 integrins but had no effect on  $\beta$ 1 integrins. In contrast, cross-linking of Fc $\gamma$ RIIB not only increased  $\beta$ 2 integrins on the cell surface but also induced  $\beta$ 1 integrin activation, as indicated by an increase in binding to fibronectin and the appearance of an activation epitope detected by the monoclonal antibody 15/7. The Fc $\gamma$ RIIB-induced increase of  $\beta$ 2 integrins required Src-family tyrosine kinases, Syk kinase, and phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K), as the corresponding, specific inhibitors, PP2, Piccattanol, and LY294002, completely blocked it. Contrary to this, Fc $\gamma$ RIIB-induced  $\beta$ 1 integrin activation was not blocked by PP2 or LY294002. It was, however, enhanced by Piccattanol. After Fc $\gamma$ RIIB cross-linking, colocalization of Fc $\gamma$ RIIB and active  $\beta$ 1 integrins was detected on the neutrophil membrane. These data show, for the first time, that cross-linking of Fc $\gamma$ RIIB induces an inside-out signaling pathway that leads to  $\beta$ 1 integrin activation. This activation is independent of Src-family kinases, and PI-3K and may be induced in part by the interaction of Fc $\gamma$ RIIB with  $\beta$ 1 integrins. *J. Leukoc. Biol.* 77: 787–799; 2005.

**Key Words:** Fc receptors · inside-out signaling · PI-3K · ERK · Syk · calcium

## INTRODUCTION

Human neutrophils (PMN) represent one of the first lines of defense against invading pathogens [1]. PMN are recruited early to sites of infection, and their numbers increase notoriously during systemic inflammatory responses. One powerful stimulus for activation of PMN is immune complexes [2], which are recognized by PMN through their receptors for the Fc portion of immunoglobulin G (IgG) molecules, Fc $\gamma$  receptors (Fc $\gamma$ R) [3, 4]. Human neutrophils present two types of Fc $\gamma$ R, Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIB [5]. Both receptors have low affinity for monomeric IgG but recognize immune complexes efficiently.

Fc $\gamma$ RIIA consists of a single  $\alpha$  chain, which transverse the membrane. Fc $\gamma$ RIIA has, within its cytoplasmic region, an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) [6]. The tyrosines within this ITAM get phosphorylated upon receptor cross-linking and serve as docking sites for Src homology 2 domain-containing proteins, which further propagate the signal inside the cell [2]. Fc $\gamma$ RIIB, conversely, is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked protein, which does not cross the membrane [5]. The signaling mechanism of Fc $\gamma$ RIIB is not clear to date, but it has been proposed that interactions with the  $\alpha$ M $\beta$ 2 integrin or the Fc $\gamma$ RIIA may be responsible for its signaling capacities [7–13]. Nonetheless, there are responses elicited by Fc $\gamma$ RIIB, which are not replicated by the stimulation of  $\alpha$ M $\beta$ 2 or Fc $\gamma$ RIIA [14–17], suggesting that Fc $\gamma$ RIIB is capable of signaling on its own or requires another yet-uncharacterized signaling partner.

Other important mediators of PMN responses are integrins [18], which are heterodimeric transmembrane proteins capable of altering their ligand-binding capacity in response to signals arising from inside the cell [19, 20]. This process of integrin modulation has been termed inside-out signaling [21], which allows the cell to rapidly modulate its adhesive state in response to extracellular input. Several integrins have been shown to be subjects of this inside-out signaling regulation [20, 22]. In PMN, the affinity of  $\beta$ 2 and  $\beta$ 1 integrins is tightly regulated [23–30].

One important consequence of Fc $\gamma$ R stimulation in PMN is the activation and up-regulation of  $\beta$ 2 integrins [24, 31–33]. This activation of  $\beta$ 2 integrins is important for adhesion to immune complexes, enhanced Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, and the production of certain inflammatory mediators [10, 24, 34]. It has been demonstrated that Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIB, when cross-linked independently with monoclonal antibodies (mAb), are capable of inducing activation [32] and also up-regulation of  $\beta$ 2 integrins [32]. This response is dependent on the activity of phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K), as pharmacological inhibition of this enzyme prevents up-regulation and activation of  $\beta$ 2 integrins in response to Fc $\gamma$ R stimulation [24]. In other cell types, stimulation of FcR for IgE (Fc $\epsilon$ RI) has been shown to

<sup>1</sup> Correspondence: Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas–UNAM, Apdo. Postal 70228, Cd. Universitaria, México D.F.–04510, México. E-mail: carosal@servidor.unam.mx

Received May 27, 2004; revised December 15, 2004; accepted December 19, 2004; doi: 10.1189/jlb.0504310.

affect the affinity of  $\beta 1$  integrins but not the expression levels of  $\beta 1$  integrins on the cell surface [35, 36]. Fc $\epsilon$ RI stimulation induced activation of  $\alpha 4\beta 1$  integrins in human basophils [36] and of  $\alpha 5\beta 1$  in mast cells [35]. Both responses required the activity of PI-3K [35, 36]. To date, there are no reports describing the effects of Fc $\gamma$ R stimulation in PMN on the activation and up-regulation of  $\beta 1$  integrins. We set to explore whether Fc $\gamma$ R stimulation of PMN affects  $\beta 1$  integrin activation by selectively cross-linking each Fc $\gamma$ R with mAb and analyzing the activation state of integrins.

We found that cross-linking of Fc $\gamma$ RIIB in addition to inducing up-regulation of  $\beta 2$  integrin expression also induced  $\beta 1$  integrin activation. The Fc $\gamma$ RIIB-induced signaling pathway to  $\beta 1$  integrin activation was independent of PI-3K and Src-family tyrosine kinases but may be caused by interaction of Fc $\gamma$ RIIB with  $\beta 1$  integrins on the PMN membrane.

## MATERIALS AND METHODS

### Antibodies and reagents

The following antibodies were used: anti-extracellular signal-regulated kinase (anti-ERK) rabbit polyclonal IgG and anti-phospho-ERK (anti-pERK) rabbit polyclonal IgG from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Dr. Eric J. Brown (University of California, San Francisco) donated anti-integrin  $\beta 2$  (mAb IB4). Anti-Fc $\gamma$ RII (mAb IV.3), anti-Fc $\gamma$ RIII (mAb 3G8), and anti-major histocompatibility complex (anti-MHC) class I (mAb W6/32) were from American Type Culture Collection (Manassas, VA). Anti- $\beta 1$  integrin (mAb MAR4) coupled to Cy-chrome was from BD PharMingen (Torrey Pines, CA); Dr Martin Hemler (Dana Farber Cancer Research Institute, Boston, MA) provided anti- $\beta 1$  integrin (mAb TS2/16). Anti-activated  $\beta 1$  integrin (mAb 15/7) was a kind gift from Dr. Ted Yednock (Elan Pharmaceuticals, San Francisco, CA). The specific PI-3K inhibitors wortmannin and LY294002, the protein kinase A (PKA) inhibitor H89, the PKC inhibitor Staurosporine, and the specific Syk inhibitor Piceatannol were from Calbiochem (San Diego, CA). The Src-family tyrosine kinase inhibitor PP2 was from Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA). The mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK)-1-specific inhibitor PD98059 was from New England Biolabs (Beverly, MA). The glutathione S-transferase (GST)-Fn9-11 fusion protein cloned in the pGEX plasmid was a kind gift from Dr. Mark Ginsberg (Scripps Research Institute, La Jolla, CA) and has been described previously [37]. GST alone was purified from plasmid pGEX-4T-1, a kind gift from Dr. Pavel Isa (Instituto de Biocología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico). All other chemicals were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

### Purification of neutrophils

Neutrophils were obtained from heparinized venous blood from healthy adult donors and purified by standard techniques as described previously [38, 39].

### Preparation of Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragments

Pepsin digestion of mAb IV.3, 3G8, and W6/32 was carried out essentially as described [2]. Briefly, antibodies were diluted at 2 mg/ml in 0.1 M sodium citrate, pH = 3.5, and pepsin was added at 25  $\mu$ g/ml. The mixture was incubated at 37°C for 45 min for mAb IV.3, 4 h for mAb 3G8, and 4 h for mAb W6/32. Incubation was stopped by adding 1/10 vol 3 M Tris, pH = 8.6. Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragments were dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS), and undigested IgG was removed with protein G sepharose (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Sweden). Purity of Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragments was confirmed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and silver-staining of the gels.

### Fluorescein isothiocyanate (FITC) labeling of Fab and F(ab')<sub>2</sub> antibody fragments

NaHCO<sub>3</sub> (1/10 vol; 1 M, pH=9.0) was added to Fab or F(ab')<sub>2</sub> antibody fragments in PBS. Isomer I of FITC (iFITC), diluted at 10 mg/ml in dimethyl

sulfoxide (DMSO), was added at a molar ratio of 40:1 (iFITC:protein) and shaken continuously for 1 h at room temperature. Excess iFITC was removed by dialysis against PBS. FITC labeling of antibody fragments was assessed by flow cytometry. FITC-labeled fragments retained the properties of unlabeled antibody fragments.

### Fc $\gamma$ R stimulation

PMN ( $1 \times 10^7$  cell/ml) in PBS (150 mM NaCl, 5.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), containing 2 mM Ca<sup>2+</sup> and 2 mM Mg<sup>2+</sup>, were incubated with 5  $\mu$ g/ml Fab fragments of mAb IV.3 or with 5  $\mu$ g/ml F(ab')<sub>2</sub> fragments of mAb 3G8 at 4°C during 1 h. For some experiments, PMN were concomitantly incubated with enzyme inhibitors. PMN were then washed and resuspended in the same volume of PBS containing 40  $\mu$ g/ml F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG (GAM) (ICN/Cappel, Costa Mesa, CA) and immediately placed at 37°C for various periods of time. Stimulation was terminated by the addition of ice-cold PBS.

### Western blot

ERK or activated pERK was detected by immunoblotting with the corresponding antibody at 75 ng/ml, as described [40].

### Fluorescent calcium measurements

PMN were loaded with Fura-2/AM (Calbiochem), and intracellular calcium concentrations were determined and calculated with an LS-55 spectrofluorimeter (Perkin-Elmer, Wellesly, MA), as described previously [41, 42].

### Biotinylation

mAb IB4, mAb 15/7, GST, and the GST-Fn9-11 recombinant protein were biotinylated using *N*-hydroxysulfosuccinimido biotin (NHS-biotin) (Pierce, Rockford, IL), according to the manufacturer's instructions. Briefly, protein was diluted at a concentration of 1 mg/ml in PBS. Sulfo-NHS-biotin was added at a molar ratio of 20:1 (sulfo-NHS-biotin:protein). The reaction took place for 1 h at room temperature. Excess sulfo-NHS-biotin was removed by dialysis against PBS.

### Flow cytometry [fluorescein-activated cell sorter (FACS)]

Stimulated PMN ( $1 \times 10^6$ ) were diluted in 100  $\mu$ l cold flow buffer (1% sucrose, 0.5% bovine serum albumin, in PBS) and incubated with 5  $\mu$ g/ml of the corresponding, biotinylated mAb at 4°C during 45 min. PMN were then washed three times with cold flow buffer, resuspended in 20  $\mu$ l flow buffer containing a 1/500 dilution of Cy-chrome streptavidin (Pierce), and incubated at 4°C for 30 min. PMN were then washed three more times with cold flow buffer and finally, fixed in 300  $\mu$ l 1% paraformaldehyde in PBS.

### Purification of GST and GST-Fn9-11

The central cell-binding domain of fibronectin (Fn9-11), containing the integrin Arg-Gly-Asp-binding site [43] coupled to GST, was purified as a recombinant protein (GST-Fn9-11) as described previously [43]. Briefly, *Escherichia coli*, carrying a plasmid containing GST-Fn9-11 under the lac promoter, were grown to absorbance at 600 nm = 0.5, 1 mM isopropylthiogalactoside was added, and bacteria were incubated for 2 h more. Bacteria from a 400-ml culture were collected by centrifugation and lysed by sonication in 20 ml cold PBS. Bacterial lysates were clarified by centrifuging 10 min at 10,000 rpm in a JA-20 rotor in a J2-MC centrifuge (Beckman Coulter, Miami, FL). Supernatant was then passed over a glutathione sepharose column (Amersham-Pharmacia), which was washed with PBS until no protein could be recovered. The GST-Fn9-11 recombinant protein was eluted with 10 mM free reduced glutathione. GST-Fn9-11-containing fractions were pooled and dialyzed against PBS. Purity of the recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE. Purified protein was finally stored at -70°C until use. The same procedure was used to purify GST alone, albeit bacteria were transformed with a plasmid coding only for recombinant GST.



## Binding of GST-Fn9-11 to neutrophils

Fc $\gamma$ R-stimulated PMN ( $1 \times 10^6$ ) in 100  $\mu$ l cold flow buffer plus Ca $^{2+}$  and Mg $^{2+}$  were incubated with 5  $\mu$ g/ml biotinylated GST-Fn9-11 recombinant protein at 4°C for 45 min. PMN were then washed three times with cold flow buffer and resuspended in 20  $\mu$ l flow buffer containing a 1/500 dilution of Cy-chrome streptavidin (Pierce). Cells were washed three more times with cold flow buffer and finally fixed in 300  $\mu$ l 1% paraformaldehyde in PBS for FACS analysis. For GST versus GST-Fn9-11 fluorescence, glutathione sepharose beads were incubated with the biotinylated protein for 10 min, washed three times with cold flow buffer, stained with Cy-chrome streptavidin, washed three more times, fixed in 1% paraformaldehyde in PBS, and analyzed by flow cytometry.

## Confocal microscopy

PMN were stimulated as described under Fc $\gamma$ R stimulation (see above), but FITC-labeled Fab and F(ab') $_2$  antibody fragments were used instead of unlabeled antibody fragments. Stimulated PMN were stained as described under flow cytometry (see above). Once labeled, PMN were allowed to settle overnight, and excess liquid was discarded. The cell pellet was resuspended in 10  $\mu$ l mounting buffer [10% 1,4-diazabicyclo(2.2.2)octane, 50% glycerol, in PBS], and cells were mounted on slides for microscopical analysis. All images were acquired with an LSM 5 PASCAL confocal microscope (Carl Zeiss, Jenna, Germany), using a Zeiss LSM image examiner. Excitation at 80.6% of the 488 nm channel and 100% of the 633 nm was used. Filters for FITC emission were set to 505–530 nm, and filters for Cy-chrome emission were set to 650 nm.

## Up-regulation/activation indexes

For experiments with enzyme inhibitors, the up-regulation and activation indexes were calculated according to the next formula: Index = (MFSI–MFI)/(MFS–MF), where MFSI is the mean fluorescence of inhibitor-treated, stimulated cells; MFI is the mean fluorescence of inhibitor-treated, unstimulated cells; MFS is the mean fluorescence of DMSO-treated, stimulated cells; and MF is the mean fluorescence of DMSO-treated, unstimulated cells. The same cells were analyzed for IB4 and 15/7 binding in each experiment.

## Internalization of Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIB

Human neutrophils were incubated for 1 h at 4°C with the FITC-labeled Fab or F(ab') $_2$  antibody fragments of mAb IV.3 and mAb 3G8, respectively. After this time, cells were left unstimulated or were stimulated as above by cross-linking with goat anti-mouse antibodies for 10 min at 37°C. At the end of this period, cells were washed three times with cold flow buffer and fixed with 1% paraformaldehyde in PBS. Samples were divided in two, and after 30 min, Trypan blue was added to one of the samples to a final concentration of 0.2%, and cells were analyzed by flow cytometry. Fluorescence was normalized to the MFI of the unquenched sample.

## Statistical analysis

For experiments with enzyme inhibitors, data were analyzed with a Student's *t*-test, using Simple Interactive Statistical Analysis (<http://home.clara.net/sisa/t-test.htm>). Differences were considered statistically significant when  $P \leq 0.01$ .

## RESULTS

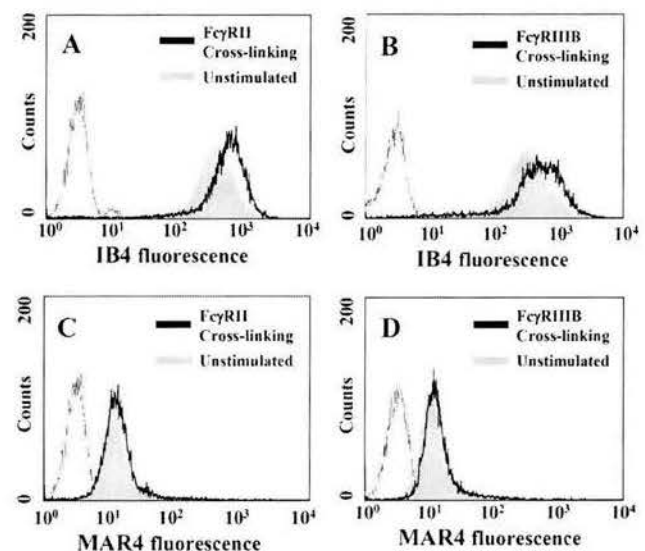
### Fc $\gamma$ R cross-linking activates ERK and generates calcium fluxes

It has been reported previously that Fc $\gamma$ R engagement in neutrophils leads to activation of ERK [14] and stimulation of calcium fluxes [12, 17, 41]. It seems that Fc $\gamma$ RII or Fc $\gamma$ RIII causes this effect [14]. We decided to confirm these results by selectively cross-linking each Fc $\gamma$ R with specific mAb. To avoid binding of these mAb through their Fc portions, we prepared Fab fragments of anti-Fc $\gamma$ RII mAb IV.3 and F(ab') $_2$  fragments of anti-Fc $\gamma$ RIII mAb 3G8. The mAb IV.3 is sensi-

tive to pepsin digestion, so only Fab fragments can be obtained [44]. Cross-linking of Fc $\gamma$ RII or Fc $\gamma$ RIIIB caused a strong activation of ERK, as indicated by the appearance of the phosphorylated form of this enzyme (data not shown). As with ERK phosphorylation, cross-linking of Fc $\gamma$ RII or Fc $\gamma$ RIIIB induced a rapid and transient raise in intracellular calcium [39] (data not shown). Unlike stimulation of Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIIIB, cross-linking of MHC class I molecules did not have an effect on ERK phosphorylation (data not shown) or on intracellular calcium levels (data not shown). These results indicated that Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIIIB were capable of signaling independently of each other when they were cross-linked with Fab fragments of mAb IV.3 and F(ab') $_2$  fragments of mAb 3G8.

### Fc $\gamma$ R cross-linking promotes $\beta$ 2 integrin up-regulation

As Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIIIB have been shown to promote up-regulation and activation of  $\beta$ 2 integrins [24, 32], we studied the behavior of  $\beta$ 2 and also  $\beta$ 1 integrins after Fc $\gamma$ R stimulation by flow cytometry. Neutrophils that had been stimulated previously by Fc $\gamma$ RII or Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking were stained with a biotinylated anti- $\beta$ 2 integrin mAb IB4 followed by Cy-chrome streptavidin or with a Cy-chrome-conjugated anti- $\beta$ 1 integrin mAb MAR4. Membrane expression of  $\beta$ 2 integrins increased on the surface of Fc $\gamma$ RII-stimulated neutrophils (Fig. 1A). This up-regulation became evident 5 min after stimulation and did not decline for up to 30 min (data not shown). Surface expression of  $\beta$ 2 integrins on the surface of neutrophils also increased after Fc $\gamma$ RIIIB stimulation (Fig. 1B). This up-regulation also became evident 5 min after stim-

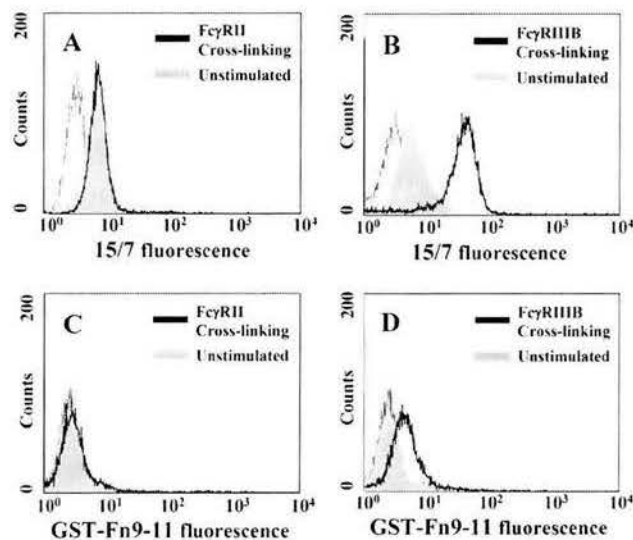


**Fig. 1.** Fc $\gamma$ R cross-linking up-regulates  $\beta$ 2 integrins but not  $\beta$ 1 integrins. Human neutrophils were stimulated for 10 min by cross-linking Fc $\gamma$ RII (A and C) or Fc $\gamma$ RIIIB (B and D). Cells ( $1 \times 10^6$ ) were stained with anti- $\beta$ 2 integrin mAb IB4 (A and B) or with anti- $\beta$ 1 integrin mAb MAR4 (C and D) for flow cytometry analysis of integrin surface expression. Dotted line is the isotype-matched, negative staining. Gray area is the integrin surface expression of unstimulated cells, and the bold line is the integrin surface expression after Fc $\gamma$ R cross-linking. Data are representative of three separate experiments.

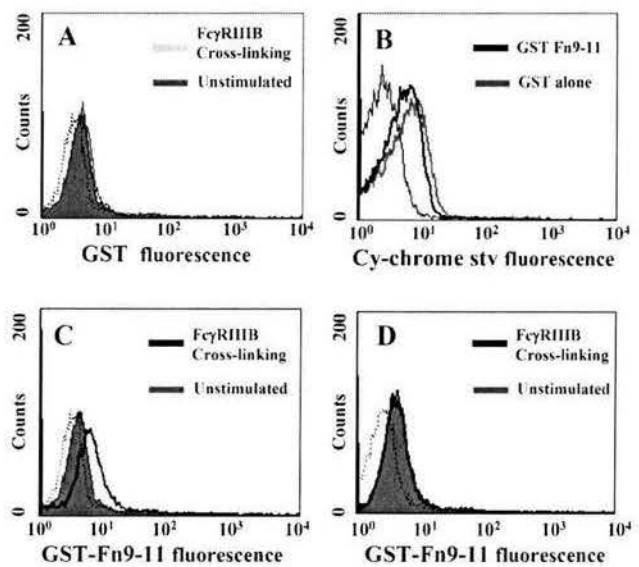
ulation and did not decline for up to 30 min (data not shown). Unlike  $\beta 2$  integrins, membrane expression of  $\beta 1$  integrins on the surface of neutrophils did not change after cross-linking of  $Fc\gamma RII$  or  $Fc\gamma RIIB$  (Fig. 1, C and D). These data indicated that  $Fc\gamma RII$  and  $Fc\gamma RIIB$  can up-regulate  $\beta 2$  integrins but not  $\beta 1$  integrins on PMN.

### $Fc\gamma RIIB$ cross-linking promotes $\beta 1$ integrin activation

Although there was no change in membrane expression of  $\beta 1$  integrins on the surface of  $Fc\gamma R$ -stimulated neutrophils (Fig. 1, C and D), it was still possible that integrins could be activated to increase their ligand-binding capacity in response to  $Fc\gamma R$  stimulation, as has been shown to occur after  $Fc\epsilon R$  stimulation [35, 36]. This increase in the binding capacities of integrins is thought to occur through a conformational change in the molecule [19, 30, 45]. Certain anti-integrin antibodies have the capacity to recognize these conformational changes. These antibodies are thus useful in identifying activated integrins. One antibody that recognizes activated  $\beta 1$  integrins is the mAb 15/7 [30]. Cross-linking of  $Fc\gamma RII$  produced no change in the binding of mAb 15/7 (Fig. 2A), indicating that  $Fc\gamma RII$  stimulation does not induce  $\beta 1$  integrin activation. In contrast, we found that cross-linking  $Fc\gamma RIIB$  produced a clear increase in the binding of mAb 15/7 (Fig. 2B). This result showed for the first time that cross-linking  $Fc\gamma RIIB$  induces  $\beta 1$  integrin activation. To confirm that this conformational change is indeed responsible for an increase in  $\beta 1$  integrin ligand-binding capacity, we looked at direct binding of a natural integrin ligand. We used the recombinant protein GST-Fn9-11, which contains the central-binding domain of fibronectin [37]. Cross-



**Fig. 2.**  $Fc\gamma RIIB$  cross-linking activates  $\beta 1$  integrins. Human neutrophils were stimulated for 10 min by cross-linking  $Fc\gamma RII$  (A and C) or  $Fc\gamma RIIB$  (B and D). Cells ( $1 \times 10^6$ ) were stained with anti-activated  $\beta 1$  integrin mAb 15/7 (A and B) or with GST-Fn9-11 fragment (C and D) for flow cytometry analysis of  $\beta 1$  integrin activation. Dotted line is the isotype-matched, negative staining; shaded area is the integrin activation status of unstimulated cells; and bold line is the integrin activation status after  $Fc\gamma R$  cross-linking. Data are representative of three separate experiments.



**Fig. 3.** Fibronectin binding after  $Fc\gamma RIIB$  depends on  $\beta 1$  integrins. Human neutrophils were stimulated for 10 min by cross-linking  $Fc\gamma RIIB$  (A, C, and D). Cells ( $1 \times 10^6$ ) were stained with GST alone (A) or with GST-Fn9-11 fragment (C and D) for flow cytometry analysis of  $\beta 1$  integrin activation. Immediately after stimulation, cells incubated for 10 min on ice with an excess amount (20  $\mu\text{g/ml}$ ) of (C) anti- $\beta 2$  integrin mAb IB4 or (D) anti- $\beta 1$  integrin mAb TS2/16 before GST-Fn9-11 binding were assayed. Dotted line, the staining as a result of the unspecific binding of streptavidin (stv) Cy-chrome was used as the negative control; shaded area, fibronectin-binding status of unstimulated cells; and bold line, fibronectin-binding status after  $Fc\gamma R$  cross-linking. (B) Glutathione sepharose beads were incubated with GST alone or with the GST-Fn-9-11 fusion to show that the amount of label was the same for both proteins. Data are representative of three separate experiments.

linking of  $Fc\gamma RII$  had no effect on GST-Fn9-11 binding to PMN (Fig. 2C), indicating similarly to mAb 15/7, that  $\beta 1$  integrins are not activated by  $Fc\gamma RII$  stimulation. In contrast,  $Fc\gamma RIIB$  cross-linking produced a clear increase in the binding of GST-Fn9-11 (Fig. 2D). This binding depends on the Fn9-11 portion of the GST-Fn9-11 recombinant protein, as no increase in the binding of GST alone could be detected after  $Fc\gamma RIIB$  stimulation (Fig. 3A). It is important to notice that binding of GST and GST-Fn9-11 could be detected with equal intensity bound to glutathione sepharose beads (Fig. 3B). To further strengthen the fact that fibronectin binding after  $Fc\gamma RIIB$  is dependent on the activation of  $\beta 1$  integrins, a blockade of  $\beta 2$  or  $\beta 1$  integrins with mAb was performed after PMN stimulation but before GST-Fn9-11 binding. The blockade of  $\beta 2$  integrins had no effect on GST-Fn9-11 binding (Fig. 3C); nonetheless, the blockade of  $\beta 1$  integrins clearly abolished the fibronectin binding (Fig. 3D). The increased binding of the GST-Fn9-11 in response to  $Fc\gamma RIIB$  stimulation required  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ , as performing the same experiment in the absence of these ions did not augment binding of the fibronectin fragment (data not shown). Activation of  $\beta 1$  integrins secondary to  $Fc\gamma RIIB$  stimulation is evident 3 min after  $Fc\gamma RIIB$  cross-linking and declines after 30 min (data not shown). These data confirmed that  $Fc\gamma RIIB$  cross-linking on PMN induces  $\beta 1$  integrin activation and that

this activation results in a better binding of fibronectin to  $\beta 1$  integrins.

### Fc $\gamma$ RIIIB-mediated activation of $\beta 1$ integrins is independent of PI-3K

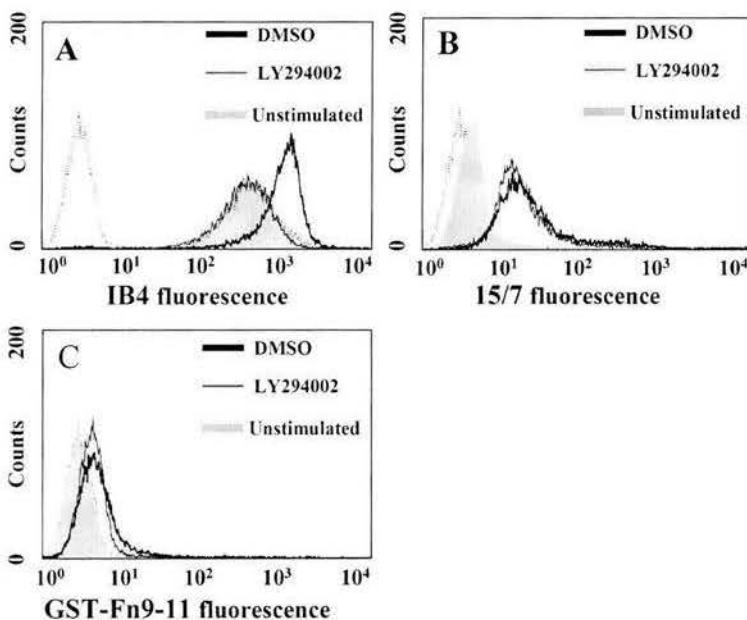
Previous reports of FcR-dependent integrin activation, including the up-regulation of  $\beta 2$  integrins in human neutrophils, suggested the participation of PI-3K in this activation [24, 35, 36]. To determine whether PI-3K was also used for  $\beta 1$  integrin activation secondary to Fc $\gamma$ RIIIB stimulation, we used the PI-3K-specific inhibitors LY294002 and wortmannin. Inhibiting PI-3K activity greatly diminished the Fc $\gamma$ RIIIB-mediated  $\beta 2$  integrin up-regulation (Figs. 4A and 5A). This result is similar to results in previous reports [24, 32] and confirmed the participation of PI-3K in the up-regulation of  $\beta 2$  integrins in response to Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking on human neutrophils. In contrast, treatment of PMN with LY294002 did not prevent the augmented binding of mAb 15/7 (Figs. 4B and 5B) or the binding of the GST-Fn9-11 protein (Fig. 4C). Same results were obtained when PI-3K activity was blocked with wortmannin (data not shown). These data clearly showed that Fc $\gamma$ RIIIB-mediated  $\beta 1$  integrin activation is independent of PI-3K activity.

### $\beta 1$ integrin activation secondary to Fc $\gamma$ RIIIB stimulation is independent of Src kinases, PKC, PKA, and ERK and is negatively regulated by the cytoskeleton and Syk

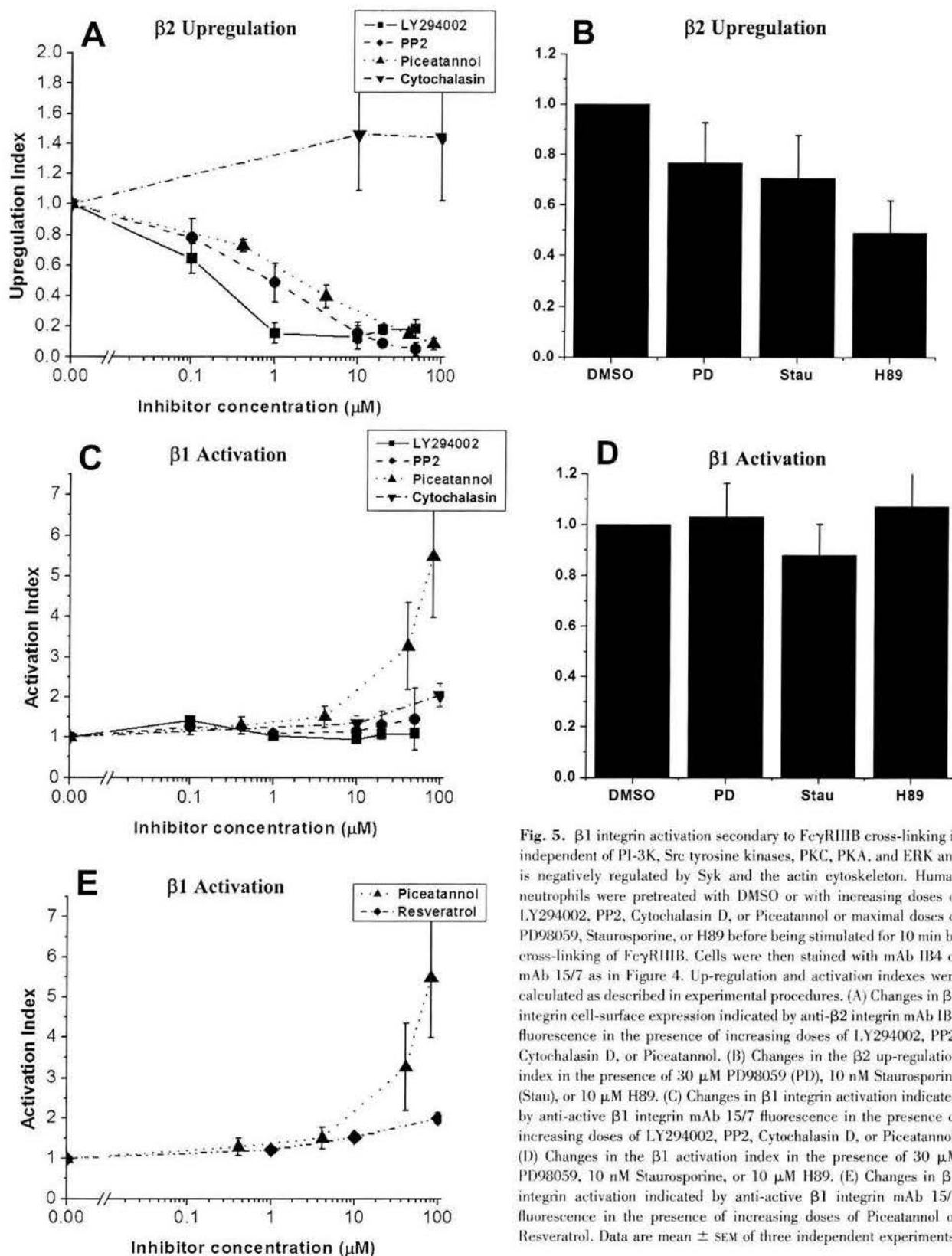
As PI-3K was not involved in the activation of  $\beta 1$  integrins secondary to Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking, we wanted to identify other possible candidates known to modulate Fc $\gamma$ R-mediated responses [2, 4, 28, 42]. For this purpose, we used pharmacological inhibitors of Src-family tyrosine kinases, PKC, PKA, ERK, the actin cytoskeleton, and of Syk kinase to evaluate the signaling pathway from Fc $\gamma$ RIIIB to integrins. Blocking Src-family tyrosine kinase activity with the inhibitor PP2 elimi-

nated Fc $\gamma$ RIIIB-mediated  $\beta 2$  integrin up-regulation in a dose-dependent manner (Fig. 5A). This response is similar to the one seen after the pharmacological inhibition of PI-3K (Fig. 5A). In addition, inhibition of Syk with Piceatannol resulted in impaired  $\beta 2$  integrin up-regulation in a dose-dependent manner (Fig. 5A). The MEK inhibitor PD98059 and the PKC inhibitor Staurosporine each abolished  $\sim 30\%$  of the Fc $\gamma$ RIIIB-mediated  $\beta 2$  integrin up-regulation at their maximum doses, but this effect was not statistically significant (Fig. 5B). The PKA inhibitor H89 abolished  $\beta 2$  up-regulation  $\sim 50\%$  when used at its maximum dose (Fig. 5B). Contrary to these results, abolishing actin polymerization with Cytochalasin D did not abolish the Fc $\gamma$ RIIIB-dependent  $\beta 2$  integrin up-regulation which was actually enhanced mildly (Fig. 5A). These results suggest that Fc $\gamma$ RIIIB initiates a signaling transduction pathway leading to  $\beta 2$  up-regulation, which requires Src-family tyrosine kinases, Syk, and PI-3K and is partially dependent on the activation of PKA. Although Fc $\gamma$ RIIIB stimulation is capable of activating ERK, a kinase known to be activated by MEK-1, this activation is not required for  $\beta 2$  integrin up-regulation.

Contrary to these results, inhibition of Src-family kinases or PI-3K was incapable of preventing  $\beta 1$  integrin activation secondary to Fc $\gamma$ RIIIB stimulation, even at doses that completely inhibited  $\beta 2$  integrin up-regulation (Fig. 5C). It is surprising that inhibition of Syk enhanced Fc $\gamma$ RIIIB-mediated  $\beta 1$  integrin activation in a dose-dependent manner. Low doses of Piceatannol did not affect  $\beta 1$  integrin activation even when  $\beta 2$  up-regulation was inhibited by as much as 60% (compare Fig. 5, A and C), but higher doses of Piceatannol, which completely inhibited  $\beta 2$  integrin up-regulation, increased  $\beta 1$  integrin activation as much as fivefold (Fig. 5C). Disruption of the actin cytoskeleton also promoted a slight (twofold) increase in  $\beta 1$  integrin activation after Fc $\gamma$ RIIIB stimulation (Fig. 5C), but this effect was seen only when high concentrations of Cytochalasin D were used. Inhibition of MEK, PKC, or PKA had no



**Fig. 4.**  $\beta 1$  integrin activation secondary to Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking is independent of PI-3K activity. Human neutrophils were stimulated for 10 min by cross-linking Fc $\gamma$ RIIIB in the presence of only DMSO (bold line) or in the presence of 50  $\mu$ M LY294002 (thin line). PMN ( $1 \times 10^6$ ) were then stained with anti- $\beta 2$  integrin mAb IB4 (A), with anti-activated  $\beta 1$  integrin mAb 15/7 (B), or with GST-Fn9-11 protein (C) for flow cytometry analysis of  $\beta 1$  integrin activation. Dotted line is the isotype-matched, negative control; shaded area is the binding of unstimulated cells. Data are representative of three separate experiments.



**Fig. 5.**  $\beta 1$  integrin activation secondary to Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking is independent of PI-3K, Src tyrosine kinases, PKC, PKA, and ERK and is negatively regulated by Syk and the actin cytoskeleton. Human neutrophils were pretreated with DMSO or with increasing doses of LY294002, PP2, Cytochalasin D, or Piceatannol or maximal doses of PD98059, Staurosporine, or H89 before being stimulated for 10 min by cross-linking of Fc $\gamma$ RIIIB. Cells were then stained with mAb IB4 or mAb 15/7 as in Figure 4. Up-regulation and activation indexes were calculated as described in experimental procedures. (A) Changes in  $\beta 2$  integrin cell-surface expression indicated by anti- $\beta 2$  integrin mAb IB4 fluorescence in the presence of increasing doses of LY294002, PP2, Cytochalasin D, or Piceatannol. (B) Changes in the  $\beta 2$  up-regulation index in the presence of 30  $\mu\text{M}$  PD98059 (PD), 10 nM Staurosporine (Stau), or 10  $\mu\text{M}$  H89. (C) Changes in  $\beta 1$  integrin activation indicated by anti-active  $\beta 1$  integrin mAb 15/7 fluorescence in the presence of increasing doses of LY294002, PP2, Cytochalasin D, or Piceatannol. (D) Changes in the  $\beta 1$  activation index in the presence of 30  $\mu\text{M}$  PD98059, 10 nM Staurosporine, or 10  $\mu\text{M}$  H89. (E) Changes in  $\beta 1$  integrin activation indicated by anti-active  $\beta 1$  integrin mAb 15/7 fluorescence in the presence of increasing doses of Piceatannol or Resveratrol. Data are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.

effect on the activation of  $\beta 1$  integrins secondary to Fc $\gamma$ RIIIB stimulation (Fig. 5D). To further support the fact that Syk is responsible for the observed increase in  $\beta 1$  integrin activation when PMN are treated with Piceatannol, we treated the cells

with Resveratrol, an analog of Piceatannol, which has no effect on Syk activity [46]. Treating the cells with up to 100  $\mu\text{M}$  Resveratrol previous to Fc $\gamma$ RIIIB stimulation did not promote an increase in  $\beta 1$  integrin activation equivalent to that pro-

duced when cells were treated with Piceatannol (Fig. 5E). These data suggested that Fc $\gamma$ RIIIB induces  $\beta$ 1 integrin activation by a signaling pathway, which is independent of Src-family tyrosine kinases, PI-3K, MEK, PKC, and PKA but that may be negatively regulated by Syk.

### Fc $\gamma$ RIIIB, but not Fc $\gamma$ RII, colocalizes with $\beta$ 2 integrins after cross-linking

As Fc $\gamma$ RIIIB seemed to induce  $\beta$ 1 integrin activation independently of a biochemical cascade, it was possible that another mechanism was used by this FcR to activate integrins. It has been reported that Fc $\gamma$ RIIIB has the capacity to interact on the cell surface with other receptors, and it is also thought that this interaction may be responsible for its signaling capacities. Thus, an interesting possibility was then that Fc $\gamma$ RIIIB and  $\beta$ 1 integrins interact on the cell surface and that this interaction is responsible for the activation of  $\beta$ 1 integrins. We explored the interaction of Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIIIB with  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 integrins on PMN by confocal microscopy.

We found that Fc $\gamma$ RII was uniformly distributed on the cell surface of unstimulated PMN (Fig. 6A).  $\beta$ 2 integrins were also distributed uniformly on the cell surface of unstimulated cells (Fig. 6, B and H). In unstimulated cells, Fc $\gamma$ RII and  $\beta$ 2 integrins did not colocalize (Fig. 6C). Upon Fc $\gamma$ RII cross-

linking, patches of the receptor appeared on the cell surface, reflecting receptor clustering (Fig. 6D). In Fc $\gamma$ RII-stimulated cells, patches of  $\beta$ 2 integrins also appeared on the cell surface (Fig. 6E); however, Fc $\gamma$ RII and  $\beta$ 2 integrins did not colocalize (Fig. 6F).

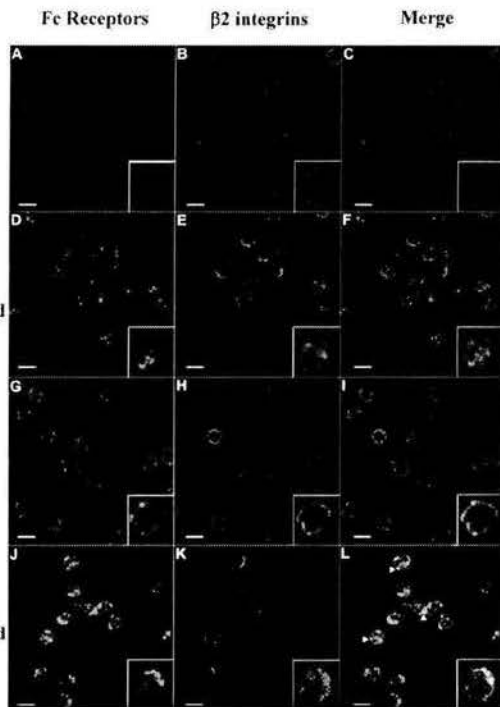
Similar to Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIIIB was uniformly distributed across the cell surface in unstimulated cells (Fig. 6G). Also, Fc $\gamma$ RIIIB and  $\beta$ 2 integrins did not colocalize in unstimulated cells (Fig. 6I). After Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking, patches of the receptor appeared, reflecting receptor clustering (Fig. 6J), and  $\beta$ 2 integrin up-regulation occurred, as evidenced by the appearance of  $\beta$ 2 integrin patches (Fig. 6K). Contrary to Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIIIB and  $\beta$ 2 integrins did colocalize in small patches after cross-linking (Fig. 6L). It is important to notice that even after Fc $\gamma$ RIIIB stimulation, the bulk of  $\beta$ 2 integrins does not colocalize with Fc $\gamma$ RIIIB. These results showed that Fc $\gamma$ RIIIB and a small fraction of  $\beta$ 2 integrins indeed colocalize, but they do so only after Fc $\gamma$ RIIIB stimulation.

### Fc $\gamma$ RIIIB colocalizes with active $\beta$ 1 integrins, and this interaction is enhanced after the inhibition of Syk

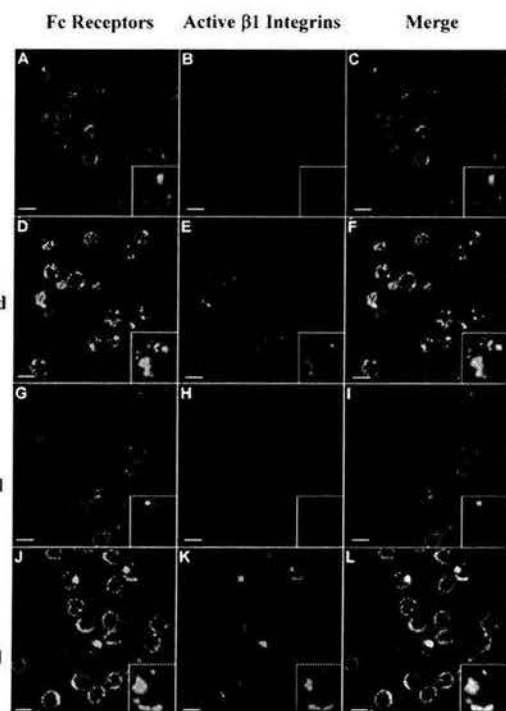
In the case of  $\beta$ 1 integrins, we first looked at total  $\beta$ 1 integrins on the cell surface before and after Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking using confocal microscopy. No changes in the distribution of total  $\beta$ 1 integrins were evident after Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking (data not shown). As no changes in total  $\beta$ 1 integrins could be detected, we looked at the distribution of active integrins, evidenced by the binding of mAb 15/7, after Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking. As shown before, Fc $\gamma$ RIIIB was uniformly distributed on the membrane of unstimulated cells (Fig. 7A), and as it had been shown by flow cytometry, there was no binding of mAb 15/7 to unstimulated cells (Fig. 7B), indicating that  $\beta$ 1 integrins were not activated on these cells. Upon Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking, the receptor was aggregated in patches (Fig. 7D), and small patches of mAb 15/7 staining also appeared on the cell surface (Fig. 7E). All of these patches of active  $\beta$ 1 integrins colocalized with Fc $\gamma$ RIIIB (Fig. 7F). This result suggested that  $\beta$ 1 integrin activation, secondary to Fc $\gamma$ RIIIB stimulation, might be the result of interactions between Fc $\gamma$ RIIIB and  $\beta$ 1 integrins on the PMN membrane. As Piceatannol treatment augmented the binding of mAb 15/7 to Fc $\gamma$ RIIIB-stimulated cells (Fig. 5B), we looked at Piceatannol-treated cells to detect the increased binding of mAb 15/7. Piceatannol treatment of unstimulated PMN did not elicit any mAb 15/7 binding (Fig. 7H). However, as shown before, mAb 15/7 binding to PMN after Fc $\gamma$ RIIIB stimulation was clearly enhanced by Piceatannol treatment (Fig. 7K). In these conditions, the colocalization of active  $\beta$ 1 integrins and Fc $\gamma$ RIIIB was more evident (Fig. 7L). All these data suggested that Fc $\gamma$ RIIIB might be able to interact with  $\beta$ 1 integrins and in this way, activate them.

### Fc $\gamma$ RII is internalized after cross-linking, but Fc $\gamma$ RIIIB is not, and clusters of Fc $\gamma$ RIIIB after stimulation only appear on the cell surface

To better understand the nature of the possible interaction between Fc $\gamma$ RIIIB and  $\beta$ 1 integrins, we hypothesized that if Fc $\gamma$ RIIIB were internalized following cross-linking, then a



**Fig. 6.** Fc $\gamma$ RIIIB, but not Fc $\gamma$ RII, colocalizes with  $\beta$ 2 integrins after cross-linking. Human neutrophils were incubated with FITC-labeled Fab fragments of mAb IV.3 (A and D) or FITC-labeled F(ab')<sub>2</sub> fragments of mAb 3G8 (G and J). Cells were stimulated for 10 min by the addition of F(ab')<sub>2</sub> fragments of goat anti-mouse IgG (D, E, J, and K). Cells were then stained using biotinylated mAb IB4 and streptavidin Cy-chrome to detect  $\beta$ 2 integrins (B, E, H, and K). Merge images are shown in the last column. (L) Arrowheads show colocalization of Fc $\gamma$ RIIIB with  $\beta$ 2 integrins after cross-linking. Insets show detail at the single-cell level. Over 100 cells were analyzed for each condition in at least two separate experiments. Original scale bar is 10  $\mu$ m. Representative images are shown.



**Fig. 7.** Fc $\gamma$ RIIIB colocalizes with active  $\beta$ 1 integrins. Human neutrophils were stimulated using FITC-labeled F(ab')<sub>2</sub> fragments of mAb 3G8 (A, D, G, and J) and cross-linked with F(ab')<sub>2</sub> fragments of goat anti-mouse IgG (D, E, J, and K). Stimulated cells were stained with biotinylated mAb 15/7 and streptavidin Cy-chrome (B, E, H, and K). Merge images are shown on the right. Active  $\beta$ 1 integrins and Fc $\gamma$ RIIIB colocalization are seen as yellow (F). Detail is shown on the inset. Fc $\gamma$ RIIIB-labeled, unstimulated cells (G) or stimulated cells (J) were also treated with 40  $\mu$ M Piceatannol. Staining with mAb 15/7 (H and K) shows that Piceatannol only enhances mAb 15/7 binding of stimulated cells (K). This mAb 15/7 binding also colocalizes with Fc $\gamma$ RIIIB, as shown by the yellow areas of the merged image (L). Over 100 cells were analyzed for each condition in at least two separate experiments. Original scale bar is 10  $\mu$ m. Representative images are shown.

portion of the active  $\beta$ 1 integrins could also be internalized if the interaction between both molecules were strong enough. To study the internalization of FcRs, PMN were stained with FITC-labeled Fab fragments of mAb IV.3 or FITC-labeled F(ab')<sub>2</sub> fragments of mAb 3G8. Receptor internalization was evaluated using Trypan blue to quench the extracellular FITC signal in unstimulated and stimulated cells. Our results show that in the steady-state, the amount of Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIIIB that is inaccessible to the quencher remains the same in unstimulated cells after 10 min at 37°C (**Fig. 8A**). When receptors are stimulated by the addition of F(ab')<sub>2</sub> fragments of goat anti-mouse IgG, receptor internalization is evident for Fc $\gamma$ RII as a clear increase in the amount of fluorescence that is protected from Trypan blue quenching. In contrast, Fc $\gamma$ RIIIB does not seem to become internalized after stimulation, as the percentage of fluorescence that is protected from Trypan blue quenching remains the same as before stimulation (**Fig. 8A**). As no net change is seen in the amount of Fc $\gamma$ RIIIB that is internalized after stimulation, it is safe to assume that  $\beta$ 1 integrins, which may associate with this receptor after stimulation, will not undergo internalization either. To further support this notion, we undertook the analysis of Fc $\gamma$ RIIIB

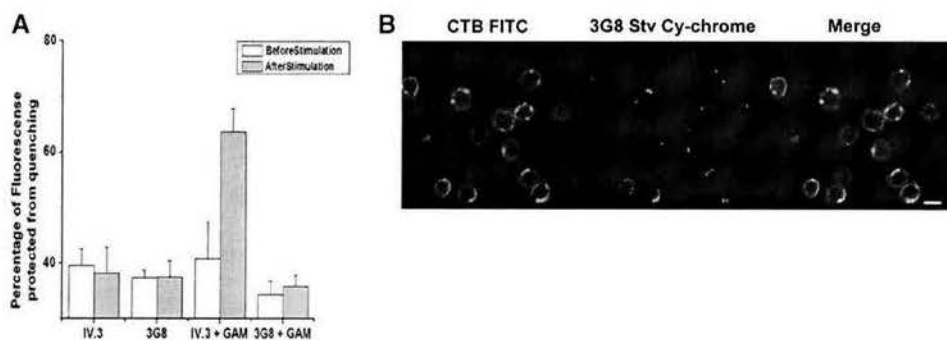
cluster formation after stimulation, using a different cross-linking approach. Neutrophils were incubated with biotinylated F(ab')<sub>2</sub> fragments of mAb 3G8 and then cross-linked with Cy-chrome streptavidin (**Fig. 8B**); when cells are stimulated this way, clusters appear on the cell surface and do not seem to become internalized, as in all confocal planes, they colocalized with lipid rafts on the cell membrane, as evidenced by the colocalization with cholera toxin B (**Fig. 8B**). As Fc $\gamma$ RIIIB does not seem to be internalized after stimulation, these data support the hypothesis that interaction between Fc $\gamma$ RIIIB and  $\beta$ 1 integrins may only occur at the cell surface.

### $\beta$ 1 integrin activation after Fc $\gamma$ RIIIB stimulation seems to be independent of lipid rafts

As Fc $\gamma$ RIIIB is a GPI-linked protein, its primary localization seems to be the cholesterol-enriched lipid rafts of the outer leaflet of the cell membrane (**Fig. 8B**). We also detected 15/7 mAb staining in lipid rafts after Fc $\gamma$ RIIIB stimulation, as evidenced by colocalization with cholera toxin B (data not shown). We set to examine whether lipid rafts and cholesterol play any part on the activation of  $\beta$ 1 integrins secondary to Fc $\gamma$ RIIIB stimulation. For this, we evaluated the effect of cholesterol-depleting agent methyl- $\beta$ -cyclodextrin [47, 48]. It has been reported previously that methyl- $\beta$ -cyclodextrin produced shedding of GPI-linked proteins [47]. In our case, Fc $\gamma$ RIIIB was reduced by 30% on the membrane surface after treatment with methyl- $\beta$ -cyclodextrin, also suggesting shedding of this receptor (**Fig. 9A**). It is surprising that  $\beta$ 1 integrin activation after Fc $\gamma$ RIIIB stimulation was not affected by the treatment with methyl- $\beta$ -cyclodextrin (**Fig. 9B**). We then decided to study whether methyl- $\beta$ -cyclodextrin affected the colocalization of active  $\beta$ 1 integrins and Fc $\gamma$ RIIIB after stimulation. When PMN were treated with methyl- $\beta$ -cyclodextrin, they became extremely round, and Fc $\gamma$ RIIIB distribution was altered. Fc $\gamma$ RIIIB clusters were not seen as such but as a more diffuse membrane distribution (**Fig. 9C**). Still, the colocalization between Fc $\gamma$ RIIIB and active integrins was not disturbed by the treatment with methyl- $\beta$ -cyclodextrin (**Fig. 9C**). These results suggest that the mechanism responsible for the activation and the colocalization of  $\beta$ 1 integrins with Fc $\gamma$ RIIIB secondary to Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking is independent of lipid raft integrity.

## DISCUSSION

In this report, we have found that Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking in the human neutrophil activates  $\beta$ 1 integrins. This activation does not depend on an increase in expression of  $\beta$ 1 integrins on the cell membrane but involves an increase in ligand-binding affinity. The Fc $\gamma$ RIIIB-induced activation of  $\beta$ 1 integrins is independent of a signaling pathway involving PI-3K and Src-family tyrosine kinases but might be negatively regulated by Syk. We also show that Fc $\gamma$ RIIIB and activated  $\beta$ 1 integrins colocalize on the cell surface, suggesting that the interaction between these molecules may be responsible for activation of  $\beta$ 1 integrins.



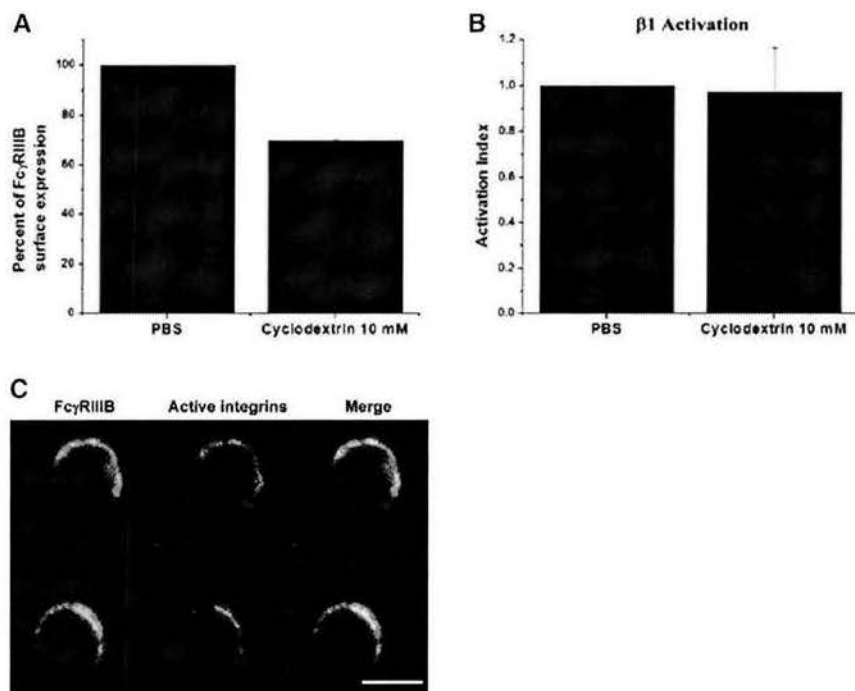
**Fig. 8.** Fc $\gamma$ RII becomes internalized after cross-linking, but Fc $\gamma$ RIIIB does not and clusters on the cell surface. (A) Human neutrophils were incubated with FITC-labeled Fab fragments of mAb IV.3 or FITC-labeled F(ab')<sub>2</sub> fragments of mAb 3G8. Antibody-labeled cells (IV.3, 3G8) and activated cells (IV.3+GAM, 3G8+GAM) were analyzed for FITC fluorescence after Trypan blue quenching before (open bars) or after (shaded bars) they had been placed at 37°C for 10 min. Data are mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. (B) PMN were incubated with biotinylated F(ab')<sub>2</sub> fragments of mAb 3G8 and cross-linked for 10 min with Streptavidin (Stv) Cy-chrome, and cells were washed, labeled with cholera toxin B (CTB)-FITC, and fixed. Over 100 cells were analyzed for each condition in at least two separate experiments. Original scale bar is 10  $\mu$ m. Representative images are shown.

The role of integrins in the hematopoietic system is an area of active research [26, 49–55]. Integrins have emerged as important regulators of leukocyte adhesion, homing, and recruitment of leukocytes to lymphoid organs [49], platelet functions [56], phagocytosis, and degranulation [34]. In addition, in humans, various diseases are caused by integrin deficiencies or malfunctions. For example,  $\beta$ 2 integrin deficiency is a deadly disease characterized by leukocyte malfunction and defective migration [57]. Also, the absence of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, the platelet integrin, promotes a bleeding disorder known as Glanzmann's thrombasthenia [56]. Thus, understanding the biology of integrins has relevance in the understanding of the normal functions of the hematopoietic system as well as in human disease.

Integrins exist in two different conformations, inactive and active. The inactive integrin is not capable of interacting with its ligand, and the active integrin can bind to it. Integrins have

the capacity to alter their activation state in response to cellular stimulation, thus modulating their adhesive phenotype [21]. This integrin activation is essential for the proper function of integrins, as only the active integrin binds its ligand. This essential function of integrins is further underscored by the fact that deficiencies in the ability to activate  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 3 integrins result in a disease that mimics  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3 absence [55]. In addition to integrin activation, it has been appreciated that integrins can up-regulate their numbers on the cell surface and cluster upon stimulation, further adding to their functional capacities [32].

The mechanisms of integrin activation and their regulation are not yet clearly defined. Integrin activation seems to involve a conformational change [20, 45, 58]. This conformational change can be elicited from the inside of the cell or from the outside of the cell with mAb [59]. The intracellular events that



**Fig. 9.**  $\beta$ 1 integrin activation secondary to Fc $\gamma$ RIIIB stimulation seems independent of lipid raft integrity. (A) Human neutrophils were incubated with FITC-labeled F(ab')<sub>2</sub> fragments of mAb 3G8, and Fc $\gamma$ RIIIB expression on the cell surface was analyzed by flow cytometry in the absence or presence of 10 mM methyl- $\beta$ -cyclodextrin. (B) Activation of  $\beta$ 1 integrins was assessed as in Figure 5 in the absence or presence of 10 mM methyl- $\beta$ -cyclodextrin. Data are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (C) Human neutrophils were treated and stained as in Figure 7, but the experiment was performed in the presence of 10 mM methyl- $\beta$ -cyclodextrin. Over 100 cells were analyzed for each condition in at least two separate experiments. Original scale bar is 10  $\mu$ m. Representative images are shown.

lead to this conformational change are not clear yet, but several stimuli have been shown to promote integrin activation in different cellular systems. Integrins are known to become activated in response to T cell receptor signaling, chemokines, selectins, phorbol esters, and Fc $\gamma$ R stimulation [22].

FcR stimulation has been identified as an important activator of integrins in neutrophils and other cell types. [24, 33–36]. In neutrophils,  $\beta$ 2 integrin up-regulation and activation have been shown to occur after Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIIIB stimulation [24, 32]. Fc $\gamma$ RII- and Fc $\gamma$ RIIIB-mediated  $\beta$ 2 integrin up-regulation occurred through a biochemical cascade that involves PI-3K [32]. Our results described here show that in the case of Fc $\gamma$ RIIIB stimulation, Src-family tyrosine kinases and Syk kinase, in addition to PI-3K, are involved in the up-regulation of  $\beta$ 2 integrins. This biochemical pathway, emerging from Fc $\gamma$ RIIIB, is similar to the traditional ITAM-based signaling of Fc $\gamma$ RII [2]. This signaling mechanism for Fc $\gamma$ RIIIB-mediated  $\beta$ 2 integrin up-regulation makes it attractive to speculate that indeed, Fc $\gamma$ RIIIB recruits Fc $\gamma$ RII to mediate intracellular signaling, as has been suggested by other authors [12]. However, the fact that Fc $\gamma$ RIIIB but not Fc $\gamma$ RII promoted  $\beta$ 1 integrin activation points to the idea that other signaling mechanisms for Fc $\gamma$ RIIIB must exist.

$\beta$ 1 integrin responses, after Fc $\gamma$ R stimulation, were different from those of  $\beta$ 2 integrins. When PMN were stimulated by Fc $\gamma$ RII or Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking,  $\beta$ 1 integrin expression on the cell surface remained intact. It had been reported previously that  $\beta$ 2 integrins exist preformed in the secretory granules of human neutrophils [60]. The degranulation that occurs secondary to Fc $\gamma$ R stimulation seems to be responsible for the observed increase in the number of  $\beta$ 2 integrins on the cell surface. As  $\beta$ 1 integrin numbers on the cell surface did not increase after Fc $\gamma$ RII or Fc $\gamma$ RIIIB stimulation, it can be argued that these preformed vesicles do not contain  $\beta$ 1 integrins.

Although no  $\beta$ 1 integrin up-regulation was observed after Fc $\gamma$ R stimulation, Fc $\gamma$ RIIIB promoted  $\beta$ 1 integrin activation that led to increased fibronectin binding. Contrary to Fc $\gamma$ RIIIB-mediated  $\beta$ 2 integrin up-regulation, Fc $\gamma$ RIIIB-mediated  $\beta$ 1 activation was independent of the enzymatic activity of PI-3K and Src-family kinases. This suggests that Fc $\gamma$ RIIIB is capable of activating at least two different signaling pathways in human neutrophils: one that could use a signaling pathway similar to the ITAM signaling machinery of Fc $\gamma$ RII to promote up-regulation of  $\beta$ 2 integrins and another independent pathway to activate  $\beta$ 1 integrins.

As Fc $\gamma$ RIIIB activates  $\beta$ 1 integrins independently of a classical, biochemical pathway, we thought that another possibility for this activation was the interaction of the receptors on the cell surface. This idea is supported by the fact that Fc $\gamma$ RIIIB has been shown to interact with at least Fc $\gamma$ RII and  $\beta$ 2 integrins [7, 11, 33]. It is generally perceived that Fc $\gamma$ RIIIB and  $\beta$ 2 integrins interact almost permanently on the cell surface of the human neutrophil, as has been interpreted by some authors [61]. This perception aroused from studies using fluorescence resonance energy transfer (FRET), which showed that Fc $\gamma$ RIIIB and  $\beta$ 2 integrins were capable of interacting on the cell surface after transfection on fibroblasts [9, 62]. However, these studies did not show that this interaction is permanent. Our colocalization studies show that contrary to

this perception, Fc $\gamma$ RIIIB and  $\beta$ 2 integrins are not together on the cell surface all the time but only colocalize after Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking. A finding that is in accordance with FRET studies but restricts the interactions of Fc $\gamma$ RIIIB and  $\beta$ 2 integrins to the Fc $\gamma$ RIIIB-activated neutrophil.

Based on the existence of interactions between Fc $\gamma$ RIIIB and  $\beta$ 2 integrins after Fc $\gamma$ RIIIB stimulation, we examined the location of active  $\beta$ 1 integrins on the cell membrane of PMN. We found that Fc $\gamma$ RIIIB and active  $\beta$ 1 integrins colocalize on the PMN membrane. This finding suggests that interactions between the two receptors may be responsible for the activation of  $\beta$ 1 integrins. Additionally, it was recently found that a urokinase-type plasminogen activator receptor, a GPI-linked receptor, is capable of associating laterally with  $\beta$ 1 integrins on the cell surface [63]. As Fc $\gamma$ RIIIB is also a GPI-linked receptor, this finding further supports the idea that  $\beta$ 1 integrins have the capacity of engaging Fc $\gamma$ RIIIB in lateral associations on the cell surface.

Although our findings support the notion that Fc $\gamma$ RIIIB activates  $\beta$ 1 integrins by interactions on the cell surface, other possibilities exist. Small GTPases of several families have been implicated in  $\beta$ 1 integrin activation in several cell types [64–69]. So, it is possible that some of them may be responsible for the regulation of the signaling to  $\beta$ 1 integrins after Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking.

We found that when cross-linking of Fc $\gamma$ RIIIB was performed in the presence of Piceatannol, the colocalization between Fc $\gamma$ RIIIB and the active  $\beta$ 1 integrins was enhanced, suggesting that Syk might negatively regulate this phenomenon. Syk is considered a key mediator of Fc $\gamma$ R signaling [70] and has also been shown recently to be critical for several integrin functions in the human neutrophil [71]. Also, Syk has been shown to interact directly with the cytoplasmic tails of  $\beta$ 3 and  $\beta$ 1A integrins [72–74]. Syk has also been found to regulate the binding cycle of  $\beta$ 2 integrins [75]. So, precedents exist where Syk regulates integrin events by interacting directly with the integrin cytoplasmic tails. As with all pharmacological inhibitors, Piceatannol is not completely specific for Syk, and high doses have been shown to interfere with other enzymes [76]. Nonetheless, the use of Resveratrol, a Piceatannol analog without activity toward Syk, supports the notion that Syk is actively involved in the regulation of  $\beta$ 1 integrin activation secondary to Fc $\gamma$ RIIIB stimulation. Although Resveratrol did not affect  $\beta$ 1 integrin activation as much as Piceatannol, high doses also stimulated an increase in  $\beta$ 1 integrin activation, which suggests that other proteins may also regulate  $\beta$ 1 integrin activation. Unfortunately, it is not known if Resveratrol has any specific targets on PMN. Whether blocking Syk affects  $\beta$ 1 integrins directly or interferes indirectly with other elements that modulate integrin activation, such as the cytoskeleton, is an interesting question. Our results suggest that a direct effect seems more possible, as disrupting the actin cytoskeleton did not produce an increase in  $\beta$ 1 activation of the same magnitude as that of the treatment with Piceatannol, albeit there was a minor increase in  $\beta$ 1 integrin activation after treatment with high doses of cytochalasin. Although at these doses, the effects of cytochalasin may be somewhat unspecific, this finding is in agreement with previous reports showing that



disruption of the cytoskeleton frees the integrin intracytoplasmic tails and thus facilitates activation.

Fc $\gamma$ RIIIB is a GPI-linked receptor and is presumed to float on the outer leaflet of the cell membrane in cholesterol-enriched lipid rafts. As a result of this fact, the use of cholesterol-depleting agents could tell us whether lipid rafts play any significant role in the activation of  $\beta$ 1 integrins secondary to Fc $\gamma$ RIIIB. Our results suggest that  $\beta$ 1 integrin activation and colocalization with Fc $\gamma$ RIIIB, in this case, are independent of lipid raft function. This result, however, should be examined carefully in light of the fact that cholesterol depletion of PMN has been shown to promote degranulation [77], shedding of GPI-linked proteins [47], activation of small GTPases [78], and polymerization of actin [78]; so establishing a clear role for lipid rafts may not be possible using this approach. Still, our results are in agreement with those of Pierini and collaborators [79]. This group showed that CD44 (a lipid raft marker) was localized to the uropod of formyl-Met-Leu-Phe-stimulated PMN and that this redistribution upon stimulation was lost when cells were treated with methyl- $\beta$ -cyclodextrin. Our results show that although Fc $\gamma$ RIIIB stimulation in untreated PMN results in the formation of clusters on the cell membrane, these clusters are no longer seen in methyl- $\beta$ -cyclodextrin-treated cells, thus reflecting the importance of lipid raft integrin for the adequate distribution of raft-associated proteins.

It is possible to imagine that after Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking, Fc $\gamma$ RIIIB may undergo a "conformational change", which may expose certain areas of the molecule so that interactions with  $\beta$ 1 integrins become possible. This association will in turn promote  $\beta$ 1 integrin activation, which would be tightly regulated by the interaction between Syk and the  $\beta$ 1 integrin cytoplasmic tail. When Piceatannol blocks the activity of Syk, the interactions between Fc $\gamma$ RIIIB and  $\beta$ 1 integrins are no longer regulated, which permits a broader activation of  $\beta$ 1 integrins. The activity of Syk required to maintain the  $\beta$ 1 integrins tightly regulated would be minimal, as only large doses of Piceatannol promote  $\beta$ 1 integrin activation deregulation. Although highly speculative, this model provides a working hypothesis for the activation of  $\beta$ 1 integrins secondary to Fc $\gamma$ RIIIB cross-linking. A clear demonstration of this hypothesis would come from immunoprecipitation studies if Fc $\gamma$ RIIIB could be isolated and shown to associate with  $\beta$ 1 integrins after stimulation. These immunoprecipitation studies would also show if interactions between Fc $\gamma$ RIIIB and  $\beta$ 1 integrins exist even before stimulation, a fact that would explain the apparent absence of a signaling intermediate between Fc $\gamma$ RIIIB stimulation and  $\beta$ 1 integrin activation. It was not possible, however, to perform this experiment, as the recovery of Fc $\gamma$ RIIIB after cellular lysis was not feasible using the reagents available to us today.

In the human neutrophil, Fc $\gamma$ RIIIB expression is 10 times higher than that of Fc $\gamma$ RIIA [80]. This suggests that Fc $\gamma$ RIIIB is the first Fc $\gamma$ R that the neutrophil uses to recognize immune complexes. Indeed, evidence for a major role of Fc $\gamma$ RIIIB in immune complex recognition in rolling neutrophils has been reported recently [16]. After Fc $\gamma$ R stimulation, integrins get activated ([24] and this report), generating a more adhesive phenotype for the PMN. It is clear that  $\beta$ 2 integrins are important for transendothelial migration, yet the role for acti-

vated  $\beta$ 1 integrins is not as clear.  $\beta$ 1 integrins have been shown to be important for the migration of PMN through the extracellular matrix [51, 81–83]. Also, in patients and mice with  $\beta$ 2 integrin deficiency, recruitment of PMN to the lung remains intact [57, 84], suggesting that  $\beta$ 1 integrins could be responsible for this migration. Thus,  $\beta$ 1 integrin activation could be an important mechanism to recruit PMN from the circulation to certain tissues in response to immune complexes.

In conclusion, this report shows for the first time that human neutrophils are capable of activating  $\beta$ 1 integrins in response to Fc $\gamma$ RIIIB stimulation. This Fc $\gamma$ RIIIB-mediated  $\beta$ 1 integrin activation is independent of the enzymatic activity of PI-3K and Src-family tyrosine kinases and may be mediated through interactions between Fc $\gamma$ RIIIB and  $\beta$ 1 integrins.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grant 36407-M from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico, and by Grant IN220703 from DGAPA-UNAM, Mexico. We thank Nancy Mora for excellent technical assistance, Dr. Ted Yednock for mAb 15/7, Dr. Mark Ginsberg for the plasmid encoding the GST-Fn9-11 recombinant protein, Dr. Pavel Isa for the plasmid encoding GST alone, and all the blood donors who made this work possible.

## REFERENCES

1. Rosales, C., Brown, E. J. (1993) Neutrophil collaboration in the immune response. In *The Neutrophil* (J. G. Wheeler, J. S. Abramson, eds.), New York, NY, Oxford University Press, 23–62.
2. Sanchez-Mejorada, G., Rosales, C. (1998) Fc $\gamma$  receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras. *J. Biol. Chem.* **273**, 27610–27619.
3. Ravetch, J. V. (1997) Fc receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 121–125.
4. Ravetch, J. V., Bolland, S. (2001) IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 275–290.
5. Ravetch, J. V., Kinetic, J. P. (1991) Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 457–492.
6. Isakov, N. (1997) Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades. *J. Leukoc. Biol.* **61**, 6–16.
7. Zhou, M., Todd III, R. F., van de Winkel, J. G., Petty, H. R. (1993) Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with Fc $\gamma$  receptor III on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions. *J. Immunol.* **150**, 3030–3041.
8. Zhou, M., Brown, E. J. (1994) CR3 (Mac-1,  $\alpha$ M $\beta$ 2, CD11b/CD18) and Fc $\gamma$ RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc $\gamma$ RIII and tyrosine phosphorylation. *J. Cell Biol.* **125**, 1407–1416.
9. Poo, H., Krauss, J. C., Mayo-Bond, L., Todd III, R. F., Petty, H. R. (1995) Interaction of Fc $\gamma$ R 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.
10. van Spruel, A. B., Leusen, J. H., van Egmond, M., Dijkman, H. B., Assmann, K. J., Mayadas, T. N., van de Winkel, J. G. (2001) Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood* **97**, 2478–2486.
11. Petty, H. R., Worth, R. G., Todd III, R. F. (2002) Interactions of integrins with their partner proteins in leukocyte membranes. *Immunol. Res.* **25**, 75–95.
12. Chuang, F. Y., Sassaroli, M., Unkeless, J. C. (2000) Convergence of Fc $\gamma$  receptor IIa and Fc $\gamma$  receptor IIb signaling pathways in human neutrophils. *J. Immunol.* **164**, 350–360.

13. 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 $\gamma$ RIII, CD16) triggers cell activation through interaction with complement receptors. *J. Immunol.* **157**, 1184–1192.
14. Coxon, P. Y., Rane, M. J., Powell, D. W., Klein, J. B., McLeish, K. R. (2000) Differential mitogen-activated protein kinase stimulation by Fc $\gamma$ RIIa and Fc $\gamma$ RIIIb determines the activation phenotype of human neutrophils. *J. Immunol.* **164**, 6530–6537.
15. Durand, V., Renaudineau, Y., Pers, J. O., Youinou, P., Jamin, C. (2001) Cross-linking of human Fc $\gamma$ RIIIb induces the production of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* **167**, 3996–4007.
16. Coxon, A., Cullere, X., Knight, S., Sethi, S., Wakelin, M. W., Stavakis, G., Lusinskas, F. W., Mayadas, T. N. (2001) Fc $\gamma$ RIII mediates neutrophil recruitment to immune complexes: a mechanism for neutrophil accumulation in immune-mediated inflammation. *Immunity* **14**, 693–704.
17. Edberg, J. C., Moon, J. J., Chang, D. J., Kimberly, R. P. (1998) Differential regulation of human neutrophil Fc $\gamma$ RIIa (CD32) and Fc $\gamma$ RIIIb (CD16)-induced Ca<sup>2+</sup> transients. *J. Biol. Chem.* **273**, 8071–8079.
18. Hynes, R. O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11–25.
19. Hughes, P. E., Pfaff, M. (1998) Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol.* **8**, 359–364.
20. Liddington, R. C., Ginsberg, M. H. (2002) Integrin activation takes shape. *J. Cell Biol.* **158**, 833–839.
21. Ginsberg, M. H., Du, X., Plow, E. F. (1992) Inside-out integrin signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 766–771.
22. Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687.
23. DiVietro, J. A., Smith, M. J., Smith, B. R., Petruzzelli, L., Larson, R. S., Lawrence, M. B. (2001) Immobilized IL-8 triggers progressive activation of neutrophils rolling in vitro on P-selectin and intercellular adhesion molecule-1. *J. Immunol.* **167**, 4017–4025.
24. Jones, S. L., Knaus, U. G., Bokoch, G. M., Brown, E. J. (1998) Two signaling mechanisms for activation of  $\alpha$ M  $\beta$ 2 avidity in polymorphonuclear neutrophils. *J. Biol. Chem.* **273**, 10556–10566.
25. Rowin, M. E., Whatley, R. E., Yednock, T., Bohnsack, J. F. (1998) Intracellular calcium requirements for  $\beta$ 1 integrin activation. *J. Cell. Physiol.* **175**, 193–202.
26. Loike, J. D., Cao, L., Budhu, S., Marcantonio, E. E., El Khoury, J., Hoffman, S., Yednock, T. A., Silverstein, S. C. (1999) Differential regulation of  $\beta$ 1 integrins by chemoattractants regulates neutrophil migration through fibrin. *J. Cell Biol.* **144**, 1047–1056.
27. Ley, K. (2002) Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol. Rev.* **186**, 8–18.
28. Jones, S. L. (2002) Protein kinase A regulates  $\beta$ 2 integrin avidity in neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 1042–1048.
29. Seo, S. M., McIntire, L. V., Smith, C. W. (2001) Effects of IL-8, Gro- $\alpha$ , and LTB<sub>4</sub> on the adhesive kinetics of LFA-1 and Mac-1 on human neutrophils. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**, C1563–C1578.
30. Yednock, T. A., Cannon, C., Vandever, C., Goldbach, E. G., Shaw, G., Ellis, D. K., Liaw, C., Fritz, I. C., Tanner, L. I. (1995)  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin-dependent cell adhesion is regulated by a low-affinity receptor pool that is conformationally responsive to ligand. *J. Biol. Chem.* **270**, 28740–28750.
31. Tang, T., Rosenkranz, A., Assmann, K. J., Goodman, M. J., Gutierrez-Ramos, J. C., Carroll, M. C., Cotran, R. S., Mayadas, T. N. (1997) A role for Mac-1 (CD11b/CD18) in immune complex-stimulated neutrophil function in vivo: Mac-1 deficiency abrogates sustained Fc $\gamma$  receptor-dependent neutrophil adhesion and complement-dependent proteinuria in acute glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* **186**, 1853–1863.
32. Kocher, M., Siegel, M. E., Edberg, J. C., Kimberly, R. P. (1997) Cross-linking of Fc $\gamma$ RIIa and Fc $\gamma$ RIIIb induces different proadhesive phenotypes on human neutrophils. *J. Immunol.* **159**, 3940–3948.
33. Ortiz-Stern, A., Rosales, C. (2003) Cross-talk between Fc receptors and integrins. *Immunol. Lett.* **90**, 137–143.
34. Graham, I. L., Lefkowitz, J. B., Anderson, D. C., Brown, E. J. (1993) Immune complex-stimulated neutrophil LTB<sub>4</sub> production is dependent on  $\beta$ 2 integrins. *J. Cell Biol.* **120**, 1509–1517.
35. Kinashi, T., Asaoka, T., Setoguchi, R., Takatsu, K. (1999) Affinity modulation of very late antigen-5 through phosphatidylinositol 3-kinase in mast cells. *J. Immunol.* **162**, 2850–2857.
36. Andrews, R. P., Kepley, C. L., Youssef, L., Wilson, B. S., Oliver, J. M. (2001) Regulation of the very late antigen-4-mediated adhesive activity of normal and nonreleaser basophils: roles for Src, Syk, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 776–782.
37. Huges, P. E., Oertli, B., Hansen, M., Chou, F.-L., Willumsen, B. M., Ginsberg, M. H. (2002) Suppression of integrin activation by activated Ras or Raf does not correlate with bulk activation of ERK MAP kinase. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2256–2265.
38. Rosales, C., Brown, E. J. (1991) Two mechanisms for IgG Fc-receptor-mediated phagocytosis by human neutrophils. *J. Immunol.* **146**, 3937–3944.
39. Rosales, C., Brown, E. J. (1992) Signal transduction by neutrophil IgG Fc receptors: dissociation of [Ca<sup>2+</sup>] rise from IP<sub>3</sub>. *J. Biol. Chem.* **267**, 5265–5271.
40. Reyes-Reyes, M., Mora, N., Zentella, A., Rosales, C. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase mediates integrin-dependent NF- $\kappa$ B and MAPK activation through separate signaling pathways. *J. Cell Sci.* **114**, 1579–1589.
41. Rosales, C., Brown, E. J. (1992) Calcium channel blockers nifedipine and diltiazem inhibit Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores in neutrophils. *J. Biol. Chem.* **267**, 1443–1448.
42. Garcia-Garcia, E., Sanchez-Mejorada, C., Rosales, C. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase and ERK are required for NF- $\kappa$ B activation, but not for phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 649–658.
43. Ramos, J. W., DeSimone, D. W. (1996) Xenopus embryonic cell adhesion to fibronectin: position-specific activation of RGD/synergy site-dependent migratory behavior at gastrulation. *J. Cell Biol.* **134**, 227–240.
44. Strohmeier, G. R., Brunkhorst, B. A., Seetoo, K. F., Meshulam, T., Bernardo, J., Simons, E. R. (1995) Role of the Fc $\gamma$ R subclasses Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIII in the activation of human neutrophils by low and high valency immune complexes. *J. Leukoc. Biol.* **58**, 415–422.
45. Salas, A., Shimaoka, M., Chen, S., Carman, C. V., Springer, T. (2002) Transition from rolling to firm adhesion is regulated by the conformation of the I domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *J. Biol. Chem.* **277**, 50255–50262.
46. Maccaglia, A., Mallozzi, C., Minetti, M. (2003) Differential effects of quercetin and resveratrol on Band 3 tyrosine phosphorylation signalling of red blood cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 541–547.
47. Ilangumaran, S., Hoessli, D. C. (1998) Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J.* **335**, 433–440.
48. Barabe, F., Pare, G., Fernandes, M. J., Bourgoin, S. G., Naccache, P. H. (2002) Cholesterol-modulating agents selectively inhibit calcium influx induced by chemoattractants in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **277**, 13473–13478.
49. Lu, T. T., Cyster, J. G. (2002) Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science* **297**, 409–412.
50. Werr, J., Xie, X., Hedqvist, P., Ruoslahti, E., Lindbom, L. (1998)  $\beta$ 1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue in vivo. *J. Exp. Med.* **187**, 2091–2096.
51. Taooka, Y., Chen, J., Yednock, T., Sheppard, D. (1999) The integrin  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1. *J. Cell Biol.* **145**, 413–420.
52. Reyes-Reyes, M., Mora, N., Gonzalez, G., Rosales, C. (2002)  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 integrins activate different signalling pathways in monocytes. *Biochem. J.* **363**, 273–280.
53. Brakebusch, C., Fillatreau, S., Potocnik, A. J., Bungartz, G., Wilhelm, P., Svensson, M., Kearney, P., Korner, H., Gray, D., Fassler, R. (2002)  $\beta$ 1 integrin is not essential for hematopoiesis but is necessary for the T cell-dependent IgM antibody response. *Immunity* **16**, 465–477.
54. Dangerfield, J., Larbi, K. Y., Huang, M. T., Dewar, A., Nourshargh, S. (2002) PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of  $\alpha$ 6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *J. Exp. Med.* **196**, 1201–1211.
55. McDowall, A., Inwald, D., Leitinger, B., Jones, A., Liesner, R., Klein, N., Hogg, N. (2003) A novel form of integrin dysfunction involving  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 3 integrins. *J. Clin. Invest.* **111**, 51–60.
56. Tomiyama, Y. (2000) Glanzmann thrombasthenia: integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 deficiency. *Int. J. Hematol.* **72**, 448–454.
57. Hawkins, H., Heffelfinger, S., Anderson, D. (1992) Leukocyte adhesion deficiency: clinical and postmortem observations. *Pediatr. Pathol.* **12**, 119–130.
58. Takagi, J., Springer, T. A. (2002) Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol. Rev.* **186**, 141–163.
59. Arroyo, A. G., Garcia-Pardo, A., Sanchez-Madrid, F. (1993) A high affinity conformational state on VLA integrin heterodimers induced by an anti- $\beta$ 1 chain monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **268**, 9863–9868.
60. Borregaard, N., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Diamond, M. S., Springer, T. A., Anderson, H. C., Kishimoto, T. K., Bainton, D. F. (1994) Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *J. Leukoc. Biol.* **56**, 80–87.

61. Jongstra-Bilen, J., Harrison, R., Grinstein, S. (2003) Fc $\gamma$ -receptors induce Mac-1 (CD11b/CD18) mobilization and accumulation in the phagocytic cup for optimal phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 45720–45729.
62. Kindzelskii, A. L., Yang, Z., Nabel, G. J., Todd III, R. F., Petty, H. R. (2000) Ebola virus secretory glycoprotein (sGP) diminishes Fc $\gamma$ RIIIB-to-CR3 proximity on neutrophils. *J. Immunol.* **164**, 953–958.
63. Tarui, T., Andronicos, N., Czekay, R-P., Mazar, A. P., Bdeir, K., Parry, G. C., Kuo, A., Loskutoff, D. J., Cines, D. B., Takada, Y. (2003) Critical role of integrin  $\alpha 5\beta 1$  in urokinase (uPA)/urokinase receptor (uPAR, CD87) signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 29863–29872.
64. Berrier, A. L., Mastrangelo, A. M., Downward, J., Ginsberg, M., LaFlamme, S. E. (2000) Activated R-ras, Rac1, PI 3-kinase and PKC $\epsilon$  can each restore cell spreading inhibited by isolated integrin  $\beta 1$  cytoplasmic domains. *J. Cell Biol.* **151**, 1549–1560.
65. Katagiri, K., Hattori, M., Minato, N., Irie, S., Takatsu, K., Kinashi, T. (2000) Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1956–1969.
66. Kinashi, T., Katagiri, K., Watanabe, S., Vanhaesebroeck, B., Downward, J., Takatsu, K. (2000) Distinct mechanisms of  $\alpha 5\beta 1$  integrin activation by Ha-Ras and R-Ras. *J. Biol. Chem.* **275**, 22590–22596.
67. Miao, H., Li, S., Hu, Y. L., Yuan, S., Zhao, Y., Chen, B. P., Puzon-McLaughlin, W., Tarui, T., Shyy, J. Y., Takada, Y., Usami, S., Chien, S. (2002) Differential regulation of Rho GTPases by  $\beta 1$  and  $\beta 3$  integrins: the role of an extracellular domain of integrin in intracellular signaling. *J. Cell Sci.* **115**, 2199–2206.
68. Ridley, A. J. (2001) Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* **114**, 2713–2722.
69. Bos, J. L., de Bruyn, K., Enserink, J., Kuiperij, B., Rangarajan, S., Rehmann, H., Riedl, J., de Rooij, J., van Mansfeld, F., Zwartkruis, F. (2003) The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 83–86.
70. Fitzer-Attas, C. J., Lowry, M., Crowley, M. T., Finn, A. J., Meng, F., DeFranco, A. L., Lowell, C. A. (2000) Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases *Hck*, *Fgr*, and *Lyn*. *J. Exp. Med.* **191**, 669–682.
71. Mocsai, A., Zhou, M., Meng, F., Tybulewicz, V. L., Lowell, C. A. (2002) Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* **16**, 547–558.
72. Miller, L. A., Hong, J. J., Kinch, M. S., Harrison, M. L., Geahlen, R. L. (1999) The engagement of  $\beta 1$  integrins on promonocytic cells promotes phosphorylation of Syk and formation of a protein complex containing *Lyn* and  $\beta 1$  integrin. *Eur. J. Immunol.* **29**, 1426–1434.
73. Woodside, D. G., Obergfell, A., Leng, L., Wilsbacher, J. L., Miranti, C. K., Brugge, J. S., Shattil, S. J., Ginsberg, M. H. (2001) Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin  $\beta$  cytoplasmic domains. *Curr. Biol.* **11**, 1799–1804.
74. Woodside, D. G., Obergfell, A., Talapatra, A., Calderwood, D. A., Shattil, S. J., Ginsberg, M. H. (2002) The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin  $\beta$  cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* **277**, 39401–39408.
75. Willeke, T., Schymeinsky, J., Prange, P., Zahler, S., Walzog, B. (2003) A role for Syk-kinase in the control of the binding cycle of the  $\beta 2$  integrins (CD11/CD18) in human polymorphonuclear neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 260–269.
76. Wang, B. H., Lu, Z. X., Polya, G. M. (1998) Inhibition of eukaryote serine/threonine-specific protein kinases by piceatannol. *Planta Med.* **64**, 195–199.
77. Tuluc, F., Meshki, J., Kunapuli, S. P. (2003) Membrane lipid microdomains differentially regulate intracellular signaling events in human neutrophils. *Int. Immunopharmacol.* **3**, 1775–1790.
78. Fessler, M. B., Arndt, P. G., Frasch, S. C., Lieber, J. G., Johnson, C. A., Murphy, R. C., Nick, J. A., Bratton, D. L., Malcolm, K. C., Worthen, G. S. (2004) Lipid rafts regulate lipopolysaccharide-induced activation of Cdc42 and inflammatory functions of the human neutrophil. *J. Biol. Chem.* **279**, 39989–39998.
79. Pierini, L. M., Eddy, R. J., Fuortes, M., Seveau, S., Casulo, C., Maxfield, F. R. (2003) Membrane lipid organization is critical for human neutrophil polarization. *J. Biol. Chem.* **278**, 10831–10841.
80. Unkeless, J. C., Shen, Z., Lin, C. W., DeBeus, E. (1995) Function of human Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIB. *Semin. Immunol.* **7**, 37–44.
81. Werr, J., Johansson, J., Eriksson, E. E., Hedqvist, P., Ruoslahti, E., Lindbom, L. (2000) Integrin  $\alpha 2\beta 1$  (VLA-2) is a principal receptor used by neutrophils for locomotion in extravascular tissue. *Blood* **95**, 1804–1809.
82. Werr, J., Eriksson, E. E., Hedqvist, P., Lindbom, L. (2000) Engagement of  $\beta 2$  integrins induces surface expression of  $\beta 1$  integrin receptors in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 553–560.
83. Sixt, M., Hallmann, R., Wendler, O., Scharffetter-Kochanek, K., Sorokin, L. M. (2001) Cell adhesion and migration properties of  $\beta 2$ -integrin negative polymorphonuclear granulocytes on defined extracellular matrix molecules. Relevance for leukocyte extravasation. *J. Biol. Chem.* **276**, 18878–18887.
84. Mizgerd, J. P., Horwitz, B. H., Quillen, H. C., Scott, M. L., Doerschuk, C. M. (1999) Effects of CD18 deficiency on the emigration of murine neutrophils during pneumonia. *J. Immunol.* **163**, 995–999.

# Cross-talk between Fc receptors and integrins

Alejandro Ortiz-Stern, Carlos Rosales\*

*Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México,  
Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, México D.F., C.P. 04510, Mexico*

Received 18 July 2003; accepted 26 August 2003

## Abstract

Fc receptors (FcRs) and integrins are both key players of immune responses. These receptors are capable of independent signaling that leads to various cell functions. Recently, it is becoming clear that these receptors are also capable of modulating each other's responses. This modulation is achieved by direct physical interactions of the receptors on the cell surface, or by one receptor modifying the signaling pathway of the other receptor. Receptor co-localization and resonance energy transfer studies have shown that Fc receptors and integrins interact on the cell surface. Biochemical and functional studies have shown that signaling from Fc receptors modulates integrin adhesiveness through a process called "inside-out signaling". Other studies also show that the signaling from integrins modulates Fc receptor responses such as adhesion to immune complexes and cell mediated antibody-dependent cytotoxicity. This bi-directional cross-talk between Fc receptors and integrins is very important for the final cell function. Here, we review the latest information about interactions between Fc receptors and integrins.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Fc receptors; Integrins; Inside-out signaling

## 1. Introduction

Cells receive a multitude of stimuli from their environment and respond accordingly. Some of these responses take a long time, involving signaling to the nucleus and synthesis of new proteins. Other responses involve already synthesized proteins, and modulate cell functions on the short-term. Some stimuli promote both long- and short-term responses. Fc receptors (FcRs) and integrins are not only capable of promoting both long- and short-term responses, but they are also capable of modulating each other. This cross-talk adds a major complexity to the signaling capabilities of these two groups of receptors. In this review, we examine the evidence for this cross-talk and some of the cellular mechanisms involved in modulating it.

## 2. Fc receptors

Fc receptors comprise a family of membrane proteins capable of interacting with the constant region of immunoglob-

ulins (Ig). Fc receptors are important mediators of immune responses. These responses range from effector functions such as phagocytosis, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), cell degranulation, production, and secretion of chemokines, to immunomodulatory functions such as regulation of lymphocyte proliferation, antibody secretion, and antigen presentation.

Fc receptors are named according to the immunoglobulin heavy chain isotype they bind [1]. For example, the receptor for IgA is called Fc $\alpha$ R, but the receptor for IgM, which is also capable of binding IgA, is called Fc $\alpha/\mu$ R. To date, three types of receptors for IgG have been identified [2], two types of receptors for IgE [3], and one type for each IgA [4], IgD [5], and IgM [6]. There are two other types of Fc receptors, the polyIgG receptor [7] and the FcnR [8]. The polyIgG receptor transports IgM and IgA across epithelium, while the FcnR binds and transports IgG across cells, and also regulates serum IgG levels. Of these receptors, the most studied to date have been those for IgG and IgE. Although studies on the responses generated by the other Ig receptors are slowly emerging.

Fc $\alpha$ R, Fc $\gamma$ RI, and Fc $\gamma$ RIIIA share a common structure [1,4] (Fig. 1). They have an  $\alpha$  chain which is a trans-membrane protein with extracellular Ig-like domains. These Ig-like domains are responsible for the interaction

\* Corresponding author. Tel.: +52-55-56223883;

fax: +52-55-56223369.

E-mail address: [carosal@servidor.unam.mx](mailto:carosal@servidor.unam.mx) (C. Rosales).

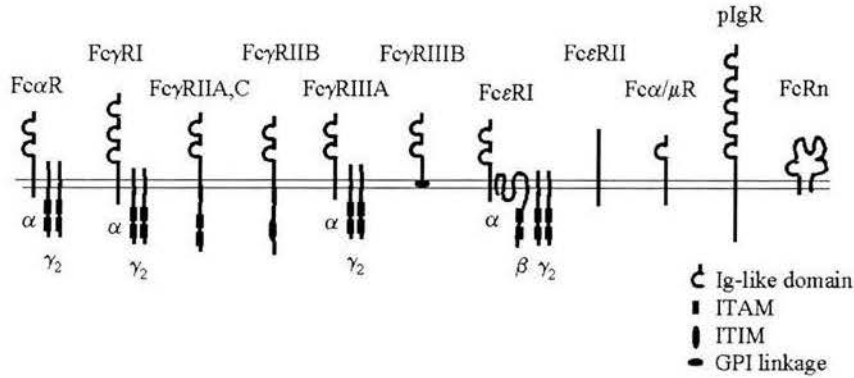


Fig. 1. Fc receptors. Schematic depiction of receptors for the Fc portion of immunoglobulins (Ig). Most Fc receptors (FcRs) contain immunoglobulin-like (Ig-like) domains in the extracellular portion of their  $\alpha$  chain. Thus, they belong to the Ig-superfamily. Exception to this are Fc $\epsilon$ RII and FcRn. Fc $\alpha$ R, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA,C, Fc $\gamma$ RIIIA, and Fc $\epsilon$ RI, all signal to the inside of the cell through an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). Fc $\gamma$ RIIB contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM). Fc $\gamma$ RIIIB is expressed only on neutrophils and is anchored to the cell membrane by a glycosidylphosphatidylinositol (GPI) linkage. The signaling mechanism of Fc $\gamma$ RIIIB, Fc $\epsilon$ RII, Fc $\alpha$ / $\mu$ R, pIgR, and FcRn is not clear to date.

with the Fc portions of immunoglobulins. They also have two associated  $\gamma$  chains which interact non-covalently with the  $\alpha$  chain. These  $\gamma$  chains are responsible for the signaling capacities of the receptors. The  $\gamma$  chains contain an amino acid sequence named immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) (Fig. 1). Tyrosines residues within the ITAM are essential for FcRs signaling [9].

Fc $\epsilon$ RI has an associated  $\beta$  chain in addition to the  $\alpha$  and  $\gamma$  chains. This  $\beta$  chain also contains ITAMs [1]. Fc $\epsilon$ RII is a low affinity IgE receptor, that belongs to the C-type lectin family [10]. Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIC receptors are single transmembrane proteins, in which the ITAMs are embedded in the same  $\alpha$  chain. These receptors, thus, do not need an associated  $\gamma$  chain for signaling [1]. Fc $\gamma$ RIIB is an inhibitory receptor with a single chain. Instead of an ITAM, Fc $\gamma$ RIIB has an ITIM, for immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif [11]. Fc $\gamma$ RIIIB is a glycosyl phosphatidylinositol (GPI) linked form of the Fc $\gamma$ RIII receptor [1]. Fc $\gamma$ RIIIB does not have associated chains and consequently no ITAMs. Fc $\alpha$ / $\mu$ R is a single trans-membrane protein that lacks either ITAMs or ITIMs, and does not have associated subunits [6]. The polyIg receptor is also a single trans-membrane protein, with no associated units, ITAMs or ITIMs [7]. The FcRn is structurally related to major histocompatibility complex class I proteins, and requires  $\beta$ 2-microglobulin for its full function [8]. To date the structure of the IgD receptor is not known, and there is still some controversy regarding its existence [5].

Most of the Fc receptors studied to date (Fc $\alpha$ R, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIIIA, and Fc $\epsilon$ RI) share a similar signaling mechanism. Upon interacting with its ligand the receptor is cross-linked, and its  $\alpha$  chain or its associated  $\gamma$  chains get phosphorylated by Src family kinases on specific tyrosines embedded in the ITAM. Upon phosphorylation of such tyrosines, the receptor becomes a docking site for SH2-domain containing proteins which propagate the signal inside the cell, generating a variety of cellu-

lar responses [9,12]. Fc $\gamma$ RIIB signaling differs from the model depicted above, in that its tyrosines are embedded in an ITIM. This ITIM, in contrast to ITAMs, serves to recruit phosphatases that down-modulate signals that emerge from activated receptors containing ITAMs [13]. Fc $\gamma$ RIIIB signaling mechanism remains the subject of active investigation, since it is a GPI-linked protein without a defined intracellular signaling partner [14–16]. The signaling mechanism of Fc $\alpha$ / $\mu$ R is not known at the moment [6].

Despite the similar mechanisms of signaling by Fc receptors, each receptor is capable of generating different cellular responses. This is because the ITAM sequences are different, and thus they can recruit different SH2-domain containing proteins. In addition, different cells also contain different components of any particular signaling cascade. Of all the cellular responses elicited by Fc receptors we will examine in this review the modulation of the integrin functions. Recently, other responses elicited by Fc receptors have been reviewed elsewhere [2,17–19].

### 3. Integrins

Integrins are a family of transmembrane receptors that comprises 24 members to date. Each integrin is a heterodimer formed by an  $\alpha$  and a  $\beta$  chain [20]. The name integrin was given to these receptors because they were found to integrate the extracellular matrix with the intracellular cytoskeleton. Integrins are named according to their corresponding  $\alpha$  and  $\beta$  chains, for example,  $\alpha$ 1 $\beta$ 1,  $\alpha$ 2 $\beta$ 1, and so on. As the study of integrin functions has evolved, it has become clear that integrins, besides acting as adhesion molecules, are also capable of signaling into the cell. Integrin signaling provides very important regulatory signals that control cell growth, differentiation, and survival (Fig. 2) [21–23].

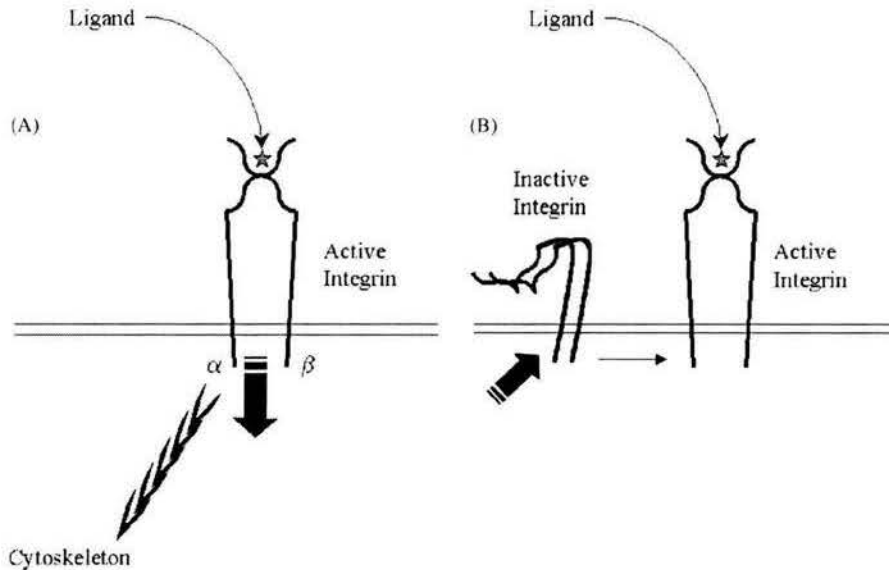


Fig. 2. Integrin signaling. (A) "Outside-in signaling". Integrins in their active state interact with their extracellular ligand. Upon interaction integrins signal to the inside of the cell (thick arrow), regulating functions such as cell growth, differentiation and survival. Integrins also serve as points of anchoring to the cytoskeleton. (B) "Inside-out signaling". Integrins in their inactive state become activated in response to signals from the inside of the cell (thick arrow). The final mechanism of this activation process, seems to involve the separation of the intracellular segments and the unfolding of the extracellular portion of the integrin. Thus, the integrin becomes competent to interact with its ligand.

In addition to signaling into the cell, integrins are themselves targets for regulation. This regulation within the cell appears to alter the affinity of the integrin for its ligand [24]. The capacity of the cell to regulate its adhesiveness via its integrins, represents a mechanism to respond rapidly to extracellular environmental changes. Such mechanism is particularly important, for example, in the recruitment of leukocytes to sites of inflammation or during immune responses [25]. The capacity of integrins to regulate their affinity has been termed "inside-out signaling", since the integrin responds to signals generated from inside the cell, as opposed to "outside-in signaling", where the cell responds to signals generated by the integrin (Fig. 2) [20]. The "outside-in signaling" generated by integrins generally involves the formation of clusters of integrins, where different signaling proteins are recruited. From these clusters, integrins can initiate signaling cascades. These clusters also serve as points of anchoring to the cytoskeleton and transduce mechanical signals to the inside of the cell (Fig. 2A). The "inside-out signaling" relies on proteins that when activated interact with the cytoplasmic tails of integrins and promote a conformational change in the integrin, probably through the disruption of the union between the  $\alpha$  and the  $\beta$  chains. This disruption promotes a straightening of the integrin on the cell surface, as well as the exposure of the ligand binding site (Fig. 2B).  $\beta 2$  integrins are of special mentioning because they are expressed only in leukocytes. There are four  $\beta 2$  integrins, all of them have the  $\beta 2$  chain coupled to a different  $\alpha$  chain. These integrins are:  $\alpha L\beta 2$ , an ICAM-1 receptor [26];  $\alpha M\beta 2$ , a complement receptor with phagocytic capacities [27];  $\alpha X\beta 2$ , also a complement receptor [28]; and  $\alpha D\beta 2$ , which has just been recently described in [29].

#### 4. Cross-talk between Fc receptors and integrins

Integrins are capable of regulating and be regulated by Fc receptors. We will examine in detail such interactions, specially those regarding  $\beta 2$  and  $\beta 1$  integrins. To date, three different types of interactions between Fc receptors and integrins have been described. First, a physical interaction between both types of receptors on the surface of the cell. Second, integrin responses that occur because of Fc receptor signaling, i.e. "inside-out signaling". Third, cellular responses to Fc receptors that occur only after integrin occupation or when both receptors are stimulated simultaneously, i.e. "outside-in signaling".

#### 5. Physical interaction between Fc receptors and integrins

At least three Fc receptors are known, and a fourth is suspected, to interact on the cell surface with integrins [30–33]. By means of resonance energy transfer, a technology which permits the detection of molecules that are closer than 7 nm apart, it has been found that Fc $\gamma$ RIIIB interacts with integrin  $\alpha M\beta 2$  on the membrane of the human neutrophil [30] (Fig. 3). Also, soluble Fc $\gamma$ RIIIB was capable of interacting with  $\alpha M\beta 2$  on the surface of human polymorphonuclear cells [34]. This interaction is suspected to occur via a lectin-like interaction, since it can be prevented by the presence of certain carbohydrates [35]. Due to the fact that Fc $\gamma$ RIIIB does not have an intracellular portion, it has been proposed that this interaction with  $\alpha M\beta 2$  allows Fc $\gamma$ RIIIB to generate cellular responses. The idea

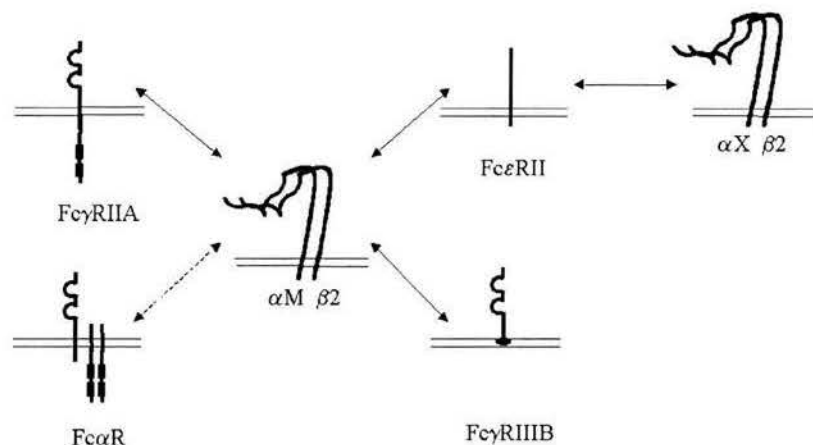


Fig. 3. Interactions between Fc receptors and integrins on the cell membrane.  $\beta 2$  integrins are known to interact with Fc receptors on the cell membrane. Both Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIB interact with  $\alpha M\beta 2$ , but their mode of interaction is different. Fc $\gamma$ RIIB interacts through lectin-like interactions, while Fc $\gamma$ RIIA does not. The nature of Fc $\gamma$ RIIA interaction to  $\alpha M\beta 2$  is not known. Fc $\epsilon$ RII also has been shown to interact with  $\alpha M\beta 2$  and  $\alpha X\beta 2$ . Although the interaction of Fc $\alpha$ R and  $\alpha M\beta 2$  has not been directly assessed, indirect evidence suggests that it occurs.

of  $\alpha M\beta 2$  being the molecule responsible for Fc $\gamma$ RIIB signaling has been supported by various lines of research [36–38]. When human neutrophils roll over immune complexes, the tethering phase is mediated by Fc $\gamma$ RIIB, and the arrest phase is mediated by both Fc $\gamma$ RIIB and  $\beta 2$  integrins [36], as discussed later. Urate crystals can activate human neutrophils by engaging Fc $\gamma$ RIIB due to a serendipitous interaction. This neutrophil activation depends on the capacity of Fc $\gamma$ RIIB to interact with  $\alpha M\beta 2$  [37]. When fibroblasts are transfected with Fc $\gamma$ RIIB, they are only capable of generating FcR-dependent responses when  $\alpha M\beta 2$  is cotransfected [38]. Even though the above results strongly suggest that Fc $\gamma$ RIIB and  $\alpha M\beta 2$  cooperate for all Fc $\gamma$ RIIB responses, this may not be absolutely true. Some studies involving protein phosphorylation and protein redistribution in which either receptor has been stimulated independently, demonstrated that each receptor generates different intracellular signals [39]. In addition, ligation of Fc $\gamma$ RIIB promotes an anti-apoptotic phenotype via the synthesis of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) [40]. This finding is not replicated by the cross-linking of  $\beta 2$  integrins. These reports suggest that  $\alpha M\beta 2$  and Fc $\gamma$ RIIB may not share all of their signaling capabilities.

Fc $\gamma$ RIIA is also known to interact with  $\beta 2$  integrins (Fig. 3). Similarly, to Fc $\gamma$ RIIB resonance energy transfer detected interactions between Fc $\gamma$ RIIA and  $\alpha M\beta 2$  [31]. But in contrast to Fc $\gamma$ RIIB, such interactions were not disrupted by carbohydrates (Fig. 3) [31]. Although these results indicate an interaction between Fc $\gamma$ RIIA and  $\alpha M\beta 2$ , other reports suggest that these receptors function independently. On polarized neutrophils, Fc $\gamma$ RIIA and  $\alpha M\beta 2$  traffic to different types of membrane protrusions. While Fc $\gamma$ RIIA translocates to the lamellipodium,  $\alpha M\beta 2$  moves to the uropod [31]. Nonetheless, functional cooperation on

the cell surface by these two receptors has been suggested by studies demonstrating that a tail-minus Fc $\gamma$ RIIA (which lacks ITAMs) is capable of phagocytosis when cotransfected with  $\alpha M\beta 2$  [41].

Another FcR that has been found to interact with  $\beta 2$  integrins on the cell surface is the low affinity receptor for IgE, Fc $\epsilon$ RII. It was found that monocytes undergo activation when Fc $\epsilon$ RII interacts with  $\alpha M\beta 2$  or with  $\alpha X\beta 2$ , but not with  $\alpha L\beta 2$  (Fig. 3). This interaction promoted the synthesis of cytokines and the increase of nitrite and other oxidative products. However, to date the importance of this interaction in vivo remains unknown [32].

Fc $\alpha$ R also appears to interact with  $\alpha M\beta 2$  (Fig. 3). Interaction between Fc $\alpha$ R and  $\alpha M\beta 2$  has not been studied using resonance energy transfer, but evidence for association of these two receptors comes from the fact that binding of neutrophils to secretory IgA is abolished in  $\beta 2$  deficient mice [33]. This response seems to involve the interaction of the secretory component of IgA with  $\alpha M\beta 2$ , since secretory IgA but not IgA prevents N-acetyl-D-glucosamine binding to this integrin [33].

It is not known whether FcRs are capable of interacting with integrins other than those of the  $\beta 2$  family on the cell membrane. But it is clear from the evidence presented above that interactions between FcRs and  $\beta 2$  integrins on the cell surface are very important for key FcR-mediated responses.

## 6. Fc receptor modulation of integrin responses via “inside-out signaling”

Fc receptors for IgG and IgE are known to modulate integrin activation via “inside-out signaling”. Several Fc $\gamma$ R responses have been shown to require the presence of  $\beta 2$  integrins, particularly of  $\alpha M\beta 2$ . These responses include adhesion to immune complexes, enhanced Fc-dependent

phagocytosis, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, and the production of certain chemokines [42]. Still, certain other Fc $\gamma$ R responses seem to be independent of  $\beta$ 2 integrins, for example, basal FcR-dependent phagocytosis, the generation of calcium fluxes, and the production of superoxide [43].

Of particular interest is the adhesion to immune complexes. Adhesion to immune complexes is mediated by Fc $\gamma$ Rs [43]. Adhesion to immune complexes consists of two-phases. The first-phase occurs within the first 10 min of the interaction between the cell and the immune complexes and the second phase occurs after the first 10 min and lasts almost 1 h [44]. The first phase is  $\beta$ 2 integrin independent, as it occurs in patients with complete absence of  $\beta$ 2 integrins on their cell surface (a condition known as leukocyte adhesion deficiency (LAD)), or in the presence of  $\beta$ 2 blocking antibodies. The second phase of the response is  $\beta$ 2 integrin dependent and is absent in LAD patients or in the presence of  $\beta$ 2 blocking antibodies [43]. The interaction between IgG in the form of immune complexes and Fc $\gamma$ R promotes the recruitment and activation of  $\beta$ 2 integrins during the second sustained adhesive phase. It has been shown that this recruitment and activation of  $\beta$ 2 integrins occurs because of the activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), secondary to Fc $\gamma$ R signaling [44]. On human neutrophils it has been shown that both Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIIIB are capable of activating PI3K. Concordantly, both Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIIIB are able to recruit and activate  $\beta$ 2 integrins, particularly  $\alpha$ M $\beta$ 2 (Fig. 4A). In addition to PI3K, PAK-1, a serine/threonine kinase [44], and protein kinase A (PKA) [45] are two other proteins that seem to be involved in the regulation of  $\beta$ 2 integrin activation in response to Fc $\gamma$ R stimulation. Failure of LAD leukocytes to sustain adhesion to immune complexes, was also accompanied by a decline in the production of leukotriene B4 (LTB4) [43]. This suggests that activation of  $\beta$ 2 integrins after Fc $\gamma$ R stimulation is important not only for adhesion but also for other FcR-mediated responses.

Most Fc $\gamma$ R functions dependent on  $\beta$ 2 integrins, seem to work in a very similar way to the adhesion to immune complexes. That is, there are two phases: the first-phase is an integrin independent phase, and the second-phase is integrin dependent. This idea is supported by the fact that neutrophils from LAD patients are capable of binding cellular targets for antibody dependent cytotoxicity during the first integrin independent phase. However, these neutrophils seem incapable of sustaining the interaction in the integrin dependent phase and thus fail to kill their targets [46]. This failure is due to the lack of  $\beta$ 2 integrins, and it is further underscored by the fact that *in vivo* killing of melanoma cells, is also impaired in  $\beta$ 2 deficient mice [47]. Another FcR-mediated response with a biphasic mode, is the renal infiltration of neutrophils and tissue damage induced by immune complexes during acute glomerulonephritis. In this condition, immune complexes are formed in the basal membrane of the glomerulus. These immune complexes activate complement and recruit

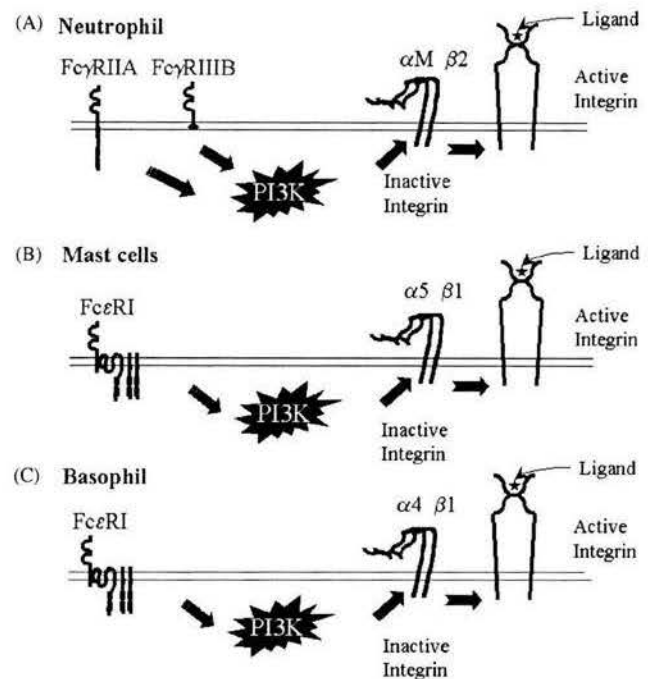


Fig. 4. "Inside-out signaling" to integrins secondary to stimulation of Fc receptors. (A) On the neutrophil stimulation of either Fc $\gamma$ RIIA or Fc $\gamma$ RIIIB leads to  $\alpha$ M $\beta$ 2 activation through a pathway that requires the activity of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K). (B) On mast cells, Fc $\epsilon$ RI activates integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 and this signaling pathway requires PI3-K. (C) On the human basophil, Fc $\epsilon$ RI is activates  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 also through a PI3-K dependent pathway.

neutrophils from the circulation. Activated neutrophils then cause the accompanying renal damage. In both wild type mice and  $\alpha$ M $\beta$ 2-deficient mice, the first-phase, which is the recruitment of neutrophils, is intact. In contrast, in  $\alpha$ M $\beta$ 2 deficient mice, the second-phase, which is the persistence of neutrophils in the glomerulus is abated [48]. Neutrophil infiltration over time correlates with tissue damage in the kidney. The failure of neutrophils to sustain infiltration in the  $\alpha$ M $\beta$ 2-deficient mice leads to an almost absent tissue damage in the kidney [48].

In contrast to the  $\beta$ 2 integrin activation mediated by Fc $\gamma$ R stimulation, Fc $\epsilon$ RI activation leads to changes in  $\beta$ 1 integrins. In mast cells, the engagement of Fc $\epsilon$ RI leads to activation of the  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin [49] (Fig. 4B). This activation, depends on PI3K, in a manner analogous to the activation of  $\beta$ 2 integrins by Fc $\gamma$ Rs. In basophils, Fc $\epsilon$ RI activation leads to an increased affinity of  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrins for their ligands [50]. This activation is also dependent on PI3K (Fig. 4C). Besides PI3K, Src, and Syk, kinases seem to be involved in the signaling pathway that leads to integrin activation [50]. It is interesting to mention that in platelets, the activation of the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin mediated by Fc $\gamma$ RII also depends on PI3K [51].

The molecular events that occur after integrin activation secondary to FcR stimulation, is still one question that lacks answers. This is in part due to the fact that many mediators



of integrin responses are also used by FcRs for their own signaling [52]. For example, it has been found that Syk is critically involved in both Fc $\gamma$ R signaling and  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 3 integrin signaling in human neutrophils [53]. This way, stimulating Fc $\gamma$ RII in human neutrophils will lead to Syk activation and consequently to  $\beta$ 2 integrin activation.  $\beta$ 2 integrins in turn, will signal to the cell, but they will also use Syk for signaling. So, if we are to study the role of Syk after  $\beta$ 2 integrin activation, secondary to Fc $\gamma$ RII stimulation, we will not be able to do so using pharmacological inhibitors or mutant proteins. We are forced then, to divide the study of integrin activation from that of signaling emerging from activated integrins. The picture that will arise from studying integrin activation and signaling independently, is necessarily incomplete. Hopefully, in the future we will be able to devise techniques to study signaling pathways such as the one described above.

### 7. Integrin modulation of Fc receptor responses via “outside-in signaling”

As it has been mentioned earlier, cross-talk between integrins and FcRs is bi-directional, i.e., FcRs are capable of modulating integrin functions and vice versa. The capacity of integrins to modulate FcRs responses has been known for a long time. Priming of human neutrophils with complement, a ligand of  $\alpha$ M $\beta$ 2, promoted an increased phagocytosis mediated by Fc $\gamma$ Rs [54]. More recent studies have also shown that activating  $\alpha$ M $\beta$ 2 with fibrinogen also increases the Fc $\gamma$ R phagocytic response, apparently through an extracellular signal-regulated kinase (ERK) mediated pathway [55]. Furthermore, simultaneous cross-linking of both  $\alpha$ M $\beta$ 2 and Fc $\gamma$ Rs using monoclonal antibodies has also been shown to promote enhanced phagocytosis [56]. Another line of evidence that supports the idea of integrins modulating FcR responses, is that neutrophils from LAD patients lack the capacity to perform enhanced phagocytosis [42]. It is therefore clear that engagement of  $\beta$ 2 integrins on the cell surface augments Fc $\gamma$ R dependent phagocytosis.

The molecular mechanisms that direct this neutrophil priming, secondary to  $\beta$ 2 integrin engagement, have not been fully elucidated. To date, two molecules have been shown to be involved in this responses. One molecule is protein kinase C (PKC), which is recruited to the phagocytic machinery of neutrophils when they are pre-activated via  $\beta$ 2 integrins, by a mechanism that is not understood [42]. The other molecule is phospholipase D, which when inactivated prevents the synergistic phagocytic response elicited by simultaneous cross-linking of Fc $\gamma$ R and  $\beta$ 2 integrins on human neutrophils [56]. There is still a large void in our knowledge of the mechanisms directing the enhanced FcRs response secondary to  $\beta$ 2 integrin priming, but candidates likely to play a role are the proteins of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen activated protein kinase (ERK/MAPK) pathway. It is known that in adherent cells,

integrins regulate tightly the ERK pathway, and  $\beta$ 2 integrin signaling in monocytes, utilizes ERK to signal to the nucleus [57]. It is also known that in macrophages, the recruitment of ERK and PI3K, to the phagocytic machinery enhances phagocytosis [58]. Whether this  $\beta$ 2 signaling to ERK also affects FcR signaling, is an interesting possibility. The capacity of other integrins to prime FcR-mediated responses is not clear. Interestingly, it was shown that the RGD containing peptides were capable of priming neutrophil responses under certain conditions, but the integrin responsible for such priming was not identified [42]. Studies to identify whether or not other integrins are capable of priming FcR-mediated responses have not been reported. However, integrins have emerged as important regulators of FcR-mediated responses, and most of these regulatory pathways enhance or facilitate FcR-mediated functions. It has also been shown that the integrins can inhibit these responses, for example,  $\beta$ 1 integrin engagement can inhibit certain Fc $\gamma$ RIIIA-mediated responses on natural killer cells [59].

### 8. Conclusion

Fc receptors and integrins are both essential to the immune response. They are capable of generating signals on their own, but they are also able to modify the signaling capabilities from each other. The extent of these interactions is not known. It has been shown that, at least three types of FcRs, those for IgG, IgE, and IgA, interact at some level with integrins of the  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 families. Thus, the ample diversity of both FcRs and integrins presents a large array of potential interactions.

Since the crucial interaction of Fc $\gamma$ Rs and  $\beta$ 2 integrins is clear, it is interesting to speculate that other integrin-FcR responses might be just as important, but experimental support for this affirmation is still lacking. As the mechanisms regulating integrin-FcR responses become clearer, a picture will emerge in which the cell senses the environment through more than one receptor and modifies itself to better respond to particular situations. What cells, integrins, Fc receptors are involved, and what is the nature of such interactions, are still very interesting unanswered questions. We should see some answers coming out in the near future.

### Acknowledgements

Research in the author's laboratory is supported by grant 36407-M from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico.

### References

- [1] J.V. Ravetch, J.P. Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457–492.
- [2] J.V. Ravetch, S. Bolland, *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 275–290.

- [3] N. Novak, S. Kraft, T. Bieber, *Curr. Opin. Immunol.* 13 (2001) 721–726.
- [4] R.C. Monteiro, J.G. Van De Winkel, *Annu. Rev. Immunol.* 21 (2003) 177–204.
- [5] S.M. Tamma, R.F. Coico, *J. Immunol.* 148 (1992) 2050–2057.
- [6] A. Shibuya, N. Sakamoto, Y. Shimizu, K. Shibuya, M. Osawa, T. Hiroshima, H.J. Eyre, G.R. Sutherland, Y. Endo, T. Fujita, T. Miyabayashi, S. Sakano, T. Tsuji, E. Nakayama, J.H. Phillips, L.L. Lanier, H. Nakauchi, *Nat. Immunol.* 1 (2000) 441–446.
- [7] P. Krajci, D. Kvale, P. Brandtzaeg, *Adv. Exp. Med. Biol.* (1995) 617–623.
- [8] V. Ghetie, E.S. Ward, *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000) 739–766.
- [9] G. Sanchez-Mejorada, C. Rosales, *J. Leukoc. Biol.* 63 (1998) 521–533.
- [10] S. Kijimoto-Ochiai, *Cell Mol. Life Sci.* 59 (2002) 648–664.
- [11] R. Clynes, J.S. Maizes, R. Guinamard, M. Ono, T. Takai, J.V. Ravetch, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 179–185.
- [12] N. Isakov, *J. Leukoc. Biol.* 61 (1997) 6–16.
- [13] M.J. Aman, A.C. Tosello-Tramont, K. Ravichandran, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 46371–46378.
- [14] M.J. Zhou, D.M. Lublin, D.C. Link, E.J. Brown, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 13553–13560.
- [15] C. Rosales, E.J. Brown, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 5265–5271.
- [16] F.Y. Chuang, M. Sassaroli, J.C. Unkeless, *J. Immunol.* 164 (2000) 350–360.
- [17] E. Garcia-Garcia, C. Rosales, *J. Leukoc. Biol.* 72 (2002) 1092–1108.
- [18] T. Takai, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 580–592.
- [19] J. Kohl, J.E. Gessner, *Mol. Immunol.* 36 (1999) 893–903.
- [20] R.O. Hynes, *Cell* 110 (2002) 673–687.
- [21] F.G. Giancotti, E. Ruoslahti, *Science* 285 (1999) 1028–1032.
- [22] K.H. Martin, J.K. Slack, S.A. Boerner, C.C. Martin, J.T. Parsons, *Science* 296 (2002) 1652–1653.
- [23] M.A. Schwartz, M.H. Ginsberg, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) E65–E68.
- [24] P.E. Hughes, M. Pfaff, *Trends Cell Biol.* 8 (1998) 359–364.
- [25] Y. van Kooyk, C.G. Figdor, *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2000) 542–547.
- [26] T.R. Gadek, D.J. Burdick, R.S. McDowell, M.S. Stanley, J.C. Marsters Jr., K.J. Paris, D.A. Oare, M.E. Reynolds, C. Ladner, K.A. Zionscheck, W.P. Lee, P. Gribbling, M.S. Dennis, N.J. Skelton, D.B. Tumas, K.R. Clark, S.M. Keating, M.H. Beresini, J.W. Tilley, L.G. Presta, S.C. Bodary, *Science* 295 (2002) 1086–1089.
- [27] G.D. Ross, *Crit. Rev. Immunol.* 20 (2000) 197–222.
- [28] N. Hogg, *Immunol. Today* 10 (1989) 111–114.
- [29] J.D. Noti, A.K. Johnson, J.D. Dillon, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 8959–8969.
- [30] A.L. Kindzelskii, Z. Yang, G.J. Nabel, R.F. Todd III, H.R. Petty, *J. Immunol.* 164 (2000) 953–958.
- [31] H.R. Petty, R.G. Worth, R.F. Todd III, *Immunol. Res.* 25 (2002) 75–95.
- [32] S. Leccoanet-Henchoz, J.F. Gauchat, J.P. Aubry, P. Graber, P. Life, N. Paul-Eugene, B. Ferrua, A.L. Corbi, B. Dugas, C. Plater-Zyberk, et al., *Immunity* 3 (1995) 119–125.
- [33] A.B. Van Spriel, J.H. Leusen, H. Vile, J.G. Van De Winkel, *J. Immunol.* 169 (2002) 3831–3836.
- [34] J. Galon, J.F. Gauchat, N. Mazieres, R. Spagnoli, W. Storkus, M. Lotze, J.Y. Bonnefoy, W.H. Fridman, C. Sautes, *J. Immunol.* 157 (1996) 1184–1192.
- [35] M. Zhou, R.F. Todd III, J.G. van de Winkel, H.R. Petty, *J. Immunol.* 150 (1993) 3030–3041.
- [36] A. Coxon, X. Cullere, S. Knight, S. Sethi, M.W. Wakelin, G. Stavrakis, F.W. Luscinskas, T.N. Mayadas, *Immunity* 14 (2001) 693–704.
- [37] F. Barabe, C. Gilbert, N. Liao, S.G. Bourgoin, P.H. Naccache, *Faseb J.* 12 (1998) 209–220.
- [38] H. Poo, J.C. Krauss, L. Mayo-Bond, R.F. Todd III, H.R. Petty, *J. Mol. Biol.* 247 (1995) 597–603.
- [39] M.J. Zhou, E.J. Brown, *J. Cell Biol.* 125 (1994) 1407–1416.
- [40] V. Durand, Y. Renaudineau, J.O. Pers, P. Youinou, C. Jamin, *J. Immunol.* 167 (2001) 3996–4007.
- [41] R.G. Worth, L. Mayo-Bond, M.K. Kim, J.G. van de Winkel, R.F. Todd III, H.R. Petty, A.D. Schreiber, *Blood* 98 (2001) 3429–3434.
- [42] H.D. Gresham, I.L. Graham, D.C. Anderson, E.J. Brown, *J. Clin. Invest.* 88 (1991) 588–597.
- [43] I.L. Graham, J.B. Lefkowitz, D.C. Anderson, E.J. Brown, *J. Cell Biol.* 120 (1993) 1509–1517.
- [44] S.L. Jones, U.G. Knaus, G.M. Bokoch, E.J. Brown, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 10556–10566.
- [45] S.L. Jones, *J. Leukoc. Biol.* 71 (2002) 1042–1048.
- [46] A.B. van Spriel, J.H. Leusen, M. van Egmond, H.B. Dijkman, K.J. Assmann, T.N. Mayadas, J.G. van de Winkel, *Blood* 97 (2001) 2478–2486.
- [47] A.B. van Spriel, H.H. van Ojik, A. Bakker, M.J. Jansen, J.G. van de Winkel, *Blood* 101 (2003) 253–258.
- [48] T. Tang, A. Rosenkranz, K.J. Assmann, M.J. Goodman, J.C. Gutierrez-Ramos, M.C. Carroll, R.S. Cotran, T.N. Mayadas, *J. Exp. Med.* 186 (1997) 1853–1863.
- [49] T. Kinashi, T. Asaoka, R. Setoguchi, K. Takatsu, *J. Immunol.* 162 (1999) 2850–2857.
- [50] R.P. Andrews, C.L. Kepley, L. Youssef, B.S. Wilson, J.M. Oliver, *J. Leukoc. Biol.* 70 (2001) 776–782.
- [51] A. Saci, S. Pain, F. Rendu, C. Bachelot-Loza, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 1898–1904.
- [52] M. Turner, E. Schweighoffer, F. Colucci, J.P. Di Santo, V.L. Tybulewicz, *Immunol. Today* 21 (2000) 148–154.
- [53] A. Mocsai, M. Zhou, F. Meng, V.L. Tybulewicz, C.A. Lowell, *Immunity* 16 (2002) 547–558.
- [54] E.J. Pettit, M.B. Hallett, *Biochem. Soc. Trans.* 22 (1994) 327S.
- [55] C. Rubel, G.C. Fernandez, F.A. Rosa, S. Gomez, M.B. Bompadre, O.A. Coso, M.A. Isturiz, M.S. Palermo, *J. Immunol.* 168 (2002) 3527–3535.
- [56] M. Ohkuro, M. Ogura-Masaki, K. Kobayashi, M. Sakai, K. Takahashi, S. Nagasawa, *FEBS Lett.* 373 (1995) 189–192.
- [57] M. Reyes-Reyes, N. Mora, G. Gonzalez, C. Rosales, *Biochem. J.* 363 (2002) 273–280.
- [58] E. Garcia-Garcia, R. Rosales, C. Rosales, *J. Leukoc. Biol.* 72 (2002) 107–114.
- [59] M. Milella, A. Gismondi, P. Roncaioli, G. Palmieri, S. Morrone, M. Piccoli, L. Frati, M.G. Cifone, A. Santoni, *J. Immunol.* 162 (1999) 2064–2072.