



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS  
POR RECEPTORES MUTANTES DEL FcγRIIA.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

**P R E S E N T A :**

MELISSA IVONNE RUIZ SALDAÑA

Tutor: Dr. Carlos Rosales Ledezma



México, D.F.

Junio 2009



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.

# TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR RECEPTORES MUTANTES DEL FcγRIIA

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Carlos Rosales Ledezma en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Carlos Rosales Ledezma	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Marina Macias Silva	Instituto de Fisiología celular, UNAM
Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay	Instituto de Biotecnología, UNAM

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (48573-M) Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en el examen presentado el día 30 de Junio de 2009

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay	Instituto de Biotecnología, UNAM
VOCAL	Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo	Facultad de Medicina, UNAM
SECRETARIO	Dra. Marcela Lizano Soberón	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
SUPLENTE	Dr. Enrique Ortega Soto	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
SUPLENTE	Dra. Martha Robles Flores	Facultad de Medicina, UNAM

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios  
Por la vida que me dio

A mi Madre  
Quien me impulsó a volar

A mi Padre  
Quien me mostró las armas para luchar

A mi Abuelita  
Quien ablandó mi andar

A Noreen  
Quien me enseñó a vivir

Al Dr. Carlos Rosales Ledezma  
Quien me abrió las puertas de su laboratorio y es mi guía por el método científico

A la Técnico Académico MC. Nancy Yorley Mora Pérez  
Quien me brindó su apoyo y asesoramiento técnico

A Erick  
Quien me demostró que con el trabajo se puede llegar a la cima y me impulsó a subir

A Marco  
Quien me mostró vías para imaginar

A Luis  
Quien me mantuvo en el camino

	<b>Pag</b>
<b>ÍNDICE</b>	
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>El sistema Inmunológico</b>	<b>5</b>
<b>Receptores Fc: FcR</b>	<b>6</b>
<b>Señalización de los Fc<math>\gamma</math>R</b>	<b>10</b>
<b>Receptor Fc endógeno en células RBL-2H3</b>	<b>11</b>
	<b>12</b>
<b>Microdominios de Membrana</b>	
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVO PARTICULAR</b>	<b>16</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>19</b>
<b>Medición de la elevación de calcio intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) en leucocitos polimorfonucleares mediada por el Fc<math>\gamma</math>R<sub>IIA</sub></b>	<b>19</b>
<b>Verificación de la expresión de Fc<math>\gamma</math>R<sub>IIA</sub> en la superficie celular de las células RBL-2H3</b>	<b>20</b>
<b>Medición de la elevación de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en células RBL-2H3 mediada por Fc<math>\gamma</math>R<sub>IIA</sub></b>	<b>21</b>
<b>Medición de la elevación de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en células RBL-2H3 mediada por Fc<math>\epsilon</math>R<sub>I</sub></b>	<b>24</b>

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>32</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>33</b>

## ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
BCR	Receptor para antígeno de células B
$[Ca^{2+}]_i$	Calcio intracitoplásmico
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
CD8	Cluster of differentiation 8
DAG	Diacilglicerol
DNP	Dinitrofenol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Fc	Fragmento cristalizable
FcR	Receptor para la porción Fc de anticuerpos
Fc $\alpha$ R	Receptor para anticuerpos IgA
Fc $\epsilon$ R	Receptor para anticuerpos IgE
Fc $\gamma$ R	Receptor para anticuerpos IgG
Fc $\gamma$ RI	Receptor Fc $\gamma$ RI
Fc $\gamma$ RII	Receptor Fc $\gamma$ RII
Fc $\gamma$ RIII	Receptor Fc $\gamma$ RIII
Fc $\gamma$ RIIA	Receptor Fc $\gamma$ RIIA
Fc $\gamma$ RIIB	Receptor Fc $\gamma$ RIIB
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HEPES	Ácido N-2-Hidroxiethylpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico
IgA	Inmunoglobulina A
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
INF $\gamma$	Interferón gamma
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
Lck	Cinasa específica de leucocitos
MDM	Microdominios de membrana
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PI-3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PI(4,5)P <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol, 4,5-bifosfato
PI(3,4,5)P <sub>3</sub>	Fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PLC $\gamma$	Fosfolipasa C gamma
Syk	Spleen tyrosine kinase
TCR	Receptor para antígeno de células T

# TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR RECEPTORES MUTANTES DEL Fc $\gamma$ RIIA

## RESUMEN

El receptor Fc $\gamma$ RIIA pertenece a la familia de receptores para la porción Fc de los anticuerpos IgG. Este receptor se encuentra expresado de manera constitutiva en monocitos, macrófagos y neutrófilos. El Fc $\gamma$ RIIA activa funciones importantes para la respuesta inmunológica como son: la eliminación de complejos inmunes, el estallido respiratorio, la secreción de mediadores proinflamatorios y la fagocitosis. La manera en que el Fc $\gamma$ RIIA activa estas funciones celulares es por medio de cascadas de señalización que ocurren en el interior de la célula tras el entrecruzamiento del receptor.

Existen porciones de la membrana plasmática con alto contenido en colesterol y esfingolípidos denominadas microdominios de membrana. Los microdominios de membrana fueron reconocidos inicialmente por su participación en el transporte de proteínas a partir del aparato de Golgi hacia la superficie celular. Actualmente se piensa que estas porciones de la membrana funcionan como plataformas en las que se inician los eventos de transducción de señales al interior de las células. Por lo tanto existe mucho interés en descubrir si la asociación de un receptor con los microdominios de membrana es indispensable para la señalización del receptor. En el caso del Fc $\gamma$ RIIA, sabemos que el receptor se asocia a los microdominios de membrana al ser estimulado a través de su agregación con complejos inmunes (complejos antígeno-anticuerpo). Sin embargo se desconoce si para la señalización del Fc $\gamma$ RIIA es indispensable su asociación con microdominios de membrana.

En nuestro grupo de trabajo se han desarrollado mutantes del receptor Fc $\gamma$ RIIA que presentan diferentes patrones de asociación a los microdominios de membrana. Los receptores Fc $\gamma$ RIIA silvestre y mutantes han sido transfectados y se expresan de manera estable en la línea celular RBL-2H3. El receptor tipo silvestre se encuentra en su estado basal fuera de microdominios



de membrana y tras su entrecruzamiento, se asocia a microdominios de membrana. El receptor con la mutación A224S se encuentra fuera de microdominios de membrana en un estado basal y tras su entrecruzamiento, es incapaz de asociarse con microdominios de membrana. En condiciones basales, el receptor con la mutación VA231-32MM se localiza tanto en microdominios de membrana como fuera de microdominios de membrana. El receptor con la mutación VVAL234-7GISF se localiza constitutivamente en microdominios de membrana.

Un efecto temprano de la señalización del Fc $\gamma$ R1IA es la elevación de calcio intracitoplásmico. Esta respuesta es entonces un buen indicador de la necesidad de la asociación del Fc $\gamma$ R1IA a los microdominios de membrana para su señalización. En este trabajo se midió la elevación de calcio intracitoplásmico tras la estimulación de los Fc $\gamma$ R1IA mutantes con diferentes patrones de asociación a microdominios de membrana. Para determinar si esta asociación es indispensable para la señalización del Fc $\gamma$ R1IA. Tanto el Fc $\gamma$ R1IA silvestre como las tres mutantes fueron capaces de inducir una elevación de calcio intracitoplásmico a niveles similares. Por lo tanto concluimos que la asociación de Fc $\gamma$ R1IA a microdominios de membrana no es indispensable para activar los eventos iniciales de transducción de señales que llevan a la elevación de calcio intracitoplásmico inducida por este receptor.

## ABSTRACT

Fc $\gamma$ R1IA is a member of the receptor family that binds IgG antibodies, known as Fc $\gamma$  receptors (Fc $\gamma$ R). Fc $\gamma$ R1IA is expressed in monocytes, macrophages and neutrophils. Fc $\gamma$ R1IA initiates important functions for the immune response including: immunity complex elimination, respiratory burst, inflammatory mediators production, and phagocytosis. Fc $\gamma$ R1IA turns on these functions by initiating signalling pathways into the cells, after receptor cross-linking.

There are membrane domains that are enriched on sphingolipids and cholesterol. These regions are denominated membranes microdomains. Initially the membrane microdomains were recognized by their role on protein transport from the Golgi to the cell surface. It has been thought that membrane microdomains work as platforms where signal pathways begun. For this reason, there is a lot of interest on finding out, whether receptor association with membrane microdomains is necessary for the receptor signalling. For Fc $\gamma$ R1IA, we already know that this receptor is associated with membrane microdomains after it is cross-linked. Nevertheless it is unknown if this association is dispensable for Fc $\gamma$ R1IA signalling.

In our research team there were generated Fc $\gamma$ R1IA mutants that had diverse ability of association to membrane microdomains. Fc $\gamma$ R1IA wild-type and mutants were stably transfected and in the RBL-2H3 cell line. The wild-type receptor is localized out of membrane microdomains in a basal state and, after cross-linking it is associated to membrane microdomains. The receptor with the A224S mutation is localized out of membrane microdomains in a basal state and, after cross-linking it remains out of them. The receptor with the VA231-32MM mutation is localized in both, out of membrane microdomains and in membrane microdomains. The receptor with the VVAL234-7GISF mutation is constitutively localized in membrane microdomains.

An early event in Fc $\gamma$ R1IA signalling pathway is intracellular calcium elevation. This response is then a good indicator of the requirement of the Fc $\gamma$ R1IA association with membrane microdomains for Fc $\gamma$ R1IA signalling. In these work, the intracellular calcium elevation was measure after Fc $\gamma$ R1IA

cross-linking. Both wild-type and the three mutants that had diverse ability of association to membrane microdomains, were capable of inducing similar intracellular calcium elevation. In conclusion, intracellular calcium elevation mediated by Fc $\gamma$ R1IA signalling can occur in the absence of receptor association with membrane microdomains.

# TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR RECEPTORES MUTANTES DEL Fc $\gamma$ RIIA

## INTRODUCCIÓN

### El sistema inmunológico

El sistema inmunológico está conformado por un conjunto de órganos, los vasos linfáticos y células. Todos estos elementos cooperan entre sí para protegernos de los agentes patógenos. Los órganos del sistema inmunológico se clasifican en órganos linfáticos primarios y órganos linfáticos secundarios. Los órganos linfáticos primarios comprenden la médula ósea y el timo. Estos órganos son el lugar donde los linfocitos (un tipo celular del sistema inmunológico) alcanzan la madurez. Los órganos linfáticos secundarios comprenden los ganglios linfáticos, el bazo, el sistema inmunitario cutáneo y el sistema inmunitario de las mucosas. Estos órganos son el lugar donde se inician y desarrollan las respuestas inmunológicas para combatir a los patógenos.

Los órganos linfáticos se encuentran comunicados por una red de vasos y capilares que conforman el sistema linfático. Los agentes patógenos suelen entrar al cuerpo a través de la piel y los aparatos respiratorio y digestivo. Estos aparatos contienen capilares del sistema linfático. Los capilares del sistema linfático absorben y drenan líquido intersticial. Al líquido absorbido se le llama linfa. Los ganglios linfáticos están intercalados a lo largo de vasos del sistema linfático. Estos ganglios linfáticos actúan como filtros que analizan la linfa. Los antígenos presentes en la linfa pueden ser eliminados del líquido por distintas células del sistema inmunológico.

Las células del sistema inmunológico o leucocitos se dividen por su origen en linfoide o mieloide. Dentro de los leucocitos de origen linfoide se encuentran los linfocitos T, los linfocitos B y las células NK. Dentro de los leucocitos de origen mieloide se encuentran los basófilos, los eosinófilos, los magrófagos y los neutrófilos.

Todos estos leucocitos llevan a cabo funciones importantes dentro del sistema inmunológico. Como ejemplos de estas funciones se encuentran: la organización de la respuesta inmunológica mediada por los linfocitos T, la producción de anticuerpos mediada por los linfocitos B, el estallido respiratorio mediado por basófilos y eosinófilos y la fagocitosis de patógenos mediada por macrófagos y neutrófilos. Dichas respuestas son desencadenadas por una serie de reacciones que se originan al estimular receptores localizados en la membrana plasmática de estas células.

Entre estos receptores podemos nombrar al receptor para antígeno de células T (TCR), expresado por los linfocitos T, al receptor para antígeno de células B (BCR) expresado por los linfocitos B y a los receptores para la porción Fc de anticuerpos (FcR) expresados por la mayoría de los leucocitos. Los FcR son el vínculo entre el reconocimiento de antígenos por los anticuerpos y la respuesta celular, que finalmente elimina a los agentes infecciosos.

## **Receptores Fc**

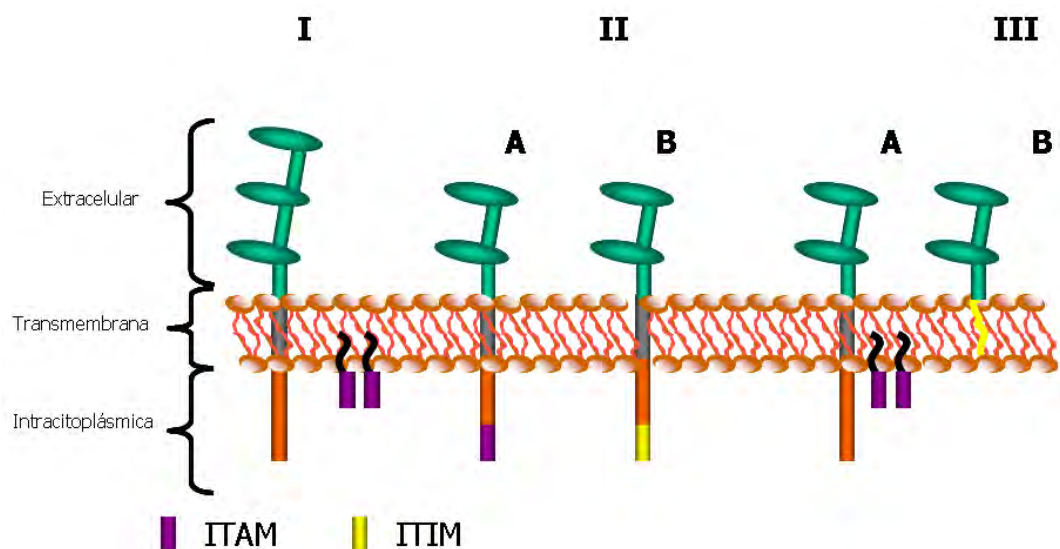
Los anticuerpos son glicoproteínas responsables de reconocer a los antígenos. Los anticuerpos cuentan con dos regiones principales. La región Fab que es la responsable del reconocimiento de los antígenos y la región Fc que es la responsable de la interacción con FcR (1). Debido a diferencias en su estructura, los anticuerpos se pueden clasificar en diferentes tipos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Existen FcR para los anticuerpos IgA, denominados  $Fc\alpha R$ , para IgE, denominados  $Fc\epsilon R$ , y para IgG, denominados  $Fc\gamma R$  (2, 3).

Los receptores para la porción Fc de los anticuerpos, se conocen como receptores Fc (FcR). Los FcR son glicoproteínas de la membrana celular de leucocitos que reconocen específicamente la parte Fc de los anticuerpos. Los FcR, al interactuar, con los anticuerpos desencadenan una serie de repuestas celulares que juegan un papel crucial en la inflamación y en la inmunidad (4).

Los FcR para la IgG se encuentran expresados por la mayoría de los leucocitos.

## Receptores Fc para IgG

Los FcR para los anticuerpos IgG se denominan Fc $\gamma$ R. Los Fc $\gamma$ R son los FcR más estudiados, se encuentran expresados por la mayoría de los leucocitos y están codificados por una familia heterogénea de al menos seis genes, conformando trece isoformas en tres clases: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. Todas las isoformas de Fc $\gamma$ R son muy semejantes en su segmento extracelular pero difieren mucho en su segmento intracitoplásmico (5) Figura 1.



**Fig 1. Existen tres clases diferentes de Fc $\gamma$ R.** Los Fc $\gamma$ R son codificados por una familia heterogénea de al menos seis genes, conformando tres clases: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. Todas las isoformas de Fc $\gamma$ R son muy semejantes en su segmento extracelular pero difieren mucho en su segmento intracitoplásmico A y B indican subtipos diferentes de los receptores clase II y III. (I) Secuencia ITAM (del inglés Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). (II) Secuencia ITIM (del inglés Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif).

Fc $\gamma$ RI

El receptor Fc $\gamma$ RI (CD64) es una glicoproteína de 72 kDa. El Fc $\gamma$ RI tiene una región extracelular de 292 aminoácidos, una región transmembranal de 21 amino ácidos y una región citoplásmica (4).

El Fc $\gamma$ RI al igual que el Fc $\gamma$ RIIIA, se expresa como complejo hetero-oligomérico conteniendo una cadena  $\alpha$  responsable de la unión a ligando y dos cadenas  $\gamma$  asociadas responsables de la señalización (Figura 1). Existen tres isotipos de cadenas  $\alpha$  de Fc $\gamma$ RI. Las cadenas  $\alpha$  muestran alto grado de homología en su región extracelular pero difieren significativamente en sus regiones citoplásmicas.

Las regiones citoplásmicas de las cadenas  $\gamma$  contienen una secuencia específica de aminoácidos conocida como ITAM (del inglés Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) (2). El ITAM posee la secuencia consenso (D/E)XXYXXL(X)<sub>6,8</sub>YXXL, (donde D es aspartato, E es glutamato, Y es tirosina, L es leucina y X es cualquier aminoácido) que es importante para la señalización del FcR. El Fc $\gamma$ RI se encuentra expresado constitutivamente en monocitos, macrófagos y en neutrófilos tratados con INF $\gamma$  (3).

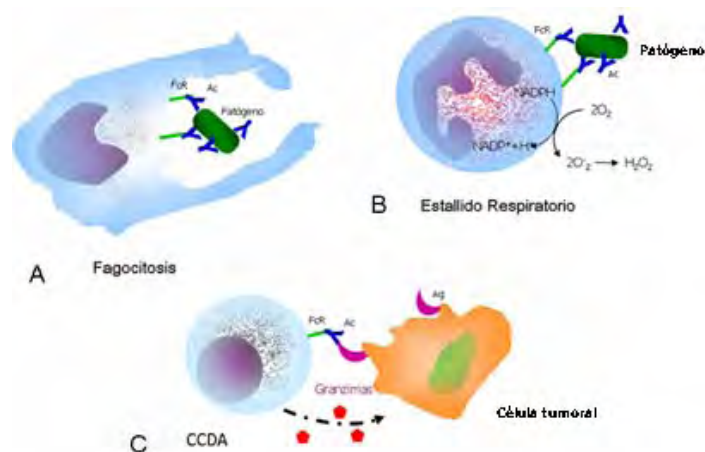
### *Fc $\gamma$ RII*

Se conocen tres genes diferentes para Fc $\gamma$ RII, los genes Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB y Fc $\gamma$ RIIC. El receptor Fc $\gamma$ RII (CD32) (2) es una glicoproteína de 40 kDa (5). El Fc $\gamma$ RII tiene una región extracelular de 180 aminoácidos, una región transmembranal con 24 a 26 amino ácidos y una región citoplásmica (6) (7) que contiene la secuencia ITAM o la secuencia ITIM (del inglés Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) según sea el caso. El Fc $\gamma$ RIIA tiene una secuencia ITAM, dicha secuencia es responsable de desencadenar una serie de reacciones que involucradas en la activación celular. El Fc $\gamma$ RIIB tiene una secuencia ITIM, dicha secuencia está involucrada en la inhibición celular (8) (Figura 1). El Fc $\gamma$ RII se encuentra expresado constitutivamente en monocitos, macrófagos y neutrófilos (3).

### *Fc $\gamma$ RIII*

El receptor  $Fc\gamma RIII$  (CD16) es una glicoproteína de 50 a 80 kDa (9). El  $Fc\gamma RIII$  tiene una región extracelular de 180 aminoácidos, una región transmembranal con 24 a 26 amino ácidos y una región citoplásmica de longitud variable (6) (7). Se han identificado dos genes que codifican para  $Fc\gamma RIII$ : los genes A y B. La proteína que codifica el gen A es un receptor transmembranal y se expresa en células NK y en macrófagos (4). Este receptor se encuentra asociado a un dímero de cadenas  $\gamma$  o  $\zeta$  que contienen una secuencia ITAM. La proteína codificada por el gen B es un receptor que se ancla a la membrana plasmática por medio de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (10), y es exclusivo de neutrófilos (11) (Figura 1).

Los  $Fc\gamma R$  regulan funciones celulares importantes como la eliminación de complejos inmunes, el estallido respiratorio, la secreción de mediadores proinflamatorios, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y la fagocitosis (4) (Figura 2). La manera en que los  $Fc\gamma R$  activan estas funciones es por medio de cascadas de señalización que el  $Fc\gamma R$  inicia al interior de la célula tras ser estimulado.

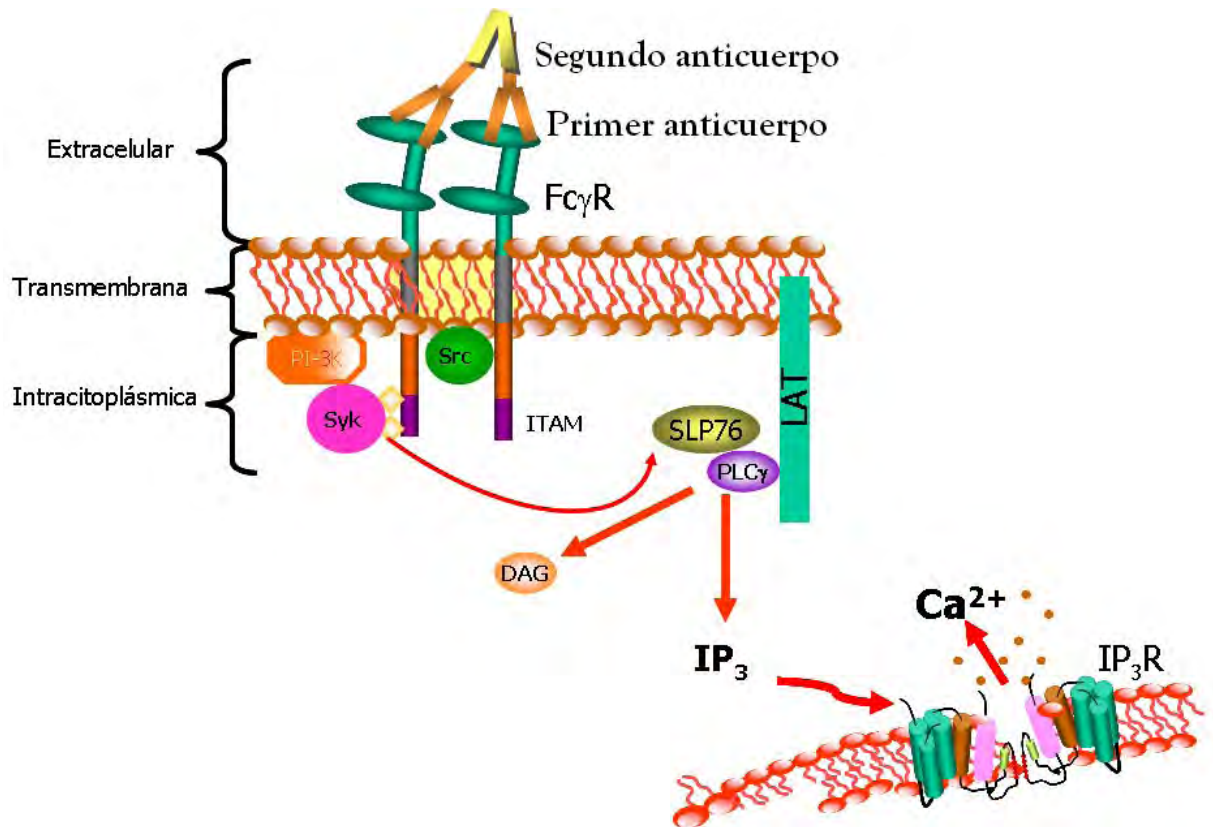


**Fig 2. Los Receptores Fc gamma ( $Fc\gamma R$ ) median funciones importantes en la respuesta inmunológica.** Tras la interacción de los  $Fc\gamma R$  con los anticuerpos (Ac) se llevan a cabo una serie de funciones entre las que se encuentran A) la fagocitosis B) el estallido respiratorio, y C) la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA).

## Señalización de los $Fc\gamma R$



Los Fc $\gamma$ R activan funciones importantes para la respuesta inmunológica por medio de cascadas de señalización que el Fc $\gamma$ R inicia al interior de la célula. Para lograr una correcta estimulación de los Fc $\gamma$ R éstos deben ser entrecruzados por medio de complejos antígeno-anticuerpo. Después del entrecruzamiento de receptores Fc, las regiones ITAM del receptor se fosforilan, gracias a la acción de enzimas de la familia Src de cinasas de tirosina. Una vez fosforilado el ITAM se vuelve sitio de anclaje para las regiones SH-2 de Syk (del inglés spleen tyrosine kinase). El anclaje de Syk permite su fosforilación por las cinasas Src y de esta manera Syk es activado(4). Syk entonces fosforila y activa a fosfatidilinositol 3 cinasa (PI-3K) (3). PI-3K es una cinasa de lípidos que fosforila el anillo de inositol en la posición 3. Los productos lipídicos, de PI-3K: fosfatidilinositol, 4,5-bifosfato [PI(4,5)P<sub>2</sub>] y fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato [PI(3,4,5)P<sub>3</sub>], se encuentran involucrados en la activación de algunas isoformas de PKC (proteína cinasa C). Además en monocitos la activación de ERK (del inglés extracellular signal-regulated kinase) mediada por Fc $\gamma$ R, depende de PI-3K (4). ERK es una cinasa de serina/treonina que media la activación de factores nucleares como Elk-1, el cual, está involucrado en la expresión de citosina. Las fosfolipasas C (PLC) PLC $\gamma$ 1 y PLC $\gamma$ 2, son responsables de la hidrólisis de PI(4,5)P<sub>2</sub> generando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). El IP<sub>3</sub> tiene la capacidad de unirse a canales de calcio localizados en el retículo endoplásmico permitiendo la apertura de estos canales y la consecuente liberación de calcio (3). El aumento de calcio intracitoplásmico [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, cumple funciones como son la fusión de gránulos secretorios con la membrana plasmática, la fusión del fagolisosoma y la quimiotaxis. Esta serie de reacciones se encuentra representada en la Figura 3.



**Fig 3. Señalización de receptores Fc.** El entrecruzamiento de un subtipo de receptor Fc puede lograrse de manera específica empleando anticuerpos. Primero se marca al receptor de interés con un primer anticuerpo que reconozca específicamente al receptor y a continuación se añade un segundo anticuerpo que reconocerá al primero, y promoverá el entrecruzamiento del receptor. El entrecruzamiento del receptor Fc desencadena una serie de reacciones intracelulares que finalmente permitirán que la célula lleve a cabo funciones efectoras que permiten eliminar a los agentes patógenos. ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) Src: cinasas de tirosina de la familia Src. Syk (del Inglés Spleen tyrosine kinase) IP $_3$ : inositol trifosfato, IP $_3$ R Receptor para IP $_3$  PI-3K: fosfatidilinositol 3 cinasa, ERK: cinasa de serina/treonina que media la activación de factores nucleares como Elk-1 PLC: fosfolipasa C, DAG: Diacilglicerol.

### Receptor Fc endógeno en células RBL-2H3

Las células RBL-2H3, son células cebadas de rata que expresan de manera endógena el receptor de anticuerpos IgE, denominado Fc $\epsilon$ RI. El receptor Fc $\epsilon$ RI es un complejo molecular compuesto de una cadena  $\beta$ , dos cadenas  $\gamma$  unidas por puentes disulfuro y una cadena  $\alpha$ , que reconoce la

molécula IgE. En las regiones citoplásmicas de las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$ , el Fc $\epsilon$ RI posee secuencias ITAM. Al entrecruzar el Fc $\epsilon$ RI, se desencadena una vía de señalización semejante a la reportada para los Fc $\gamma$ Rs. Primero sus secuencias ITAM son fosforiladas. Syk se une al ITAM fosforilado y luego la actividad de PLC se incrementa (12), dando lugar a la formación de DAG e IP3. Éste último lleva a la liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico.

Si las células RBL-2H3 se incuban con el anticuerpo IgE, SPE-7. El anticuerpo SPE-7 por ser de clase IgE se une a los Fc $\epsilon$ R de las células mediante su fragmento Fc y queda listo para reconocer a su antígeno. Este anticuerpo SPE-7 es específico contra dinitrofenol (DNP). Después se agrega el reactivo entrecruzador DNP-BSA, el cual es un conglomerado del antígeno que reconoce el anticuerpo SPE-7, y por tanto puede lograr el entrecruzamiento del Fc $\epsilon$ R y la consiguiente activación celular.

### **Microdominios de membrana**

Las balsas lipídicas (del inglés "lipid rafts") son regiones de la membrana plasmática con alta concentración de colesterol y esfingolípidos. Debido a su composición las balsas lipídicas son resistentes a la solubilización en detergentes no iónicos como Triton X-100 motivo por el que a estas regiones se les ha dado el nombre de microdominios de membrana (MDM). Diversos receptores de membrana se asocian a los MDM. Algunos de los receptores se asocian a MDM por modificación con lípidos saturados. La modificación de los receptores con lípidos saturados favorece la asociación de los receptores a MDM, debido a que los lípidos saturados se empaquetan en un ambiente lipídico ordenado. Ejemplos de grupos lipídicos que se acomodan en un ambiente altamente ordenado son los anclajes de glicosil fosfatidil inositol (GPI), plamitato y miristato.

Se ha propuesto que dentro de los receptores del sistema inmunológico que tras su entrecruzamiento se asocian a estas porciones de la membrana se encuentran el TCR, el BCR y los FcR. Esta asociación de los receptores a los MDM parece ser un paso importante para el inicio de la señalización intracelular mediada por el receptor.

La causa principal por la que se considera que los MDM pueden tener un papel importante en la señalización intracelular, es que existen componentes de las vías de transducción de señales que se encuentran anclados a la porción interna del MDM. Entre estos componentes encontramos a la proteína tirosina cinasa específica de leucocitos (Lck), LAT (del inglés linker for activation of T cells), CD8, el TCR, moléculas del complejo Mayor de Histocompatibilidad, así como proteínas G. (13)

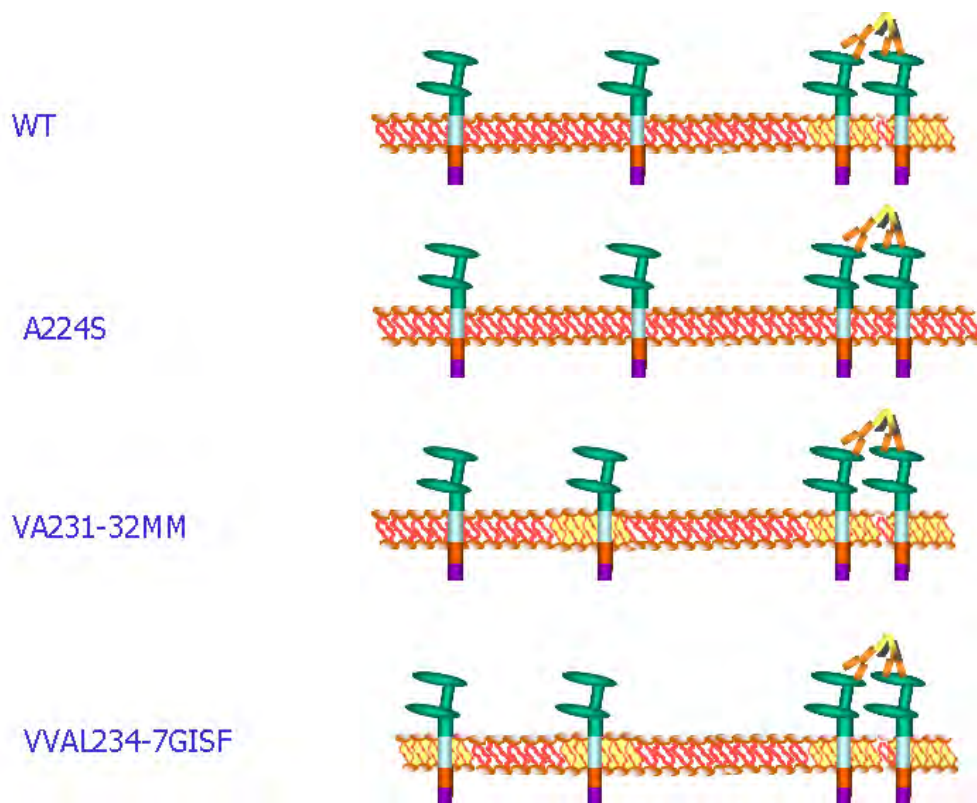
Entonces los MDM serían formadores de plataformas de señalización que enlazarían los eventos al exterior de la membrana con las vías de señalización al interior de la célula (15, 18, 19). Se ha sugerido entonces que el papel de los MDM en la señalización sería la función más importante de los MDM.

Aún cuando dentro del sistema inmune se ha mostrado que muchos inmunorreceptores, incluyendo los receptores para antígenos de las células B y T, así como muchos FcR, se asocian a MDM tras su entrecruzamiento, no se tiene claro si la localización de estos receptores en MDM es indispensable para su señalización al interior de la célula. Existen trabajos en los que se pretende esclarecer la importancia de los MDM en la señalización celular empleando técnicas como la eliminación del colesterol celular. Tal eliminación del colesterol celular se logra mediante de inhibidores de la síntesis de colesterol y en ausencia de colesterol en el medio extracelular, o bien mediante la extracción de colesterol por medio de ciclodextrinas. El empleo de estas técnicas asume, que al eliminar al colesterol de las células, se impedirá la formación de MDM. No obstante, esta metodología puede arrojar falsos resultados debido al papel del colesterol en otros procesos celulares. Entre los procesos afectados podemos enunciar la regulación del intercambio iónico o la actividad de algunas proteínas de membrana tales como la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (15). Por lo que es necesario contar con otra metodología capaz de resolver la incógnita del papel que juegan los MDM en la señalización celular.

En el caso del receptor  $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$  se sabe que tras su entrecruzamiento, este receptor se desplaza hacia MDM(22) sin embargo se desconoce si el localizarse en los MDM es importante para la señalización. Con la finalidad de conocer las características moleculares que permiten la localización del

Fc $\gamma$ RIIA en MDM, en mi grupo de trabajo se lograron obtener una serie de mutantes del Fc $\gamma$ RIIA, las cuales se expresaron en la línea celular RBL-2H3. Las mutantes del Fc $\gamma$ RIIA expresadas en la línea celular RBL-2H3 presentan propiedades diferentes al receptor silvestre, con respecto a su asociación con MDM (Figura 4). Estos receptores Fc $\gamma$ RIIA mutados son: receptor con mutación A224S, receptor con mutación VA231-32MM y receptor con mutación VVAL234-7GISF. El receptor tipo silvestre (WT) se encuentra fuera de MDM en un estado basal. Tras su entrecruzamiento, se asocia a MDM. El receptor con la mutación A224S se encuentra fuera de MDM en un estado basal. Tras su entrecruzamiento, es incapaz de asociarse a MDM. El receptor con la mutación VA231-32MM se localiza en estado basal tanto en MDM como fuera de MDM. Tras su entrecruzamiento, se asocia a MDM. El receptor con la mutación VVAL234-7GISF se localiza constitutivamente en MDM (23).

Como anteriormente se mencionó, la localización del receptor Fc $\gamma$ RIIA en MDM se considera un paso esencial para la señalización del mismo. Sin embargo aún no se sabe si la asociación del Fc $\gamma$ RIIA con MDM es indispensable para la señalización del receptor. Las diferencias en la asociación a MDM de los receptores Fc $\gamma$ RIIA mutados, que se expresan en la línea celular RBL-2H3, permiten evaluar si es necesaria la localización del receptor Fc $\gamma$ RIIA en MDM para que este receptor pueda enviar señales al interior de las células. Además esta metodología que no requiere eliminar el colesterol de las células, permite que estas puedan continuar llevando a cabo sus funciones de manera normal. En el presente trabajo se midió la elevación de la concentración de calcio intracitoplásmico como indicador de la señalización de Fc $\gamma$ RIIA al interior la célula. Se encontró que la asociación de Fc $\gamma$ RIIA con los MDM no es indispensable para la elevación de calcio intracitoplásmico mediada por Fc $\gamma$ RIIA.



**Fig 4. Diferentes patrones de asociación a microdominios de membrana (MDM) de receptores mutantes de Fc $\gamma$ RIIA.** Los receptores mutantes del Fc $\gamma$ RIIA se expresan en la línea celular RBL-2H3 y presentan diferentes patrones de asociación a microdominios de membrana. El receptor tipo silvestre (WT) se encuentra fuera de MDM en su estado basal. Tras su entrecruzamiento, se asocia a MDM. El receptor con la mutación A224S se encuentra fuera de MDM en su estado basal. Tras su entrecruzamiento, es incapaz de asociarse a MDM. El receptor con la mutación VA231-32MM se localiza en su estado basal tanto en MDM como fuera de MDM. El receptor con la mutación VVAL234-7GISF se localiza constitutivamente en MDM.

## **HIPÓTESIS**

El entrecruzamiento del Fc $\gamma$ RIIA induce un incremento de calcio intracitoplásmico, que es independiente de la localización del receptor en MDM.

## **OBJETIVO**

Determinar si la asociación de Fc $\gamma$ RIIA a MDM es indispensable para su señalización al interior de la célula.

## **OBJETIVO PARTICULAR**

Medir el incremento de calcio intracitoplásmico inducido por el entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RIIA para los diferentes receptores mutantes del Fc $\gamma$ RIIA, que presentan diferente patrón de asociación a MDM.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Anticuerpos*

Se emplearon los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal IV.3 contra el Fc $\gamma$ RII (CD32) (catálogo No. 025-1) de Medarex (Annandale, NJ). El anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> de cabra contra la molécula completa de IgG de ratón (catálogo No. 55468), y el anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> de cabra conjugado con FITC contra la molécula completa de IgG de ratón (catálogo No. 55522) se compraron de Cappel (Aurora, OH), el anticuerpo monoclonal SPE-7 de la clase IgE contra el hapteno DNP fue donado generosamente por el Dr. Enrique Ortega (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México D.F.)

### *Reactivos*

Se emplearon los siguientes reactivos: Fura 2/AM (catálogo No. 344905) de Calbiochem (San Diego, CA). El dinitrofenol conjugado con albúmina sérica bovina (DNP-BSA, 24 moléculas de DNP/molécula de BSA) fue donado generosamente por el Dr. Enrique Ortega (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM México D.F.)

### *Purificación de leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN)*

Se obtuvo sangre venosa periférica de voluntarios adultos sanos. A 10 mL de sangre fresca, se añadieron 0.25 mL de heparina (1000 unidades/mL) y 2 mL de 6 % dextran T500, en PBS. La sangre, la heparina y la solución de dextran se mezclaron por inversión y dejaron reposar por 45 min. El plasma se colocó sobre 5 mL de Ficoll-Hypaque (formando una segunda capa) y se centrifugó a 1600 rpm durante 20 min a 4°C. Tras el centrifugado se eliminó el sobrenadante y el paquete de PMN se resuspendió en PBS. La suspensión se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min, posteriormente al paquete celular se le añadieron 10 mL de solución hipotónica fría (0.2 % NaCl, 1 % BSA, 20 mM HEPES) y se mezcló por un minuto tras el cual se añadieron 10 mL de solución hipertónica a 4°C (1.6 % NaCl, 1 % BSA, 20 mM HEPES) y se mezcló nuevamente, se centrifugó la suspensión celular a 1200



rpm durante 5 min y finalmente los PMN se resuspendieron en PBS a una concentración de  $10^7$  células/mL.

#### *Cultivo celular*

La línea celular RBL-2H3 previamente transfectada ya sea con el receptor silvestre Fc $\gamma$ R1IA, o con alguna de las mutantes de Fc $\gamma$ R1IA (19), se mantuvo en medio de cultivo completo (RPMI-1640, suplementado con 10% de suero bovino fetal, 2 mM glutamina, 50 U/mL de penicilina y 50  $\mu$ g/mL de estreptomycin), a 37 °C en una atmósfera al 5 % en CO $_2$ . Ya que esta línea celular crece adherida a la superficie del matraz de cultivo, una vez que las células alcanzaron el 90 % de confluencia, se retiró el medio de cultivo y a continuación, la monocapa celular se removió de la superficie del matraz de cultivo por medio de la adición de una disolución de tripsina al 0.25 % y EDTA 5 mM en PBS, las células se incubaron con esta disolución a 37 °C por 5 minutos, y al término de este tiempo se añadió medio de cultivo completo. A partir de esta suspensión se retiró una alícuota, la cual, se trasladó a un nuevo matraz de cultivo, para continuar el cultivo.

#### *Carga celular con Fura-2/AM*

Las células RBL-2H3 o los PMN, se resuspendieron a una concentración de  $10^8$  células/mL, en PBS Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$  (PBS conteniendo 1.5 mM en calcio y 1.5 mM en magnesio). La suspensión celular se estabilizó a 37 °C por 5 min, se le añadió 10  $\mu$ M Fura-2/AM, y se incubó a 37 °C por 5 minutos. La suspensión se diluyó 1/10 en PBS Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$  a 37 °C, y se incubó durante 20 minutos a 37 °C. Las células se lavaron agregando PBS Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$  a 37 °C y se centrifugando a 1200 rpm durante 5 min, se resuspendieron en buffer Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$  a una concentración de  $10^7$  células/mL. Y se incubaron 15 minutos a 37 °C. Finalmente las células se lavaron y se resuspendieron en buffer Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$ .

#### *Marcaje de molécula para detección por citometría de flujo*

Las células se suspendieron en buffer de tinción (PBS adicionado con 0.5 % de albúmina sérica bovina y 1 % de sucrosa) a una concentración de

$10^7$  células/mL, se incubaron en baño de hielo por 45 minutos con 10  $\mu\text{g/mL}$  del anticuerpo monoclonal correspondiente, las células se lavaron tres veces agregando solución de tinción y se centrifugando la suspensión a 4500 rpm durante 1 min, tras los lavados, las células se incubaron en baño de hielo, por 30 minutos con 20  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/10 de FITC-F(ab')<sub>2</sub> de cabra contra IgG de ratón. Después las células se lavaron tres veces y finalmente se resuspendieron en 300  $\mu\text{L}$  de 1 % paraformaldehído en PBS para ser analizadas posteriormente en un citómetro de flujo (FACScalibur BECTON DICKINSON).

#### *Entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RIIA*

Las células previamente cargadas con Fura-2/AM, se incubaron con 10  $\mu\text{g/mL}$  del anticuerpo monoclonal IV.3 por 15 min en hielo. Después se lavaron tres veces agregando PBS Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup> a 4 °C y se centrifugando la suspensión a 1200 rpm durante 5 min, tras los lavados, las células se resuspendieron a la concentración final que se indica en cada ensayo. Dos mililitros de la suspensión celular se colocaron en una celda para espectrofluorímetro, para después realizar la estimulación, añadiendo la concentración que se especifique en cada experimento de segundo anticuerpo; anticuerpo entrecruzador F(ab')<sub>2</sub> de cabra contra IgG de ratón.

#### *Entrecruzamiento de Fc $\epsilon$ RI*

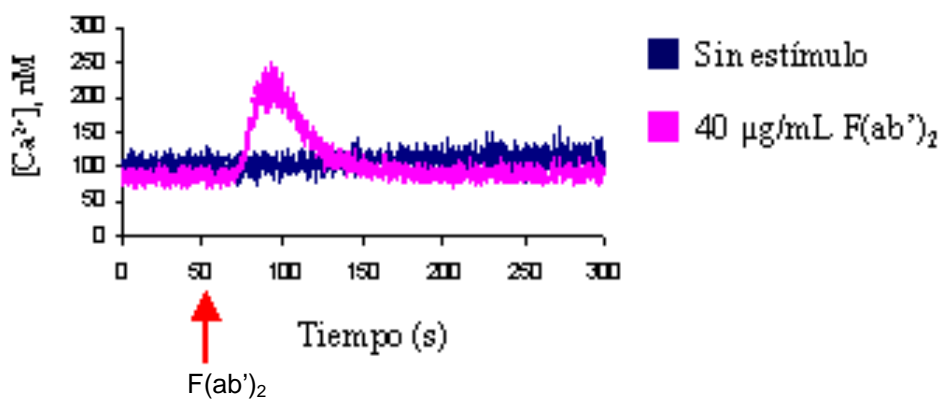
Las monocapa de células RBL-2H3 se incubó con 10  $\mu\text{g/mL}$  del anticuerpo monoclonal SPE-7 por 16 h a 37 °C. Las células se despegaron con 5mM EDTA y se pasaron a un tubo de ensayo y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min. A continuación las células se resuspendieron a una concentración de  $10^8$  células/mL, en PBS Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>, para posteriormente ser cargadas con Fura-2/AM. Las células con Fura se resuspendieron a  $2.5 \times 10^6$  cel/mL y 2 mL de la suspensión celular se colocaron en una celda para espectrofluorímetro. La estimulación entrecruzando el receptor Fc $\epsilon$ RI se logró añadiendo 100 ng/mL de DNP-BSA.

## RESULTADOS

### Medición de la elevación de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) en leucocitos polimorfonucleares mediada por el $Fc\gamma RIIA$

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) son células que expresan el  $Fc\gamma RIIA$ . Este receptor, tras ser entrecruzado en los PMN, induce una elevación en la concentración citoplásmica de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Por esta razón se consideró que los PMN son un sistema adecuado para el aprendizaje y estandarización de la técnica de medición de  $[Ca^{2+}]_i$ .

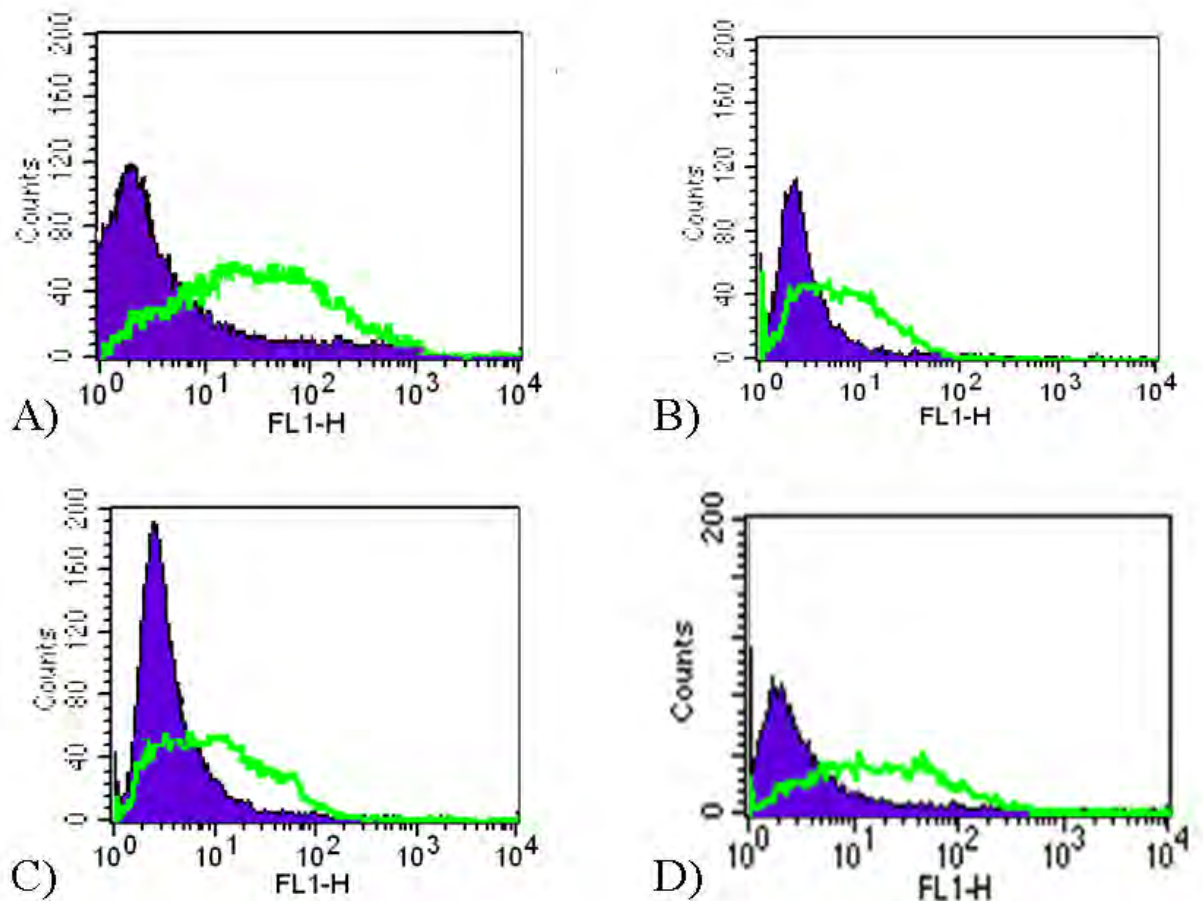
Con esta finalidad se obtuvieron PMN de donadores adultos sanos. Los PMN fueron cargados con Fura 2/AM. Los PMN se trataron entonces con el anticuerpo monoclonal IV.3 que reconoce específicamente al  $Fc\gamma RIIA$ . Al añadir otro anticuerpo que reconoce al anticuerpo IV.3, se induce la agregación de los anticuerpos y con esto la agregación de los  $Fc\gamma RIIA$ . Esta agregación de receptores  $Fc\gamma RIIA$  indujo una elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  de alrededor de 100 nM (Figura 5). Con esto se confirmó que el método para medir  $[Ca^{2+}]_i$  funcionaba bien al estimular selectivamente al  $Fc\gamma RIIA$  de los PMN.



**Fig 5. Elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  en leucocitos polimorfonucleares (PMN) tras entrecruzar  $Fc\gamma RIIA$ .** Los PMN fueron cargados con Fura 2/AM, y tratados con el anticuerpo IV.3 contra  $Fc\gamma RIIA$ . La agregación del  $Fc\gamma RIIA$  se inicia al añadir, 40  $\mu\text{g/mL}$  del anticuerpo IV.3 (flecha). La gráfica es de un experimento representativo de 6 experimentos independientes.

## Verificación de la expresión de Fc $\gamma$ RIIA en la superficie celular de las células RBL-2H3

El receptor humano Fc $\gamma$ RIIA en su forma silvestre o en las varias formas mutantes fueron transfectadas en la línea celular de células cebadas RBL-2H3. Para confirmar la expresión del Fc $\gamma$ RIIA en estas células, las células fueron marcadas con el anticuerpo IV.3 que reconoce al Fc $\gamma$ RIIA y después con un anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> conjugado con FITC contra la molécula completa de IgG de ratón. La presencia del receptor se detectó mediante citometría de flujo. Las células RBL-2H3 previamente transfectadas con el Fc $\gamma$ RIIA expresaban este receptor en su membrana (Figura 6).

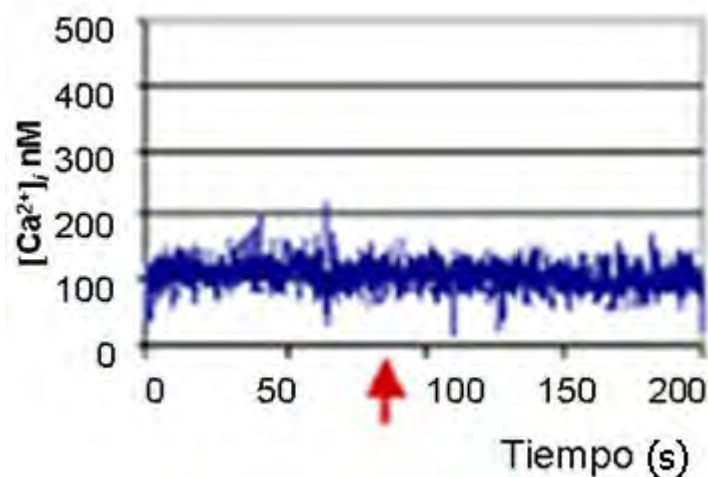


**Fig 6.** El Fc $\gamma$ RIIA se expresa en la superficie de células RBL-2H3 transfectadas con el cDNA para este receptor. Las células RBL-2H3 sin transfectar (área morada) o transfectadas establemente con el Fc $\gamma$ RIIA (línea verde) se marcaron con el mAb IV.3 (anti-Fc $\gamma$ RIIA) y analizaron posteriormente por citometría de flujo. A) Fc $\gamma$ RIIA WT B)

Fc $\gamma$ R1IA con la mutación VA231-32MM C) Fc $\gamma$ R1IA con la mutación VVAL234-7GISF D)  
Fc $\gamma$ R1IA con la mutación A224S.

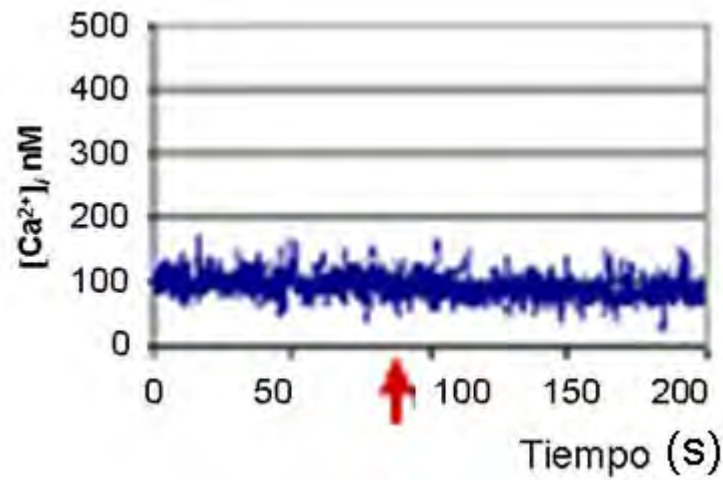
### Medición de la elevación de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en células RBL-2H3 mediada por Fc $\gamma$ R1IA

Con la finalidad de averiguar si existe diferencia en la señalización de Fc $\gamma$ R1IA dependiente de su asociación a microdominios de membrana (MDM), las células RBL-2H3 que expresan ya sea el Fc $\gamma$ R1IA tipo silvestre o las mutantes de Fc $\gamma$ R1IA con diferentes patrones de asociación a MDM, fueron cargadas con Fura 2/AM, para medir la concentración de calcio intracelular, antes y después de entrecruzar al receptor Fc $\gamma$ R1IA con el anticuerpo IV.3 específico contra este receptor. El Fc $\gamma$ R1IA silvestre expresado en las células RBL-2H3 no fue capaz de inducir una elevación de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Figura 7). De la misma forma el Fc $\gamma$ R1IA con la mutación A224S, que no se asocia a MDM, no indujo un aumento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Figura 8). Tampoco el Fc $\gamma$ R1IA con la mutación VA231-32MM, que se encuentra constitutivamente tanto dentro como fuera de MDM, fue capaz de inducir una elevación de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Figura 9)

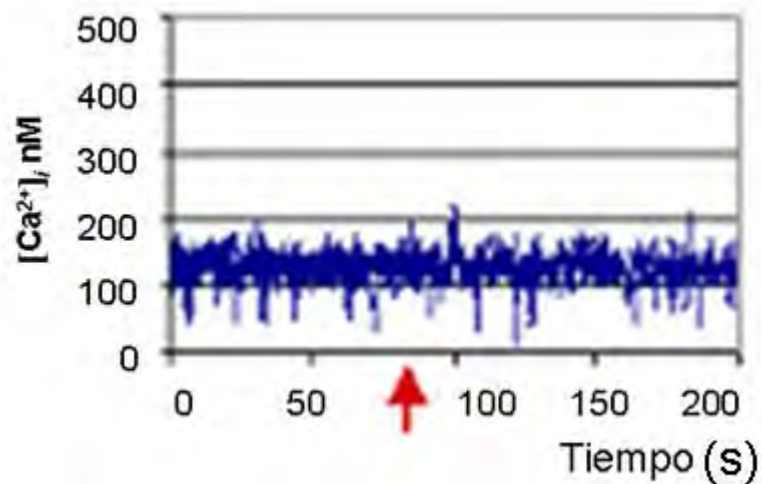


**Fig 7. El Fc $\gamma$ R1IA en células RBL-2H3 no elevó [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.** Las células RBL-2H3 que expresan en forma estable al Fc $\gamma$ R1IA tipo silvestre, fueron cargadas con Fura 2/AM y tratadas con el anticuerpo IV.3 contra el Fc $\gamma$ R1IA. La agregación del Fc $\gamma$ R1IA se

inicia al añadir 60  $\mu\text{g/mL}$  del anticuerpo contra el anticuerpo IV.3 (Flecha).



**Fig 8.** El  $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$  con la mutación **A224S** en células **RBL-2H3** no elevó  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Las células **RBL-2H3** que expresan en forma estable al  $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$  con la mutación **A224S**, fueron cargadas con Fura 2/AM y tratadas con el anticuerpo **IV.3** contra el  $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ . La agregación del  $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$  se inicia al añadir 60  $\mu\text{g/mL}$  del anticuerpo contra el anticuerpo **IV.3** (Flecha).

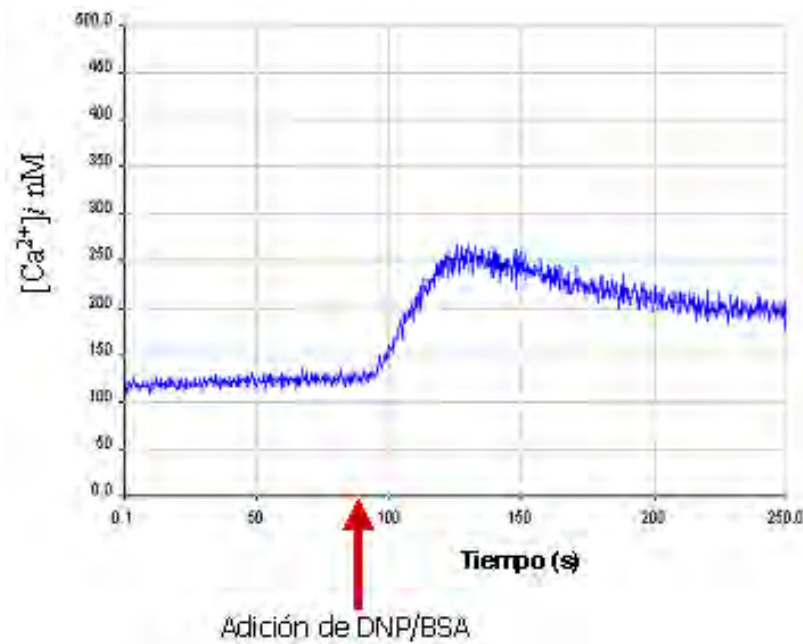


**Fig 9.** El  $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$  con la mutación **VA231-32MM** en células **RBL-2H3** no elevó  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Las células **RBL-2H3** que expresan en forma estable al  $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$  con la mutación **VA231-32MM**, fueron cargadas con Fura 2/AM y tratadas con el anticuerpo **IV.3** contra el  $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ . La agregación del  $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$  se inicia al añadir 60  $\mu\text{g/mL}$  del anticuerpo contra el anticuerpo **IV.3** (Flecha).

## Medición de la elevación de $[Ca^{2+}]_i$ en células RBL-2H3 mediada por $Fc\epsilon RI$

Considerando la posibilidad de que, la no elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  tras entrecruzar el  $Fc\gamma RIIA$  en estas células se debiera a defectos en la maquinaria celular de señalización, se midió la elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  estimulada por otro receptor. Las células RBL-2H3, (células en las que se expresó establemente el  $Fc\gamma RIIA$ ) son células cebadas de rata, que expresa de manera endógena el receptor de anticuerpos IgE, denominado  $Fc\epsilon RI$ . El receptor  $Fc\epsilon RI$  es un complejo molecular compuesto de una cadena  $\beta$ , dos cadenas  $\gamma$  unidas por puentes disulfuro y una cadena  $\alpha$ , que reconoce la molécula IgE. En las regiones citoplásmicas de las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$ , el  $Fc\epsilon RI$  posee secuencias ITAM. Al entrecruzar el  $Fc\epsilon RI$ , se desencadena una vía de señalización semejante a la reportada para los  $Fc\gamma Rs$ . Primero sus secuencias ITAM son fosforiladas. Syk se une al ITAM fosforilado y luego la actividad de PLC se incrementa (12), dando lugar a la formación de DAG e IP3. Éste último lleva a la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico.

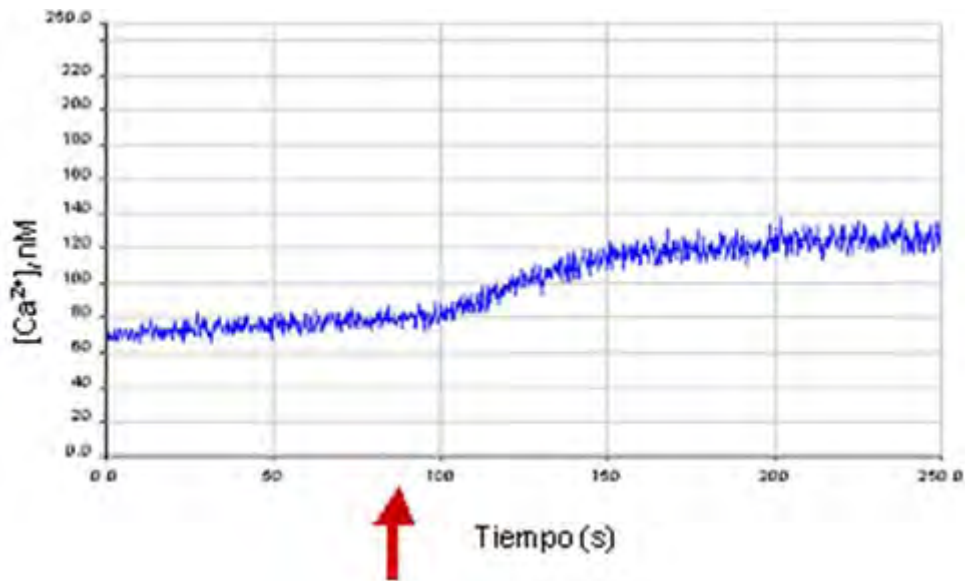
Las células RBL-2H3 que se encontraban transfectadas con el receptor  $Fc\gamma RIIA$  fueron incubadas con el anticuerpo IgE, SPE-7. El anticuerpo SPE-7 por ser de clase IgE se une a los  $Fc\epsilon R$  de las células mediante su fragmento Fc y queda listo para reconocer a su antígeno. Este anticuerpo es específico contra dinitrofenol (DNP). Tras la adición del reactivo entrecruzador DNP-BSA, el cual es un conglomerado del antígeno que reconoce el anticuerpo SPE-7, y por tanto entrecruza al receptor  $Fc\epsilon R$ , se detectó una elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  de 100 nM (Figura 10). Este resultado indica que la maquinaria necesaria para la elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  se encuentra en buenas condiciones, en las células RBL-2H3.



**Fig 10. Las células RBL-2H3 son capaces de elevar la  $[Ca^{2+}]_i$  mediada por  $Fc\epsilon RI$ .** Las células RBL-2H3 cargadas con fura 2/AM fueron marcadas con el anticuerpo IgE SPE-7 anti DNP. Los  $Fc\epsilon R$  se entrecruzan al añadir DNP-BSA (Flecha). Gráfica representativa de 8 ensayos independientes.

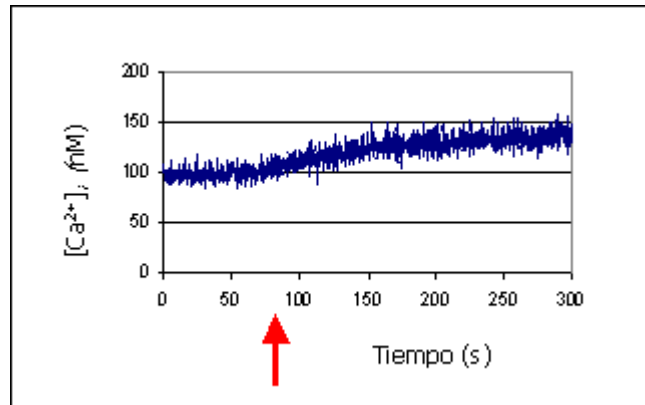
La detección de  $Ca^{2+}$  en el espectrofluorímetro es una medición promedio de todas las células en la celda del instrumento. En el caso de que muchas células no respondan al mismo tiempo la señal puede no ser detectada. Con el fin de ver si la no elevación del calcio era en realidad un problema de detección de una señal débil y no falta de respuesta de los receptores  $Fc$ , se repitieron los ensayos con cantidades mayores de células en la celda del instrumento. Colocando 7.5 millones de células en la celda y entrecruzando al  $Fc\gamma RIIA$  con el anticuerpo monoclonal IV.3, se detectó una buena señal de elevación de  $[Ca^{2+}]_i$





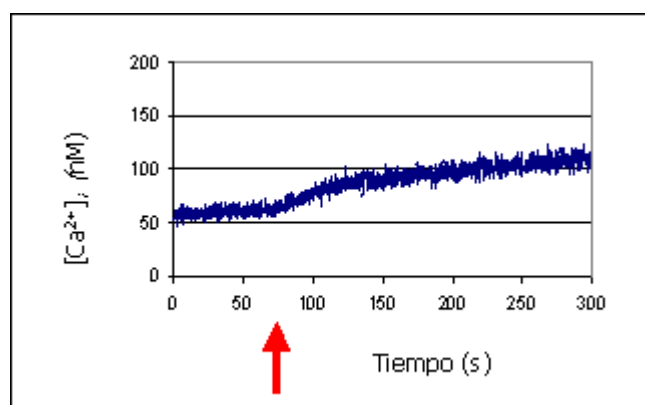
**Fig 11. El incremento de la concentración celular por ensayo permite la detección de la elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  tras el entrecruzamiento de  $Fc\gamma RIIA$ .** Las células RBL-2H3 transfectadas con el receptor  $Fc\gamma RIIA$  tipo silvestre fueron cargadas con Fura 2/AM, marcadas con el anticuerpo IV.3 contra  $Fc\gamma RIIA$  y llevadas al espectrofluorímetro para realizar las mediciones de  $[Ca^{2+}]_i$  a una suspensión con concentración de 7.5 millones de células/mL. El anticuerpo entrecruzador de cabra  $F(ab')_2$  contra IgG de ratón se añadió a la suspensión en el momento que indica la flecha.

Una vez encontrada la concentración celular que permitió la detección de la elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  en las células RBL-2H3 transfectadas con  $Fc\gamma RIIA$ . Se midió la elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  tras el entrecruzamiento del  $Fc\gamma RIIA$  tipo silvestre y las mutantes de  $Fc\gamma RIIA$  con diferente patrón de asociación a MDM. Se encontró que el receptor tipo silvestre logró promover una elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  de alrededor de 45 nM (Figura 11).



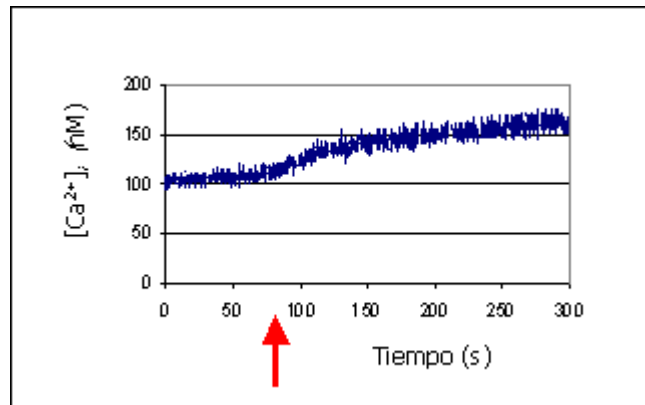
**Fig 12. El receptor FcγRIIA con la mutación VA231-32MM media la elevación de  $[Ca^{2+}]_i$** ; Las células RBL-2H3 transfectadas con el receptor FcγRIIA con la mutación VA231-32MM fueron cargadas con Fura 2/AM, marcadas con el anticuerpo IV.3 contra FcγRIIA y llevadas al espectrofluorímetro para realizar las mediciones de  $[Ca^{2+}]_i$ . Gráfica representativa de 6 ensayos independientes.

Así mismo, el receptor con la mutación VA231-32MM logró promover una elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  de alrededor de 45 nM (Figura 12). El receptor con la mutación VVAL234-7GISF, logró promover una elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  de alrededor de 45 nM (Figura 13). Finalmente, el receptor con la mutación A224S, también logró promover una elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  de alrededor de 45 nM (Figura 14).



**Fig 13. El receptor FcγRIIA con la mutación VVAL234-7GISF media la elevación de  $[Ca^{2+}]_i$** ; Las células RBL-2H3 transfectadas con el receptor FcγRIIA con la mutación

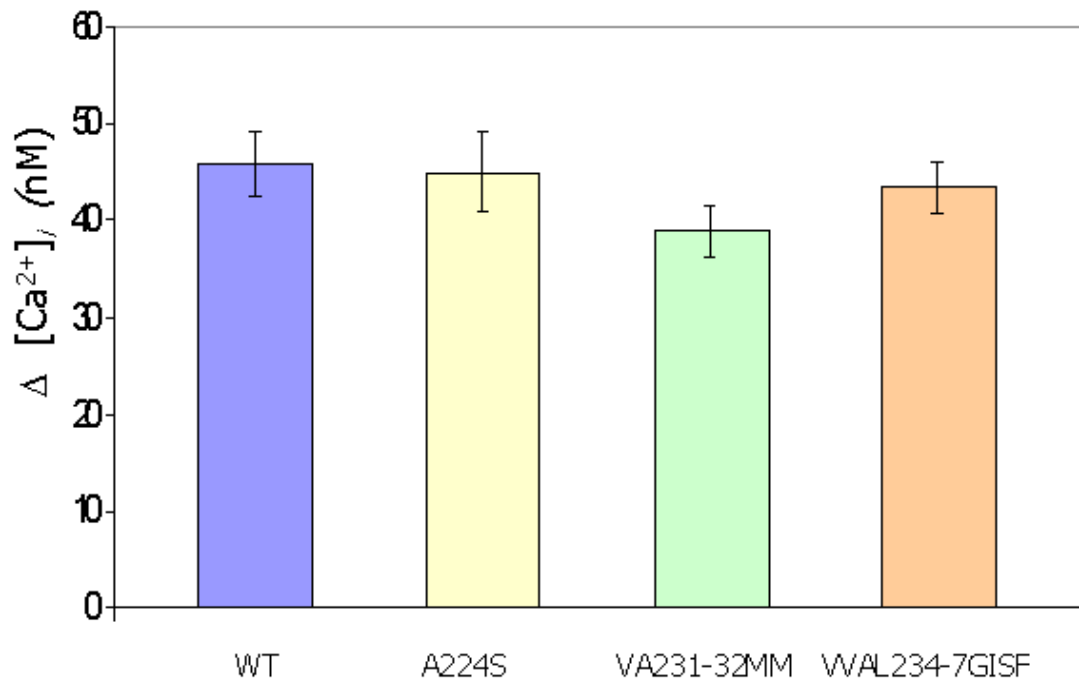
VVAL234-7GISF fueron cargadas con Fura 2/AM, marcadas con el anticuerpo IV.3 contra Fc $\gamma$ RIIA y llevadas al espectrofluorómetro para realizar las mediciones de [Ca $^{2+}$ ] $_i$ . Gráfica representativa de 3 ensayos independientes.



**Fig 14. El receptor Fc $\gamma$ RIIA con la mutación A224S media la elevación de [Ca $^{2+}$ ] $_i$**

Las células RBL-2H3 transfectadas con el receptor Fc $\gamma$ RIIA con la mutación A224S fueron cargadas con Fura 2/AM, marcadas con el anticuerpo IV.3 contra Fc $\gamma$ RIIA y llevadas al espectrofluorómetro para realizar las mediciones de [Ca $^{2+}$ ] $_i$ . Gráfica representativa de 7 ensayos independientes.

Estos resultados indican que el receptor Fc $\gamma$ RIIA es capaz de mediar la elevación de [Ca $^{2+}$ ] $_i$  ya sea se encuentre asociado o no a MDM (Figura 16).



**Fig 15. El receptor Fc $\gamma$ RIIA con la mutaci3n A224S media la elevaci3n de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> independientemente de su asociaci3n a microdominios de membrana (MDM).  $\Delta$  [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> tras entrecruzar los Fc $\gamma$ RIIA con diferentes patrones de asociaci3n a MDM. Receptor Fc $\gamma$ RIIA tipo silvestre (WT) n=11, Fc $\gamma$ RIIA con mutaci3n A224S n =7 Fc $\gamma$ RIIA con mutaci3n VA231-32MM n= 6 Fc $\gamma$ RIIA con mutaci3n VVAL234-7GISF n = 3**

## DISCUSIÓN

La asociación del Fc $\gamma$ RIIA con los microdominios de membrana (MDM) no es indispensable para la señalización mediada por Fc $\gamma$ RIIA ya que la elevación de calcio intracitoplásmico ( $[Ca^{2+}]_i$ ) mediada por Fc $\gamma$ RIIA ocurre independientemente de la asociación de este receptor a MDM (Fig 15).

La existencia de las balsas lipídicas o MDM fue un tema controvertido por muchos años. Ésta controversia se daba ya que la naturaleza insoluble de los MDM es la propiedad más usada para probar la existencia de estos MDM. No obstante al juntar diferentes técnicas de análisis se comprueba la existencia de las balsas lipídicas, tanto en células completas como en modelos de sistemas de membranas. Entre las técnicas que se han usado para respaldar la existencia de los MDM se encuentran la microscopía FRET (del inglés fluorescence resonance energy transfer), microscopía de fluorescencia, microscopía de fuerza atómica, FRAP (del inglés fluorescence recovery after photobleaching) y single-particle tracking(16). Al comparar los resultados de ensayos realizados en células completas se ha corroborado que efectivamente los MDM obtenidos mediante solubilización en frío con detergentes no iónicos corresponden a aquellos presentes en las células completas.

Se ha establecido que las balsas lipídicas o MDM juegan un papel importante en varios procesos celulares. Entre los procesos celulares en los que se ha involucrado a las balsas lipídicas se encuentra la exocitosis, el tráfico intracelular y la señalización intracelular. (24)

Existen reportes en los que se emplean técnicas que ayudan a eliminar a los MDM. De esta manera se pretende evaluar si los MDM son indispensables para la señalización de algunos receptores pertenecientes al sistema inmunológico tales como el BCR. En estos reportes indican que la presencia de los MDM es necesaria para la señalización mediada por el receptor (10). Las técnicas empleadas para la eliminación de los MDM en estos trabajos involucran el uso de inhibidores de la síntesis de colesterol y compuestos que retiran al colesterol de las células tales como la ciclodextrina. El eliminar al colesterol de las células puede efectivamente eliminar la formación de los

MDM. Sin embargo no se le puede atribuir la responsabilidad completa de la ineficiencia de la señalización del receptor a la eliminación de los MDM. El colesterol cumple otras funciones celulares importantes tales como el equilibrio iónico (8). Al afectarse las otras funciones que cumple el colesterol en la célula se afecta el buen funcionamiento de la célula. Por esta razón los resultados que indican que la localización de dichos receptores en MDM es indispensable, pudieran estar confundiendo con defectos en la señalización. Debidos a defectos en el buen funcionamiento general de la célula. El presente estudio ofrece la ventaja de que al no estar eliminando al colesterol de la célula, ésta puede llevar a cabo sus funciones de manera normal. Lo anterior permite evaluar los efectos en la señalización del Fc $\gamma$ R1IA debidos únicamente a la asociación del Fc $\gamma$ R1IA a los MDM y no debidos a defectos en otras funciones celulares.

La causa principal de que se considere que los MDM pueden tener un papel importante en la señalización intracelular, se debe a que existen componentes de las vías de transducción de señales que se encuentran anclados a la porción interna del MDM. Entre estos componentes encontramos a la proteína tirosina cinasa específica de leucocitos (Lck), la proteína de unión adaptadora de linfocitos T activos (LAT), CD8, moléculas del complejo Mayor de Histocompatibilidad, y algunas proteínas G.(13)

Existen reportes que sugieren que diversos receptores pertenecientes al sistema inmunológico incluyendo al Fc $\gamma$ R1IA deben asociarse con los MDM para poder enviar señales al interior de la célula. Estos reportes basan esta hipótesis en la evidencia de que a estos receptores se les ha localizado en los MDM tras su entrecruzamiento (22). Otra evidencia que apoya la hipótesis de que la asociación del Fc $\gamma$ R1IA con los MDM es indispensable para la señalización del Fc $\gamma$ R1IA es que se han encontrado moléculas involucradas en la señalización del Fc $\gamma$ R1IA como son; algunas cinasas de la familia Src, en asociación con los MDM (25). Sin embargo, en este estudio se demuestra que la asociación del Fc $\gamma$ R1IA con MDM no es indispensable para su señalización. Ya que el que Fc $\gamma$ R1IA que es incapaz de asociarse a MDM, es capaz de mediar la elevación de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> tras el entrecruzamiento del Fc $\gamma$ R1IA. Esto bien puede deberse a que existen moléculas involucradas en la señalización del

Fc $\gamma$ R1IA como son algunas de las propias cinasas de la familia Src que no se encuentran asociadas a los MDM (26). Más aún; se ha detectado que cinasas de la familia Src, a las que normalmente se les encuentra asociadas a MDM, se les puede localizar fuera de MDM (26). Por lo que estas cinasas pueden estar disponibles para ser usadas en la cascada de señalización mediada por el Fc $\gamma$ R1IA, aún si el Fc $\gamma$ R1IA no se asocia a MDM.

Existe un reporte que muestra que la activación de NF- $\kappa$ B (del inglés Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) mediada por Fc $\gamma$ R1IA necesita de la asociación del Fc $\gamma$ R1IA a los MDM (23). La activación de NF- $\kappa$ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) es un evento tardío en la cascada de señalización que tiene lugar tras el entrecruzamiento del Fc $\gamma$ R1IA (4). La elevación de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> es un evento temprano en la cascada de señalización que tiene lugar tras el entrecruzamiento del Fc $\gamma$ R1IA (27). Siendo la activación de NF- $\kappa$ B un evento tardío en la señalización pudiera ser que el requerimiento de la asociación del Fc $\gamma$ R1IA a los MDM para activación de NF- $\kappa$ B se deba a que una mayor cantidad de moléculas involucradas requiere una organización más estricta que esté mediada por MDM. Existen etapas en la señalización en las que se requieren plataformas de señalización que involucran moléculas adaptadoras que se reclutan al complejo original de señalización. Este proceso se ha descrito mejor en la activación de los linfocitos T en donde la activación del receptor conlleva al reclutamiento de la cinasa ZAP-70, la cual después recluta a la fosfolipasa C, a la fosfatidilinositol 3 cinasa y la proteína de unión adaptadora de linfocitos T activos (LAT). Posteriormente la fosforilación de la proteína LAT crea sitios de anclaje para más moléculas de señalamiento. Se ha pensado que los mecanismos que regulan el ensamblaje y la dinámica de los MDM influyen en la duración y la fuerza de la señalización del TCR(13)

No obstante aunque la asociación del Fc $\gamma$ R1IA a MDM al parecer es necesaria para la activación de NF- $\kappa$ B, este trabajo muestra que la asociación del receptor Fc $\gamma$ R1IA a MDM no es indispensable para la señalización del Fc $\gamma$ R1IA. Ya que el Fc $\gamma$ R1IA no requiere de su localización en MDM para la movilización de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

## CONCLUSIONES

Debido a que el Fc $\gamma$ RIIA ya sea tipo silvestre o las mutantes de Fc $\gamma$ RIIA con diferentes patrones de asociación a microdominios de membrana, fueron capaces de elevar en igual magnitud la concentración de calcio intracitoplásmico ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), la asociación de Fc $\gamma$ RIIA a MDM no es indispensable para la elevación de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mediada por este receptor.



## REFERENCIAS

1. Wang, W., S. Singh, D. L. Zeng, K. King, and S. Nema. 2007. Antibody structure, instability, and formulation. *J Pharm Sci* 96:1-26.
2. Ravetch, J. V., and S. Bolland. 2001. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19:275-290.
3. Sanchez-Mejorada, G., and C. Rosales. 1998. Fc gamma receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras. *J Biol Chem* 273:27610-27619.
4. Garcia-Garcia, E., and C. Rosales. 2002. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 72:1092-1108.
5. van de Winkel, J. G., R. van Ommen, T. W. Huizinga, M. A. de Raad, W. B. Tuijnman, P. J. Groenen, P. J. Capel, R. A. Koene, and W. J. Tax. 1989. Proteolysis induces increased binding affinity of the monocyte type II FcR for human IgG. *J Immunol* 143:571-578.
6. Stuart, S. G., M. L. Trounstein, D. J. Vaux, T. Koch, C. L. Martens, I. Mellman, and K. W. Moore. 1987. Isolation and expression of cDNA clones encoding a human receptor for IgG (Fc gamma RII). *J Exp Med* 166:1668-1684.
7. Huizinga, T. W., D. Roos, and A. E. von dem Borne. 1990. Neutrophil Fc-gamma receptors: a two-way bridge in the immune system. *Blood* 75:1211-1214.
8. Pan, L., and P. Pei. 2003. Signaling transduction by IgG receptors. *Chin Med J (Engl)* 116:487-494.
9. Barnes, N. C., M. S. Powell, H. M. Trist, A. L. Gavin, B. D. Wines, and P. M. Hogarth. 2006. Raft localisation of Fc gamma RIIa and efficient signaling are dependent on palmitoylation of cysteine 208. *Immunol Lett* 104:118-123.
10. Sautès, C., and L. Cassard. 2003. Fc Gamma Receptors. A Magic Link with the Outside World. *ASHI Quarterly*.
11. Li, M., U. Wirthmueller, and J. V. Ravetch. 1996. Reconstitution of human Fc gamma RIII cell type specificity in transgenic mice. *J Exp Med* 183:1259-1263.
12. Penhallow, R. C., K. Class, H. Sonoda, J. B. Bolen, and R. B. Rowley. 1995. Temporal activation of nontransmembrane protein-tyrosine kinases following mast cell Fc epsilon RI engagement. *J Biol Chem* 270:23362-23365.
13. Golub, T., S. Wacha, and P. Caroni. 2004. Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr Opin Neurobiol* 14:542-550.
14. Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
15. Munro, S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115:377-388.
16. Radeva, G., and F. J. Sharom. 2004. Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. *Biochem J* 380:219-230.
17. Taner, S. B., B. Onfelt, N. J. Pirinen, F. E. McCann, A. I. Magee, and D. M. Davis. 2004. Control of immune responses by trafficking cell surface proteins,

- vesicles and lipid rafts to and from the immunological synapse. *Traffic* 5:651-661.
18. Brown, D. 1993. The tyrosine kinase connection: how GPI-anchored proteins activate T cells. *Curr Opin Immunol* 5:349-354.
  19. Harder, T., P. Scheiffele, P. Verkade, and K. Simons. 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 141:929-942.
  20. Bromley, S. K., W. R. Burack, K. G. Johnson, K. Somersalo, T. N. Sims, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin. 2001. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 19:375-396.
  21. Paratcha, G., and C. F. Ibanez. 2002. Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme. *Curr Opin Neurobiol* 12:542-549.
  22. Rollet-Labelle, E., S. Marois, K. Barbeau, S. E. Malawista, and P. H. Naccache. 2004. Recruitment of the cross-linked opsonic receptor CD32A (FcγRIIA) to high-density detergent-resistant membrane domains in human neutrophils. *Biochem J* 381:919-928.
  23. Garcia-Garcia, E., E. J. Brown, and C. Rosales. 2007. Transmembrane mutations to FcγRIIA alter its association with lipid rafts: implications for receptor signaling. *J Immunol* 178:3048-3058.
  24. Ikonen, E. 2001. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 13:470-477.
  25. Zhou, M. J., D. M. Lublin, D. C. Link, and E. J. Brown. 1995. 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* 270:13553-13560.
  26. Liang, X., A. Nazarian, H. Erdjument-Bromage, W. Bornmann, P. Tempst, and M. D. Resh. 2001. Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction. *J Biol Chem* 276:30987-30994.
  27. Barabe, F., E. Rollet-Labelle, C. Gilbert, M. J. Fernandes, S. N. Naccache, and P. H. Naccache. 2002. Early events in the activation of Fc gamma RIIA in human neutrophils: stimulated insolubilization, translocation to detergent-resistant domains, and degradation of Fc gamma RIIA. *J Immunol* 168:4042-4049.