



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Participación de la cinasa Lyn en el sistema de transducción de señales del receptor tipo Toll-4 (TLR-4) en células cebadas

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
D O C T O R E N C I E N C I A S
P R E S E N T A:
ALEJANDRO MARTÍN ÁVILA HERNÁNDEZ

TUTORA: DRA. CLAUDIA GONZÁLEZ ESPINOSA

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

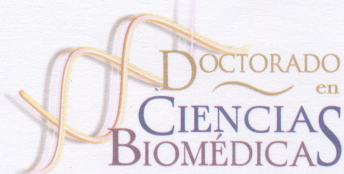


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PDCB/grad/007/Jur/2012

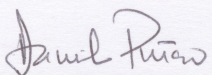
DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
 Presente.

Nos permitimos informarle que el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión **293** del 18 de enero del 2012, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **ALEJANDRO MARTÍN ÁVILA HERNÁNDEZ**, con número de cuenta **99016555**, con la tesis titulada: **"PARTICIPACIÓN DE LA CINASA LYN EN EL SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DEL RECEPTOR TIPO TOLL-4 (TLR-4) EN CÉLULAS CEBADAS"**, dirigida por la Dra. Claudia González Espinosa.

| | |
|-------------|----------------------------|
| Presidente: | Dr. Enrique Ortega Soto |
| Vocal: | Dr. Leopoldo Flores Romo |
| Vocal: | Dr. Gustavo Pedraza Alba |
| Vocal: | Dr. Alberto Olivares Reyes |
| Secretario: | Dr. Eduardo García Zepeda |

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud del alumno **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base a lo establecido en el **Artículo 31** del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 Ciudad Universitaria a 18 de enero del 2012


DR. DANIEL PIÑERO DALMAU
COORDINADOR


DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
RESPONSABLE DE ENTIDAD

c.c.p: Expediente alumno
 DPD/AZD/aap

Teléfono 5623 0171 5623 0170 <http://www.pdcb.unam.mx> E-mail: pdcb@servidor.unam.mx

Comité tutor:

Dra. Marina Macías Silva, Investigadora titular del Departamento de Biología celular, Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM.

Dr. Eduardo García Zepeda, Investigador titular del Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBm), UNAM

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), donativo no. 83079 (CGE), beca de doctorado no. 208218 (AMAH) y beca para tesis de licenciatura no. 102830 (Adriana Martínez Juárez). Toda la investigación contenida en esta tesis se realizó en el laboratorio no. 11 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN).

Quiero dedicar esta tesis a las siguientes personas:

A María de los Ángeles y Florencio. A Guadalupe, Celia, Fabián y Rigoberto. A Josefina, José, Alejandra, Martha y Moisés. A María e Ikram. A Iván, Gabriel, Sara e Israel. A la Dra. Claudia y a todos mi compañeros y ex-compañeros del laboratorio. A mis amigos.

Gracias por toda la inspiración que representan en mi vida, por ser la fuerza que me impulsa día a día a seguir adelante, por guiarme y enseñarme el valor de fijarse una meta y llegar hasta ella. Gracias también por acompañarme en las aventuras de la vida y formar parte de mi entorno.

I. ÍNDICE GENERAL

Resumen, p 14

Abstract, p 15

Prólogo, p 16

1. Introducción, p 18

1.1 Perspectiva biológica del sistema inmune, p 19

1.2 El sistema inmune innato, p 24

1.3 Receptores tipo Toll, p 27

1.4 De *Drosophila melanogaster* al *Homo sapiens*, p 31

1.5 El receptor TLR-4, p 35

a) Vía de señalización dependiente de MyD88, p 36

b) Vía de señalización dependiente de TRIF, p 39

1.6 Las células cebadas (CCs), p 41

a) Origen y diferenciación, p 41

b) Estructura y características morfo-fisiológicas, p 45

1.7 Las CCs en las reacciones alérgicas, p 48

a) Estructura del receptor FcεRI, p 50

b) Las cinsasas de la familia Src (SFKs): Lyn y Fyn, p 51

c) Señalización del FcεRI a través de Lyn, p 51

d) Señalización del FcεRI a través de Fyn, p 52

e) La vía de regulación negativa orquestada por Lyn, p 53

1.8 Las CCs en las infecciones bacterianas, p 57

1.9 Señalización a través del TLR4 en células cebadas, p 58

1.10 Lyn en la activación del receptor TLR-4, p 61

1.11 Planteamiento del problema, p 62

2. Hipótesis, p 63

3. Objetivos, p 65

a) Objetivo general, p 66

b) Objetivos particulares, p 66

4. Diseño Experimental, p 67

5. Materiales y métodos, p 69

5.1 Anticuerpos y reactivos, p 70

5.2 Ratones, p 70

5.3 Genotipos, p 71

a) *Purificación del ADN, p 71*

b) *Amplificación del ADN, p 72*

5.4 Cultivo celular, p 73

5.5 Citometría de flujo, p 74

5.6 Estimulación de BMMCs con LPS, obtención de proteínas totales, inmunoblot e inmunoprecipitación de proteínas, p 74

5.7 Ensayo de movilidad electroforética (EMSA) , p 76

5.8 Reconstitución intraperitoneal de ratones Kit^w/Kit^{wsh}, p 77

5.9 Modelo murino de endotoxemia y lavados peritoneales, p 77

5.10 ELISA, p 78

5.11 Análisis estadístico, p 79

6. Resultados, p 80

6.1 Lyn participa en la secreción de TNF en respuesta al LPS en células cebadas, p 81

6.2 Lyn controla la activación de MEK3/6 en células cebadas estimuladas con LPS, p 84

6.3 Lyn contribuye a la activación de ERK1/2, p38 y JNK inducida por el receptor TLR-4, p 85

6.4 El receptor TLR-4 es activado selectivamente por LPS, p 87

6.5 Lyn controla positivamente la vía de NFκB inducida por la activación del TLR-4, p 88

6.6 Lyn controla la formación del complejo de TRAF-6/TAK-1 en respuesta al LPS, p 91

6.7 Lyn se activa y puede asociarse con TRAF-6 en respuesta al LPS, p 92

6.8 Lyn regula positivamente la secreción de TNF inducida por LPS, en un modelo in vivo de estimulación de células cebada, p 95

6.9 Lyn controla la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal en respuesta al LPS *in vivo*, p 96

7. Discusión, p 99**8. Apéndices, p 114**

A) La secreción de TNF inducida por LPS requiere la activación de PKC α/β y δ , p 115

B) Lyn participa en el establecimiento de la tolerancia al LPS, p 117

9. Referencias, p 120**10. Artículos generados, p 128****II. ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Moléculas del sistema inmune encontrados en diversos organismos del árbol filogenético, p 20

Figura 2. Inmunidad innata y adaptativa, p 23

Figura 3. Respuesta de inmunidad mediadas por receptores TLR, p 28

Figura 4. Estructura de los TLRs, p 29

Figura 5. Vía de Toll en *Drosophila* y vía TLR en mamíferos, p 34

Figura 6. Mecanismo de presentación del LPS con el TLR-4, p 35

Figura 7. El lipopolisacárido (LPS), p 36

Figura 8. Señalización del receptor TLR-4, p 38

Figura 9. Esquema del paradigma de la localización del adaptador señalizador, p 40

Figura 10. Dos modelos para explicar el origen hematopoyético de las CCs, p 43

Figura 11. Micrografía de una célula cebada, p 46

Figura 12. Señalización a través del receptor Fc ϵ RI, p 55

Figura 13. Estructura y modo de regulación de Lyn, p 56

Figura 14. Vía de señalización del TLR-4 en CCs, p 59

Figura 15. Genotipos de CCs WT y Lyn $^{-/-}$, p 73

Figura 16. Lyn regula positivamente la secreción de TNF inducida por LPS en células cebadas, p 83

Figura 17. Lyn controla positivamente la activación de las MAPKs dependiente de LPS, p 86

Figura 18. El receptor TLR-4 es selectivamente activado por el LPS en BMDCs, p 87

Figura 19. La cinasa Lyn regula la vía de NF κ B activada por el receptor TLR-4 en células cebadas, p 90

Figura 20. La cinasa Lyn modula la formación y función del complejo TRAF-6/TAK-1 inducido por TLR-4, p 93

Figura 21. Lyn se activa y se asocia con TRAF-6 in respuesta al LPS in células cebadas, p 94

Figura 22. La cinasa Lyn controla positivamente la secreción temprana de TNF, dependiente de células cebadas, inducida por LPS *in vivo*, p 98

Figura 23. Tres hipótesis para explicar el mecanismo por el cual Lyn podría regular el sistema de transducción del TLR-4, p 107

Figura 24. Lyn participa en el establecimiento de la tolerancia al LPS, p 115

Figura 25. La secreción de TNF inducida por LPS requiere la activación de PKC α/β y δ , p 119

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evolución del sistema immune, p 22

Tabla 2. Perspectiva general de las principales características del sistema immune en mamíferos, p 26

Tabla 3. TLRs y sus ligandos, p 30

Tabla 4. Vías canónicas dependientes de MyD88 y TRIF, p 32

Tabla 5. Mediadores de las células cebadas, p 48

Tabla 6. Diseño experimental, p 68

IV. ABREVIATURAS

A

Ag: Antigen

Ab: Antibody

B

BMMC: Bone marrow derived mast cell

BSA: Bovin Serum Albumin

BTK: Bruton's tyrosine kinase

C

Cbp: Csk binding protein

CD14: cluster design 14

CD36: cluster design 36

cDNA: complementary desoxiribonucleic acid

Csk: COOH-terminal Src Kinase

D

DAG: diacilglicerol)

DEPC : Diethylpyrocarbonate

DNA: Deoxyribonucleic acid

DNP: dinitrophenol

E

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay

ERK: extracellular signal regulated kinase

F

FcεRI: Fc epsilon receptor I

G

Gab2: Grb2-associated binder 2

GADS: Grb2 related adaptor protein

GATA: Gata binding protein

GDP: Guanosine diphosphate

GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

GTP: Guanosine triphosphate

H

HSA: human serum albumin

Hsk: Src family kinase

I

IFN: Interferon

IgE: Immunoglobulin E

IKK: inhibitor of nuclear factor-κB-kinase complex

IL-3: Interleukine 3

IP₃: inositol 1, 4, 5-triphosphate

IRAK: IL-1R associated kinase

ITAM: immunoreceptor tyrosine based activated motifs

ITIM: Immunoreceptor tyrosine based inhibition motif

I κ B: inhibitor of NF- κ B

J

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

K

kDa: kilodaltones

L

LAT: linker for activation of T cells

LPS: lipopolisaccharide

LRR: Leucine rich repeats

LTC: Leucotriene

M

μ l: microlitros

MAPK: Mitogen activated protein kinase

MCP: Monocyte chemoattractant protein

MCP: Mast cell protenitor

MD-2: myeloid differentiation protein 2

MHC: Major Histocompatibility Complex

MIP: Macrophage Inflammatory Protein

MCP: Myeolid common progenitor

MyD88: myeloid differentiation primary-response protein 88

MyD88: Myeloid differentiation primary-response protein 88

N

NEO: Neomycin

NF- κ B: Nuclear factor κ B

NK: Natural Killer

NTAL: Non T-cell activated linker

O

OVA: Ovalbumin

P

p38: protein of 38 kDa

PAMP: Pathogen associated molecular pattern

PCR: Polymerase Chain Reaction

PGL: Prostaglandine

PI3K: phosphatidilinositol 3-kinase

PIP2: phosphatilinositol 4, 5- biphosphate

PIP3: phosphatidilinositol 3, 4, 5-triphosphato

PKC: protein kinase C

PLA: Phospholipase A

PLC- γ : phospholipase C- γ

PLD: Phospholipase D

PTK: Protein tyrosine kinase

Q

R

RNA: Ribonucleic acid

RT-PCR: Reverse Transcription polymerase chain reaction

S

S1P: Sphingosine 1-phosphate

SCF: stem cell factor

SH2: Src homology 2

SH3: Src homology 3

SHIP: SH2-containing inositol 5 phosphatase

SHP-1: SH2-containing protein Tyrosine phosphatase 1

Snap23: synaptosomal-associated protein, 23kDa

Sphk1: Sphingosine kinase 1

Syk: Spleen tyrosine kinase

T

TAB: TAK-1-binding protein

TAK-1: Transforming growth factor- β (TGF- β) activated kinase

TCR: T-cell receptor

Th: T helper

TIR: Toll/IL-1 receptor

TIRAP: TIR-domain-containing adaptor protein

TLR4: toll like receptor-4

TNF- α : tumour necrosis factor- α

TRAF-6: Tumor necrosis factor (TNF)-receptor associated factor 6

TRAM: TRIF-related adaptor molecule

TRIF: TIR-domain-containing adaptor protein inducing INF- β

U

UBC13: Ubiquitin-conjugating enzyme 13

UEV1A: Ubiquitin conjugating enzyme E2 variant 1

V

Vav:

W

WT: Wild type

X

Y

Z

Zap70: zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa

Zym: Zymosan

Resumen

Las células cebadas (CCs) participan en las reacciones alérgicas y activan mecanismos protectores de la inmunidad innata a través del receptor TLR-4. La cinasa Lyn es un elemento importante para el sistema de transducción del receptor FcεRI en CCs, pero su papel específico en la cascada de activación del TLR-4 es aun desconocido. En el presente trabajo, caracterizamos distintas respuestas inducidas por el TLR-4 en CCs derivadas de médula ósea (BMMCs) de ratones WT y Lyn^{-/-} y encontramos que las CCs Lyn^{-/-} secretaron menos TNF que las CCs WT en respuesta al LPS. Las CCs carentes de Lyn también mostraron menor fosforilación de las MAPKs e IKK-IκB, así como una menor actividad de NFκB después de la activación del TLR-4, en comparación con las células WT. Asimismo, fue detectada una interacción constitutiva entre el factor 6 asociado al receptor para TNF (TRAF-6) y la cinasa 1 activada por TGF-β (TAK-1) en células Lyn^{-/-} y este complejo fue insensible a la activación del TLR-4. Después de la estimulación con LPS, encontramos que Lyn puede activarse y asociarse con TRAF-6. Analizando dos respuestas locales dependientes de CCs *in vivo*, encontramos que Lyn controla positivamente la producción temprana de TNF después de una inyección intraperitoneal de LPS. En conjunto, nuestros resultados indican que Lyn juega un papel positivo en la producción de TNF inducida por el receptor TLR-4 controlando la actividad del complejo TRAF-6/TAK-1 en CCs.

Abstract

Mast cells (MCs) control allergic reactions and contribute to protective innate immune responses through Toll-like receptor (TLR)-4 activation. The tyrosine kinase Lyn is important to the high affinity IgE receptor (FcεRI) signal transduction system in MCs, but its role on TLR-4 signalling cascade is still elusive. Here, we characterized several TLR-4-triggered responses in bone marrow-derived mast cells (BMMCs) from WT and Lyn ^{-/-} mice. We found that Lyn ^{-/-} MCs secreted lower amounts of TNF after LPS challenge when compared to WT cells. Lyn ^{-/-} BMMCs showed less MAPK, IκB phosphorylation and NFκB nuclear translocation after TLR-4 triggering than WT cells. LPS-induced MAPK and IKK phosphorylation were importantly reduced in the absence of Lyn. A constitutive interaction between TNF receptor associated factor 6 (TRAF-6) and phosphorylated TGF-β-activated kinase 1 (TAK-1) was observed in Lyn ^{-/-} BMMCs and this complex was insensitive to LPS addition. Lyn kinase was activated and associated to TRAF-6 shortly after LPS addition in WT MCs. Analyzing two local mast cell-dependent innate immune responses *in vivo*, we found that Lyn positively controls early TNF production and immune cell recruitment after an intraperitoneal injection of LPS. Our results indicate that Lyn plays a positive role in TLR-4-induced production of TNF in MCs controlling the activity of the TRAF-6/TAK-1 protein complex.

Prólogo

Importantes descubrimientos han dado lugar al desarrollo de los conceptos más elementales en inmunología y gracias a éstos ha sido posible entender, cada vez mejor, las atribuciones de la inmunidad innata, también conocida como inmunidad natural, en el control de la respuesta inmune global¹. Han transcurrido poco más de dos décadas desde que la inmunidad innata comenzó a ser explorada extensivamente debido al impacto que resultó tener en la regulación de la respuesta inmune adaptativa². Por presentar una alta especificidad, memoria y resolver con extraordinaria selectividad diversos procesos inflamatorios, la mayor parte de la investigación básica en inmunología se había centrado casi exclusivamente a entender los mecanismos de la inmunidad adaptativa desde mediados del siglo XIX hasta finales del siglo XX^{3,4}. El estudio de la inmunidad adaptativa fue dando paso a excitantes descubrimientos útiles no sólo en la caracterización de las bases celulares y moleculares de este tipo de inmunidad, sino también en la construcción de un cuerpo de evidencias experimentales que sugerían la existencia de procesos inmunológicos complementarios que podían optimizar su capacidad de respuesta⁵. Este tipo de inmunidad fue descrito predominantemente como parte del sistema innato y su caracterización cambió la manera en la que nuevas preguntas fueron planteadas en torno al desarrollo de estrategias para frenar los efectos dañinos en diversos estados inflamatorios. A pesar de que se tenía conocimiento de la inmunidad natural desde por lo menos finales del siglo XIX⁴, fue en las décadas de los años 80's y 90's del siglo pasado cuando una base experimental bien cimentada tomó forma, y lo que parecía ser lógicamente relevante en la teoría, pudo ser corroborado a través de la investigación científica^{1,2}. Basado en un sistema de receptores de

reconocimiento de patrones, la inmunidad innata mantiene constante comunicación con la inmunidad adaptativa a través de una compleja red de células y moléculas involucradas en la coordinación de la respuesta inmune frente a agentes extraños, infecciosos o no, que pueden llegar a presentarse en el hospedero. Actualmente es posible vislumbrar que el entendimiento del control innato sobre la capacidad de adaptación de la respuesta inmune constituye uno de los tópicos de especial interés que tendrán que ser aún desarrollados en los próximos años con el afán de tener una visión integral sobre los estados de salud y enfermedad en el organismo.

En la introducción de esta tesis daremos un panorama general sobre los elementos que definen al sistema inmune. Especialmente, nos enfocaremos en describir algunos de los componentes del sistema inmune innato, haciendo énfasis en los receptores tipo Toll (TLRs). De manera particular, hablaremos del sistema de transducción del receptor TLR-4, cuya activación es inducida por el lipopolisacárido (LPS) bacteriano a través de las vías dependientes de MyD88 y TRIF. También hablaremos de las células cebadas (CCs) y tocaremos aspectos sobre su origen, diferenciación, estructura, papel en las enfermedades alérgicas y relevancia en las infecciones bacterianas. Finalmente abordaremos la evidencia existente sobre la señalización a través del receptor TLR-4 en CCs y hablaremos de las cinasas de la familia de Src (SFKs), para después revisar los hallazgos experimentales que han sugerido su participación en el sistema del receptor TLR-4.

1. Introducción

1.1 Perspectiva biológica del sistema inmune

El sistema inmune comprende todos los mecanismos tisulares, celulares y moleculares involucrados en el reconocimiento de los componentes propios del organismo y en la eliminación de sustancias ajenas al hospedero⁶⁻⁸. La función primordial del sistema inmune es proteger al organismo de los patógenos que se hallan en el medio. A las acciones de protección que ejercen todos los componentes del sistema inmune se les denomina inmunidad, y a los procesos de inmunidad que son activados después de que un agente extraño ha sido censado por el sistema se les llama respuesta inmune⁶⁻⁸. En los vertebrados hay dos tipos de inmunidad, la innata y la adaptativa, y en conjunto son capaces de coordinar y controlar las respuestas que proveen de protección al organismo (Tabla 1).

Las reacciones de inmunidad están representadas a lo largo del árbol filogenético, desde los organismos unicelulares hasta la aparición de las formas de vida más complejas de las que se tenga conocimiento⁶⁻⁸. En los vertebrados existen vestigios de procesos antiguos de defensa del hospedero frente a patógenos^{1,6-8} (Figura 1), e interesantemente han sido encontradas cascadas de activación extraordinariamente conservadas en organismos tan distantes como lo están la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* del *Homo sapiens* o *Mus musculus*⁹. De esta manera, las vías de eliminación de patógenos que han resultado “exitosas” se han preservado a lo largo de la evolución biológica de acuerdo a los retos que representa el ambiente. Sin embargo, la necesidad persistente de desarrollar nuevas

estrategias capaces de neutralizar la proliferación de agentes infecciosos, y el constante desarrollo de estrategias de evasión de la respuesta inmune por tales agentes, constituyen la base sobre la cual se construyen las relaciones huésped-hospedero. De esta manera, tanto el huésped como el hospedero se hallan en constante innovación de los procesos celulares y moleculares que les permiten transferir sus genes a las siguientes generaciones y de esta forma mantenerse en la naturaleza.

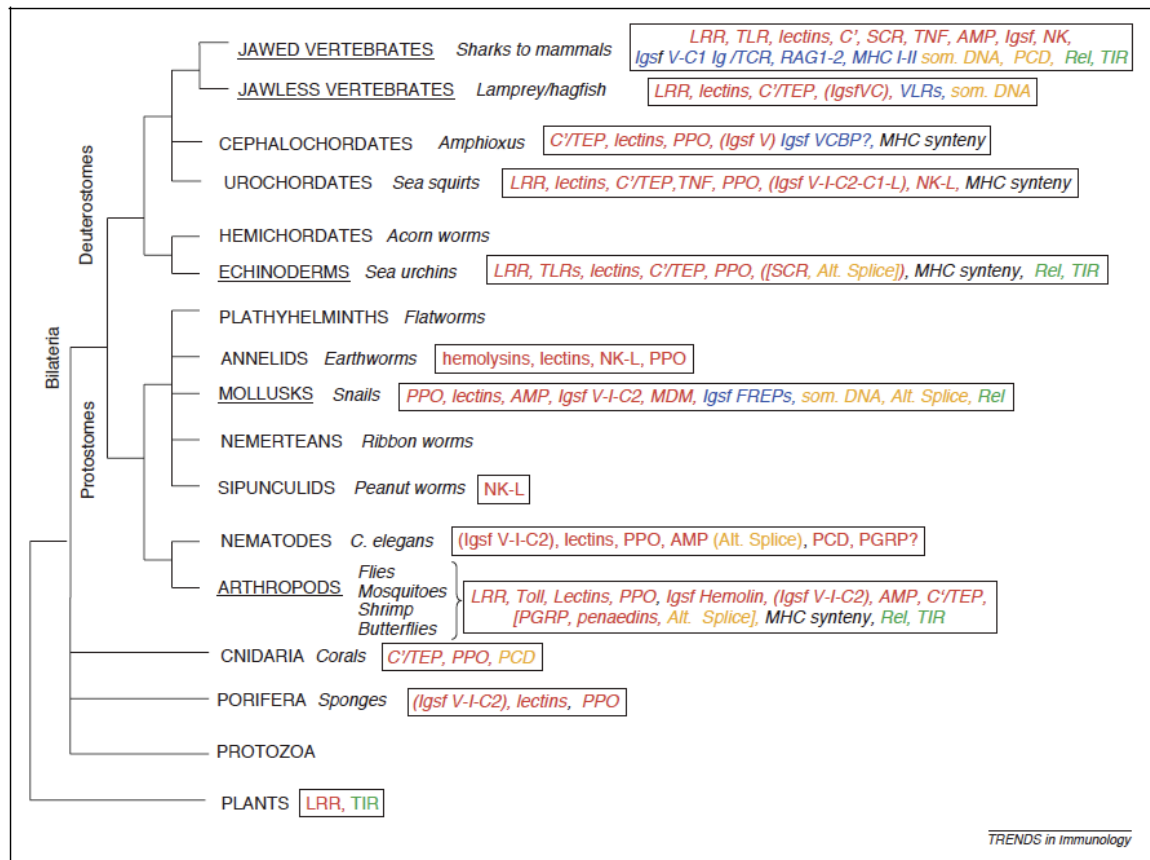


Figura 1. Moléculas del sistema inmune encontrados en diversos organismos del árbol filogenético. En rojo se hallan moléculas o mecanismos involucrados en la inmunidad innata. En azul se indican las moléculas cuyos genes se han diversificado somáticamente y están involucrados (o se cree que lo están) en la inmunidad adaptativa. En anaranjado se indican los mecanismos somáticos a nivel de ADN o ARN para generar o maximizar la diversidad inmune (los taxa delineados indican grupos que representan mecanismos de diversificación de genes del sistema inmune). En verde se indican las vías de señalización conservadas. En negro se indican los genes parecidos al MHC de vertebrados superiores. Tomado y modificado de Flajnik, M., 2004.

Se han descrito mecanismos de inmunidad innata tanto en invertebrados como en vertebrados primordialmente a través de la presencia de células fagocíticas, comúnmente referidas como fagocitos, así como de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, que se encargan de detectar arreglos macromoleculares asociados a los patógenos), y de sustancias anti-microbianas⁶⁻⁸ (Tabla 1 y figura 1). En contraste, la inmunidad adaptativa está presente sólo en los vertebrados y sus células orquestadoras, denominadas linfocitos T y B, muestran mecanismos efectores muy sofisticados que permiten el reconocimiento, mediante la expresión de receptores producidos clonalmente, de fragmentos muy específicos presentes en los patógenos⁶⁻⁸. Además, el sistema inmune adaptativo tiene sitios especializados de presentación antigénica conocidos como nodos linfáticos (Tabla 1), los cuales se hallan distribuidos en diferentes sitios del cuerpo. Este tipo de inmunidad tiene la capacidad de generar memoria, la cual le permite responder más rápidamente y con mayor fuerza a antígenos con los cuales se ha encontrado previamente⁶⁻⁸. Otra diferencia fundamental entre la inmunidad innata y la adaptativa tiene que ver con que la primera es heredable, es decir, está codificada en la línea germinal, y la segunda se adquiere de manera clonal durante el tiempo de vida del organismo, es decir, mediante la producción de receptores que requieren rearrreglos genéticos,⁶⁻⁸.

| TABLA 1. Evolución del sistema inmune | Inmunidad innata | | | Inmunidad adaptativa | |
|--|------------------|------------|-------------------|----------------------|----------------------|
| | Fagocitos | Células NK | Anticuerpos | Linfocitos T y B | Nodos linfoides |
| Invertebrados | | | | | |
| Plantas | + | - | - | - | - |
| Protozoarios | + | - | - | - | - |
| Eponjas | + | - | - | - | - |
| Anélidos | + | + | - | - | - |
| Artrópodos | + | - | - | - | - |
| Vertebrados | | | | | |
| Elasmobranquios (tiburones, rayas) | + | + | + (IgM solamente) | + | - |
| Teleosteos (peces comunes) | + | + | + (IgM, otros?) | + | - |
| Anfibios | + | + | + (2 o 3 clases) | + | - |
| Reptiles | + | + | + (3 clases) | + | - |
| Aves | + | + | + (3 clases) | + | + (algunas especies) |
| Mamíferos | + | + | + (7 or 8 clases) | + | + |

NOTA: Diferencias en los componentes que conforman la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa son observadas en algunos organismos representativos de los diferentes grupos a lo largo de la escala filogenética. Tomado y modificado de Abbas et al, Cellular and Molecular Immunology 7ª edición.

En cuanto a la cinética de activación, ante el ingreso de un agente infeccioso, la inmunidad innata se activa dentro de las primeras horas y si ésta es incapaz de frenar el avance del agente infeccioso, la inmunidad adaptativa comienza a activarse, lo que puede tomar varios días⁶⁻⁸ (Figura 2).

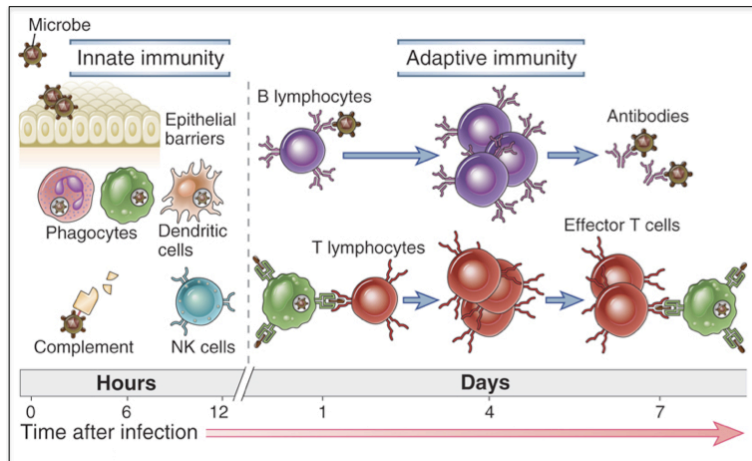


Figura 2. Inmunidad innata y adaptativa. Los mecanismos de la inmunidad innata proporcionan la defensa inicial contra las infecciones. La respuesta inmune adaptativa se desarrolla posteriormente y consiste de la activación de linfocitos. La cinética de activación de la inmunidad innata y adaptativa que

se muestra en la figura son aproximaciones y puede variar dependiendo de la infección. Tomado de Abbas et al, Cellular and Molecular Immunology 7ª edición.

El sistema inmune puede reconocer una amplia gama de agentes infecciosos, entre los que se encuentran virus, bacterias, hongos, micobacterias y parásitos⁶⁻⁸. Sin embargo, componentes propios del hospedero pueden también inducir la activación del sistema inmune y bajo estas condiciones, pueden tener lugar distintos padecimientos de tipo autoinmune⁶⁻⁸. Por su parte, el grupo de sustancias no infecciosas denominadas alérgenos, p. ej. polen, moléculas asociadas al polvo suspendidas en el aire, sustancias contenidas en alimentos, antibióticos y otros compuestos químicos potencialmente inmunogénicos, pueden desencadenar reacciones de hipersensibilidad y tener efectos dañinos al organismo⁶⁻⁸.

El sistema inmune debe tener la capacidad de discriminar entre lo propio y lo ajeno, así como entre lo infeccioso, lo no-infeccioso y lo potencialmente alergénico. Todas estas funciones se pueden llevar a cabo gracias a la coordinación de los componentes del sistema, y a las funciones que cada uno puede ejercer, es decir, al adecuado funcionamiento entre lo innato y lo adaptativo frente a cada uno de los insultos que se hallan en el ambiente.

1.2 El sistema inmune innato

El sistema inmune innato comprende todos los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la primera línea de defensa del hospedero frente a agentes extraños⁶⁻⁸ (Tabla 2). A pesar de reconocer un número limitado de estructuras, el sistema inmune innato tiene la capacidad de censar diferencialmente patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), así como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) y múltiples estímulos de diversa naturaleza, tanto infecciosos como no infecciosos. El sistema de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) es un sistema altamente conservado y se caracteriza por llevar a cabo interacciones homotípicas mediante el reconocimiento específico de dominios, cascadas de fosforilación/desfosforilación, formación de oligómeros de ubiquitina, y activación de genes de citocinas, después de la activación de un PRR determinado⁶⁻⁸. Los patrones están en la superficie de, o son derivados de la acción de, virus, bacterias, parásitos y hongos, los cuales a su vez se

hallan filogenéticamente relacionados entre sí. El reconocimiento de patrones asociados a patógenos por parte de la inmunidad innata constituye un paso esencial para el desarrollo adecuado de la respuesta inmune adaptativa^{2,10}.

Los receptores de la inmunidad innata no sólo pueden activar mecanismos efectores que directamente atacan al agente infeccioso y secretar factores solubles pro- y anti-inflamatorios (que regulan la actividad del propio sistema innato y en consecuencia, del adaptativo) sino además pueden fagocitar, procesar y presentar fragmentos del agente endocitado a los linfocitos T y generar reacciones inmunes específicas si éstas son requeridas⁶⁻⁸. Los componentes celulares que conforman la línea de defensa innata son los siguientes: células epiteliales, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células NK, células cebadas y células de la microglía⁶⁻⁸. Todos estos tipos celulares, en conjunto, tienen la capacidad de generar los mecanismos protectores que ayudan a la resolución de un proceso inflamatorio inducido por algún agente infeccioso.

| Sistema Inmune | Características | | | Componentes | | |
|------------------------|--|--|---------|---|--|--|
| | Especificidad | Diversidad | Memoria | Químicos | Celulares | Principales receptores |
| Innato o Natural | Reconoce patrones moleculares asociados a patógenos relacionados filogenéticamente entre sí. | Limitada: codificada en la línea germinal | No | Sustancias con actividad antimicrobiana | Epitelios, células NK, macrófagos/m onocitos, células dendríticas, células cebadas, basófilos, neutrófilos, eosinófilos, microglia, entre otros. | <ul style="list-style-type: none"> • Receptores tipo Toll (TLRs) • Lectinas tipo C • Receptores Scavenger • Receptores tipo NOD (NLRs) • Receptores para N-formyl Met-Leu-Phe • Receptores tipo RIG-I (RLRs) |
| Adaptativo o Adquirido | Reconoce antígenos microbianos y no microbianos. Asegura el desarrollo de una respuesta inmune llevada a cabo de manera específica en contra de distintos antígenos. | Muy amplia: recombinación somática de segmentos de genes. Expansión clonal | Si | Anticuerpos secretados en las superficies epiteliales | Epitelios, Linfocitos T y B, células NK, células dendríticas, macrófagos, células cebadas. | <ul style="list-style-type: none"> • Receptor de células T (TCR) • Receptor de células B (BCR) • Receptores para anticuerpos y correceptores tipo inmunoglobulina |

NOTA: A pesar de que ambas inmunidades tienen rasgos distintivos en cuanto a los mecanismos efectores, repertorio de reconocimiento de antígenos y origen evolutivo, éstas mantienen una íntima relación que coadyuva al ejercicio de una respuesta inmune conjunta y coordinada inducida por los retos que representa el medio en el que se desarrolla el organismo. Tomado y modificado de Abbas et al. Cellular and Molecular Immunology, 7ª Edición.

Entre las células que tienen la capacidad de llevar a cabo la presentación antigénica están los macrófagos y células dendríticas. Por su parte, neutrófilos y eosinófilos tienen una alta actividad antimicrobiana en la zona de infección, y las células NK pueden inducir muerte en células infectadas mediante interacciones célula-célula. Basófilos y células cebadas pueden inducir reacciones de hipersensibilidad inmediata, lo que comúnmente resulta en una respuesta deletérea para el organismo. Sin embargo, también pueden secretar diversos péptidos antimicrobianos. Por su parte, las células cebadas tienen la

capacidad de sintetizar y almacenar diversas citocinas y mediadores pro-inflamatorios, los cuales ejercen funciones profilácticas esenciales para la defensa del hospedero frente a diversos agentes infecciosos. Por su parte, las células de la microglía tienen, entre otras funciones, la capacidad de mantener un ambiente inmunológicamente estable en el sistema nervioso central⁶⁻⁸.

A pesar de la capacidad limitada en el reconocimiento diferencial de patógenos que tiene el sistema inmune innato, la presencia de los PRRs es esencial para llevar a cabo funciones efectoras que coadyuven en la resolución del proceso inflamatorio⁶⁻⁸. Tales funciones son posibles, en gran medida, gracias a la participación de receptores TLR, cuya actividad puede iniciar una compleja red de señales involucradas en las reacciones de corto y largo plazo de distintos estados patológicos.

1.3 Receptores tipo Toll

La biología de los TLRs presenta en la actualidad un gran número de ventanas abiertas de investigación científica. Desde su descubrimiento en la década de los 80's, éstos receptores han motivado diversos estudios en distintas ramas del conocimiento. Hasta la fecha han sido identificados 12 TLRs en ratones y 10 en humanos, la mayoría de ellos descritos como receptores específicos para al menos un tipo de PAMP determinado^{11,12} (Tabla 3 y figura 3).

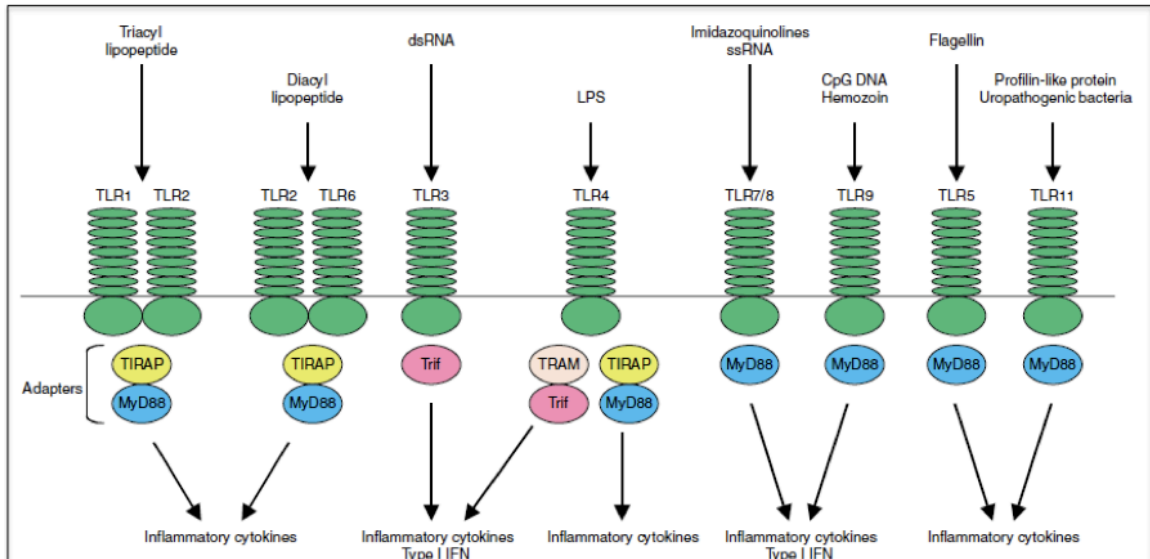


Figura 3. Respuestas de inmunidad mediadas por receptores TLR. El TLR-2 junto con el TLR-1 o TLR-6 discriminan entre los patrones moleculares de triacil y diacil lipopéptido, respectivamente. El TLR-3 reconoce hebras de doble cadena de ARN (dsRNA). El TLR-4 reconoce el lipopolisacárido (LPS) bacteriano. El dímero TLR-7/TLR-8 media el reconocimiento de imidazoquinolinas y hebras de cadena sencilla de ARN (ssRNA). El TLR-9 reconoce islas CpG de ADN de bacterias y virus. El TLR-5 reconoce flagelina bacteriana y el TLR-11 reconoce componentes de bacterias uropatógenicas y moléculas tipo profilina del parásito *Toxoplasma gondii*. Tomado de Kawai, T., y Akira, S., (2006).

En su parte extracelular presentan regiones ricas en leucinas (LRR), las cuales se encargan de llevar a cabo el reconocimiento del ligando. Dependiendo del patrón de estructuras que pueda reconocer, cada TLR es capaz de desencadenar señales específicas al interior de la célula¹³ y con ello ejercer respuestas celulares concretas y críticas durante el desarrollo de un proceso inflamatorio. En su porción intracelular, los TLRs tienen un dominio que es homólogo al dominio intracelular de los receptores para interleucina 1 (IL-1, figura 4). Este dominio se conoce como TIR (Toll/IL-1R) y mediante reconocimiento homotípico puede interactuar con otras proteínas poseedoras de dominios TIR¹³, como es el caso de las proteínas adaptadoras MyD88-TIRAP/Mal y

TRIF-TRAM, quienes pueden asociarse diferencialmente a los complejos señalizadores después de la activación por ligando.

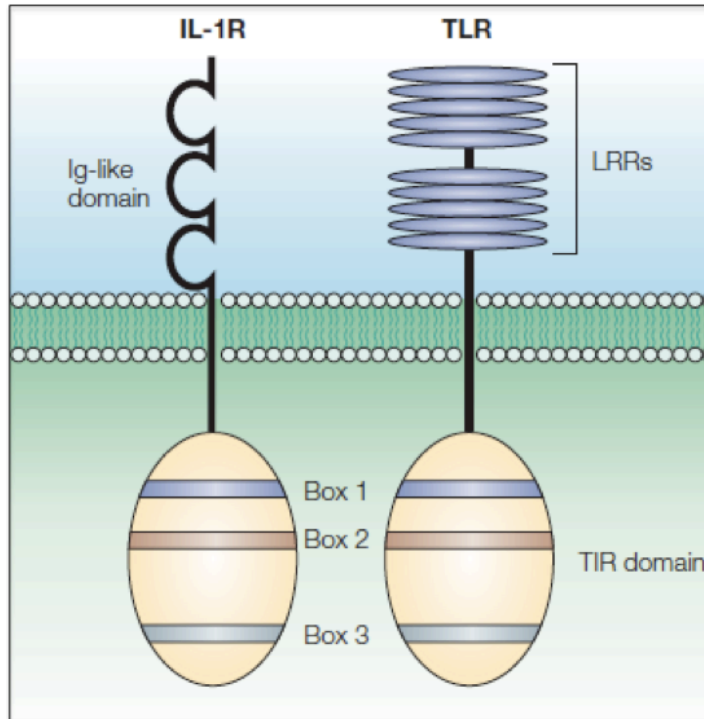


Figura 4. Estructura de los TLRs.

Los receptores TLR y el receptor para interleucina 1 (IL-1R) tienen un dominio citoplásmico conservado que es conocido como TIR (Toll/IL-R). El dominio TIR está caracterizado por la presencia de tres regiones altamente homólogas conocidas como cajas (Box) 1, 2 y 3. A pesar de la similitudes del dominio TIR en ambos tipos de receptores, sus regiones extracelulares son marcadamente distintas, los TLRs tiene repeticiones de regiones en tandem ricas en leucina (LRR) y los IL-1Rs tienen tres dominios tipo inmunoglobulina.

Tomado de Akira, S y Takeda, K (2004).

A excepción del TLR4, el resto de los receptores de esta familia sólo pueden activar la vía dependiente de MyD88 o la vía dependiente de TRIF (Tabla 4)¹². Mientras que la vía dependiente de MyD88 está más relacionada a la inducción de citocinas pro- y anti-inflamatorias, la vía de TRIF está estrechamente ligada a la activación de interferón tipo I (IFN- β). Los TLRs forman homo o heterodímeros para poder transducir sus señales. La vía de MyD88 es primordialmente empleada en las cascadas de señalización de los receptores TLR1/2, TLR2/6, TLR7/8, TLR9, TLR4, TLR5 y TLR11, mientras que la vía dependiente de TRIF es empleada por los sistemas de señalización del TLR3 y TLR4¹².

| TABLA 3. TLRs y sus ligandos | | |
|------------------------------|--|--|
| Especies | PAMP | TLR involucrado |
| Bacteria/micobacteria | LPS Lipoproteínas, LTA, PNG, Lipoarabinomannano Flagelina DNA RNA | TLR4 TLR2/1, TLR2/6 TLR5 TLR9 TLR7 |
| Virus | DNA RNA Proteínas estructurales | TLR9 TLR3, TLR7, TLR8 TLR2, TLR4 |
| Hongos | Zymosan, β -glucano Mannano DNA RNA | TLR2, TLR6 TLR2, TLR4 TLR9 TLR7 |
| Parásitos | tGPI-mutina (Trypanosoma) Glicoinositolfosfolípidos (Trypanosoma) DNA Hemozoin (Plasmodium) Molécula tipo profilina (Toxoplasma gondhi) | TLR2 TLR4 TLR9 TLR9 TLR11 |

NOTA: TLRs encontrados en ratones y humanos. Muchos de ellos involucrados en diversas situaciones patológicas, así como en algunas funciones en el desarrollo embrionario de diversos organismos. Estos receptores están especializados en el reconocimiento de patrones presentes en la naturaleza y activan vías de transducción de señales donde las interacciones homotípicas tiene especial relevancia. Debido a ello, estos receptores

pueden ejercer respuestas altamente específicas frente al ligando que reconocen. Tomado y modificado de Kawai, T y Akira, S., 2011.

Las vías de señalización canónicas que emplean los TLRs están altamente conservadas y se comparten entre todos los miembros de la familia. Sin embargo, la selectividad dada por las regiones LRR para el reconocimiento diferencial de cada ligando, la presencia de co-receptores, la disposición relativa de cada proteína señalizadora, así como la ubicación subcelular de los sustratos que participan en las cascadas de activación, determinan el grado de especificidad de las señales. Dado que la señalización a través del TLR-4 es la vía prototipo para el estudio de esta familia, el mecanismo general de activación será abordado con detalle en la sección 1.5.

1.4 De *Drosophila melanogaster* al *Homo sapiens*

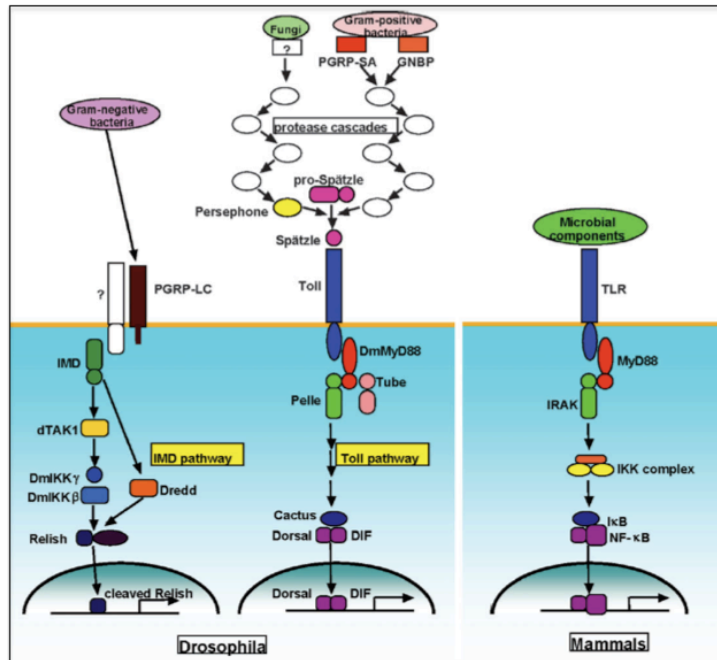
Diversos trabajos han sido importantes en el estudio de la activación de la respuesta inmune innata y sus implicaciones en la modulación de la respuesta inmune adaptativa. El reporte que por primera vez sugirió que la activación de linfocitos B inducida por LPS podía darse de manera independiente de la participación de receptores producidos clonalmente tuvo lugar en 1974, momento en el cual se introdujo la idea del reconocimiento no clonal en la activación linfocitaria^{5,14}. El concepto de reconocimiento de patrones y el marco conceptual de lo que hoy conocemos como el control innato de la inmunidad adaptativa fue expuesto por Charles Janeway durante una conferencia en Cold Spring Harbor en 1989¹. Siete años más tarde fue reportado que Toll, una proteína involucrada en la disposición dorsoventral de los segmentos de la larva de *Drosophila melanogaster*¹⁵, fue hallada para ejercer funciones protectoras frente a infecciones por hongos y bacterias¹⁶. Al año siguiente se describió un homólogo de Toll, conocido en la actualidad como TLR4², que podía activar al factor nuclear κ B e inducir la expresión de diversas citocinas en células de ratones y de humanos¹⁷. En 1998, en una cepa congénita de ratones C3H/NeN denominada C3H/HeJ (cuyo fenotipo es insensible a la administración de LPS bacteriano) se encontró que el receptor involucrado en los efectos del LPS era el TLR-4. Tal hallazgo dio lugar a la identificación de un ligando natural para este receptor y al estudio de los mecanismos de señalización intracelular y expresión genética involucrados¹⁸.

| TLR involucrado Tipo de molécula señalizadora | TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-11 | TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-8, TLR-9 |
|--|--|---|
| Adaptadores | MyD88 (Myeloid of Differentiation protein 88) | TRIF (TIR (Toll/IL-1R)-domain containing adapter inducing interferon-β) |
| | Mal (MyD88-adapter like) | TRAM (TRIF-adapter related molecule) |
| GTPasas pequeñas | ND. | Rab11a GTPasa/Rab5 |
| Cinasas Serina/treonina | IRAK-1 and 4 (IL-1 Receptor-associated kinase 1/4) | TBK (TANK-binding kinase)/ IRAK 1 and 4 |
| Ligasas de ubiquitina | TRAF-6 (TNFR-associated factor 6) | TRAF-3 (TNFR-associated factor 3) |
| Cinasas con actividad en residuos de serina/treonina | TAK-1 (TGF-β associated kinase 1) | TAK-1 |
| | MAPK (mitogen-activated protein kinases) | ND |
| | IKKα/IKKβ/IKKγ (inhibitor of nuclear factor κB (IκB) kinase) | IKKi/IKKε |
| | IκB (inhibitor of nuclear factor κB) | |
| Factores de transcripción | NFκB (Nuclear factor κB), AP-1 (c-Fos and c-Jun) | IRF-3/7 (IFN-β regulatory factor 3/7) |
| Citocinas | Citocinas pro y anti-inflamatorias | Interferón tipo I, IFN-β |

NOTA: Los dímeros TLR-1/TLR-2 y TLR-2/TLR-6 utilizan la vía de MyD88 y TIRAP/Mal como adaptadores esenciales, mientras que el TLR-3 sólo usa el adaptador TRIF (en anaranjado). El TLR-4 usa todos los adaptadores: MyD88/Mal y TRIF/TRAM. El dímero TLR-7/TLR-8, así como el TLR-9, usan al adaptador MyD88 (en azul). Sin embargo, debido a que éstos pueden también inducir la expresión de IFN-β, es posible que puedan activar la vía de TRIF-TRAM. TLR-5, TLR-11 usan solamente al adaptador MyD88. La vía dependiente de MyD88 controla la síntesis de citocinas pro- y anti-inflamatorias, mientras TRIF media principalmente las respuestas mediadas por interferón (IFN) tipo I. ND: no determinado. Ver figura 5 para una representación esquemática. Tomado de Kawai, T., y Akira, S., (2006).

Con el inicio del esclarecimiento de las vías tipo Toll fue posible descubrir que existen moléculas altamente conservadas, tanto en estructura como en función, en la defensa del hospedero frente a patógenos. Diverseos genes que codifican para la vía de Toll y GPRP-LC en la mosca de la fruta han sido encontrados en la vía tipo Toll en mamíferos (Figura 5)¹⁹. En el caso de la vía de Toll, DmMyD88, Pelle, Cactus y DIF, son homólogos a los genes de MyD88, IRAK, I κ B y NF κ B, respectivamente. En la vía de GPRP-LC, los genes de dTAK-1 y DmIKK β y DmIKK γ , son homologos de TAK-1 e IKK β e IKK γ , respectivamente. Las fuerzas de selección y adaptación a nuevos ambientes que han operado a lo largo del tiempo sobre las vías de Toll y GPRP-LC, han convergido en lo que conocemos como la vía de los receptores tipo Toll en vertebrados, particularmente en mamíferos, lo cual constituye un fascinante ejemplo de las vías que pueden compartirse en organismos que se encuentran evolutivamente distantes uno del otro.

Figura 5. Vía de Toll en *Drosophila* y vía TLR en mamíferos. Las infecciones causadas por bacterias Gram-positivas y hongos son sensadas por proteínas de reconocimiento de patrones. En *D. melanogaster*



las cuales llevan a la activación del factor de transcripción tipo Rel NFκB. Tomado un modificado de Takeda, K., y Akira, S., (2005)

Entre los receptores mejor estudiados de la familia tipo Toll se encuentra el TLR-4, no sólo por haber sido el primer TLR caracterizado y hallado detrás de diversas condiciones infecciosas inducidas por agentes bacterianos Gram-negativos, sino por ser el único receptor descrito hasta la fecha que puede activar las vías dependientes de MyD88-TIRAP/Mal y TRIF-TRAM. Debido a esta última característica, el estudio del TLR-4 ha servido como modelo para descifrar las vías de activación canónicas de los miembros de la familia. El TLR-4 induce señales desde la superficie celular en lo que se denomina “ola temprana de activación” y desde endosomas, en lo que se conoce como “ola tardía”, la cual tiene lugar durante el proceso de endocitosis del receptor.

1.5 El receptor TLR-4

El receptor TLR-4, al igual que los demás miembros de la familia, posee una región LRR en la parte extracelular, una región transmembranal y un dominio TIR en el extremo carboxilo terminal¹⁰. Uno de los ligandos naturales de este receptor es el lipopolisacárido bacteriano (LPS, figura 7), distribuído principalmente sobre la superficie de las bacterias Gram-negativas, no obstante, también puede ser hallado de forma soluble en distintos estadios de infección bacteriana como la sepsis. Una vez que el LPS ha sido presentado al TLR4 a través del co-receptor CD14, el receptor se dimeriza y en un mecanismo dependiente de la proteína MD-2 (Figura 6), la señal puede atravesar la membrana e iniciar la cascada de activación dependiente de MyD88 y dependiente de TRIF¹² (Figuras 8 y 9).

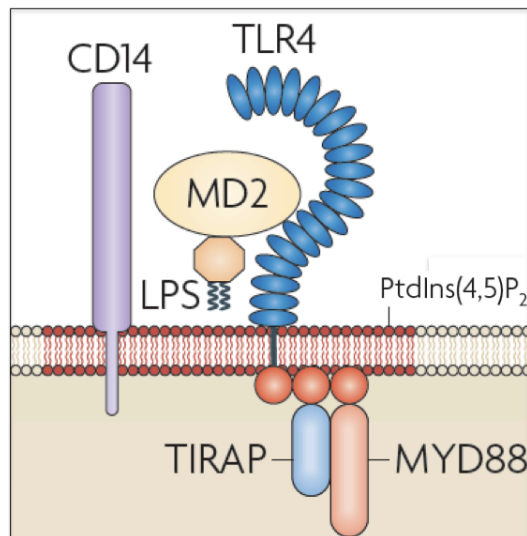
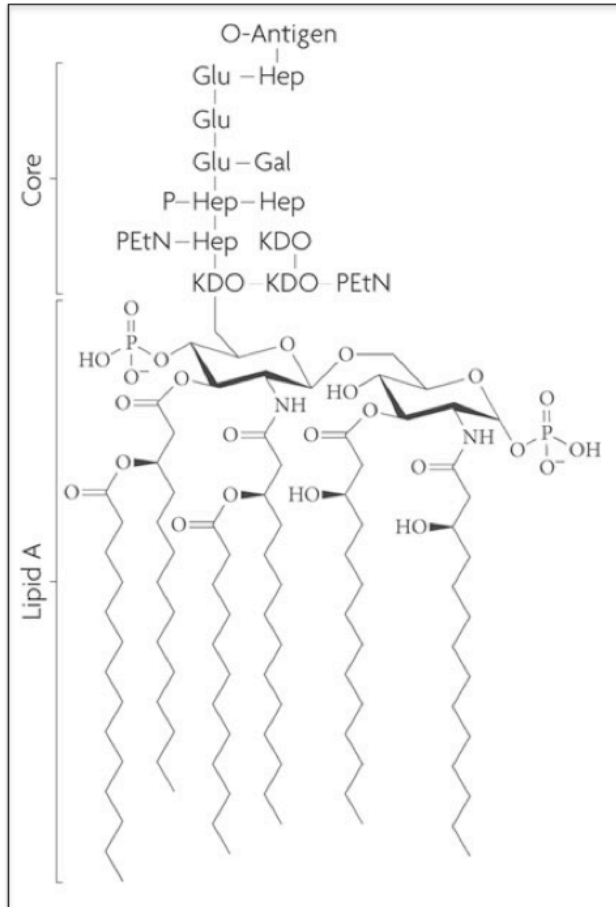


Figura 6. Mecanismo de presentación del LPS con el TLR-4. Para mayor claridad se muestra sólo un monómero del receptor TLR-4. Una vez que CD14 ha reconocido al LPS, éste es presentado con el TLR-4 quien sufre la formación de un dímero y mediante la participación de MD-2, la señal es transducida al interior de la célula. En un primer estadio de activación, la vía dependiente de MyD88-TIRAP/Mal es activada. En una segunda ola de activación las señales corren a cargo de la vía dependiente de TRIF-TRAM (ver figura 8). PtdIns(4,5)P2, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato. Tomado y modificado de Barton, GM., y Kagan, JC., (2008).

Figura 7. El lipopolisacárido (LPS). El LPS, también conocido como *endotoxina*, es un fragmento derivado de las paredes externas de las bacterias Gram-negativas²⁰. La estructura básica de este PAMP comprende seis brazos de ácidos grasos con los que puede anclarse a la pared bacteriana. Hacia su porción



externa, el LPS presenta una región denominada lípido A, quien posee propiedades inmunogénicas y puede determinar la intensidad de la señal. Enseguida de la región del lípido A, se halla una zona llamada núcleo polisacárido (core) la cual está formada por anillos de azúcares que forman parte de la región constante del LPS, y en la zona más apical, se encuentra el antígeno O, el cual está formado por largas cadenas de azúcares de al menos 40 repeticiones²¹. El LPS puede además de estar asociado a la pared bacteria, desprenderse de ésta y mantenerse en su forma soluble hasta ser reconocida por la proteína de unión al LPS (LBP, LPS-binding protein), la cual presenta al LPS con la glicoproteína CD14 (Figura 7), quien actúa como co-receptor del TLR-4 dando paso a la activación de las señales intracelulares. EtN, etanolamina; Gal, D-galactosa; Glu, D-glucosa; Hep, Lglicero-D-mano-heptosa; KDO, ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosónico; P, fosfato. Tomado de Ruiz, N., et al. (2009)

a) *Vía de señalización dependiente de MyD88*

La señalización temprana está orquestada por un par de adaptadores denominados MyD88 y TIRAP/Mal, los cuales mediante sus dominios TIR establecen interacciones homotípicas que son requeridas para la señalización río abajo²² de los distintos complejos que median la síntesis y secreción de citocinas. TIRAP/Mal posee un dominio de unión a fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), el cual le permite funcionar como intermediario entre MyD88 y el TLR4²³. Una vez que ambos adaptadores se han agregado al receptor, dos

cinastas de la familia IRAK se unen al complejo señalizador. IRAK-1 es hiperfosforilado por IRAK-4 y esta actividad permite que TRAF-6 pueda unirse al agregado asociado a la membrana²⁴. TRAF6 es una ligasa de ubiquitinas de tipo E3 y en conjunto con las enzimas conjugadoras de ubiquitina UBC13 y UEV1A inducen la activación del complejo conformado por TAK-1/TAB-1, -2 y -3⁹. El complejo de TRAF-6 puede ubiquitinar a TAB-2, y con ello inducir la autofosforilación de TAK1, quien en consecuencia, activa la vía de IKK y la vía de las MAPKs²⁵. El complejo IKK está compuesto por IKK α , IKK β e IKK γ , también conocido como NEMO, y su actividad está centrada en la fosforilación de I κ B, para que éste pueda dejar de reprimir la actividad de NF κ B y se transloque al núcleo. Por otro lado, una vez que la vía de las MAPK se ha activado, el factor nuclear AP-1 conformado por c-jun y c-fos, también viaja al núcleo. Tanto NF κ B como AP-1 son esenciales en la transcripción de genes de citocinas, para orquestar los procesos inflamatorios de corto y largo plazos, así como la atenuación de tales respuestas⁹. La activación de la vía de MyD88-TIRAP/Mal es ejercida principalmente desde la membrana celular y es a través de ésta que los eventos tempranos de activación del TLR-4 tienen lugar. Sin embargo, la cinética de activación del TLR-4 también comprende su endocitosis y señalización desde el endosoma, con lo que una segunda ola de activación dirigida por TRIF-TRAM puede llevarse a cabo.

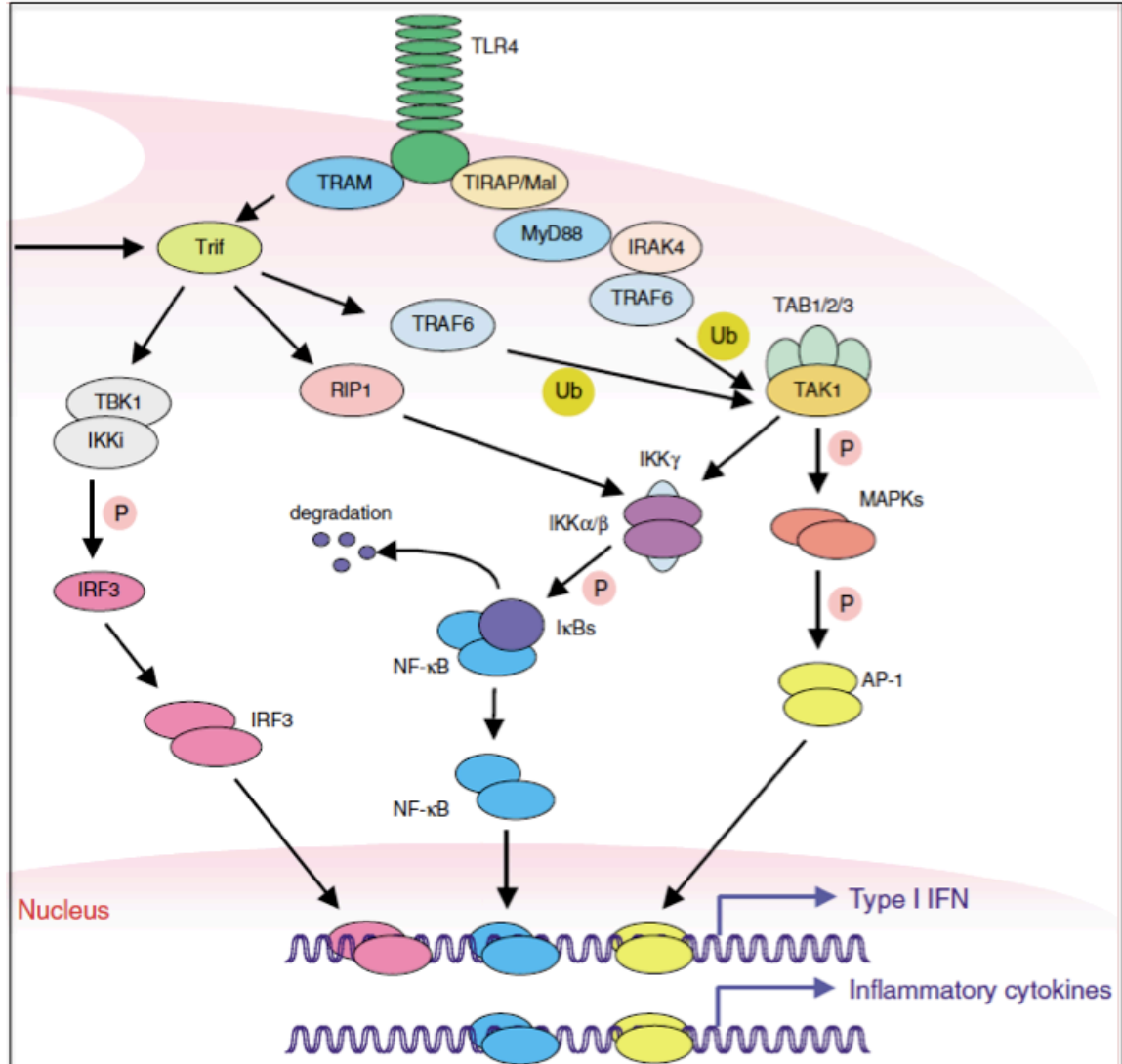


Figura 8. Señalización del receptor TLR-4. El TLR-4 activa las vías dependientes de MyD88 y TRIF. TIRAP/Mal y TRAM son requeridas para la activación de las vías dependientes de MyD88 y TRIF, respectivamente. MyD88 recluta a IRAK-4 y TRAF-6 después de la estimulación del receptor. TRAF-6 activa al complejo TAK-1/TAB-1/TAB-2/TAB-3 vía ubiquitinación (Ub) dependiente de lisina 63 (K63). El complejo de TAK-1 activa al complejo IKK, el cual consiste de IKK α , IKK β , IKK γ /NEMO, el cual cataliza la fosforilación (P) de I κ B. I κ B es degradado vía proteosoma permitiendo la translocación de NF κ B al núcleo. TAK-1 simultáneamente activa la vía de las MAPKs, las cuales inducen la fosforilación y activación de AP-1. NF κ B y AP-1 controlan las respuesta inflamatorias induciendo citocinas pro- y anti-inflamatorias. Complementariamente, el TLR-4 también puede reclutar a TRAM y TRIF, los cuales interactúan con TBK-1 vía TRAF-3. TBK-1 en concierto con IKKi media la fosforilación de IRF-3, la cual se dimeriza y transloca al núcleo para unirse al ADN. TRIF además interactúa con TRAF-6 y RIP-1, los cuales median la activación de NF κ B. La activación de NF κ B, AP-1 e IRF-3 es requerida para la inducción de IFN tipo I, particularmente IFN β . Tomado y modificado de Kawai, T y Akira, S. (2006).

b) Vía de señalización dependiente de TRIF

Después de que el TLR4 ha emitido sus señales tempranas a través de MyD88 y TIRAP/Mal en respuesta al LPS, TRIF y TRAM son activados (Figuras 8 y 9). El modelo del “adaptador de ubicación específica” indica que TRAM actúa como intermediario en la unión del TLR-4 con TRIF, quien a su vez conecta al receptor con la maquinaria endocítica a través de un mecanismo dependiente de la actividad de Dinamina²⁶ y Rab11a²⁷. TRIF entonces funciona como un adaptador que dirige las señales hacia sustratos que no se hallan inmediatamente disponibles para la señalización del TLR-4. Mientras el proceso de endocitosis tiene lugar, el complejo señalizador asociado al endosoma alcanza a TRAF-3. A diferencia de TRAF-6, TRAF3 no se halla próximo al receptor^{26,27} y debido a ello sólo mediante el tráfico endosomal se puede alcanzar su activación. De esta manera TRAF-3 activa a los complejos IKK no canónicos TBK1 e IKKi (IKKε), los cuales activan a los factores nucleares IRF-3 e IRF-7, para iniciar la síntesis del Interferón tipo I (IFN-β)²⁸. TRAF-6 por su parte también puede ser activado mediante la vía de TRIF-TRAM y este hecho representa un punto de comunicación cruzada con la vía de MyD88-TIRAP/Mal. Durante la activación de la vía TRIF/TRAM, NFκB puede incrementar su localización en el núcleo y debido a ello puede complementar y alimentar la vía dependiente de MyD88 en estadios tardíos de inflamación²⁹.

Tanto la vía dependiente de MyD88 como la vía dependiente de TRIF han sido extensivamente exploradas en cultivos primarios de macrófagos y células dendríticas, así como en distintas líneas celulares. Sin embargo, diversos reportes sugieren que ambas

vías puede ser diferencialmente controladas dependiendo del contexto celular, es decir, del tipo célula que posea un arreglo determinado de proteínas que puedan activar la maquinaria del TLR-4 y llevar a cabo su señalización³⁰. En la siguiente sección hablaremos de las células cebadas, las cuales han sido poco exploradas en torno a la activación del TLR-4 y sus funciones protectoras, no obstante su papel crítico en la defensa del hospedero frente a infecciones bacterianas Gram-negativas.

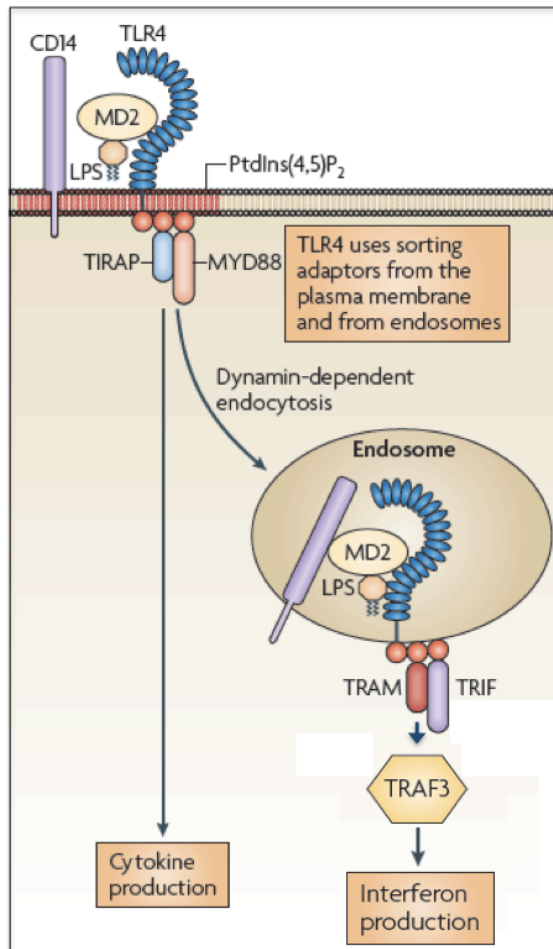


Figura 9. Esquema del modelo del adaptador de ubicación específica. MyD88 y TRIF funcionan como adaptadores señalizadores que bioquímicamente acoplan a los TLRs que son encontrados en distintos organelos con las cinas río abajo, las cuales pueden definir que vía de señalización es activa. El reclutamiento de MyD88 con los TLRs membranales y el de TRIF con los TLRs endosomales depende de la distribución específica de adaptadores en el citoplasma. Los adaptadores de “distribución específica” no engranan directamente a toda la maquinaria río abajo, por lo que requieren elementos señalizadores adicionales para poder alcanzar sustratos concretos. El reclutamiento de los adaptadores de localización específica está controlado por la actividad de unión a fosfoinosítidos, la cual restringe su localización dentro del citoplasma. PtdIns(4,5)P₂, fosfatidilinositos-4,5-bifosfato. Tomado y modificado de Barton, GM., y Kagan, JC., (2008).

1.6 Las células cebadas

a) Origen y diferenciación

La historia de las células cebadas (CCs) comienza con los trabajos pioneros de Paul Ehrlich, quien durante la disertación de su tesis doctoral el 17 de junio de 1878 en la escuela de medicina de Leipzig en Alemania, habló de diversas técnicas de tinción de gránulos de un tipo particular de células asociadas al tejido conectivo, los cuales se teñían diferencialmente dependiendo del tipo de colorante, hecho a base de anilina, que fuera empleado³¹. Ehrlich mostró que los gránulos podían teñirse de color rojo-violeta con cianina, anaranjados con fucsina y rojos con dalia y genciana. Ehrlich acuñó el término de “Mastzellen” para describir a las células granulares positivas para anilina que encontró en el tejido conectivo. La palabra alemana “Mast” (del griego μαστος: mama) (zellen: célula) implica amamantar o alimentar, y a pesar de que las CC estrictamente hablando no proveen nutrientes a su medio, sí están profundamente involucradas en el tropismo de los tejidos donde ellas residen, así como en la homeostasis, remodelación y reparación del tejido conectivo³². Las CCs pueden, entre otras cosas, tener actividad angiogénica y contribuir al desarrollo de la vasculatura de los tumores. De hecho, Ehrlich fue el primero en describir la presencia de CCs en sitios circunvecinos a tejidos en diferenciación³¹. En la actualidad se sabe que sus gránulos contienen diversas proteasas y citocinas que promueven la sobrevivencia, crecimiento y quimioatracción en otras células tales como fibroblastos, miofibroblastos, células del músculo liso, neuronas, células endoteliales, y células del sistema inmune, entre otras³³. Dadas sus características trópicas el término “Mastzellen” es apropiado para las CCs, más aún cuando el propio Ehrlich documentó

que ellas no estaban únicamente asociadas al sistema perivascular, una observación vigente debido a posteriores hallazgos sobre el papel de las CCs en la remodelación tisular durante diversos procesos inflamatorios asociados al tejido mucoso³³. Ehrlich, basado en sus observaciones, fue capaz de generar dos hipótesis sobre el origen de las CC. Él argumentó que existían dos tipos de CCs, aquellas cuyo origen y establecimiento sucedía en el tejido conectivo y aquellas que se originaban en la médula ósea y migraban hacia la sangre periférica. Las primeras fueron llamadas CCs tisulares y las segundas CCs sanguíneas o basófilos³¹. A pesar de que sus ideas en este sentido fueron incorrectas, Ehrlich pudo generar un marco conceptual que le permitió explicar el patrón de establecimiento de las CCs en los tejidos que iba inspeccionando.

En la actualidad se sabe que tanto las CCs como los basófilos comparten diversas características pero constituyen tipos celulares distintos con funciones propias y su posible origen común es motivo actual de debate. Las CCs tienen su origen en la médula ósea y migran de forma inmadura a los tejidos, tanto conectivos como mucosos para completar su maduración *in situ* influenciada por las señales del microambiente^{34,35}

La primera evidencia sobre el origen hematopoyético de las CCs fue ofrecida por los experimentos de Kitamura *et al.* a finales de los años 70's donde demostró que las CCs derivaban de progenitores multipotenciales. Tales experimentos fueron hechos usando ratones deficientes de CCs reconstituídos con médula ósea de ratones normales. A la fecha diversos trabajos han mostrado resultados interesantes sobre la ruta de

diferenciación que siguen las CCs antes de llegar a establecerse en un tejido determinado, y de ellos ha sido posible generar, al menos, dos modelos para explicar su proceso hematopoyético (Figura 10)^{34,35}.

Un primer modelo de diferenciación sugiere que el progenitor de CCs (MCP) puede originarse de un progenitor multipotencial (MPP) proveniente de la médula ósea. Según esta hipótesis, un MCP de fenotipo Thy-1^{lo}, Kit^{hi}, FcεRI⁻ encontrado en sangre fetal murina puede derivar exclusivamente en la formación de CCs *in vitro*. Durante el proceso hematopoyético en la médula ósea del ratón adulto también ha sido encontrado un MCP con fenotipo Lin⁻, Kit⁺, Sca-1⁻, Ly6c⁻, FcεRIα⁻, CD27⁻, integrina β7⁺, T1/ST2⁺ el cual puede originar CCs tanto *in vitro* como en ensayos de reconstitución *in vivo*. También se ha encontrado que las células troncales hematopoyéticas (HSC) pueden dar origen a CCs, lo cual ha abierto la posibilidad de que las HSC circulantes constituyan una fuente de MCPs en condiciones de homeostasis e inflamación. Conjuntamente, estos estudios sugieren que los MCPs se derivan de MPPs y no del progenitor mielóide común (CMPs) ni del progenitor de granulocitos y macrófagos (GMPs, figura 10).

En un segundo modelo, una población celular identificada como Lin⁻, Kit⁺, FcγRII/III^{hi}, integrina β7^{hi}, puede dar origen a un progenitor común para CCs y basófilos (BMCPs), quien puede derivarse del CMP en la médula ósea. Una vez formado el BMCP, éste puede migrar al bazo y dar origen al progenitor de basófilos (BSP) o al de CCs (MCP). En un paso posterior de diferenciación que tiene lugar en el intestino, el MCP puede ser

hallado con fenotipo $CD45^+$, Lin^- , $CD34^+$, integrina $\beta7^{hi}$, $Fc\epsilon RI\alpha^{lo}$. Entre los resultados obtenidos ha sido mostrado que la actividad de C/EBP α juega un papel crítico en la diferenciación del BMCP ya que su actividad es requerida para dar origen al BsP y su inhiición para originar al MCP^{34,35}.

Una vez en los tejidos, las CCs completan su maduración y dependiendo de las señales del microambiente, adquieren identidad propia de los sitios donde residen manteniendo siempre la expresión del receptor Fc ϵ RI y c-Kit. A pesar de que se las células cebadas han sido divididas en células de fenotipos mucosal o conectivo, diversos trabajos sugieren que las CCs tiene una plasticidad muy alta y debido a ello la existencia de subpoblaciones podría ser un factor clave para el entendimiento de las funciones ejercidas en condiciones de inflamación y homeostasis por este tipo celular^{34,35}.

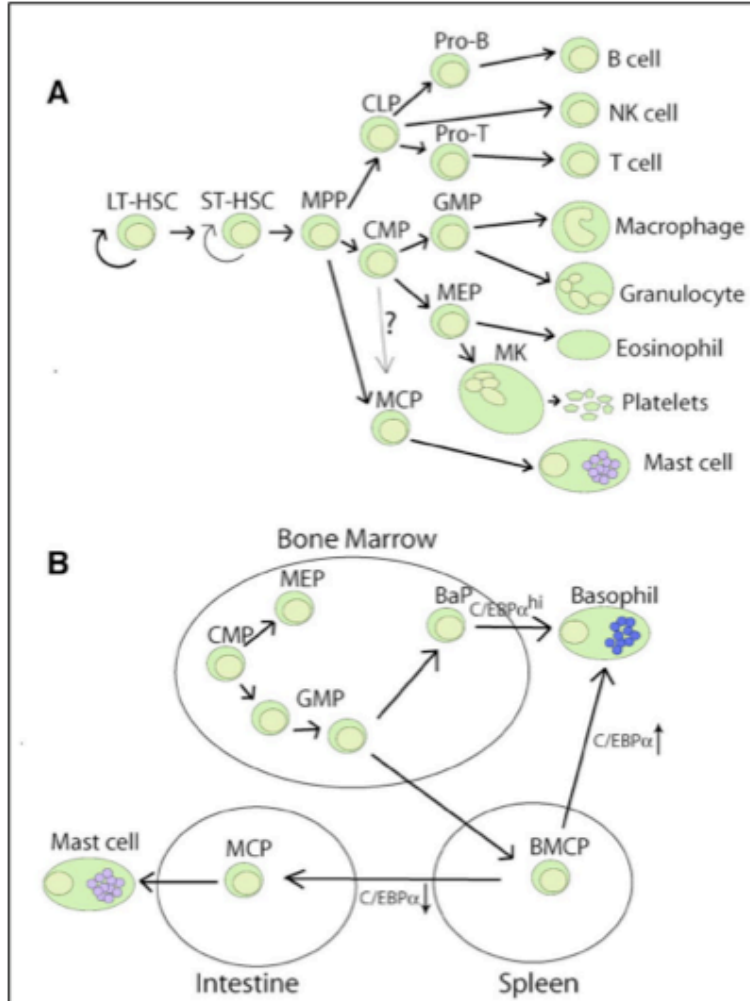


Figura 10. Dos modelos para explicar el origen hematopoyético de las CCs. A) Modelo que explica el origen de las CCs mediante la diferenciación de un progenitor multipotencial (MPPs) que puede derivar en la formación de un progenitor de CCs (MCPs). B) Modelo donde se propone que el progenitor de granulocitos y macrófagos (GMPs) integrina $\beta 7^+$ da origen al progenitor bipotencial que origina a basófilos y CCs (BMCPs) en el bazo. Bajo este esquema, del BMCPs se deriva el MCP en condiciones de baja/nula actividad de C/EBP α . Una vez que el MCP se ha diferenciado en el intestino la CCs inmaduras migran a los tejidos para terminar su maduración *in situ*. Tomado de

Okayama, Yoshimichi., y Kawakami, T., (2006).

b) Estructura y características morfo-fisiológicas

Las CCs tienen una estructura característica compuesta de diversos gránulos distribuidos en su citoplasma con un núcleo grande y de alta actividad transcripcional. El tamaño de las CCs oscila entre los 7 y los 21 micrómetros de diámetro, en tanto el tamaño de sus gránulos ronda entre los 0.15 y 0.5 micrómetros (Figura 11)³³. Los gránulos son metacrómáticos cuando se usan ciertos métodos de tinción y también muestran diferentes grados de electrodensidad dependiendo del tipo y cantidad relativa de las sustancias que

en ellos se pueden encontrar. Tales sustancias pueden ser citocinas pro y anti-inflamatorias, quimiocinas, aminas vasoactivas como serotonina e histamina, péptidos antimicrobianos y proteasas tales como quimasa y triptasa. Sin embargo, las CCs pueden inducir la síntesis *de novo* de un número grande de mediadores, como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, citocinas, entre otros^{36,37} (Tabla 5). Las CCs tienen también diversos arreglos de receptores sobre su superficie, los cuales les permiten censar y reaccionar ante un gran número de estímulos. Algunos de los receptores como el FcεRI, FcγRI, FcγRIII, TLR2, TLR4, TLR6, TLR8, C3aR, A3R, CCR1, CCR3, S1P2, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-10R, TGFβR1, c-Kit^{33,38}; entre muchos otros pueden ser diferencialmente expresados por las CCs.

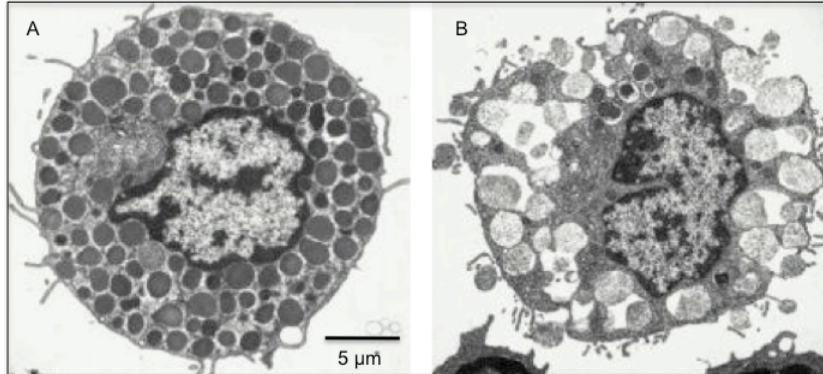


Figura 11. Micrografía de una célula cebada. A) Célula cebada sin estimular. B) Célula cebada activada por un estimulante extracelular soluble para secretar su contenido. Las vesículas que contienen histamina se observan en

tonos oscuros (A), mientras que aquellos gránulos que han liberado su contenido se observan en tonos claros (B). Tomado y modificado de D. Lawson, C. et al., (1975).

En condiciones normales y bajo la influencia de estímulos que inducen respuesta de “baja intensidad”, las CCs muestran un tráfico vesicular altamente dinámico que culmina con la liberación de sustancias contenidas en sus gránulos. Sin embargo, tras una activación de

“alta intensidad”, las CCs pueden llevar a una extraordinariamente rápida y abundante liberación de sustancias asociadas a sus gránulos, lo cual implica tener una maquinaria secretora capaz de coordinar en pocos minutos la liberación simultánea del contenido granular. Al primer tipo de liberación se le conoce como desgranulación paulatina (en inglés: piecemeal, constitutiva y de bajo umbral de activación) y al segundo tipo de desgranulación se le conoce como desgranulación anafiláctica la cual obtiene el nombre por encontrarse relacionada en las reacciones de hipersensibilidad tipo I, también conocidas como reacciones alérgicas³⁹.

Durante el proceso de desgranulación las membranas celular y granular se fusionan para promover la liberación de sustancias al medio. Cuando el estímulo es de alta intensidad, la membrana protruye en tanto ocurre la desgranulación, y después de que el proceso de liberación ha tenido lugar, las proyecciones membranales se retraen hasta volver a su configuración original e iniciar un nuevo ciclo de síntesis y almacenamiento de sus mediadores³³.

| TABLA 5. Mediadores de las células cebadas | | | | |
|--|---|---|--|---|
| Aminas vasoactivas /neurotransmisores | Eicosanoides | Citocinas | Quimiocinas | Proteasas |
| Histamina*, Heparina*, Sustancia P*, | PGD ₂ , LTC ₄ /D ₄ , | IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-6, IL-13, TNF*, SCF, NGF, TGF-β, FGF-2, IFNα, TSLP, VEGF*, IL-10, IL-1β, | CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL12, CCL17, CCL19, CCL20, CCL22, CXCL5, CXCL8. | Triptasa*, Quimasa*, mMCP-6, Triptasa, Triptasa βI, |

NOTA: Diversos mediadores han sido reportados en las CCs, tanto preformados como sintetizadas *de novo*. Entre los más importantes se hayan las aminas vasoactivas, los eicosanoides (derivados del metabolismo del ácido araquidónico), citocinas, quimiocinas y diversas proteasas. *Mediadores presintetizados localizados en los gránulos citoplásmicos de las CCs. Tomado de Moiseeva, EP. y Bradding, P. (2010), y Caughey, GH. (2010)

1.7 Las CCs en las reacciones alérgicas

Las CCs juegan un papel crítico en diversos estados inflamatorios. Sin embargo, en el desarrollo de las reacciones alérgicas, las CCs tienen una función central debido a que expresan al receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E (IgE), FcεRI, el cual, tras su activación, induce la liberación de mediadores proinflamatorios que tienen efectos inmediatos y de largo plazo que resultan dañinos para el organismo³².

Dada la complejidad estructural de las sustancias alérgicas en el ambiente, se desconoce el mecanismo específico por el cual el alérgeno es reconocido y fagocitado en cada caso. Sin embargo, bajo un esquema general, se sabe que las células dendríticas del epitelio pueden reconocer, fagocitar, y procesar el antígeno para presentarlo a las células T vírgenes (naive) CD4⁺ en los nodos linfáticos. La presentación antigénica induce la maduración de las células T CD4⁺ hacia células Th2 y células Th foliculares, las cuales

pueden interactuar físicamente con células B⁴⁰ y activarlas bajo la influencia de la interleucina 4 (IL-4), IL-13^{41,42} y el ligando de CD40, quienes promueven un cambio en la producción de isotipo hacia IgE⁴⁰.

La IgE, al igual que el resto de las inmunoglobulinas, posee una región Fab con la que puede reconocer antígenos y una región Fc con la que puede unirse a sus receptores. El nombre de esta inmunoglobulina se debe a que posee una cadena pesada ϵ y su peso molecular oscila alrededor de los 188 kDa dependiendo del grado de glucosilación que presente⁶. Tanto la disposición genética a producir IgE, como la capacidad de sintetizarla en respuesta a estímulos del medio, inciden directamente en la cantidad de IgE encontrada en sangre y la susceptibilidad a desarrollar estados alérgicos asociados a ésta. La IgE producida viaja a través del flujo sanguíneo hasta los diferentes tejidos conectivos y mucosales del cuerpo, donde se une específicamente al receptor Fc ϵ RI localizado en la superficie de las CCs. La afinidad de la IgE por el Fc ϵ RI es extraordinariamente alta (K_d 1×10^{-10} M) en comparación con la afinidad de otras inmunoglobulinas por sus receptores (menos de 5×10^{-10} M). En condiciones normales la IgE alcanza valores de menos de 1 $\mu\text{g/ml}$ de plasma en humanos. Sin embargo, en situaciones de atopia se pueden hallar concentraciones de IgE de aproximadamente 1000 $\mu\text{g/ml}$, y si esta condición persiste, diversos efectos deletéreos pueden tener lugar en el hospedero. Por otra parte, dado el papel protector de la IgE frente a infecciones causadas por helmintos, concentraciones altas de IgE pueden ser también detectadas en plasma durante estos eventos inflamatorios⁶.

Por expresar al receptor FcεRI, las células cebadas han sido ampliamente estudiadas en el contexto de las reacciones alérgicas. Importantes hallazgos en el sistema de transducción del receptor FcεRI han permitido conocer los eventos moleculares centrales en la activación inducida por IgE/Ag.

a) Estructura del receptor FcεRI

El receptor FcεRI es un tetrámero que está compuesto por una subunidad α que se encarga de reconocer a la porción Fc de la IgE, una subunidad β que atraviesa cuatro veces la membrana plasmática y dos subunidades γ unidas entre si mediante puentes disulfuro^{33,38} (Figura 12). Las subunidades β y γ poseen regiones denominadas ITAMs (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) cuya fosforilación en residuos de tirosinas generan sitios de reconocimiento para dominios SH2 de otras proteínas encargadas de amplificar la señal. La unidad mínima de activación del receptor FcεRI está conformada por dos tetrámeros (un dímero de receptores completos) los cuales reconocen cada uno a una molécula de IgE. Una vez que las moléculas de IgE unidas al receptor han reconocido a un alergeno (antígeno, Ag), proceso que se conoce como entrecruzamiento del receptor, dan inicio los eventos señalizadores tempranos que llevan a la activación de una compleja maquinaria molecular que culmina con la síntesis y secreción de diversas sustancias pro-inflamatorias que participan en el desarrollo de las reacciones alérgicas.

b) Cinasas de la familia de Src (SFKs): Lyn y Fyn

Lyn y Fyn son cinasas pertenecientes a la familia de Src (SFKs) que tienen como característica principal fosforilar residuos de tirosina y establecer interacciones con otras proteínas a través de sus dominios SH2 y SH3⁴³ (Figura 13). Su estructura básica comprende un dominio miristilado en el extremo amino terminal. Enseguida se halla un dominio único amino, un dominio SH3, y enseguida de este uno SH2 y una región catalítica denominada dominio de cinasa, en la parte del extremo COOH terminal^{43,44}. Ambas cinasas se hallan unidas débilmente a la cadena β del receptor Fc ϵ RI e inmediatamente después del entrecruzamiento inducido por IgE/Ag pueden activar cascadas diferenciales de señalización que culminan con la liberación granular o desgranulación.

c) Señalización del Fc ϵ RI a través de Lyn

Tras la activación del Fc ϵ RI Lyn inicia la cascada de fosforilaciones en los ITAMs de las cadenas $\beta\gamma$ permitiendo el acoplamiento de Syk, una cinasa de tirosinas de la familia de Zap-70, que se encarga de amplificar la señal río abajo^{38,45}. El sistema de transducción del Fc ϵ RI puede verse en la figura 12. Una vez que Syk se ha acoplado mediante su dominio SH2 al ITAM fosforilado, ésta adquiere la capacidad de fosforilar a una proteína de andamiaje denominada LAT. Lyn también puede fosforilar directamente a LAT, por lo que una vez ocurrido este paso, diversas proteínas, entre ellas, la fosfolipasa C γ (PLC γ) se unen a LAT a través de interacciones SH2 y se activan contribuyendo a la diversificación de la señal³⁸. PLC γ puede hidrolizar al PIP₂, convirtiéndolo en

diacilglicerol (DAG) e inosito trifosfato (IP₃). El DAG activa a la proteína cinasa C (PKC), y el IP₃ reconoce a su receptor localizado en la membrana del retículo endoplásmico, IP₃R, quien una vez activado promueve la salida de iones de calcio desde la pozas intracelulares al citoplasma. Paralelamente, PLC γ en conjunto con otra proteína denominada GADS, ambas median el acoplamiento de SLP76, quien recluta a VAV, lo que lleva a la activación de RAS, y en consecuencia, a la activación de las MAPKs. Tanto la activación de PKC, como la acumulación de calcio citoplásmico y la activación de la vía de las MAPKs, son necesarias para la activación de diversos factores de transcripción, como AP-1 y NFAT, implicados en la síntesis de citocinas³⁸.

d) Señalización del Fc ϵ RI a través de Fyn

Por su parte, Fyn puede orquestar las señales complementarias mediadas por el receptor Fc ϵ RI (Figura 12) debido a que una vez activa ésta puede directamente fosforilar una proteína de andamiaje denominada NTAL, quien posee diversas tirosinas que pueden ser fosforiladas y formar sitios de unión para proteínas con dominios SH2 tal como Grb2. Grb2 puede reclutar a Gab2, la cual también es directamente fosforilada por Fyn. Una vez que Gab2 es fosforilada, la PI3K adquiere una conformación activa. Esto promueve la generación de PIP₃ en la membrana, formando un complejo señalizador que permite el reclutamiento de PLC γ , cuya actividad, como en el caso de la vía dirigida por Lyn, está encaminada a la activación de PKC e IP₃R. Asimismo, la activación de PI3K dependiente de Fyn/Gab2 puede inducir la activación de NF κ B y así promover la síntesis de diversas citocinas pro-inflamatorias^{38,45}. También ha sido mostrado que Fyn participa en la síntesis *de novo* y secreción de leucotrienos después del entrecruzamiento del receptor⁴⁶. De esta

manera, la vía orquestada por Fyn completa los eventos señalizadores encargados de inducir tanto la liberación del contenido granular, como la síntesis de leucotrienos y citocinas en respuesta a la activación del receptor FcεRI.

La liberación del contenido granular inducida por IgE/Ag puede inducir diversos cambios en los tejidos donde se hallan las CCs. Por ejemplo, la histamina puede incrementar la permeabilidad vascular mediante la contracción del músculo liso y promover la infiltración del líquido intersticial y plasma a los tejidos produciendo edema. Por su parte, tanto proteasas como hidrolasas pueden promover daño tisular y generar señales de daño que contribuyen al desarrollo de un ambiente inflamatorio. Los leucotrienos y citocinas pueden promover la vasoconstricción, broncoconstricción aguda y crónica, y secreción de moco, quimiotaxis y activación de leucocitos, entre otros efectos, enseguida de los eventos de desgranulación. La activación crónica de estos componentes tiene efectos deletéreos y por ello a este tipo de reacciones se les ha llamado anafilácticas.

e) La vía de regulación negativa orquestada por Lyn

En todos los sistemas de transducción de señales es esencial la activación de proteínas que funcionan como reguladores negativos, los cuales permiten controlar la temporalidad de las señales inducidas por ligando, evitando la activación constitutiva de las cascadas de señalización. En algunos casos, una misma proteína puede tener la propiedad de ejercer señales positivas y negativas dentro de un mismo sistema de activación. El mecanismo general de regulación de las SFKs involucra eventos de fosforilación y desfosforilación

en el dominio COOH terminal. En el caso particular de Lyn, la fosfatasa involucrada en la inducción de su actividad es CD45⁴⁷. Después de la activación inducida por IgE/Ag, Lyn también ejerce un loop de retroalimentación negativa mediante el cual autoregula su actividad. Lyn puede fosforilar a la proteína adaptadora Cbp, la cual es entonces reconocida por la cinasa Csk a través de interacciones SH2. Tales interacciones son importantes para que Csk adquiera actividad y pueda fosforilar tirosinas específicas ubicadas en el COOH de Lyn, culminando así con la inhibición de su actividad y contribuyendo con el apagado de señales inductoras de desgranulación^{47,48}. Lyn no sólo puede regularse a si misma sino puede hacerlo con otros miembros de la familia, entre ellos Fyn, como ha sido mostrado después de la activación del sistema del receptor FcεRI⁴⁸.

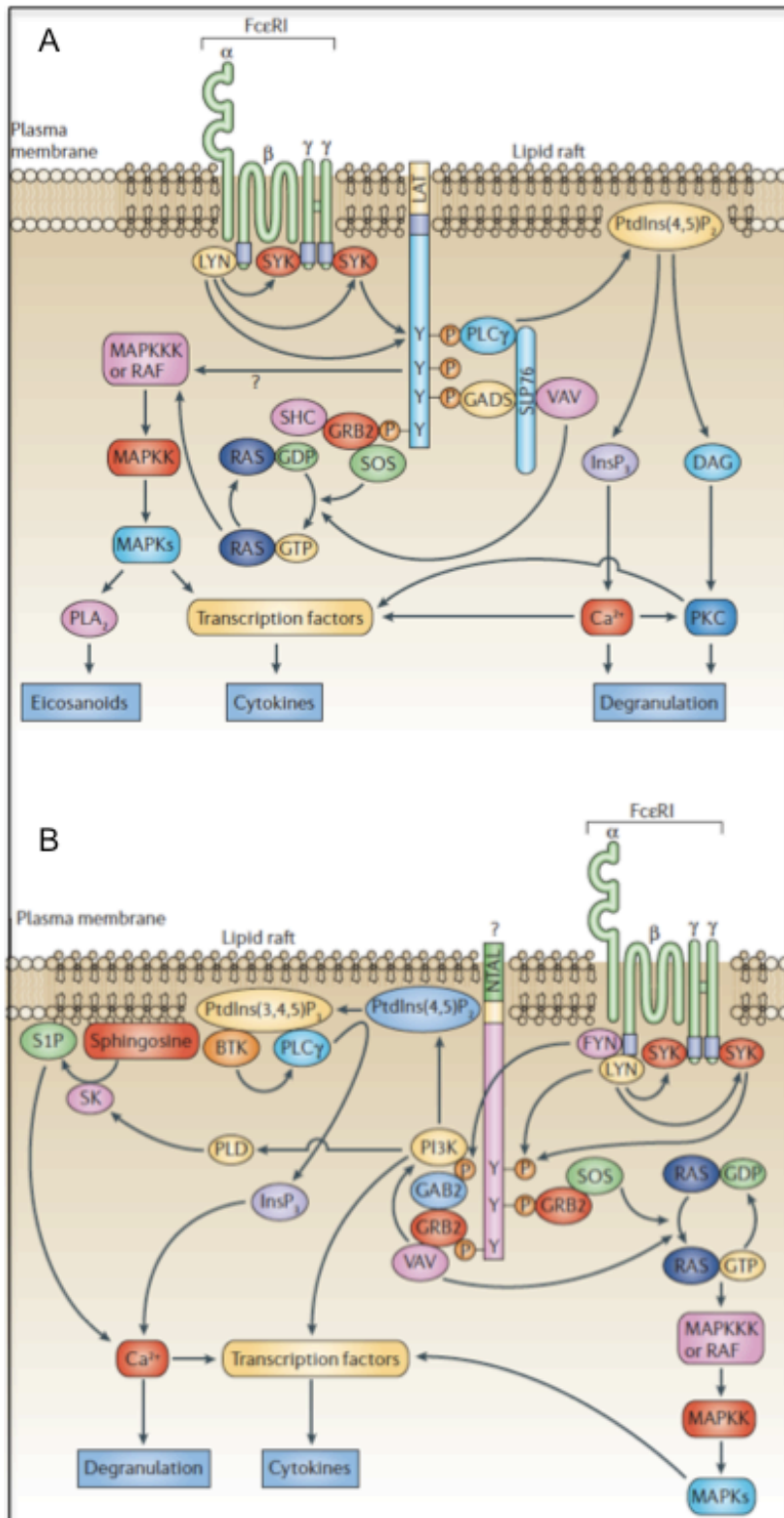


Figura 12. Señalización a través del receptor FcεRI.

A) “Vía principal” de la cascada de señalización en CCs activadas. Para mayor claridad, se muestra sólo un receptor de alta afinidad para IgE. Después de la agregación del receptor FcεRI, la molécula adaptadora LAT es fosforilada por Lyn y Syk. Esto trae como consecuencia la unión directa o indirecta de GRB2, GADS, SHC y SLP-76 a LAT (ver índice de abreviaturas), así como los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina VAV, SOS y la PLCγ. La desgranulación requiere de la activación de la PLCγ, PKC y de la movilización de calcio (Ca²⁺) intracelular. La generación de eicosanoides (leucotrienos C₄ y prostaglandinas D₂) y citocinas, cuya expresión depende de la activación de las MAPKs (ERK-1/2, JNK, p38) emplea la vía de RAS y RAF. B) Vía de señalización “complementaria”. Después de la agregación del receptor

FcεRI la cinasa Fyn es activada, lo que resulta en la fosforilación de GAB2. Esto lleva a la unión de la PI3K por GAB2, teniendo como resultado un incremento en la movilización de calcio (Ca²⁺), lo cual ocurre

a través de un mecanismo potencialmente dependiente de la fosforilación de PLC γ mediada por BTK. Alternativamente, PI3K puede incrementar la movilización de calcio (Ca²⁺) mediante la activación de la SIP. Aunque no ha sido bien demostrado, NTAL puede coordinar éstos últimos eventos mediante la unión de GRB2 inducida por Lyn y Syk. MAPK, cinasas activadas por mitógeno; MAPKK, MAPK cinasa, MAPKKK, MAPKK cinasa. DAG, diacilglicerol; InsP₃, inositol-1,4,5-trifosfato; PLA₂, fosfolipasa A₂; PtdIns(4,5)P₂, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato. Para ver revisar el significado de los nombres de las moléculas dirigirse al apéndice de abreviaturas. Tomado y modificado de Gillfilan, AM., et al (2006).

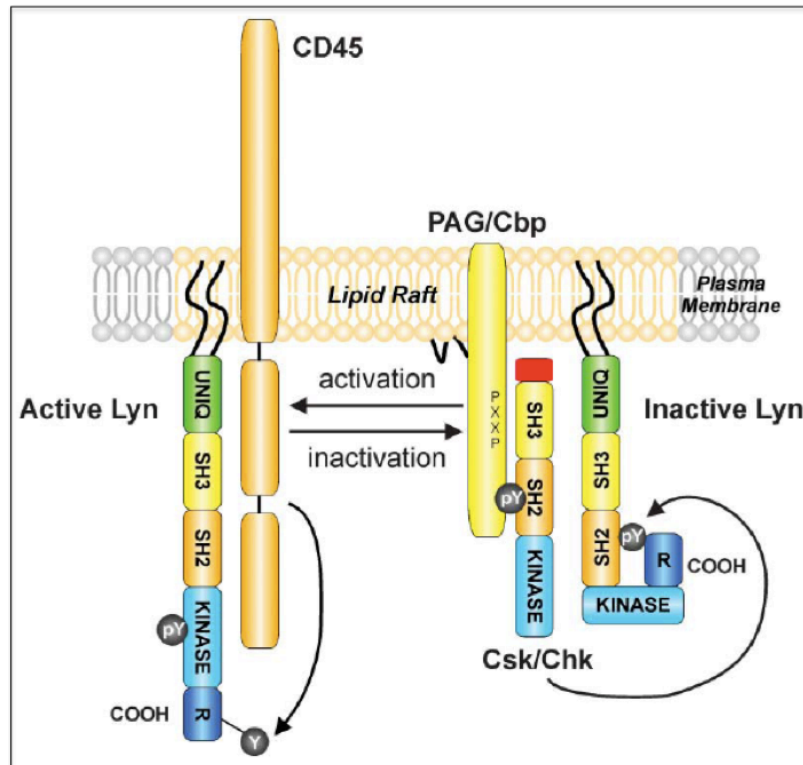


Figura 13. Estructura y modo de regulación de Lyn.

La cinasa Lyn puede ser miristilada y/o palmitilada con lo cual puede localizarse en las balsas de lípidos (lipid rafts) de la membrana plasmática. Todas las cinasas de la familia Src (SFKs) se mantienen en un estado inactivo a través de la fosforilación de un residuo de tirosina localizado en su dominio regulador (R) del C-terminal por enzimas de la familia Csk. Csk es regulada a si misma mediante

localización membranal a través de la interacción con PAG/Cbp. La fosforilación de la tirosina en el C-terminal de las SFKs mantiene las enzimas en un conformación cerrada mediante interacciones con el dominio SH2. Lyn puede ser activada a través de la desfosforilación de la tirosina reguladora del C-terminal por CD45. CD45 es mostrada dentro de las balsas de lípidos y actúa desfosforilando la tirosina 508 de Lyn. La localización de CD45 varía en función del tiempo y ésta es capaz de desfosforilar la tirosina 397, lo que inhibe la actividad de las SFKs (Ashwell y D'Oro, 1999). Tomado de Xu, Y. Et al (2005).

Alternativamente, existe otro sistema de apagado de la señal asociado al número de agregados de inmunoreceptores inducidos por IgE, entre los que se pueden incluir

receptores para IgG poseedores de dominos ITIMs (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs), quienes pueden reclutar fosfatasa como SHIP e iniciar cascadas de defosforilación sobre los sustratos activos⁶.

1.8 Las CCs en las infecciones bacterianas

Aunque el mayor conocimiento de las CCs proviene de las enfermedades alérgicas, un número cada vez mayor de evidencia experimental sugiere que las CCs tiene un papel central en las enfermedades bacterianas. Conceptualmente hablando, las CCs conforman un tipo celular que puede conectar al sistema inmune innato con el adaptativo, y esta característica aunada a su estratégica localización, hace de las CCs uno de los tipos celulares centinelas que pueden regular activamente la capacidad de respuesta del sistema inmunológico.

Como ha sido mencionado, las CCs están presentes a lo largo del tejido mucosal y conectivo y por ello se hallan en constante interacción con su microambiente al tiempo que lo hacen con el ambiente exterior, donde están expuestas a diferentes estímulos. Las CCs pueden, entre otras cosas, regular el sistema inmune durante diversas condiciones patológicas³². Su estudio en las infecciones bacterianas ha abierto una importante ventana de oportunidad para entender el papel profiláctico de este tipo celular. El uso de ratones deficientes de CCs (W/W^v, W/W^{sh}, entre otros) ha facilitado la acumulación de evidencias que muestran un papel protector de las CCs frente a estímulos que activan a la

inmunidad innata⁴⁹. Experimentos hechos en ratones W/Wv, cuyo fenotipo está asociado a una severa deficiencia de CCs, sugieren que este tipo celular juega un papel fundamental en la resolución de procesos infecciosos inducidos por bacterias Gram-negativas⁵⁰. Con el uso de por lo menos tres modelos murinos de peritonitis bacteriana inducidas por a) ligadura y punción del ciego (CLP)⁵¹, b) inyección intraperitoneal de fragmentos bacterianos Gram-negativos⁵², o c) administración intraperitoneal de LPS purificado⁵³, ha sido mostrado que las CCs tienen la capacidad de secretar la primera ola de TNF en cavidad peritoneal después del estímulo. En los tres modelos, el TNF secretado puede alcanzar su nivel máximo una hora después de la estimulación debido a que se encuentra pre-sintetizado y almacenado en los gránulos de las CCs⁵¹⁻⁵⁴. De esta manera, el TNF en conjunto con los leucotrienos LTC₄ y LTB₄, inducen la migración de neutrófilos al sitio de infección dentro de la cavidad y contribuye a la activación de señales pro-sobrevivencia en el organismo^{51,55}. Interesantemente, estudios posteriores demostraron que el TLR-4 expresado en la superficie de las CCs es uno de los receptores involucrados en la resolución del proceso inflamatorio inducido por CLP⁵⁶. En conjunto, estos resultados sugieren que las CCs pueden ejercer funciones protectoras frente a estímulos bacterianos, en parte, a través de la activación del receptor TLR-4.

1.9 Señalización a través del TLR4 en células cebadas

Como fue abordado anteriormente, a la fecha se reconocen dos vías canónicas para explicar la activación del receptor TLR-4. La mayor parte de los datos sobre los cuales se

han ido construyendo las vías de señalización provienen de macrófagos y células dendríticas debido a su gran capacidad para reconocer endotoxinas e iniciar reacciones de inmunidad⁹. Sin embargo, otros tipos celulares también pueden llevar a cabo la activación del TLR-4. En el caso particular de las CCs derivadas de médula ósea (BMMCs), ha sido reportado que expresan el co-receptor CD14⁵⁷, la proteína señalizadora MD-2⁵⁸, el receptor TLR4, y el adaptador MyD88⁵⁹, quienes pueden orquestar la activación del TLR-4 en respuesta al LPS e inducir la fosforilación de IRAK1⁶⁰ e IκB^{57,61}. Asimismo, después de la activación del TLR4, la fosforilación de ERK1/2, JNK y p38 también ha sido reportada^{60,61}. En contraste a la vía de MyD88 la cual parece ser totalmente activa, un reporte reciente indica que la vía dependiente de TRIF no es funcional en este tipo celular debido a que, entre otras cosas, tanto el adaptador TRAM como el factor regulador de interferón 3 (IRF3) carecen de actividad, aunque no de expresión, después de la activación del receptor TLR4 en este tipo celular⁶².

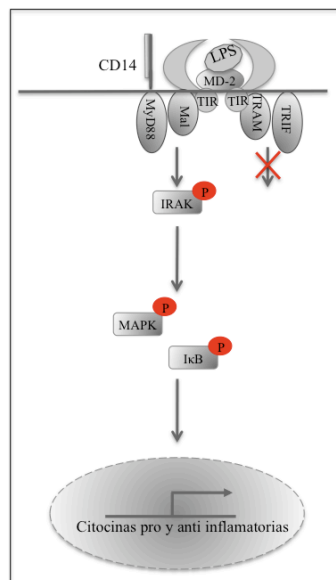


Figura 14. Señalización del TLR-4 en BMMCs. A la fecha ha sido reportado que las CCs expresan toda la maquinaria encargada de transducir las señales del LPS. Las CCs además pueden expresar los adaptadores MyD88-TIRAP/Mal y TRIF-TRAM. Sin embargo, recientemente ha sido reportado que en respuesta al LPS, sólo la vía de señalización dependiente de MyD88 es activa. Tras la adición de LPS, ha sido observado un incremento en la fosforilación de IRAK, MAPK, e IκB, así como en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como TNF, IL-6, IL-1β e IL-13, entre otras. Esquema construido con base en las referencias 55-60.

Las CCs se han venido perfilando como un tipo celular que está involucrado en distintos estados inflamatorios debido a la alta actividad transcripcional que poseen y su capacidad para contribuir en el control de la respuesta inmune frente a diversos estímulos bacterianos⁶³. Sin embargo, aún quedan por describir las complejas redes de señalización intracelular que orquestan tales respuestas, aún cuando la función de algunos elementos ha sido investigada con profundidad en ciertos sistemas de transducción. En este sentido, uno de los atributos más notables de las CCs es la implicación de las SFKs en distintos sistemas de señalización que conectan a este tipo celular con diversas condiciones microambientales. Las SFKs pueden regular una gran variedad de procesos celulares, tanto en condiciones de inflamación como de homeostasis⁴⁴. Estas cinasas han sido reconocidas como reostatos del sistema inmune, ya que, en analogía con un instrumento que varía la resistencia de un circuito eléctrico, éstas pueden regular la intensidad con la que es ejercida la activación de la respuesta inmune⁴³. A la fecha existe evidencia muy bien cimentada sobre la participación de las SFKs en distintos sistemas de transducción activados en las CCs (p. ej FcεRI y c-kit), donde se conocen con profundidad las bases moleculares de estas cinasas tras las activación del receptor³⁸. Sin embargo, en el caso particular del sistema de transducción de señales del receptor TLR-4, aún cuando se sabe que las SFKs pueden ser activadas en respuesta a la estimulación de LPS⁵⁰, se desconocen las funciones específicas que llevan a cabo dentro de este sistema de transducción.

1.10 Lyn en la activación del receptor TLR-4

Distintos miembros de la familia Src han sido relacionados con la activación del receptor TLR4. Usando diferentes modelos celulares, ha sido mostrado que el LPS puede incrementar la fosforilación de Src⁶⁴, Hck^{65,66}, Fgr⁶⁵, Fyn^(Medina-Tamayo, et al. en prensa) y Lyn^{65,67}. En el caso particular de Lyn ha sido mostrado que puede regular positiva o negativamente la activación del receptor TLR-4. En sustento de la regulación positiva ha sido mostrado que Lyn puede incrementar su actividad en respuesta al LPS, interaccionar con CD14⁶⁵ en monocitos, y con el TLR-4⁶⁸ en células HEK, y contribuir con la activación de NFκB. Recientemente ha sido reportado que esta cinasa es capaz de interaccionar con la proteína MD-2 y fosforilarla después de la estimulación con LPS, durante el proceso de endocitosis del receptor TLR4⁶⁹. La fosforilación en residuos de tirosina de MD-2 resultó ser importante para inducir señales hacia la activación de NFκB mediada por el receptor TLR4⁶⁹. Otros parámetros que pueden ser regulados positivamente por Lyn comprenden la producción de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX2) y la producción de citocinas entre las que se encuentra TNF⁶⁴.

Además del papel positivo ejercido por Lyn en el sistema de transducción de señales del receptor TLR-4, existe evidencia experimental que sugiere que también puede hacerlo negativamente. En este sentido, en macrófagos derivados de médula ósea fue encontrado que Lyn promueve un loop de regulación negativa en respuesta al LPS mediante un mecanismo dependiente de PI3K y SHIP⁷⁰. Los resultados que los autores mostraron

fueron apoyados por experimentos *in vivo*, donde después de una inyección *intravenosa* con LPS, los ratones Lyn *-/-* secretaron una mayor cantidad de TNF e IL-6 en comparación con los ratones WT, sugiriendo que Lyn puede regular negativamente las respuestas inducidas por LPS.

El comportamiento dual de Lyn ha sido observado en otros sistemas de transducción, p. ej. FcεRI y diversos reportes sugieren que su papel positivo o negativo puede estar asociado a la intensidad de la señal mediada por receptor. Alternativamente, es posible suponer que el papel específico de Lyn, en cada sistema de transducción, pueda depender del tipo celular. A pesar de los resultados obtenidos, quedan aún muchas preguntas abiertas en torno al papel que juega Lyn en el sistema de transducción de señales del receptor TLR4. En células cebadas, Lyn tiene un papel preponderante en la biología del receptor FcεRI y otros inmunoreceptores. Sin embargo, su papel en el sistema de transducción de señales del receptor TLR4 no ha sido explorado aun.

1.11 Planteamiento del problema

Con base en lo anterior, la pregunta que se desea contestar en el presente trabajo es: ¿Participa la cinasa Lyn en el sistema de transducción del receptor TLR4 en CCs *in vitro* e *in vivo*, y si es así, específicamente en qué reacciones?

2. Hipótesis

Si las CCs pueden responder al LPS a través de la activación del receptor TLR-4, y Lyn participa en las cascadas de activación río abajo de este receptor en otros tipos celulares, entonces Lyn se activará en respuesta al LPS y contribuirá en la señalización inducida por el TLR-4 en CCs

3. Objetivos

a) Objetivo general:

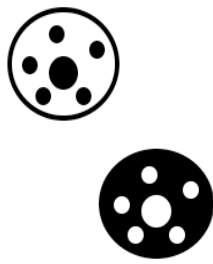

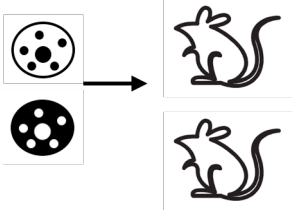
Investigar el papel de la cinasa Lyn en el sistema de transducción de señales del receptor TLR-4 en CCs

b) Objetivos particulares:

- 1) Investigar si Lyn participa en la secreción de TNF inducida por LPS en CCs *in vitro*
- 2) Determinar el papel de Lyn en las respuesta de señalización temprana inducidas por LPS *in vitro*
- 3) Averiguar si Lyn controla las respuestas de las CCs al LPS *in vivo*

4. Diseño experimental

En esta tesis se caracterizó el papel de la cinasa Lyn en la cascada de activación del receptor TLR-4 y el diseño experimental mostrado abajo fue empleado para poder constestar nuestra pregunta.

| Tabla 6. Diseño experimental | | |
|--|---|--|
| BMMCs WT y Lyn ^{-/-} | Tratamiento | Estudios <i>in vitro</i> |
|  | LPS (1000 ng/ml) A23187(50nM)/ PMA (1μM) Actinomicina D (5 μg/ml) Cursos temporales (0-24 hrs) (0-30 min) | <ul style="list-style-type: none"> • Inmunoblot (IB) • Inmunoprecipitación (IP) • Ensayo de movilidad electroforética (EMSA) • Citometría de flujo • Determinación de TNF por ELISA |
| Ratones WT y Lyn ^{-/-} | Tratamiento intraperitoneal (ip) | Estudios <i>in vivo</i> |
|  | | |
| Ensayos de transferencia de CCs (ip) en ratones Kit ^{w-sh} usando BMMCs WT y Lyn ^{-/-} | PBS LPS (1 mg/kg, 1h) | <ul style="list-style-type: none"> • Determinación de TNF por ELISA • Determinación de células Ly6G positivas por citometría de flujo |
|  | | |

5. Materiales y métodos

5.1 Anticuerpos y reactivos.

Anticuerpos policlonales anti-TLR4, Lyn, TRAF6, TAK1, I κ B, p65, p-JNK, JNK, p-p38, p38, ERK1/2, MEK3/6, y ubiquitina fueron comprados en Santa Cruz Biothechnology (Santa Cruz, CA). El anticuepo anti-pTAK fue de Cell Signalling. Anticuerpos anti-IgE y anti-IgE1 κ acoplados a FITC fueron de Pharmingen (San Diego, CA). El anticuerpo anti-Ly6G acoplado a azul pacífico fue de Biologend (San Diego, CA). La extravidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) y los anticuerpos monoclonales anti-ratón, y las inmunoglobulinas de ratón fueron de Amersham, Pharmacia Biotech (Little Chalfont, UK). El medio de cultivo celular RPMI fue de Gibco-BRL-Life Technologies (Gaithersburg, MD). El buffer de Laemmli, el β -octilglucósido, la pepstatina, la leupeptina, la aprotinina, el 2-mercaptoetanol, el dinitrofenol acoplado a albúmina de suero humana (DNP-HSA), el anticuerpo monoclonal IgE anti-DNP (clona SPE-7), el A23187, el PMA y el Lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* (serotipo 026:B6) fueron de Sigma (St. Louis, MO). La interleucina 3 (IL-3) fue de Peprotech (Rock Hill, NJ). El NP-40 fue de Pierce (Rockford, IL). El PVDF fue de Perkin Elmer (Boston, MA).

5.2 Ratones

En esta tesis se utilizaron ratones WT, Lyn^{-/-} and Kit^w/Kit^{w-sh} fueron comprados en Jackson Laboratories (Maine, USA, stock: 003204). Dado que los ratones Lyn^{-/-} se encontraban en un fondo genético 129SvImJ, al menos 5 retro-cruzas fueron hechas

usando ratones C57BL/6J (también de Jackson Laboratories), para obtener ratones $Lyn^{-/-}$ con fondo genético C57BL/6J. El genotipo de cada ratón fue analizado por PCR utilizando el protocolo sugerido por el proveedor. Todos los procedimientos donde se utilizaron ratones fueron aprobados por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), (protocolos 032/02 y 384/07)

5.3 Genotipos

a) Purificación de ADN

Para confirmar el genotipo de los ratones, se les cortó un centímetro del extremo de cola. Las colas fueron puestas en tubos eppendorf de rosca de 1.5 ml y se les añadió 1 ml de buffer SNET para mantenerlas toda la noche en un baño a 57°C y en agitación. Al día siguiente se tomaron 750 µl del sobrenadante de cada digestión y se pasaron a otro tubo nuevo para añadirles 750 µl de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol (25:24:1). Se les agitó en un VORTEX durante 30 segundos y se les centrifugó en una centrífuga HERMLE-z233 MK-2 a 15 000 rpm a 4°C a 15 000 rpm por 15 minutos. De cada muestra, se tomó 600 µl de la fase acuosa y se les agregaron 600 µl de isopropanol para mezclarlas por inversión en un tubo nuevo y mantenerlas 15 minutos en hielo seco y enseguida centrifugarlas 15 minutos a 15 000 rpm a 4°C. A las pastillas formadas en el fondo de cada tubo, se les retiró el sobrenadante y se les agregó 1ml de etanol al 70% frío, se les mezcló por inversión, se les metió en hielo seco durante 5 minutos y se les

centrifugó a 4°C a 20 000 x g por 15 minutos. EL sobrenadante fue retirado por completo de las pastillas y las muestras fueron secadas a temperatura ambiente hasta no detectar ningún solvente (aproximadamente 15 minutos). Se les agregó 25µl de agua tratada con DEPC. Para cuantificar la cantidad de ADN, se tomaron 2µl y se disolvieron en 98µl de agua con DEPC y se leyeron en un espectrofotómetro SUNRISE a longitudes de onda de 260 y 280 nanómetros. Después de esto, los genes Lyn, en el caso de las células WT y el casset de neo en el caso de las células lyn^{-/-}, fueron sometidos a 35 ciclos de replicación. (ver siguiente sección).

b) Amplificación del ADN

Para llevar a cabo la confirmación de los genotipos, se hizo lo siguiente: en tubos de 0.5 ml se puso 1µl de DNA de cada muestra. A cada uno de éstos tubos se les agregó 0.96µl de buffer para PCR 10X sin Mg, 0.96µl de dNTP mix 2.5 mM, 1.2 de MgCl₂ 25 mM, 0.3 µl de primer sentido 10 µM (oligo up Lyn y Neo), 0.3 µl de primer antisentido µM (oligo down Lyn y Neo), 0.03 µl de Taq DNA polimerasa y 5.65µl de agua. Posteriormente, se metieron las muestras a un termociclador Eppendorf y se sometieron a 35 ciclos en el programa FYNKO bajo el siguiente programa: Ciclo 1: 94°C, 3 min. Ciclo 2: 94°C, 30 seg. Ciclo 3: 58°C, 4 min. Ciclo 4: 72°C, 1 min. Ciclo 5: go to 1, rep 35 times. Ciclo 6: 72°C, 2 min. Ciclo 7: Hold 10°C. End. Después de esto las muestras fueron corridas por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Figura 15).

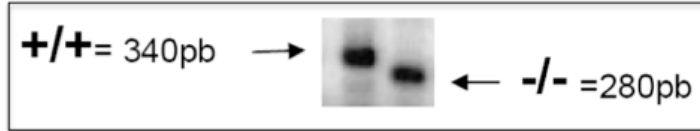


Figura 15. Genotipos de CCs WT y Lyn^{-/-}. Las células WT expresan a Lyn^{-/-}, lo que genera una banda a la altura de

340 pares de bases. En células Lyn^{-/-} se genera una banda a la altura de 280 pares de bases debido a la delección de los exones 3-7.

5.4 Cultivo celular.

BMMCs de ratones C57BL/6J WT y Lyn^{-/-} de 4-8 semanas de edad fueron diferenciadas como ha sido reportado⁷¹. Brevemente, los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO₂ y los fémures fueron extraídos para obtener progenitores de la médula ósea mediante perfusión del hueso usando medio completo para BMMCs con una jeringa de insulina con aguja de 30G x 13 mm. El medio BMMC completo está compuesto por RPMI suplementado con 2 mM L-glutamina, 100 ul/ml penicilina, 100 ug/ml estreptomicina, 10% FBS, 55 uM 2-ME, 1 mM HEPES, y 20 ng/ml de interleucina 3 (IL-3). Una vez que los progenitores fueron puestos en la caja de cultivo, la médula ósea fue cultivada en el mismo medio durante 4 semanas para tener BMMCs bien diferenciadas. Para probar el estado de maduración de las células, se realizaron ensayos de citometría de flujo para determinar la expresión del receptor FcεRI como ha sido descrito⁷², y solamente los cultivos que mostraron más del 98% de expresión fueron utilizados. Rutinariamente, una evaluación funcional de desgranulación inducida por complejos IgE/Ag mediante la determinación de la enzima β-hexosaminidasa fue hecha para determinar la funcionalidad de las BMMCs como se ha descrito⁷².

5.5 Citometría de flujo.

BMMCs derivadas de ratones WT y Lyn^{-/-} fueron incubadas con o sin IgE (clona SPE7, Sigma) durante 1 hora. Después de haber transcurrido ese tiempo, las células fueron lavadas por duplicado con una solución de tñido (staining buffer: albúmina de suero bovino (BSA) 2% y azida de sodio 0.2% en PBS 1X) y centrifugadas 750 x g durante 5 minutos a 4°C. Las pastillas celulares entonces fueron resuspendidas en una solución de bloqueo (blocking buffer 1X, Biogenex, San Ramon, CA) por 5 minutos a 4 °C. Transcurrido el último tiempo, anticuerpos anti-IgE o anti-TLR4 acoplados a FITC fueron adicionados. Paralelamente, se emplearon anticuerpos anti-isotipo para determinar el pegado inespecífico. Después de una hora de incubación, las células fueron centrifugadas y las pastillas celulares fueron resuspendidas en solución de tñido para ser analizadas en un citómetro de flujo modelo FACSort (BD Biosciences).

5.6 Estimulación de BMMCs con LPS, obtención de proteínas totales, inmunoblot e inmunoprecipitación de proteínas.

BMMCs WT y Lyn^{-/-} (dos millones de células por ml) fueron tratadas con LPS (500 ng/ml) o PMA (1 µM)/A23187 (100 nM) a 37 °C for diferentes tiempos in medio de cultivo RPMI enriquecido con IL-3. Las células fueron colectadas por centrifugación y los sobrenadantes fueron fommados para la determinación de TNF por ELISA (ver seccion de ELISA). Para el inmunoblot (western blot), dos millones de células fueron

resuspendidas en solución de Tyrode + BSA (solución de HEPES 20 mM a pH 7.4, NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 5.6 mM y BSA 0.05%) y estimuladas con LPS (500 ng/ml). Después de los tiempos apropiados, las células fueron colectadas y lisadas en solución de Laemmli 2X suplementado con orto-vanadato 4 mM y β-mercaptoetanol 0.28 mM. Para los ensayos de inmunoprecipitación, diez millones de células por condición, en un volumen total de 200 ul de solución Tyrode/BSA fueron utilizadas. Todas las muestras fueron estimuladas con LPS y centrifugadas a 800 x g a 4°C antes de ser resuspendidas en una solución de lisis que contiene NP40 1%, β-Octilglucósido 60 mM, fenilmetanesulfonilfluoruro (PMSF) 2 mM, aprotinina 10 ug/ml, leupeptina 2 ul/ml, pepstatina 5 mM, pirofosfato de sodio 5 mM, (floruro de sodio) NaF 50 mM, orto-vanadato de sodio 1 mM, por 30 minutos en hielo. Los lisados fueron centrifugados por 10 minutos a 15,000 x g a 4°C y los sobrenadantes fueron separados de las pastillas celulares (pellets) y mantenidos en hielo por una hora antes de ser usados. Los sobrenadantes fueron incubados toda la noche con anticuerpos específicos pre-unidos a esferas acopladas a proteína A o G. Después de una noche de incubación a 4°C, las esferas fueron lavadas una vez con solución de lisis con NP40 1% y una vez más con solución de lisis con NP40 0.1%. Las proteínas fueron recuperadas con un volumen igual de solución de Laemmli 2X y separadas en geles SDS-PAGE al 8, 10 y 12 % dependiendo de la proteína de interés a ser detectada. Después de haber corrido las muestras mediante electroforesis, se llevó a cabo la transferencia en membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), y posteriormente las membranas fueron bloqueadas usando leche en polvo al 4% o un coctel de inmunoglobulinas suspendidas en solución salina con Tris y Tween 20 al 1%. Las membranas fueron probadas usando el anticuerpo primario de interés y un

adecuado anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) antes de ser visualizado por quimioluminiscencia.

5.7 Ensayo de movilidad electroforética (EMSA).

La activación de NFκB fue medida obteniendo los extractos nucleares de células WT y Lyn^{-/-}. Quince millones de células fueron activadas con LPS por 30 minutos o IgE/Ag por 10 minutos. Después de ese tiempo, las células fueron colectadas para llevar a cabo la extracción nuclear usando el protocolo proporcionado con el kit TransAm Transcription Factor (Active Motif, Carlsbad, CA), suplementado con solución HB (hipotonic buffer) con leupeptina (10 mg/ml), pepstatina A (5 mg/ml) y aprotinina (4.7 U/mg prot). Los ensayos de EMSA fueron hechos usando la optimización lightShift y el kit de control (Pierce, Rockford, IL) acorde a las instrucciones de manufactura. Las secuencias de los primers biotinilados de NFκB fueron los siguientes: sentido 5' BiotinaCAA-ATG-TGG-GAT-TTT-CCC-ATG-AGT-CTC-AAA-ATT-AGA-GAG3' y antisentido 5' BiotinaCTC-TCT-AAT-TTT-GAG-ACT-CAT-GGG-AAA-ATC-CCA-CAT-TTG3' (Invitrogen). Las muestras fueron resueltas en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 6% y las bandas fueron reveladas usando el módulo de detección quimioluminiscente para ácidos nucleicos (Pierce, Rockford, IL), siguiendo las instrucciones del proveedor.

5.8 Reconstitución intraperitoneal de ratones Kit^w/Kit^{wsh} .

Ratones deficientes de CCs, Kit^w/Kit^{wsh} de 8 a 12 semanas de edad fueron selectivamente reconstituidos mediante una inyección intraperitoneal con dos millones de células cebadas derivadas de la médula ósea (BMMCs) WT y $Lyn^{-/-}$ de 4 semanas de edad. En todos los ensayos de reconstitución, las células fueron concentradas en un volumen total de 200 μ l de solución salina isotónica estéril y posteriormente fueron inyectadas en la cavidad peritoneal de los ratones⁵³. Cuatro semanas después de la inyección con BMMCs, los ratones fueron usados para los experimentos de endotoxemia. La reconstitución fue confirmada por análisis de citometría de flujo y tñido con azul de toluidina de las células cebadas obtenidas en los lavados peritoneales, así como por la producción de TNF inducida por LPS en la cavidad peritoneal de animales reconstituidos, como ha sido reportado⁵³.

5.9 Modelo murino de endotoxemia y lavados peritoneales.

Ratones WT, $Lyn^{-/-}$, Kit^w/Kit^{wsh} y Kit^w/Kit^{wsh} reconstituidos con BMMCs WT o $Lyn^{-/-}$, fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con LPS (1 mg/kg, disuelto en solución salina) o con vehículo. Una hora después, se hicieron lavados peritoneales mediante el sacrificio de ratones y posteriormente fueron inyectados con 2.5 ml de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaH_2PO_4 10 mM, K_2HPO_4 2 mM, pH 7.4) en la cavidad peritoneal. Posteriormente se llevó a cabo un ligero masaje sobre la superficie abdominal y al menos

1 ml de lavado peritoneal fue colectado en cada ratón. Cada muestra fue centrifugada a 359 g por 5 minutos y la cantidad de TNF en cada lavado fue determinada por ELISA (ver siguiente sección). Otro grupo de animales fue inyectado en el peritoneo con LPS (como se describe arriba) y 5 horas después, fueron sacrificados. Los lavados peritoneales fueron realizados y las muestras fueron tomadas para calcular el número de células totales en los lavados peritoneales mediante el uso de una cámara Neubauer. Paralelamente, las células totales fueron marcadas con un anticuerpo específico anti Ly6G⁷³ y analizadas mediante citometría de flujo.

5.10 ELISA.

La concentración de TNF en los sobrenadantes de células estimuladas o en lavados peritoneales fue determinada mediante el uso de kits de ELISA de Peprotech (Rocky Hill, NJ) e Invitrogen (Carlsbad, CA). Los sobrenadantes fueron obtenidos de la siguiente forma: dos millones de CCs WT y Lyn -/- fueron incubadas con 500 ó 1000 ng/ml de LPS durante diferentes tiempos en medio completo para BMDCs. Las células fueron colectadas por centrifugación y los sobrenadantes fueron procesados para su análisis por ELISA. Paralelamente, la secreción de TNF en los lavados peritoneales de ratones WT, Lyn-/-, Kit^w/Kit^{wsh} reconstituidos y no reconstituidos, también fueron evaluada por este método. Todos los ensayos de ELISA fueron hechas acorde a las instrucciones del fabricante.

5.11 Análisis estadísticos

Todos los resultados son mostrados como la media del error estandar. Alternativamente, pruebas de análisis de varianza (ANOVA) fueron realizadas y se consideraron diferencias estadísticamente significativas a todos los valores de p que estuvieron debajo de 0.05. Las pruebas se realizaron con el programa *Prisma V3.0*.

6. Resultados

6.1 Lyn participa en la secreción de TNF en respuesta al LPS en células cebadas.

Con la finalidad de descartar defectos en los niveles de expresión del TLR-4 asociados a la ausencia de Lyn, incubamos BMMCs WT y Lyn $-/-$ con anticuerpos anti-TLR-4 y su correspondiente control de isotipo (Figura 16A). En condiciones basales, observamos la expresión del receptor TLR-4 en cantidades similares en ambos tipos celulares (fluorescencia media: WT, 83.3 ± 11.09 ; Lyn $-/-$, 74.07 ± 6.1). Para averiguar el papel de Lyn en la secreción de TNF inducida por LPS, BMMCs WT y Lyn $-/-$ fueron incubadas con LPS (500 ng/ml) en un curso temporal de 24 horas (Figura 16B, panel izquierdo). Los resultados mostraron que ambos tipos celulares tienen cantidades basales similares y que tanto las BMMCs WT (círculos negros) como las Lyn $-/-$ (círculos blancos) pueden alcanzar su secreción máxima a las 8 horas post-estimulación con LPS. Sin embargo, las células Lyn $-/-$ mostraron un defecto parcial en la secreción de TNF.

Con el fin de descartar la posibilidad de que al ausencia de Lyn tuviera algún defecto intrínseco relacionado con la maquinaria de secreción, realizamos experimentos usando un activador de la PKC (PMA) y un ionóforo de calcio (A23187), los cuales son conocidos por inducir la secreción de mediadores independientemente de la activación mediada por receptor. BMMCs WT y Lyn $-/-$ fueron estimuladas con PMA/A23187 durante 12 horas (Figura 16B, panel derecho) y observamos que el TNF pudo ser secretado en presencia y ausencia de Lyn. En conjunto, estos resultados sugirieron que Lyn está involucrada en la secreción de una fracción de TNF en respuesta al LPS, y que

la ausencia de Lyn no afecta la maquinaria de secreción asociada a la liberación de TNF en CCs.

Para averiguar si Lyn participaba en la regulación transcripcional de TNF en respuesta al LPS, preincubamos BMMCs WT y Lyn^{-/-} con actinomicina D, 15 minutos antes de un curso temporal de 24 horas con LPS (Figura 16C). Los resultados muestran que en células WT se pudo observar el efecto de la actinomicina D después de las dos horas de estimulación con LPS y hasta el final del curso temporal (Figura 16C, panel izquierdo). En células Lyn^{-/-} se observó el efecto inhibitorio de la actinomicina D muy claramente a partir de las 4 horas de estimulación con LPS y pudo mantenerse hasta el final del curso temporal (Figura 16C, panel derecho). Estos datos indican que la secreción de TNF inducida por LPS es insensible a la actinomicina D, representa la fracción pre-sintetizada y almacenada en los gránulos. Además, estos resultados sugieren que Lyn puede contribuir a la síntesis de TNF, pero que existen vías independientes de Lyn que pueden inducir su producción.

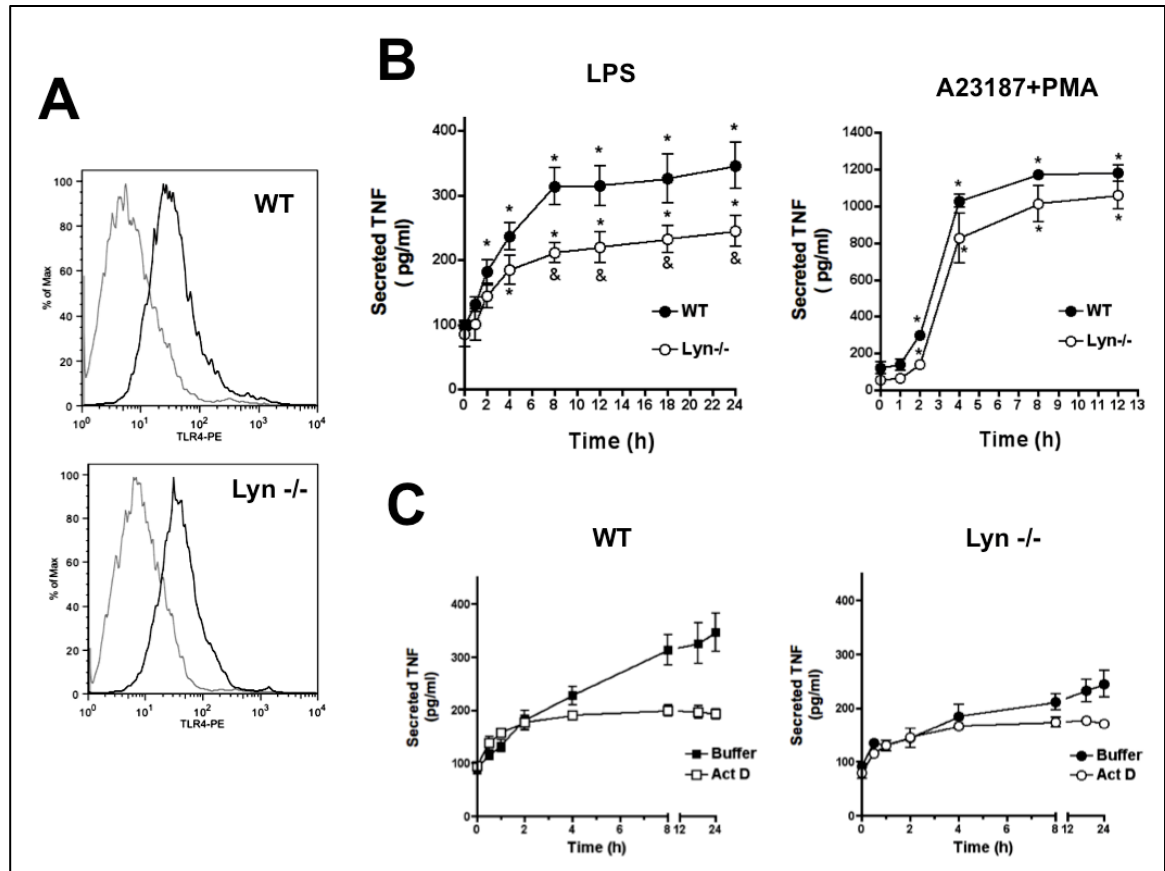


Figura 16. Lyn regula positivamente la secreción de TNF inducida por LPS en células cebadas. A)

Dos millones de células WT y Lyn^{-/-} fueron marcadas con anticuerpos específicos anti TLR-4 acoplados a FITC. El control de isotipo es presentado en el histograma izquierdo de cada gráfica en tanto la señal específica del TLR-4 puede ser observada en el histograma derecho de cada gráfica. Se muestra un experimento representativo de al menos 3 realizados con diferentes cultivos celulares. B) Dos millones de células WT y Lyn^{-/-} en cada punto fueron incubadas en presencia de 500 μ g/ml de LPS (panel izquierdo) o A23187/PMA (panel derecho) como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Después de distintos tiempos de estimulación, los sobrenadantes fueron colectados y la concentración de TNF fue determinada por ELISA. C) Dos millones de células WT y Lyn^{-/-} en cada punto fueron estimuladas con LPS (como en B) en ausencia o presencia de un tratamiento con actinomicina D (5 μ g/ml, adicionados 15 minutos antes de la estimulación con LPS). La concentración de TNF de cada sobrenadante fue determinada por ELISA. Los valores de los paneles B y C son presentados como la media \pm EE (error estándar) de entre 3 a 5 experimentos independientes hechos con diferentes cultivos. *, $p < 0.05$ con respecto a células sin estimulación. &, $p < 0.01$ con respecto a las células WT.

6.2 Lyn controla la activación de MEK3/6 en células cebadas estimuladas con LPS

En la cascada de activación del receptor TLR-4, se sabe que a partir de la activación de TAK-1 la vía de las MAPKs e IKK inducen la actividad de AP-1 y NFκB, respectivamente⁹. Por el lado de la activación de las MAPKs, se sabe que MEK 3/6 forma parte de la cascada de activación del TLR-4, y junto a MEK 1/2, pueden activar a cinasas río abajo como p38, JNK y ERK 1/2. Por otra parte, ha sido reportado que TAK-1 puede inducir la fosforilación de MEK 3/6 y contribuir a la activación de señales río abajo. Para averiguar el papel de Lyn en la activación de MEK3/6 en nuestro modelo celular, BMMCs WT y Lyn -/- fueron incubadas con LPS durante 15 minutos. Los resultados mostraron que en células WT, la fosforilación de MEK3/6 pudo ser detectada claramente sobre su basal después del tratamiento. En contraste, en células Lyn -/- se detectaron estados de fosforilación altos de MEK 3/6 y sin embargo no se observó un incremento en su activación después del estímulo (Figura 17A). Para mostrar el radio de activación de MEK3/6 en células WT y Lyn-/- en presencia y ausencia de LPS, se realizó un análisis de densitometría de al menos 4 experimentos independientes (Figura 17B). Los resultados muestran que, aunque en las células carentes de Lyn, los niveles de fosforilación basales tienden a ser más altos que los de las células WT, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos. Estos resultados sugieren que Lyn está involucrada en la activación de MEK3/6 inducida por LPS.

6.3 Lyn contribuye a la activación de ERK1/2, p38 y JNK inducida por el receptor TLR4.

Para averiguar la participación de Lyn en la activación de las MAPKs: ERK1/2, p38 y JNK inducida por LPS, realizamos un curso temporal de 30 minutos. Usando anticuerpos específicos dirigidos contra residuos de treonina o treonina/tirosina fosforilados, determinamos el estado de activación de cada sustrato después del curso temporal. Nuestros resultados muestran que el LPS pudo incrementar el estado de fosforilación de ERK1/2, JNK, p38 a los 15 y 30 minutos de estimulación en células WT. Sin embargo, en ausencia de Lyn, la fosforilación se observó afectada en respuesta al mismo estímulo. Estos resultados sugieren que Lyn controla positivamente la activación de ERK1/2, p38 y JNK (Figura 17C).

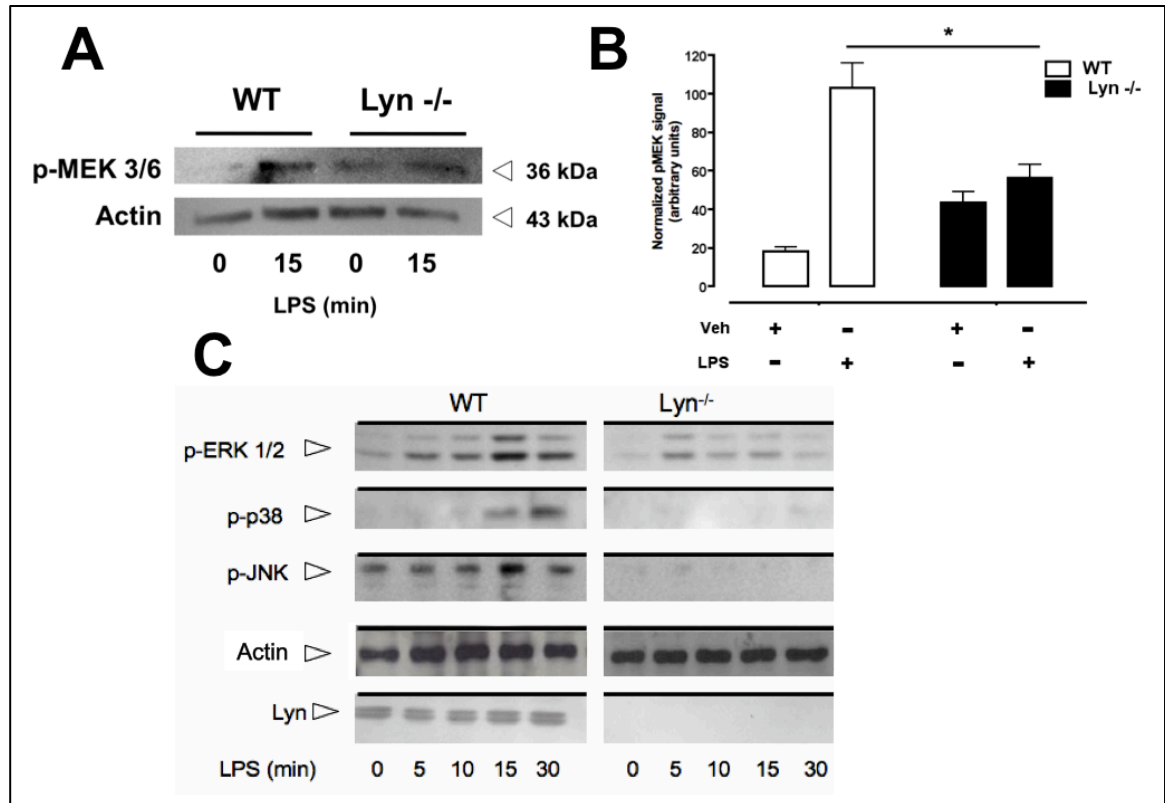


Figura 17. Lyn controla positivamente la activación de las MAPKs dependiente de LPS. Dos millones de células cebadas WT y Lyn^{-/-} por condición fueron estimuladas con LPS (500 ng/ml). Las células fueron colectadas y lisadas en buffer Laemmli 2X como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Ensayos de Western Blot muestran la fosforilación de MEK3/6 (panel A), ERK1/2, JNK, p38 (panel C) en BMMCs WT y Lyn^{-/-}. Se muestra un experimento representativo de al menos 4 experimentos independientes hechos con distintos cultivos celulares. B) Análisis densitométrico de la señal de fosforilación de MEK3/6 en células WT y Lyn^{-/-}. Los datos fueron normalizados respecto a los valores densitométricos de la señal de actina. Los datos son mostrados como la media ± MEE de al menos tres experimentos independientes usando distintos cultivos celulares. *, p < 0.05.

6.4 El receptor TLR-4 es activado selectivamente por LPS

Para descartar la posibilidad de que el LPS pudiera estar activando vías independientes del receptor TLR4⁷⁴, decidimos antagonizar las acciones del LPS con un anticuerpo que reconoce al TLR-4 y evita el ensamble con MD-2, inhibiendo su señalización al interior de la célula⁷⁵. El anticuerpo fue adicionado 15 minutos antes de retar a las células con LPS por 15 minutos mas. Los resultados indican que al bloquear la actividad de TLR4 con el anticuerpo, el LPS no fue capaz de inducir la fosforilación de ERK1/2, lo cual sugiere que en nuestras condiciones, el LPS activa selectivamente al receptor TLR4 (Figura 18).

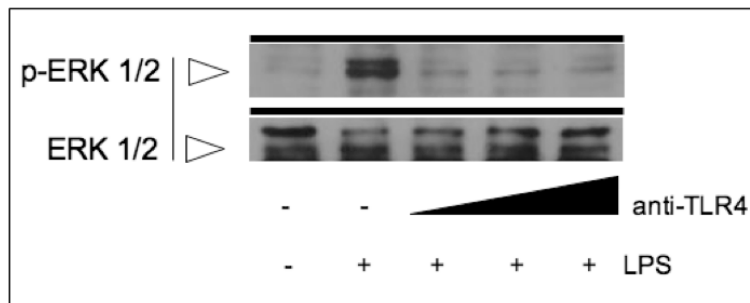


Figura 18. El receptor TLR-4 es selectivamente activado por el LPS en BMMCs. Dos millones de células WT fueron estimuladas con LPS (500 ng/ml) durante 15 minutos, en presencia o ausencia de un anticuerpo bloqueador de la

actividad del TLR-4 (MTSS10, 5, 50 y 500 pg/ml, 15 minutos antes de la estimulación con LPS)

6.5 Lyn controla positivamente la vía de NFκB inducida por la activación del TLR-4

Una vez analizadas las MAPKs, procedimos a evaluar la actividad de la vía que controla al factor de transcripción NFκB. Con el fin de averiguar la participación de Lyn en la fosforilación del complejo IKKα/β inducida por el TLR-4, BMMCs WT y Lyn^{-/-} fueron estimuladas con LPS durante 15 minutos y se obtuvieron las proteínas totales que fueron analizadas por Western Blot para determinar el estado de activación de IKKα/β mediante el uso de anticuerpo específicos dirigidos contra treoninas fosforiladas. Los resultados muestran que las células WT fueron capaces de inducir la fosforilación de IKKα/β en respuesta al LPS, mientras que éste complejo fue insensible a la estimulación en ausencia de Lyn (Figura 19A).

Para averiguar si la ausencia de Lyn también afectaba la fosforilación del inhibidor de NFκB, IκB, un sustrato río abajo del complejo IKK, realizamos un curso temporal con LPS en células WT y Lyn^{-/-}. Los resultados muestran que las células WT fueron capaces de incrementar la fosforilación de IκB a los 15 minutos después de la estimulación, la cual se mantuvo hasta los 30 minutos (Figura 19B). En las células Lyn^{-/-} pudo distinguirse un incremento discreto en la fosforilación de IκB a los 5 minutos manteniéndose hasta los 30 minutos, pero los niveles fueron claramente menores en relación con las células WT.

Con el objetivo de evaluar si la ausencia de Lyn, dada su participación en la activación de IKK $\alpha\beta$ e I κ B, podía prevenir la unión de NF κ B (p50p65) a sus sitios consenso, realizamos ensayos de movilidad electroforética (EMSA) usando células WT y Lyn $^{-/-}$ estimuladas durante un curso temporal de 30 minutos con LPS y mediante complejos IgE/Ag (como control positivo). Los resultados de la figura 19C muestran que en células WT, NF κ B fue capaz reconocer sus sitios consenso y unirse a ellos a los 10 minutos de estimulación con LPS, manteniéndose hasta los 30. En contraste, las células Lyn $^{-/-}$ mostraron un claro defecto en al unión de NF κ B a sus sitios concenso. En células WT y Lyn $^{-/-}$ estimuladas 15 minutos con IgE/Ag fue posible detectar la unión de p50p65, aunque en niveles menores a los observados en respuesta al LPS. La presencia de p50/p65 en los complejos fue determinada utilizando anticuerpos específicos (resultados no mostrados). De forma contrastante, en la figura 19C también es posible observar un complejo que migra más abajo que el de p50/p65, el cual podría corresponder al complejo p50/p50. Tal posibilidad queda abierta para ser investigada en el futuro. Conjuntamente, estos datos sugieren que Lyn juega un papel positivo en la activación de la vía de NF κ B en respuesta a la estimulación del TLR-4.

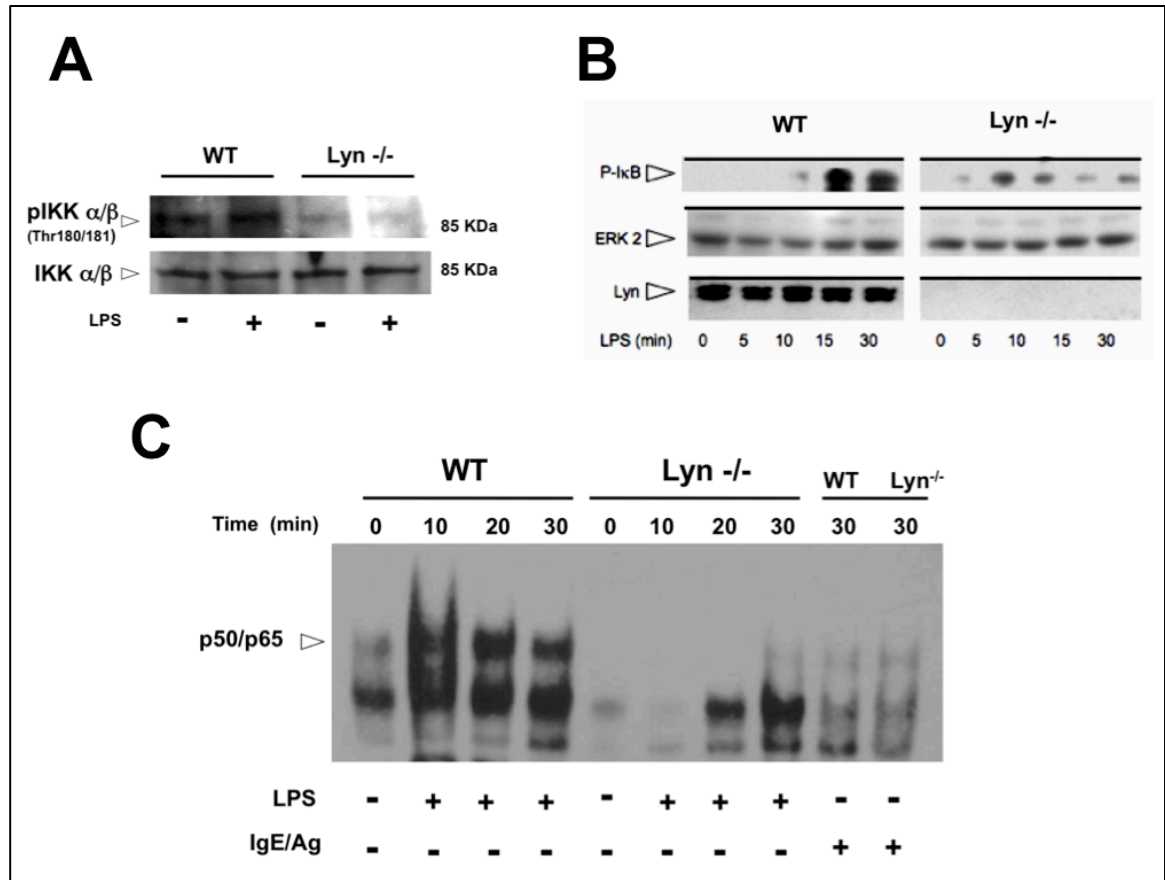


Figura 19. La cinasa Lyn regula la vía de NFκB activada por el receptor TLR-4 en células cebadas. Dos millones de células WT y Lyn^{-/-} por condición fueron estimuladas con LPS (500 ng/ml) y, a los tiempos indicados, las células fueron aisladas y lisadas para analizar la fosforilación de IKKαβ (panel A) e IκB (panel B) por Western Blot. C) Diez millones de células WT y Lyn^{-/-} por condición fueron estimuladas con LPS o IgE/Ag en los tiempos indicados. Después de la extracción de núcleos, ensayos de movilidad electroforética (EMSA) fueron hechos como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Se muestra un experimento representativo, de al menos 4 independientes hechos con diferentes cultivos. La presencia de p50/p65 en los complejos fue determinada utilizando anticuerpos específicos (resultados no mostrados). La unión de NFκB inducida por la estimulación del receptor FcεRI mediante complejos IgE (100 ng/ml)/Ag (10 ng/ml) fue empleada como control positivo.

6.6 Lyn controla la formación del complejo de TRAF-6/TAK-1 en respuesta al LPS

Como ha sido abordado en la introducción, un mecanismo propuesto para explicar la activación del complejo TAK-1 indica que TAB-2 necesita ser ubiquitinado por el complejo de TRAF-6 para que TAK-1 pueda autofosforilarse y adquirir una configuración activa que pueda transducir la señal a los sustratos río abajo (ref. 25). Con el objetivo de averiguar si Lyn podría tener algún efecto en el ensamble del complejo de TRAF-6 con el de TAK-1 después de la activación del TLR4, preincubamos células con LPS durante un curso temporal de 30 minutos. Puede verse en la figura 20A que en células WT es posible detectar un incremento en la interacción de TRAF-6 con TAK-1 a los 15 y treinta minutos de estimulación sobre su basal. En contraste, en las células Lyn^{-/-} pudo detectarse la interacción entre TRAF-6 y TAK-1 en condiciones basales, pero no fue posible observar un incremento después de la estimulación con LPS.

Debido a que ha sido reportado que la fosforilación de TAK-1 en los residuos 184/187 es un marcador de activación de esta proteína²⁵, decidimos averiguar si Lyn podía afectar la activación de TAK-1 asociada a TRAF-6 en respuesta a la activación del receptor TLR4. Células WT y Lyn^{-/-} fueron estimuladas en un curso temporal de 30 minutos con LPS. En la figura 20B los resultados indican que en células WT puede observarse un incremento en la fosforilación de TAK-1 asociada a TRAF-6 después de 15 de estimulación con LPS, alcanzando su máximo a los 30 minutos. Sin embargo, en células

Lyn^{-/-}, a pesar de que en condiciones basales se detectó la fosforilación de TAK-1, ésta no incrementó en respuesta al LPS.

Diversos reportes indican que TRAF-6 debe ubiquitinarse para completar su estado de activación e inducir señales río abajo⁷⁶. Con el fin de averiguar si el perfil de ubiquitinación de TRAF-6 estaba afectado en ausencia de Lyn después de la activación del TLR4, células WT y Lyn^{-/-} fueron estimuladas en un curso temporal de 30 minutos. Los resultados indican las células WT fueron capaces de inducir un incremento en el perfil de ubiquitinación de TRAF-6 a los 15 y 30 minutos de estimulación con LPS. Sin embargo, en ausencia de Lyn no fue posible observar un incremento en el perfil de ubiquitinación de TRAF-6 en respuesta al LPS (Figura 20C). Conjuntamente, los resultados indican que la ausencia de Lyn afecta el adecuado ensamble del complejo TRAF-6/TAK-1, así como el perfil de ubiquitinación de TRAF-6 en respuesta al LPS en CCs.

6.7 Lyn se activa y puede asociarse con TRAF-6 en respuesta al LPS

Con el fin de averiguar si Lyn podía activarse en respuesta al TLR4, células WT fueron tratadas con LPS durante un curso temporal con LPS. Mediante el uso de un anticuerpo hecho en contra de la fosfotirosina reguladora 416 de Src localizada en su extremo COOH terminal, región donde se alojan diversos residuos de tirosina asociados con la activación de las cinasas de esta familia⁴³, pudimos observar un incremento en el estado

de fosforilación de Lyn desde los 5 minutos de estimulación con LPS, el cual se mantuvo hasta los 30 minutos (Figura 21A).

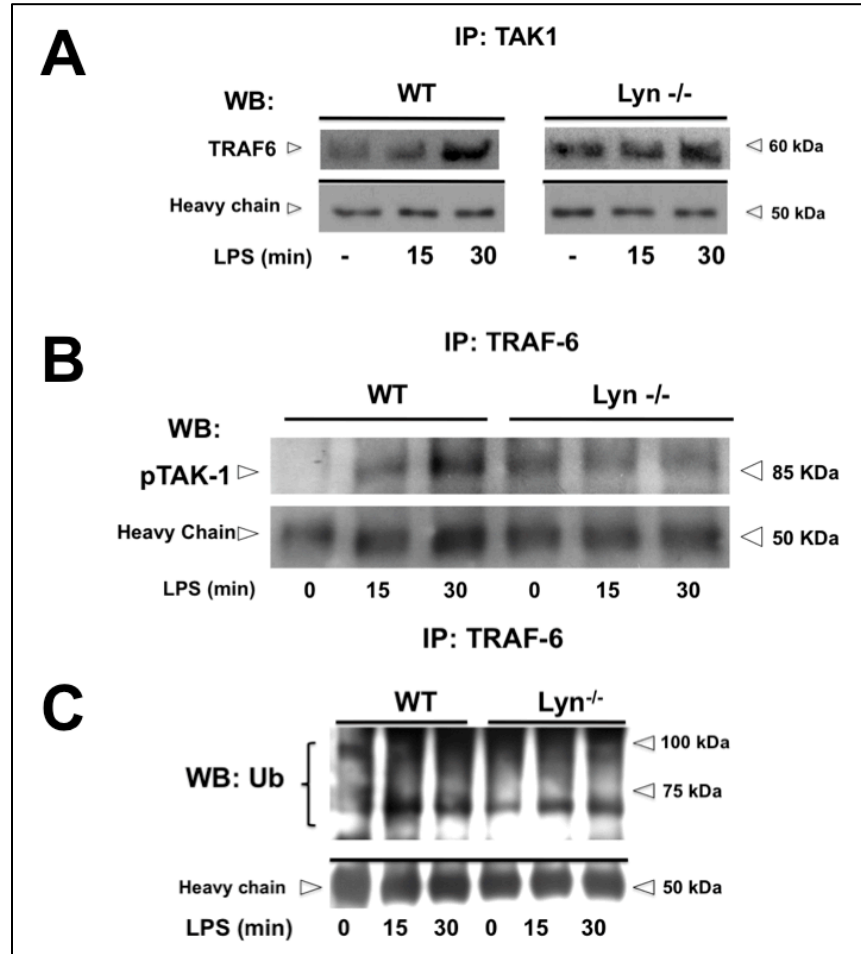


Figura 20. La cinasa Lyn modula la formación y función del complejo TRAF-6/TAK-1 inducido por TLR-4. Veinte millones de células WT y Lyn^{-/-} por punto fueron estimuladas con LPS (500 ng/ml) y en los tiempos señalados las células fueron colectadas por centrifugación y resuspendidas en buffer de lisis descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los extractos celulares fueron incubados con esferas de sefarosa/proteína A acoplada a anticuerpos anti-TAK-1 (panel A) o anti-TRAF-6 (panel B y C). Las muestras de proteínas arrastradas con las esperas fueron separadas mediante electroforesis de geles de acrilamida y Western Blot usando anticuerpos específicos anti-pTAK-1 (p-Thr 184/187) (panel B) o anti-ubiquitina (panel C). Se muestra un experimento representativo, de al menos 3 independientes hechos con diferentes cultivos

Con el fin de averiguar si Lyn podía unirse a TRAF-6 en respuesta a la activación de TLR4, células WT y Lyn^{-/-} fueron estimuladas con LPS durante un curso temporal de 30 minutos. Los resultados muestran que en células WT, Lyn puede asociarse con TRAF-6 en respuesta al LPS desde los 10 minutos, manteniendo una clara interacción hasta los 30 minutos de estimulación con LPS (Figura 21B). También se detectó la presencia de Lyn en extractos totales (WCL) como control de migración de las muestra inmunoprecipitadas. Como esperábamos, en células Lyn^{-/-} no se detectó alguna asociación con TRAF-6. Estos resultados sugieren que Lyn puede activarse, así como asociarse con con TRAF-6, después de un estímulo con LPS en CCs.

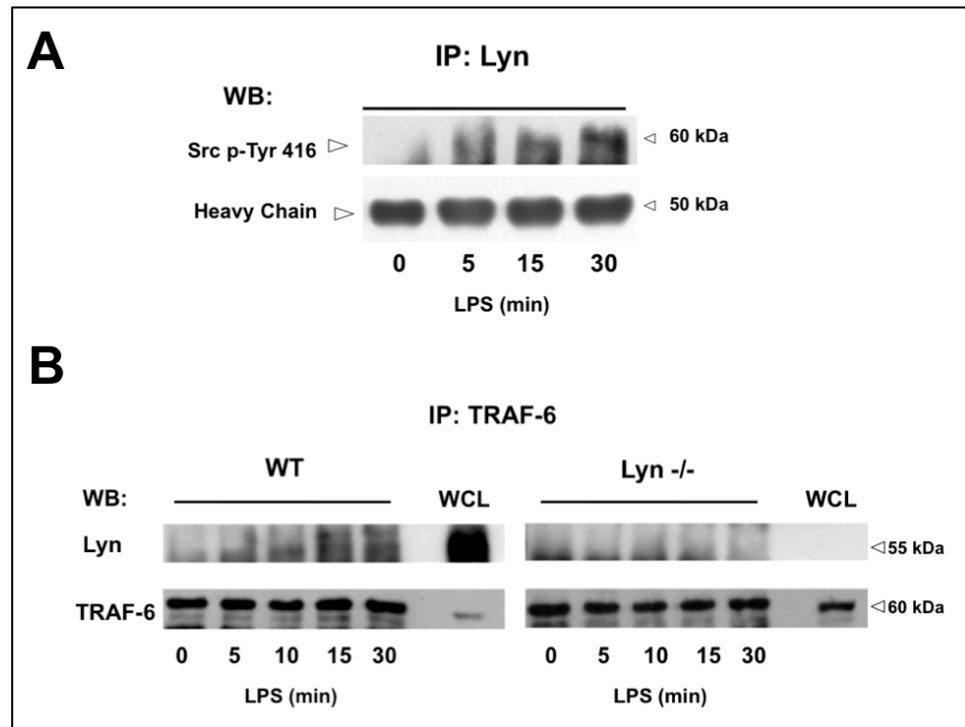


Figura 21. Lyn se activa y se asocia con TRAF-6 in respuesta al LPS in células cebadas. A) Veinte millones de células WT en cada condición fueron estimuladas con LPS (500 ng/ml) en los tiempo señalados. La cinasa Lyn fue inmunoprecipitada usando anticuerpos específicos como se describe en la sección de Materiales y Métodos y un ensayo de Western Blot fue realizado mediante el uso del anticuerpo

anti-tirosina 416 de Src⁴³. B) Veinte millones de células WT y Lyn^{-/-} fueron estimuladas con LPS (como en A) y TRAF-6 fue inmunoprecipitado. Los ensayos de Western Blot fueron realizados utilizando un anticuerpo específico anti-Lyn. Se muestra un experimento representativo de al menos 5 experimentos independientes usando distintos cultivos celulares.

6.8 Lyn regula positivamente la secreción de TNF inducida por LPS, en un modelo *in vivo* de estimulación de células cebada.

Con el fin de explorar el papel del Lyn en la secreción de TNF inducida por el receptor TLR4 en un modelo *in vivo* de endotoxemia, ratones WT y Lyn^{-/-} fueron inyectados intraperitonealmente con LPS durante una hora, y los lavados peritoneales fueron evaluados por ensayos de ELISA. Los resultados de la figura 22A muestran que los ratones WT pudieron secretar aproximadamente 100 ± 25 pg de TNF por cavidad peritoneal, en respuesta al vehículo (barra 1). Sin embargo, la administración de LPS inducido una secreción de alrededor de 400 ± 80 pg de TNF por cavidad peritoneal (barra 2). En contraste, en los ratones Lyn^{-/-} la secreción de TNF en respuesta al vehículo no sobrepasó los 50 ± 30 pg por cavidad peritoneal y la estimulación con LPS no produjo un incremento significativo sobre su secreción basal (barras 3 y 4).

Diversos reportes han mostrado que la primera ola de secreción de TNF en respuesta a compuestos bacterianos de organismos Gram-negativos proviene de las células cebadas⁵². Usando primordialmente ratones W/W^v ha sido mostrado que el incremento de TNF en la cavidad peritoneal puede ser detectado una hora después de la estimulación. Para

recapitular este evento en nuestras condiciones, usamos ratones $\text{Kit}^{\text{w}}\text{Kit}^{\text{w-sh}}$, quienes al igual que los ratones $\text{W}/\text{W}^{\text{v}}$, presentan una severa deficiencia de CCs. Realizamos ensayos de reconstitución inyectando células cebadas en la cavidad peritoneal y cuatro semanas más tarde hicimos las series experimentales. Los resultados de la figura 22A (barras 5 y 6) muestran que los ratones deficientes de CCs pudieron secretar entre 60 ± 20 y 80 ± 20 pg de TNF por cavidad peritoneal en respuesta al vehículo y al LPS, respectivamente. Como se esperaba, los ratones $\text{Kit}^{\text{w}}\text{Kit}^{\text{w-sh}}$ reconstituidos con células WT (barras 7 y 8), recuperaron su capacidad para secretar TNF en respuesta a una inyección intraperitoneal de LPS (320 ± 30 pg/cavidad peritoneal). Sin embargo, los ratones $\text{Kit}^{\text{w}}\text{Kit}^{\text{w-sh}}$ reconstituidos con células $\text{Lyn}^{-/-}$ no fueron capaces de secretar TNF en respuesta al LPS (90 ± 50 pg/cavidad peritoneal) en relación con el vehículo (40 ± 10 pg/ cavidad peritoneal). En conjunto estos datos sugieren que Lyn participa en la secreción temprana de TNF dependiente de células cebadas inducida por LPS *in vivo*.

6.9 Lyn controla la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal en respuesta al LPS *in vivo*

Se sabe que el TNF secretado por las CCs en respuesta a agentes bacterianos Gram-negativos es uno de los responsables de participar en el reclutamiento de neutrófilos hacia la cavidad peritoneal. Con el fin averiguar si la ausencia de Lyn afectaba el reclutamiento de neutrófilos a la cavidad peritoneal después de un reto con LPS (1 mg/kg), tomamos ratones WT y $\text{Lyn}^{-/-}$ y les inyectamos LPS o vehículo en la cavidad peritoneal. Cinco

horas más tarde realizamos lavados peritoneales y los pellets fueron marcados con anticuerpo anti-Ly6G, el cual reconoce selectivamente a la población de neutrófilos⁷³. Como se puede observar en la figura 22B (barras 1 y 2) el LPS pudo inducir la migración de células Ly6G⁺ a la cavidad peritoneal (200 ± 40 ($\times 10^3$) células positivas/cavidad peritoneal) por encima del vehículo (20 ± 5 ($\times 10^3$) células positivas/cavidad peritoneal). Sin embargo, en ratones Lyn ^{-/-}, aunque en condiciones basales la población de Ly6G⁺ fue mayor que en los ratones WT (55 ± 7 ($\times 10^3$) células positivas/cavidad peritoneal), no pudo ser detectado un incremento en la migración después de la administración de LPS (54 ± 6 ($\times 10^3$) células positivas/cavidad peritoneal) . Estos resultados sugieren que Lyn puede regular positivamente la secreción de TNF, y en consecuencia, contribuir a la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal

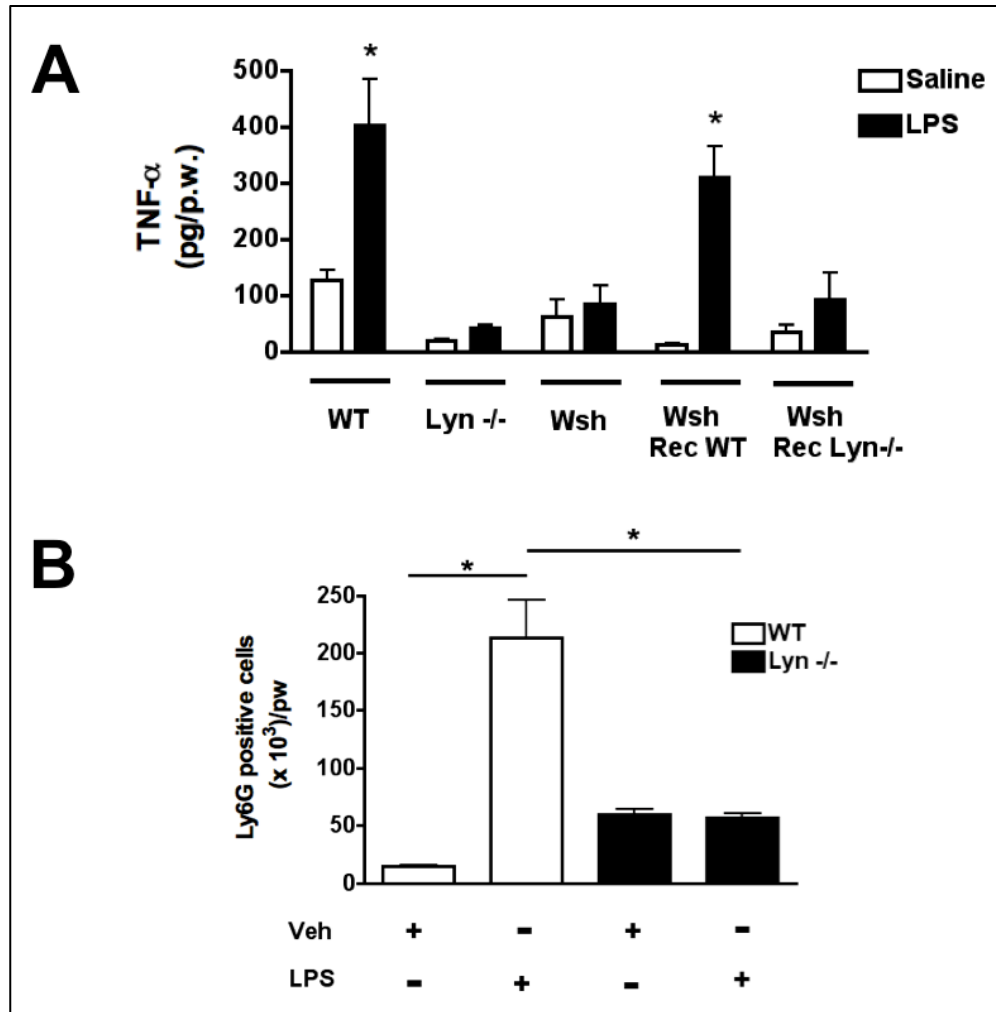


Figura 22. La cinasa Lyn controla positivamente la secreción temprana de TNF, dependiente de células cebadas, inducida por LPS *in vivo*. A) Ratones WT, Lyn^{-/-} y deficientes de células cebadas Kitw/Kitwsh (Wsh) de doce semanas de edad fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con LPS (1 mg/Kg) o vehículo (solución salina). Una hora más tarde los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron los lavados peritoneales fueron colectados para determinar la secreción de TNF por ELISA, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los ratones deficientes de células cebadas fueron reconstituidos con 3 millones de células cebadas derivadas de la médula ósea de ratones WT y Lyn^{-/-} (Wsh rec WT o Lyn^{-/-}, respectivamente). Cuatro semanas después de la reconstitución, los ratones fueron tratados con LPS o vehículo. Los resultados son presentados como la media ± EE de al menos 6 animales en cada barra. *, p < 0.001 con respecto a la inyección de solución salina en el grupo respectivo. B) Ratones WT y Lyn^{-/-} de 12 semanas de edad fueron estimulados i. p. con LPS (1 mg/Kg) y 5 horas después, los lavados peritoneales fueron realizados para determinar el número de neutrófilos positivos al anticuerpo anti-Ly6G en cada lavado, mediante citometría de flujo, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados son presentados como la media ± EE de al menos 3 animales en cada de cada barra. *, p < 0.05 con respecto a los valores indicados.

7. Discusión

En el presente trabajo caracterizamos el papel de la cinasa Lyn en el sistema de transducción de señales del receptor TLR-4 en CCs. En conjunto, nuestros resultados sugieren que Lyn controla positivamente la activación del receptor TLR4 debido a que puede interactuar con TRAF-6 y regular la activación del complejo TRAF-6/TAK-1 y, en consecuencia, promover la señalización de las vías dependientes de las MAPKs e IKK activadas río abajo, contribuyendo a la síntesis y secreción de TNF. Este hallazgo es relevante porque constituye la primera evidencia de que la cinasa Lyn es parte del sistema de activación del TLR-4 en CCs. Asimismo observamos que Lyn también tiene efectos positivos sobre la liberación de TNF dependiente de CCs en respuesta al LPS *in vivo*, lo cual representa otro hallazgo importante.

El TNF es una citocina prototipo en el estudio de diversos estados pro-inflamatorios debido a que juega un papel central en diversos estados patológicos^{77,78}. En CCs, la vía que lleva a la producción de TNF después de la activación del receptor TLR4 ha sido explorada empleando distintos modelos celulares. En conjunto, estos estudios indican que, por ejemplo, la producción de TNF requiere de la participación de las proteínas MyD88 y TRAF-6 como ha sido mostrado en CCs inmortalizadas RBL-2H3⁷⁹. En BMMCs se sabe que el TLR4, CD14⁵⁷ y MD-2⁵⁸ se expresan en células maduras, y que tras una estimulación con LPS se puede detectar la secreción de TNF⁶¹. A diferencia de las BMMCs, las células RBL-2H3 no expresan niveles adecuados de MyD88 y CD14^{80,81}, y debido a ello decidimos realizar nuestros experimentos usando BMMCs como modelo celular. Las CCs no sólo pueden sintetizar TNF *de novo* en respuesta al estímulo, sino presintetizarlo y almacenarlo en los gránulos⁵⁴. De esta manera, la liberación de TNF

sensible a la inhibición de la transcripción (mediada por actinomicina D) está asociada al desarrollo de estados crónicos inflamatorios. En contraste, la liberación de TNF insensible a la inhibición de la transcripción está más relacionada con estados inflamatorios agudos⁸². En nuestros experimentos, fuimos capaces de observar que Lyn está principalmente involucrada en la síntesis *de novo* de TNF inducida por LPS.

Por otra parte, las vías de activación de las MAPKs han sido ampliamente estudiadas en un gran número de tipos celulares y en respuesta a diversos tipos de estímulos^{83,84}. Sin embargo, en la cascada de activación del receptor TLR4, las MAPKs han sido poco estudiadas. Algunos resultados indican que la activación de MK-2/MK-3 y Rsk, quienes se hallan río abajo de p38 y de ERK1/2 respectivamente, pueden contribuir en la endocitosis del TLR4 inducida por LPS en células dendríticas⁸⁵. En macrófagos, ha sido mostrado que tanto MSK1 como MSK2, cuya actividad se sitúa río abajo de p38 y ERK1/2, respectivamente, son necesarias para limitar la producción de TNF e IL-6⁸⁶. Interesantemente, la deficiencia de MSK1 y MSK2 está relacionada con una baja actividad de los factores nucleares CREB y ATF1 en las regiones promotoras de los genes que codifican para IL-10 y DUSP1, dos elementos involucrados en la regulación negativa de las señales activadas por el TLR-4⁸⁶. Por su parte, otro miembro de la familia conocido como cot/Tlp2 puede regular la activación de ERK 1/2 y contribuir con la secreción de TNF e IL-6 en CCs⁸⁷. En CCs ha sido mostrado que ERK 1/2, JNK y p38 pueden activarse en respuesta al LPS⁸⁸. En nuestras condiciones experimentales fuimos capaces de observar que Lyn puede regular positivamente la fosforilación/activación del MEK 3/6, p38, JNK y ERK 1/2 inducida por LPS.

Cómo ha sido reportado que el LPS puede, además de activar al TLR-4, inducir la agregación de diversos receptores^{55,71} en la membrana de diversas células mieloides, entre ellos el receptor CXCR4^{74,89,90}, generando señales de activación alternas a las inducidas por el TLR-4, realizamos experimentos antagonizando al TLR-4 y adicionando LPS para evaluar, a través de la activación de ERK 1/2, si el LPS podía generar alguna activación. En este sentido, nuestros resultados indican que la fosforilación de ERK inducida por LPS no pudo ser detectada cuando la funcionalidad del TLR-4 fue bloqueada, sugiriendo que el LPS puede activar selectivamente al receptor TLR4 en CCs.

Ya que el factor de transcripción NFκB tiene un papel preponderante en la producción de TNF, y dado que nuestros resultados de secreción indicaron que Lyn participa en las señales que llevan a la síntesis *de novo* de TNF en respuesta al LPS, averiguamos el papel de Lyn en la activación de la vía de NFκB inducida por el receptor TLR-4. Nuestros resultados indican que Lyn puede regular positivamente la activación del complejo IKKαβ, la fosforilación de IκB, así como la unión de NFκB a sus sitios consenso en la región promotora del gen para TNF. Estos resultados están en concordancia con la secreción de TNF. El papel de Lyn en la activación de NFκB inducida por LPS ha sido sugerida por otros autores gracias al uso de inhibidores de la actividad de cinasas de la familia Src^{68,91}. También ha sido mostrado que la fosforilación de residuos de tirosina es requerida para la señalización dependiente de MyD88/Mal inducida por la activación del TLR-4 en células HEK293⁹². Sin embargo, en CCs se desconocía el papel que juega Lyn en este sistema de transducción. En el presente trabajo, haciendo uso de células

deficientes de Lyn, pudo ser mostrado por primera vez que Lyn ejerce un papel positivo a lo largo de la vía de NFκB inducida por LPS.

En la vía de activación dependiente del TLR4, la formación de un complejo molecular compuesto por TRAF-6/UBC13/UEV1A y TAK-1/TAB-1, -2, -3 constituye un paso fundamental en el desarrollo de la señalización²⁹. De esta manera ha sido reportado que TAK-1 puede fosforilar a MEK3/6⁹³ e IKK⁹⁴ y con ello bifurcar la señalización hacia la activación de AP-1 y NFκB, respectivamente. Debido a que en ausencia de Lyn, tanto las vías de las MAPKs e IKK, así como el perfil de ubiquitinación de TRAF6 resultaron afectados, decidimos averiguar el papel de la cinasa Lyn en el estado de activación de TAK-1 y encontramos que en su ausencia, la interacción entre TAK-1 y TRAF-6 se encuentra disregulada tanto en condiciones basales como de estimulación con LPS.

Las bases moleculares de la interacción entre TRAF-6 y TAK-1 han sido ya documentadas⁷⁶. A este respecto, ha sido propuesto un mecanismo activador para TAK-1 en el cual la ubiquitinación de TAB-2 (asociada al residuo de lisina 63, K63), inducida por el complejo TRAF-6/UBC13/UEV1A, facilita la autofosforilación de TAK-1 en los residuos 184/187, lo que culmina en la activación de TAK²⁵ y disociación del complejo. Tanto la ubiquitinación de TRAF-6 mediada por K63 como la fosforilación de TAK-1 son considerados pasos críticos para la activación de TAK-1⁹⁴ y evidencia bioquímica indica que la fosforilación de TAK-1 ocurre en la membrana pero la forma activa de TAK-1 se encuentra sólo en el citosol⁹⁵.

Nuestros resultados indican que Lyn modula el ciclo de asociación/disociación del complejo TRAF-6/TAK-1, debido a que un incremento entre la asociación de estas dos proteínas fue observado en células Lyn^{-/-} pero no pudo ser detectado algún cambio después del tratamiento con LPS. Acorde al papel de Lyn en la actividad del complejo, un incremento en la fosforilación de TAK-1 fue observado en células Lyn^{-/-}. El paradójico incremento de la fosforilación de TAK-1 y la baja actividad de las MAPKs e IKK-NFκB observados en ausencia de Lyn, podría ser explicado si la disociación de TAK-1 del complejo de TRAF-6 fuera requerida para la activación de elementos río abajo. En este escenario, Lyn sería necesaria para que TAK-1 dejara de asociarse con TRAF-6, lo que permitiría que la señal pudiera fluir adecuadamente a través de toda la cascada de activación inducida por del TLR-4. En relación con este punto, en algunos experimentos observamos un incremento basal en la fosforilación de MEK3/6, y es posible especular que, bajo nuestras condiciones experimentales, MEK3/6 puede formar parte del complejo de TRAF-6/TAK-1. De hecho, la fosforilación de MEK3/6 después de la activación de TLR-4 pudo ser observada en agregados que contienen al complejo TRAF-6/TAK-1 y en apoyo de nuestro planteamiento, la fosforilación de MEK 3/6 fue más evidente en ausencia de Lyn en condiciones basales (resultados no mostrados). Sin embargo, la fosforilación de p38, quien en diversos sistemas de transducción se activa río abajo de MEK 3/6, no fue detectada en CCs deficientes de Lyn en respuesta al LPS, sugiriendo que esta cinasa de tirosinas regula diferencialmente diversos sustratos que participan en la cascada de señalización del receptor TLR-4.

Por otra parte, la participación de Lyn en la fosforilación de residuos accesorios de TAK-1 podría ser posible debido a que ha sido reportado que otros sitios de fosforilación localizados en residuos de treonina (p. ej. 178 y 192) están involucrados en la activación de TAK-1⁹⁶. Usando células HEK293 transfectadas con diferentes construcciones de TAK-1 ha sido mostrado que los residuos de treonina 178 y 184 pueden regular la activación de las vías que llevan hacia NFκB y AP-1⁹⁶. A pesar de que en el presente trabajo no se evaluaron todos los residuos involucrados en la activación de TAK-1, nuestros resultados sugieren que Lyn contribuye a la activación de TAK-1 inducida por LPS.

Aún quedan muchas preguntas abiertas sobre el mecanismo por el cual Lyn puede modular la actividad del complejo TRAF-6/TAK-1. Sin embargo, dados nuestros resultados es posible realizar algunas hipótesis sobre el mecanismo de acción de Lyn en el control del complejo TRAF-6/TAK-1:

La *primera hipótesis* tiene que ver con la participación de Themis, una proteína involucrada en la selección linfocitaria, que funciona como una proteína señalizadora de andamiaje que participa en la producción de TNF inducida por LPS⁹⁷. Themis2 se encontró fosforilada en residuos de tirosina y sorpresivamente Lyn resultó capaz de interactuar con ese andamio. Asimismo, los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina Rho y Vav, así como Grb2 interactuaron con Themis2⁹⁷. Interesantemente, cuando se sobreexpresó Themis2, fue detectado un incremento en los niveles de

fosforilación de ERK1/2 y p38⁹⁷. Si la fosforilación de Themis2 dependiente de Lyn es importante en la activación del complejo TRAF-6/TAK-1 en respuesta al LPS, es una pregunta que requiere ser investigada (Figura 23a).

La *segunda hipótesis* está basada en el hecho de que la cinasa Lyn puede asociarse y activar a la cinasa de esfingosina tipo I (Sphk1). La actividad de Lyn sobre Sphk1 ayuda a la producción de la esfingosina 1 fosfato (S1P), cuya actividad es requerida para la liberación de calcio intracelular del retículo endoplásmico, lo que contribuye a la desgranulación de las CCs⁹⁸. Resultados obtenidos de diferentes líneas celulares han indicado que tanto Sphk1 como la producción de S1P son necesarias para la ubiquitinación mediada por K63 de la proteína 1 asociada a receptor (RIP1), la fosforilación de IKK, la degradación de IκB y la activación NFκB después de la estimulación del receptor de TNF (TNFR). De manera interesante, ha sido encontrado que S1P se une específicamente al dominio RING de TRAF2 estimulando así su actividad de ligasa⁹⁹. Paralelamente, ha sido reportado que como consecuencia de la ausencia de Lyn, tiene lugar una disminución de S1P en condiciones basales. De esta manera es posible pensar que la baja ubiquitinación de TRAF-6 observada en células Lyn^{-/-} está relacionada con el bajo nivel en S1P en este fenotipo. En concordancia con este mecanismo de acción, nuestros resultados sugieren que Lyn no sólo interacciona con TRAF6 sino que puede regular positivamente su perfil de ubiquitinación, y dado que los mecanismos transduccionales de los receptores TLR4 y TNFR están altamente conservados, podemos hipotetizar una posible participación de la cinasa Lyn sobre la

activación de Shpk1 dependiente del TLR4, lo que podría contribuir a la producción de S1P así como a la activación de TRAF6 en respuesta al LPS (Figura 23b).

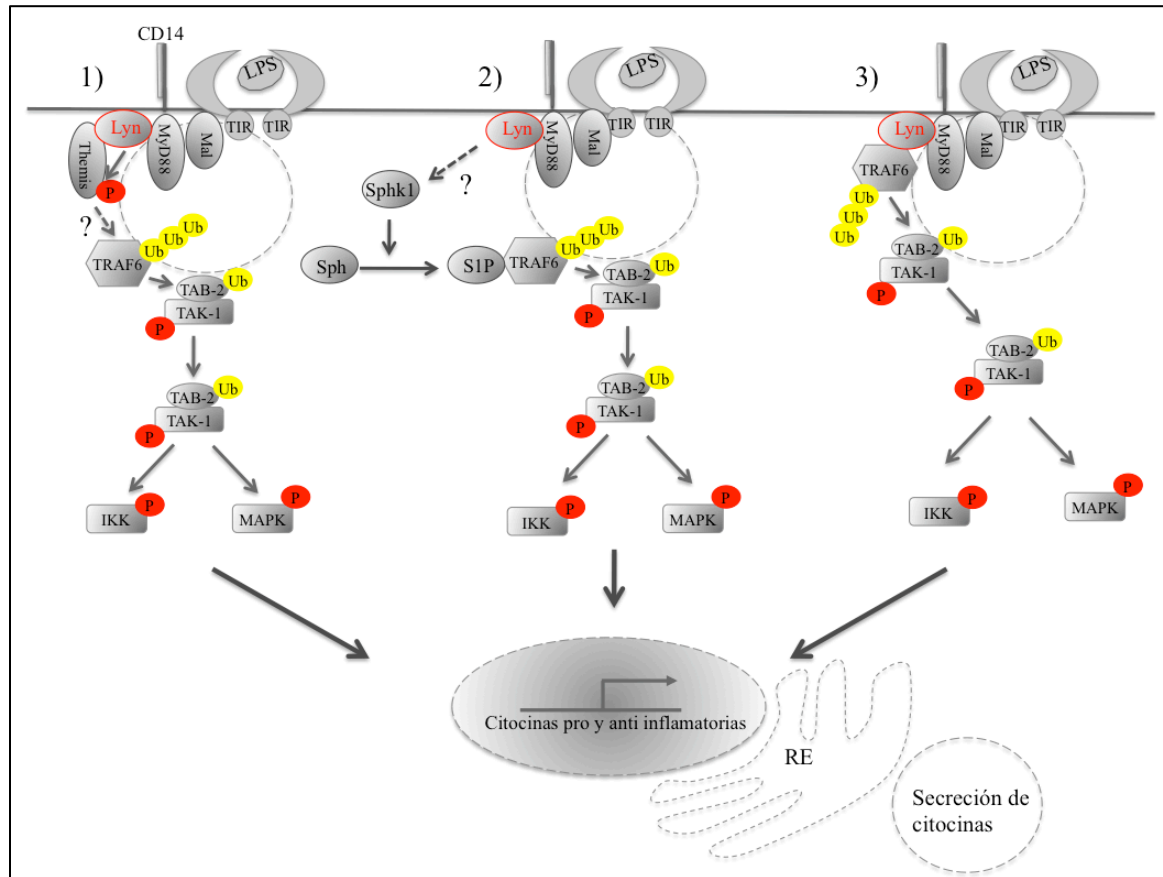


Figura 23. Tres hipótesis para explicar el mecanismo por el cual Lyn podría regular el sistema de transducción del TLR-4. El sistema de transducción de señales se representa de manera simplificada para un mejor entendimiento. a) Themis puede asociarse a Lyn y regular la activación de ERK 1/2 y p38. b) La producción de S1P inducida por la actividad de Shpk1 puede unirse al dominio RING (Really Interesting New Gene) y contribuir positivamente a la activación de miembros de la familia TRAF. Dada la deficiencia en los niveles basales de S1P en células deficientes de Lyn, es posible que S1P tenga un papel sobre la activación de TRAF-6. c) Es probable que el dominio de SH3 juegue un papel importante en la modulación de la actividad de TRAF-6. Ver detalles en el texto.

En CCs, ha sido reportado que las cinasas de la familia Src están involucradas en los pasos iniciales de activación y, particularmente, se sabe que Lyn contribuye en la señalización del FcεRI mediante la fosforilación de los ITAMs, Syk y la proteína adaptadora LAT, lo cual induce a la liberación de calcio, la activación de PKC, la desgranulación y la síntesis de citocinas^{36,38}. Sin embargo, Lyn no sólo induce señales positivas después de la activación del receptor FcεRI, sino también genera una señal de retroalimentación negativa mediada por Cbp⁴⁷, quien al ser fosforilado por Lyn, puede reclutar a Csk a través de su dominio SH2 y apagar la actividad de Fyn mediante la fosforilación en la región de su dominio de cinasa localizado en el extremo COOH terminal⁷². Interesantemente, la regulación positiva o negativa que ejerce Lyn en el sistema de transducción del receptor FcεRI ha sido asociado con la intensidad de la señal generada por el estímulo¹⁰⁰. Mientras el papel positivo de Lyn ha estado relacionado a la estimulación de baja intensidad, un papel negativo ha sido asociado a estímulo de alta intensidad¹⁰⁰.

Aunque nuestros resultados sugieren un papel positivo para Lyn sobre la señalización río abajo de TAK-1, un discreto pero detectable incremento en la fosforilación de IκB observado tempranamente (5 minutos post-estimulación en células Lyn^{-/-}) sugiere que en ausencia de Lyn se induce una activación transitoria de baja intensidad mediada por el TLR-4. Asimismo, los niveles basales altos observados en células Lyn^{-/-} respecto a la asociación entre TRAF-6 con TAK-1, la fosforilación de TAK-1 asociada a TRAF6, la fosforilación de IKKαβ, IκB, y MEK 3/6 sugieren que no se puede descartar una posible participación de Lyn como regulador negativo en el sistema de transducción del receptor

TLR-4 en CCs. Acorde a esta visión, un papel negativo sobre las respuestas inducidas por LPS ha sido observado en macrófagos a través de un mecanismo que involucra la actividad de PI3K y SHIP⁷⁰.

La fosforilación del receptor TLR4 en residuos de tirosinas, así como la asociación de Lyn con CD14 en monocitos⁶⁵ y con MD-2¹⁰¹ y TLR4 en células HEK293⁶⁸ después de la estimulación con LPS han sido reportadas. Utilizando monocitos humanos de sangre periférica, un importante incremento en la actividad de diferentes cinasas de la familia Src han sido detectadas, p. ej. Lyn^{65,67}, Hck^{65,66} y Fgr⁶⁵. En experimentos más detallados hechos en células transfectadas con TLR-4 y Lyn ha sido mostrado que tanto el TLR4⁶⁸ como TIRAP/Mal⁹² son fosforilados en residuos de tirosina y que una fracción de Lyn puede co-inmunoprecipitar con el TLR-4⁶⁸. Nosotros también realizamos experimentos para ver si Lyn podía co-inmunoprecipitar con el receptor TLR-4 después de la estimulación con LPS y nuestros resultados mostraron que sólo una pequeña fracción de Lyn puede asociarse al TLR-4 en respuesta al LPS en células cebadas (datos no mostrados).

La interacción entre Src y TRAF6 ha sido documentada y ésta ha resultado importante para la activación de Akt¹⁰² y AP-1¹⁰³ después de la activación del receptor TNFR. Adicionalmente, algunos resultados sugieren que el dominio SH3 de Src es importante para la asociación con TRAF6, lo que contribuye a la activación de elementos río abajo¹⁰². En nuestro modelo celular, fuimos capaces de detectar la asociación de Lyn con

TRAF-6 en respuesta al LPS. Con el fin de generar una *tercera hipótesis* para explicar el papel de Lyn sobre la funcionalidad del complejo TRAF-6/TAK-1 es posible especular que el dominio SH3 de Lyn puede regular su asociación con TRAF-6 y de esta manera controlar el ensamble con TAK-1 y por ende, las señales activadas debajo de este complejo (Figura 22c). La activación de TRAF-6 es un paso general para todos los TLRs²⁹. Si la activación de Lyn en concierto con TRAF-6 y la regulación que ésta ejerce en otros sistemas TLR es también un paso general, constituye un punto importante para averiguar, debido a que resultados preliminares indican que en CCs tratadas con Pam3Cys (P3C), cuyo receptor es el dímero TLR1/TLR2, Lyn controla positivamente la secreción de TNF (datos no mostrados).

Diversas observaciones hechas en el desarrollo de este trabajo sobre el papel de Lyn en la activación de NFκB después de la estimulación del receptor TLR4, indican que ésta cinasa podría estar involucrada en los mecanismos de comunicación cruzada entre los receptores FcεRI y TLR4. Evidencia experimental indica que TRAF-6 es necesaria para la activación de p38 y JNK, así como para la síntesis y secreción de CCL9, IL-6, IL-13 y TNF, pero no para la desgranulación, inducidas por el FcεRI¹⁰⁴. Por otra parte, el hecho de que en CCs carentes de Lyn hayan sido capaces de inducir la secreción de TNF a tiempos largos, sugiere la participación de vías alternas a Lyn. Entre las vías involucradas podría estar la participación del complejo Bcl-10/Malt-1, cuya activación ha sido implicada en la síntesis de TNF inducida por el receptor FcεRI¹⁰⁵, así como en las respuestas activadas por el TLR-4¹⁰⁶. Por su parte, CARD9, miembro de la familia de proteínas a las que pertenecen tanto Bcl-10 como Malt-1 (entre otras), ha sido reportada

para regular la secreción de IL-6 y TNF inducida por LPS, así como a través de receptores que contienen dominios ITAMs, como es el caso de los receptores FcεR y FcγR¹⁰⁷. De esta manera, diversas vías podrían estar actuando, de manera independiente de la actividad de Lyn, en las vías de señalización que llevan a la secreción de TNF en respuesta a la activación del TLR-4.

En cuanto a la evidencia *in vivo* sobre el papel de las CCs en las infecciones bacterianas Gram-negativas, es bien aceptado que este tipo celular puede inducir la secreción TNF y migración de neutrófilos en respuesta a la estimulación en distintos modelos murinos de endotoxemia^{51,52,55}. Cuando recapitulamos los experimentos pudimos confirmar que las CCs pueden llevar a cabo las funciones reportadas. Adicionalmente, y de manera sorpresiva, nosotros además pudimos observar que la cinasa Lyn puede regular positivamente la secreción de TNF inducida por LPS, y en consecuencia, la migración de neutrofilos Ly6G⁺⁷³, después de una inyección intraperitoneal de LPS. Dado que el primer pico de liberación de TNF en el peritoneo no requiere de la síntesis *de novo*, nuestros resultados indican que Lyn contribuye en la generación de señales pro-sobrevivencia *in vivo*. A pesar de que diversas cinasas de la familia de Src están involucradas en el tráfico vesicular¹⁰⁸, se desconoce el papel de Lyn en el movimiento granular de los depósitos de TNF hacia la membrana durante y después de la activación del receptor TLR4 y debido a ello esta pregunta queda aún para ser resuelta. No obstante es posible sugerir que Lyn podría controlar la actividad de IKKβ, quien ha sido encontrada para fosforilar a SNAP-23, y regular la secreción del TNF contenido en los gránulos después de la activación de FcεRI¹⁰⁹. Debido a que en las células deficientes de

Lyn pudo ser detectada la secreción de TNF a tiempos largo, y el incremento sistémico de TNF durante la endotoxemia se deriva de macrófagos¹¹⁰, la relevancia específica de la producción del TNF derivado de las CCs y el papel de Lyn en condiciones de sepsis será motivo de investigaciones futuras tomando en cuenta que el TNF derivado de las CCs, además de estar involucrado en la migración de neutrófilos, podría estarlo en la regulación de la hipotermia a nivel sistémico en respuesta a una estimulación prolongada de LPS¹¹¹.

Como ha sido mencionado con antelación, en células del tronco mieloide la activación de receptor TLR4 inducida por LPS requiere de la participación de CD14 y MD-2 al exterior de la célula. Una vez transducida la señal, son esencialmente tres tipos de proteínas las que se sabe tienen un papel preponderante en este sistema de transducción: a) adaptadores que poseen dominios TIR, b) ligasas de ubiquitina, y c) cinasas con actividad en residuos de serina/treonina. La participación de cinasas con actividad en residuos de tirosina, especialmente las de la familia Src, aunque han sido reportadas en la activación del TLR4, aun no han sido consideradas un paso crítico en este sistema. Sin embargo, los módulos SH2, SH3 y el dominio catalítico presentes en diversas cinasas de tirosinas también forman parte de sistemas antiguos de señalización¹¹², lo cual sugiere que la modularidad en la biología de la señalización de los receptores TLR puede ser crítica, no sólo en los sistemas transduccionales en vertebrados sino a lo largo de la evolución biológica. De esta manera, los hallazgos reportados en este trabajo ofrecen un nuevo panorama sobre el papel de Lyn en el sistema de señalización del TLR-4 en CCs, el cual tiene relevancia a nivel mecanístico, así como a nivel de una configuración *in vivo*.

En conclusión Lyn puede regular positivamente la activación del sistema de transducción de señales del receptor TLR-4 inducida por LPS, en CCs.

8. Apéndices

En los apéndices A y B se muestran resultados no incluidos en el cuerpo principal de experimentos de esta tesis, debido a que formaron parte de proyectos alternativos desarrollados con el fin de caracterizar lo más posible el papel de Lyn en las respuestas inducidas por el LPS en CCs.

A) La secreción de TNF inducida por LPS en BMMCs requiere de la activación de PKC α/β y δ

Distintas líneas de evidencia indican que PKC participa en la activación del receptor TLR4 en distintos modelos celulares de origen mieloide¹¹³. Por otra parte, ha sido reportado que Lyn puede modular la activación de las isoformas de PKC clásicas y novedosas⁷², las cuales a su vez son sensibles a la presencia de lípidos como el Diacilglicerol (DAG) y cuya activación en respuesta a la estimulación del TLR4 ha sido sugerida por el uso de inhibidores farmacológicos¹¹³.

Con el fin de evaluar el papel del PKC α/β y δ en las células cebadas, realizamos experimentos en BMMCs WT y Lyn $-/-$ utilizando inhibidores de PKC α/β (Go6976) y δ (Rottlerin) previo a la estimulación con LPS durante 8 horas (tiempo de secreción máxima para ambos tipos celulares). Los resultados muestran que la secreción de TNF inducida por LPS, requirió de la actividad de PKC α/β así como de PKC δ , tanto en células WT como en células Lyn $-/-$, indicando que tanto isoformas clásicas como atípicas pueden modular la secreción de TNF inducida por la activación del receptor TLR-4 (Figura 24A y B). Para averiguar si el LPS podía inducir la fosforilación de PKC α/β en células cebadas, BMMCs WT y Lyn $-/-$ fueron estimuladas con LPS durante 30

minutos. Como se puede observar en la figura 24C el LPS fue capaz de inducir la fosforilación de PKC α/β y PKC δ sobre su basal en células WT. Sin embargo, en células Lyn^{-/-} los niveles de fosforilación estuvieron incrementados en condiciones basales y el LPS no fue capaz de inducir un incremento en la fosforilación de PKC α/β y PKC δ . Colectivamente, estos datos sugieren que PKC α/β y PKC δ están involucradas en la secreción de TNF en respuesta al LPS, y que la ausencia de Lyn no sólo conlleva un incremento en los niveles basales de activación de éstas isoformas, sino también tiene como consecuencia la insensibilidad del sistema ante una estimulación inducida por LPS.

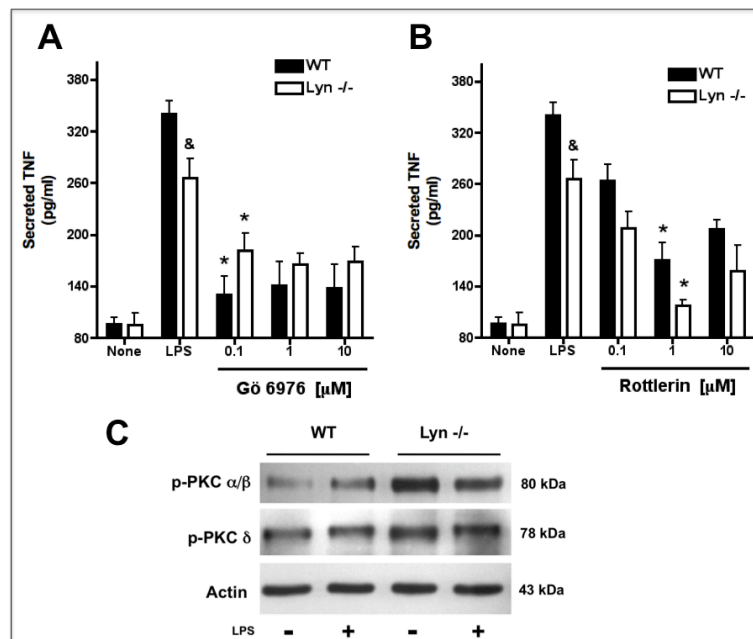


Figura 24. La secreción de TNF inducida por LPS requiere la activación de PKC α/β y δ . A y B) Dos millones de células WT y Lyn^{-/-} por condición fueron estimuladas con LPS (500 ng/ml) durante 8 horas con o sin una preincubación con rottlerin o Go6976 (0.1, 1 y 10 μ M en cada caso, 15 minutos antes de la estimulación con LPS). Los sobrenadantes fueron colectados y la detección de TNF fue hecha mediante ELISA. Los resultados

son presentados como la media \pm EE de al menos 3 experimentos independientes usando diferentes cultivos. &, $p < *$, $p <$. C) Dos millones de células WT y Lyn^{-/-} por punto fueron estimuladas con LPS (500 ng/ml) durante 4 horas. Las células fueron colectadas por centrifugación para posteriormente realizar ensayos de Western Blot usando anticuerpos específicos anti-pPKC α/β y anti-pPKC δ . Un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes hechos con diferentes cultivos es mostrado.

B) Lyn participa en el establecimiento de la tolerancia al LPS

La tolerancia a la endotoxina está definida como un estado transitorio y refractario a subsecuentes retos de LPS, una vez que la célula o el organismo ha tenido encuentros previos con éste¹¹⁴. Los mecanismos de tolerancia no están totalmente entendidos, sin embargo se ha dicho que la tolerancia a la endotoxina puede tener un papel protector limitando un estado de inflamación excesivo y previniendo el choque séptico. No obstante, el estado de hiposensibilidad a la endotoxina puede tener efectos deletéreos debido a la carencia de mecanismos capaces de censar la presencia de agentes microbianos¹¹⁴.

Diversos mecanismos de regulación negativa para la familia de receptores tipo Toll han sido descritos¹¹⁵. La mayoría de los reguladores negativos dependen de un primer pulso de activación mediada por ligando. Sin embargo, algunos, como es el caso de la enzima editora de ubiquitinas A20, es rápidamente inducible tras la activación del receptor TLR-4¹¹⁶. Entre los reguladores negativos se encuentra una versión corta de MyD88 (sMyD88), la cual impide al paso de la señal a través de la vía MyD88/TIRAP-Mal. IRAK-2 e IRAK- M pueden parar la señal a nivel de la actividad de IRAK-1 e IRAK-4. SOCS1 (supressor of cytokine signaling 1) actúa como fosfatasa y evita la señalización del TLR-4 mediada por IRAKs¹¹⁵.

Por su parte, SHIP-1 (SH2-containing inositol 5'-phosphatase 1) la cual puede defosforilar la posición 5 de la PI3K, también regula negativamente la activación del TLR-4¹¹⁴. Usando macrófagos y células cebadas derivadas de médula ósea de ratones WT y SHIP^{-/-}, ha sido mostrado que SHIP-1 puede regular negativamente la secreción de IL-6, IL-1 β y TNF en respuesta al LPS¹¹⁷. Durante la activación prolongada del receptor TLR-4 inducida por LPS, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), una citocina que puede tener efectos anti-inflamatorios, es secretada durante la primera exposición al LPS. Una vez en el medio extracelular, ésta puede llevar a cabo la activación de su receptor de manera autócrina o parácrina. La activación del receptor T β RI induce la síntesis de la fosfatasa SHIP-1 regulando negativamente la señalización del TLR-4, lo que impide que nuevas respuestas inducidas por LPS tengan lugar¹¹⁷. No obstante la baja actividad de PI3K mediada por SHIP-1 reflejada en una disminución de la señal activada por el LPS, PI3K también ha sido implicada en la regulación negativa del receptor TLR-4¹¹⁸. En células cebadas, la PI3K juega un doble papel, regulando positivamente la secreción de TNF e IL-6 y negativamente la secreción de IL-1 β ¹¹⁹.

Con el fin de averiguar el papel de Lyn durante el proceso de inducción de tolerancia, células WT y Lyn^{-/-} fueron empleadas para realizar cursos temporales de 48 horas en presencia de LPS (500 ng/ml, figura 25). Nuestros resultados preliminares muestran que las células WT tuvieron la capacidad de inducir SHIP y PI3K en respuesta al LPS de manera dependiente del tiempo. Sin embargo, en células Lyn^{-/-} estimuladas bajo las mismas condiciones experimentales, fuimos capaces de detectar una clara disminución de SHIP-1 y PI3K inducidas por LPS a lo largo del curso temporal. De manera preliminar,

éstos resultados sugieren que Lyn participa en el establecimiento de la tolerancia al LPS *in vitro*. No obstante, más experimentos son necesarios para averiguar el papel preciso de Lyn durante la tolerancia al LPS y descartar que la ausencia de Lyn tenga defectos intrínsecos asociados con los mecanismos que inducen la expresión de diversos marcadores de tolerancia, debido a que, como se observa en condiciones basales, las células deficientes de Lyn^{-/-} mostraron una clara disminución de SHIP-1.

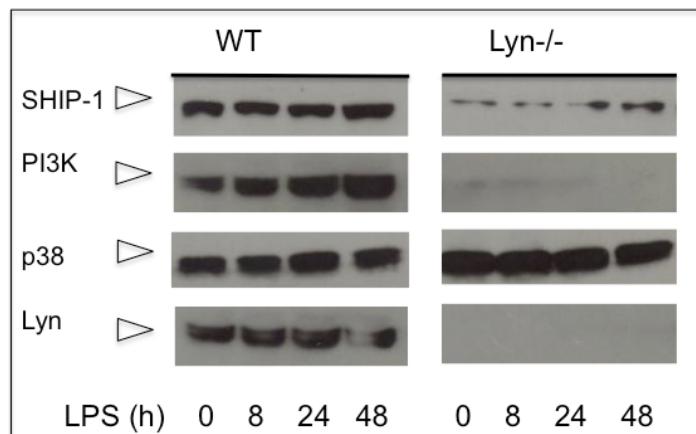


Figura 25. Lyn participa en el establecimiento de la tolerancia al LPS. Dos millones de células WT y Lyn^{-/-} en cada punto fueron incubadas en presencia de 500 mg/ml de LPS. Después de transcurrir los tiempos señalados de estimulación, las células fueron centrifugadas y ensayos de Western Blot fueron realizados usando anticuerpos específicos anti-SHIP-1,

PI3K, p38 y Lyn. Un experimento representativo de tres experimentos independientes hechos con cultivos distintos es mostrado para el caso de los blots anti-SHIP-1. Para el caso de la detección de PI3K, sólo fue realizado un solo experimento.

9. Referencias

1. Janeway, C.A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**, 1-13 (1989).
2. Medzhitov, R. Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity* **30**, 766-775 (2009).
3. Bibel, D.J. *Milestones in immunology*, (Sciences Tech Publishers, Madison, WI, 1988).
4. Silverstein, A.M. *A history of immunology*, (Academic Press, San Diego, CA, 1989).
5. Coutinho, A. & Moller, G. Editorial: Immune activation of B cells: evidence for 'one nonspecific triggering signal' not delivered by the Ig receptors. *Scand J Immunol* **3**, 133-146 (1974).
6. Abbas, A.K., Litchman, Andrew H., Pillai, Shiv. *Cellular and molecular immunology*, (Elsevier, Philadelphia, PA, 2012).
7. Janeway, C.A., Travers, Paul, Walport, Mark., and Shlomchik, Mark J. . *Immunobiology*, (Garland Science, New York, 2001).
8. Paul, W.E. *Fundamental Immunology*, (Lippincott Williams and Wilkins Publishers, 2003).
9. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* **30**, 16-34 (2011).
10. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**, 373-384 (2010).
11. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511 (2004).
12. Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**, 816-825 (2006).
13. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).
14. Coutinho, A., Moller, G. & Richter, W. Molecular basis of B-cell activation. I. Mitogenicity of native and substituted dextrans. *Scand J Immunol* **3**, 321-328 (1974).
15. Anderson, K.V., Bokla, L. & Nusslein-Volhard, C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* **42**, 791-798 (1985).
16. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. & Hoffmann, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* **86**, 973-983 (1996).
17. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C.A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397 (1997).
18. Poltorak, A., *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088 (1998).
19. Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**, 1-14 (2005).
20. Raetz, C.R. & Whitfield, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* **71**, 635-700 (2002).
21. Ruiz, N., Kahne, D. & Silhavy, T.J. Transport of lipopolysaccharide across the cell envelope: the long road of discovery. *Nat Rev Microbiol* **7**, 677-683 (2009).
22. Kenny, E.F. & O'Neill, L.A. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. *Cytokine* **43**, 342-349 (2008).
23. Kagan, J.C. & Medzhitov, R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* **125**, 943-955 (2006).
24. Huang, Y.S., Misior, A. & Li, L.W. Novel role and regulation of the interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK) family proteins. *Cell Mol Immunol* **2**, 36-39 (2005).
25. Xia, Z.P., *et al.* Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* **461**, 114-119 (2009).
26. Kagan, J.C., *et al.* TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* **9**, 361-368 (2008).
27. Husebye, H., *et al.* The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity* **33**, 583-596 (2010).
28. Barton, G.M. & Kagan, J.C. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* **9**, 535-542 (2009).
29. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**, 637-650 (2011).
30. McGettrick, A.F. & O'Neill, L.A. Regulators of TLR4 signaling by endotoxins. *Subcell Biochem* **53**, 153-171 (2010).
31. Crivellato, E., Beltrami, C., Mallardi, F. & Ribatti, D. Paul Ehrlich's doctoral thesis: a

- milestone in the study of mast cells. *Br J Haematol* **123**, 19-21 (2003).
32. Gilfillan, A.M., Austin, S.J. & Metcalfe, D.D. Mast cell biology: introduction and overview. *Adv Exp Med Biol* **716**, 2-12 (2011).
 33. Gianni, M., Lawrence M. Lichtenstein., and Stephen J. Galli. *Mast cells and Basophils*, (Academic press, London, UK, 2000).
 34. Kawakami, T. & Kitaura, J. Mast cell survival and activation by IgE in the absence of antigen: a consideration of the biologic mechanisms and relevance. *J Immunol* **175**, 4167-4173 (2005).
 35. Hallgren, J. & Gurish, M.F. Mast cell progenitor trafficking and maturation. *Adv Exp Med Biol* **716**, 14-28 (2011).
 36. Galli, S.J., *et al.* Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* **23**, 749-786 (2005).
 37. Grimbaldston, M.A., *et al.* Mast cell-deficient W-shash c-kit mutant Kit^{W-sh/W-sh} mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am J Pathol* **167**, 835-848 (2005).
 38. Gilfillan, A.M. & Tkaczyk, C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* **6**, 218-230 (2006).
 39. Crivellato, E., Nico, B., Gallo, V.P. & Ribatti, D. Cell secretion mediated by granule-associated vesicle transport: a glimpse at evolution. *Anat Rec (Hoboken)* **293**, 1115-1124 (2010).
 40. Vercelli, D., Jabara, H.H., Arai, K. & Geha, R.S. Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens. *J Exp Med* **169**, 1295-1307 (1989).
 41. Coffman, R.L., *et al.* B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J Immunol* **136**, 4538-4541 (1986).
 42. Pene, J., *et al.* IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6880-6884 (1988).
 43. Lowell, C.A. Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Mol Immunol* **41**, 631-643 (2004).
 44. Parsons, S.J. & Parsons, J.T. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* **23**, 7906-7909 (2004).
 45. Abramson, J. & Pecht, I. Regulation of the mast cell response to the type 1 Fc epsilon receptor. *Immunol Rev* **217**, 231-254 (2007).
 46. Gomez, G., *et al.* Impaired FcepsilonRI-dependent gene expression and defective eicosanoid and cytokine production as a consequence of Fyn deficiency in mast cells. *J Immunol* **175**, 7602-7610 (2005).
 47. Xu, Y., Harder, K.W., Huntington, N.D., Hibbs, M.L. & Tarlinton, D.M. Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity* **22**, 9-18 (2005).
 48. Odom, S., *et al.* Negative regulation of immunoglobulin E-dependent allergic responses by Lyn kinase. *J Exp Med* **199**, 1491-1502 (2004).
 49. Marshall, J.S. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* **4**, 787-799 (2004).
 50. Avila, M. & Gonzalez-Espinosa, C. Signaling through Toll-like receptor 4 and mast cell-dependent innate immunity responses. *IUBMB Life* **63**, 922-929 (2011).
 51. Echtenacher, B., Mannel, D.N. & Hultner, L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* **381**, 75-77 (1996).
 52. Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E. & Abraham, S.N. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* **381**, 77-80 (1996).
 53. Madera-Salcedo, I.K., Cruz, S.L. & Gonzalez-Espinosa, C. Morphine decreases early peritoneal innate immunity responses in Swiss-Webster and C57BL6/J mice through the inhibition of mast cell TNF-alpha release. *J Neuroimmunol* **232**, 101-107 (2011).
 54. Gordon, J.R. & Galli, S.J. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* **346**, 274-276 (1990).
 55. Malaviya, R. & Abraham, S.N. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J Leukoc Biol* **67**, 841-846 (2000).
 56. Supajatura, V., *et al.* Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol* **167**, 2250-2256 (2001).
 57. Medina-Tamayo, J., Ibarra-Sanchez, A., Padilla-Trejo, A. & Gonzalez-Espinosa, C. IgE-dependent sensitization increases responsiveness to LPS but does not modify development of endotoxin tolerance in mast cells. *Inflamm Res* **60**, 19-27 (2011).

58. Ushio, H., *et al.* MD-2 is required for the full responsiveness of mast cells to LPS but not to PGN. *Biochem Biophys Res Commun* **323**, 491-498 (2004).
59. McCurdy, J.D., Lin, T.J. & Marshall, J.S. Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *J Leukoc Biol* **70**, 977-984 (2001).
60. Qiao, H., Andrade, M.V., Lisboa, F.A., Morgan, K. & Beaven, M.A. FcepsilonR1 and toll-like receptors mediate synergistic signals to markedly augment production of inflammatory cytokines in murine mast cells. *Blood* **107**, 610-618 (2006).
61. Supajatura, V., *et al.* Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest* **109**, 1351-1359 (2002).
62. Keck, S., *et al.* Absence of TRIF signaling in lipopolysaccharide-stimulated murine mast cells. *J Immunol* **186**, 5478-5488 (2011).
63. Shelburne, C.P. & Abraham, S.N. The mast cell in innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* **716**, 162-185 (2011).
64. Leu, T.H., Charoenfuprasert, S., Yen, C.K., Fan, C.W. & Maa, M.C. Lipopolysaccharide-induced c-Src expression plays a role in nitric oxide and TNFalpha secretion in macrophages. *Mol Immunol* **43**, 308-316 (2006).
65. Stefanova, I., *et al.* Lipopolysaccharide induces activation of CD14-associated protein tyrosine kinase p53/56lyn. *J Biol Chem* **268**, 20725-20728 (1993).
66. Smolinska, M.J., Page, T.H., Urbaniak, A.M., Mutch, B.E. & Horwood, N.J. Hck tyrosine kinase regulates TLR4-induced TNF and IL-6 production via AP-1. *J Immunol* **187**, 6043-6051 (2011).
67. Herrera-Velitz, P. & Reiner, N.E. Bacterial lipopolysaccharide induces the association and coordinate activation of p53/56lyn and phosphatidylinositol 3-kinase in human monocytes. *J Immunol* **156**, 1157-1165 (1996).
68. Medvedev, A.E., *et al.* Role of TLR4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance. *J Biol Chem* **282**, 16042-16053 (2007).
69. Gray, P., *et al.* MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction. *J Biol Chem* **281**, 10489-10495 (2006).
70. Keck, S., Freudenberg, M. & Huber, M. Activation of murine macrophages via TLR2 and TLR4 is negatively regulated by a Lyn/PI3K module and promoted by SHIP1. *J Immunol* **184**, 5809-5818 (2010).
71. Gonzalez-Espinosa, C., *et al.* Preferential signaling and induction of allergy-promoting lymphokines upon weak stimulation of the high affinity IgE receptor on mast cells. *J Exp Med* **197**, 1453-1465 (2003).
72. Parravicini, V., *et al.* Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol* **3**, 741-748 (2002).
73. Carr, K.D., *et al.* Specific depletion reveals a novel role for neutrophil-mediated protection in the liver during *Listeria monocytogenes* infection. *Eur J Immunol* **41**, 2666-2676 (2011).
74. Triantafilou, K., Triantafilou, M. & Dedrick, R.L. A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat Immunol* **2**, 338-345 (2001).
75. Akashi, S., *et al.* Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* **164**, 3471-3475 (2000).
76. Landstrom, M. The TAK1-TRAF6 signalling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 585-589 (2010).
77. Croft, M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* **9**, 271-285 (2009).
78. Aggarwal, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745-756 (2003).
79. Gon, Y., Nunomura, S. & Ra, C. Common and distinct signalling cascades in the production of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-13 induced by lipopolysaccharide in RBL-2H3 cells. *Clin Exp Allergy* **35**, 635-642 (2005).
80. Passante, E. & Frankish, N. The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell. *Inflamm Res* **58**, 737-745 (2009).
81. Passante, E. & Frankish, N. Deficiencies in elements involved in TLR4-receptor signalling in RBL-2H3 cells. *Inflamm Res* **59 Suppl 2**, S185-186 (2010).
82. Gordon, J.R. & Galli, S.J. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *J Exp Med* **174**, 103-107 (1991).
83. Hazzalin, C.A. & Mahadevan, L.C. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 30-40 (2002).
84. Gaestel, M. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 120-130 (2006).

85. Zaru, R., Ronkina, N., Gaestel, M., Arthur, J.S. & Watts, C. The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways. *Nat Immunol* **8**, 1227-1235 (2007).
86. Ananieva, O., *et al.* The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* **9**, 1028-1036 (2008).
87. Chiba, N., Kakimoto, K., Masuda, A. & Matsuguchi, T. Functional roles of Cot/Tpl2 in mast cell responses to lipopolysaccharide and FcepsilonRI-clustering. *Biochem Biophys Res Commun* **402**, 1-6 (2010).
88. Masuda, A., Yoshikai, Y., Aiba, K. & Matsuguchi, T. Th2 cytokine production from mast cells is directly induced by lipopolysaccharide and distinctly regulated by c-Jun N-terminal kinase and p38 pathways. *J Immunol* **169**, 3801-3810 (2002).
89. Triantafilou, M. & Triantafilou, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* **23**, 301-304 (2002).
90. Triantafilou, M., *et al.* Chemokine receptor 4 (CXCR4) is part of the lipopolysaccharide "sensing apparatus". *Eur J Immunol* **38**, 192-203 (2008).
91. Huang, W.C., Chen, J.J., Inoue, H. & Chen, C.C. Tyrosine phosphorylation of I-kappa B kinase alpha/beta by protein kinase C-dependent c-Src activation is involved in TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression. *J Immunol* **170**, 4767-4775 (2003).
92. Piao, W., *et al.* Tyrosine phosphorylation of MyD88 adapter-like (Mal) is critical for signal transduction and blocked in endotoxin tolerance. *J Biol Chem* **283**, 3109-3119 (2008).
93. Moriguchi, T., *et al.* A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem* **271**, 13675-13679 (1996).
94. Wang, C., *et al.* TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346-351 (2001).
95. Jiang, Z., Ninomiya-Tsuji, J., Qian, Y., Matsumoto, K. & Li, X. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol Cell Biol* **22**, 7158-7167 (2002).
96. Yu, Y., *et al.* Phosphorylation of Thr-178 and Thr-184 in the TAK1 T-loop is required for interleukin (IL)-1-mediated optimal NFkappaB and AP-1 activation as well as IL-6 gene expression. *J Biol Chem* **283**, 24497-24505 (2008).
97. Peirce, M.J., *et al.* Themis2/ICB1 is a signaling scaffold that selectively regulates macrophage Toll-like receptor signaling and cytokine production. *PLoS One* **5**, e11465 (2010).
98. Urtz, N., *et al.* Early activation of sphingosine kinase in mast cells and recruitment to FcepsilonRI are mediated by its interaction with Lyn kinase. *Mol Cell Biol* **24**, 8765-8777 (2004).
99. Alvarez, S.E., *et al.* Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* **465**, 1084-1088 (2010).
100. Xiao, W., *et al.* Positive and negative regulation of mast cell activation by Lyn via the FcepsilonRI. *J Immunol* **175**, 6885-6892 (2005).
101. Gray, P., *et al.* Myeloid differentiation factor-2 interacts with Lyn kinase and is tyrosine phosphorylated following lipopolysaccharide-induced activation of the TLR4 signaling pathway. *J Immunol* **187**, 4331-4337 (2011).
102. Wong, B.R., *et al.* TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* **4**, 1041-1049 (1999).
103. Funakoshi-Tago, M., Tago, K., Sonoda, Y., Tominaga, S. & Kasahara, T. TRAF6 and C-SRC induce synergistic AP-1 activation via PI3-kinase-AKT-JNK pathway. *Eur J Biochem* **270**, 1257-1268 (2003).
104. Yang, Y.J., *et al.* TRAF6 specifically contributes to FcepsilonRI-mediated cytokine production but not mast cell degranulation. *J Biol Chem* **283**, 32110-32118 (2008).
105. Klemm, S., *et al.* The Bcl10-Malt1 complex segregates Fc epsilon RI-mediated nuclear factor kappa B activation and cytokine production from mast cell degranulation. *J Exp Med* **203**, 337-347 (2006).
106. Liu, Y., *et al.* BCL10 mediates lipopolysaccharide/toll-like receptor-4 signaling through interaction with Pellino2. *J Biol Chem* **279**, 37436-37444 (2004).
107. Hara, H., *et al.* The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol* **8**, 619-629 (2007).
108. Sato, I., *et al.* Differential trafficking of Src, Lyn, Yes and Fyn is specified by the state of palmitoylation in the SH4 domain. *J Cell Sci* **122**, 965-975 (2009).
109. Suzuki, K. & Verma, I.M. Phosphorylation of SNAP-23 by IkappaB kinase 2 regulates

- mast cell degranulation. *Cell* **134**, 485-495 (2008).
110. Grivennikov, S.I., *et al.* Distinct and nonredundant *in vivo* functions of TNF produced by T cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. *Immunity* **22**, 93-104 (2005).
111. Nautiyal, K.M., *et al.* Energetic responses to cold temperatures in rats lacking forebrain-caudal brain stem connections. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R789-798 (2008).
112. Harrison, S.C. Variation on an Src-like theme. *Cell* **112**, 737-740 (2003).
113. Langlet, C., *et al.* PKC- α controls MYD88-dependent TLR/IL-1R signaling and cytokine production in mouse and human dendritic cells. *Eur J Immunol* **40**, 505-515 (2010).
114. Medvedev, A.E., Sabroe, I., Hasday, J.D. & Vogel, S.N. Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease. *J Endotoxin Res* **12**, 133-150 (2006).
115. Lang, T. & Mansell, A. The negative regulation of Toll-like receptor and associated pathways. *Immunol Cell Biol* **85**, 425-434 (2007).
116. Wang, J., Ouyang, Y., Guner, Y., Ford, H.R. & Grishin, A.V. Ubiquitin-editing enzyme A20 promotes tolerance to lipopolysaccharide in enterocytes. *J Immunol* **183**, 1384-1392 (2009).
117. Sly, L.M., Rauh, M.J., Kalesnikoff, J., Song, C.H. & Krystal, G. LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. *Immunity* **21**, 227-239 (2004).
118. Hazeki, K., Nigorikawa, K. & Hazeki, O. Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity. *Biol Pharm Bull* **30**, 1617-1623 (2007).
119. Hochdorfer, T., *et al.* Activation of the PI3K pathway increases TLR-induced TNF- α and IL-6 but reduces IL-1 β production in mast cells. *Cell Signal* **23**, 866-875 (2011).

10. Artículos generados

Lyn kinase controls TLR4-dependent IKK and MAPK activation modulating the activity of TRAF-6/TAK-1 protein complex in mast cells

Martin Avila, Adriana Martinez-Juarez, Alfredo Ibarra-Sanchez and Claudia Gonzalez-Espinosa
Innate Immunity published online 2 February 2012
DOI: 10.1177/1753425911435265

The online version of this article can be found at:
<http://ini.sagepub.com/content/early/2012/01/25/1753425911435265>

Published by:



<http://www.sagepublications.com>

On behalf of:

[International Endotoxin & Innate Immunity Society](#)

Additional services and information for *Innate Immunity* can be found at:

Email Alerts: <http://ini.sagepub.com/cgi/alerts>

Subscriptions: <http://ini.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>


Permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

>> [OnlineFirst Version of Record - Feb 2, 2012](#)

[What is This?](#)

Lyn kinase controls TLR4-dependent IKK and MAPK activation modulating the activity of TRAF-6/TAK-1 protein complex in mast cells

Martin Avila, Adriana Martinez-Juarez, Alfredo Ibarra-Sanchez and Claudia Gonzalez-Espinosa

Innate Immunity
0(0) 1–13
© The Author(s) 2012
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1753425911435265
ini.sagepub.com


Abstract

Mast cells (MCs) control allergic reactions and contribute to protective innate immune responses through TLR4 activation. The tyrosine kinase Lyn is important to the high affinity IgE receptor (FcεRI) signal transduction system in MCs, but its role on the TLR4 signalling cascade is still elusive. Here, we characterized several TLR4-triggered responses in bone marrow-derived mast cells (BMMCs) from wild-type (WT) and Lyn^{-/-} mice. We found that Lyn^{-/-} MCs secreted lower amounts of TNF-α after LPS challenge when compared with WT cells. Lyn^{-/-} BMMCs showed less MAPK, IκB phosphorylation and NF-κB nuclear translocation after TLR-4 triggering than WT cells. LPS-induced MAPK and inhibitor of IκB kinase (IKK) phosphorylation were importantly reduced in the absence of Lyn. A constitutive interaction between TNF receptor associated factor 6 (TRAF-6) and phosphorylated TGF-β-activated kinase (TAK-1) was observed in Lyn^{-/-} BMMCs and this complex was insensitive to LPS addition. Lyn kinase was activated and associated to TRAF-6 shortly after LPS addition in WT MCs. Analyzing two local MC-dependent innate immune responses *in vivo*, we found that Lyn positively controls early TNF-α production and immune cell recruitment after an intraperitoneal injection of LPS. Our results indicate that Lyn plays a positive role in TLR4-induced production of TNF-α in MCs controlling the activity of the TRAF-6/TAK-1 protein complex.

Keywords

Mast cells, LPS, TLR4, Lyn, TRAF-6, TAK-1

Date received: 22 August 2011; revised: 29 November 2011; accepted: 13 December 2011

Introduction

Mast cells (MCs) are important regulatory elements in the immune system that elicit different responses in both innate and adaptive immunity.¹ These cells have been widely studied because of their participation on IgE-dependent reactions (type I hypersensitivity).² In those circumstances, the high affinity IgE receptor (FcεRI) is activated by IgE/Ag complexes and leads to the secretion of preformed and newly synthesized inflammatory mediators. Besides their role in IgE-dependent reactions, MCs are also important for innate immune responses as they can initiate inflammatory reactions against pathogen-associated molecular patterns (PAMPs).³ TLR4 is expressed on MC-plasma membranes and after activation with Gram-negative bacteria-derived LPS, induces the secretion of multiple pro-inflammatory cytokines,

such as TNF-α, IL-1β, IL-6 and several chemokines.⁴ The similarity of the effects of FcεRI and TLR4 triggering on cytokine production (although apparently not on degranulation) in MCs has led to the investigation of key common molecules regulating cytokine production after IgE/Ag or LPS stimulation of MCs.

The TLR4 signal transduction system comprises distinct adapters, serine-threonine kinases and

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Mexico City, Mexico

Corresponding author:

Claudia Gonzalez-Espinosa, Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav, IPN), Sede Sur, Calzada de los Tenorios No. 235, Col. Granjas Coapa CP 14330, Tlalpan, Distrito Federal, Mexico City, Mexico.
Email: cgonzal@cinvestav.mx

ubiquitin ligases that couple receptor activation mainly to NF- κ B and AP-1-dependent gene transcription. In myeloid cells, MyD88 and MyD88-adaptor like (Mal) proteins are able to associate to the intracellular tail of TLR4 through a Toll/IL-1R (TIR)-mediated interaction in the so-called MyD88-dependent pathway. TIR-mediated adaptor association induces the recruitment of serine/threonine IL-1R-associated kinases (IRAK)-1 and IRAK-4 to the membrane-associated signalling complex which results in the activation of the E3 ubiquitin ligase TNF receptor-associated factor (TRAF)-6. The complex formed by TRAF-6 and the proteins UBC13 and UEV1A induce K63-dependent ubiquitination on TAK-1 binding protein (TAB)-2, which results in TGF- β -activated kinase (TAK)-1 autophosphorylation. This latter molecular complex and the reactions of ubiquitination and phosphorylation of TAK-1 lead to the important step of MAPK and inhibitor of κ B kinase (IKK) pathway activation.⁵ IKK activity controls the phosphorylation/degradation of κ B and the nuclear translocation of NF- κ B, whereas the MAPK pathway activates AP-1, which also contributes to the expression of NF- κ B-induced pro-inflammatory genes.

On the other side, in the MyD88-independent pathway, TIR-domain containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) and TRIF-related adaptor molecule (TRAM) are mainly involved in the internalization of the TLR4 complex after LPS recognition^{6,7} and induce the interferon regulatory factor (IRF)3/7-dependent type I IFN expression. This arm of the TLR4 signalling pathway is involved in IFN synthesis and constitutes a complementary cascade leading to pro-inflammatory cytokine gene expression mediated by NF- κ B activity in myeloid cells,⁵ although recent evidence suggests that this pathway is not active in MCs.⁸

A number of studies indicate that the main steps of TLR4 activation encompass homotypical interactions, phosphorylation on serine/threonine residues and K63-mediated ubiquitination on distinct substrates. However, some evidence suggests that tyrosine phosphorylation also can be important in modulating TLR4 signalling. In particular, the Src-family kinase Lyn has been involved in TLR4-induced NF- κ B activation.⁹ Different studies have found that Lyn increases its autophosphorylation and associates with PI3K after LPS treatment in different cell types,^{9–12} and it has been reported that Lyn associates with CD14 in human monocytes¹² or with TLR4 (when both molecules are over-expressed⁹) in a LPS-dependent fashion. Mainly recognized for the positive¹³ and negative^{13,14} regulation on Fc ϵ RI signalling, the participation of this important regulatory kinase in the TLR4 signal transduction system in MCs is far from being elucidated.

In the present study, we analyzed the effect of the absence of Lyn kinase on TLR-4-triggered responses in MCs. We utilized bone marrow-derived mast cells

(BMMCs) from WT and Lyn^{-/-} mice to analyze LPS-induced TNF- α secretion, detecting the activation of key molecules downstream of the TLR4 receptor, such as TRAF-6, TAK-1, MAPK, IKK and NF- κ B. In addition, we utilized an *in vivo* murine model of endotoxaemia in normal and MC-deficient (*Kit^w/Kit^{w-sh}*) animals to analyze the role of Lyn kinase in the canonical MC-dependent inflammatory responses of early TNF- α production and cell recruitment triggered by LPS in peritoneal cavity.

Materials and methods

Mice

Wild-type, Lyn^{-/-}¹⁵ and *Kit^w/Kit^{w-sh}*¹⁶ mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). As Lyn^{-/-} mice were originally in the 129SvImJ, they were back-crossed with C57BL/6J WT mice (also from Jackson Laboratories), at least five times, to obtain Lyn^{-/-} mice with the genetic background of C57BL/6J.¹⁷ The genotype of each mouse was analyzed by PCR utilizing the protocol suggested by the provider. MC-deficient *Kit^w/Kit^{w-sh}* mice were subjected to intraperitoneal MC reconstitution (described below). All the procedures using mice were approved by the Institutional Committee for Use and Care of Laboratory Animals in Cinvestav (CICUAL, protocols 032/02 and 384/07).

Cell culture

MCs were derived from WT and Lyn^{-/-} C57BL/6J mice aged 4–8 weeks old, as reported¹⁸. Briefly, mice were euthanized and the femurs were extracted to obtain bone marrow progenitors by flushing them with complete BMMC media (see below) using a syringe with a 30 G \times 13 mm needle. Complete BMMC media was composed of RPMI supplemented with 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 10% FBS, 55 μ M 2-mercaptoethanol (β -ME), 1 mM HEPES and 20 ng/ml IL-3. Once in the culture flask, bone marrow was cultured in the same media over four weeks to get well-differentiated BMMCs. To test cell culture maturity, flow cytometry assays were performed to determine Fc ϵ RI expression, as described,¹⁸ only cultures showing more than 98% Fc ϵ RI positive cells were utilized. Routinely, functional evaluation of IgE/Ag-induced degranulation (β -hexosaminidase release) was performed in order to determine BMMC functionality, as described.¹³

Flow cytometry

WT and Lyn^{-/-} BMMCs were incubated with or without IgE during 1 h. After that, cells were washed twice

with staining buffer (BSA 2%, sodium azide 0.02% in PBS) and pellets were re-suspended in blocking buffer 1X (from Biogenex, San Ramon, CA, USA) for 5 min at 4°C. Then, FITC-coupled anti-IgE or anti-TLR4 Abs were added. In parallel, anti-isotype Abs were used. One hour after Ab incubation, cells were centrifuged and pellets were re-suspended in staining buffer to be analyzed in a Flow Cytometer FACSsort (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

LPS stimulation of BMMCs, Western blotting and immunoprecipitation

WT and *Lyn*^{-/-} MCs (two million cells in 1 ml) were treated with LPS (500 ng/ml) or a mixture of phorbol 12-myristate-acetate and a calcium ionophore, PMA/A23187 (1 μm/100 nM) at 37°C for different times in complete BMMC culture media. Cells were collected by centrifugation and supernatants were taken for TNF-α determination by ELISA (see following sections). For Western blot, two million cells were re-suspended in 1 ml of Tyrodés-BSA buffer (20 mM HEPES buffer at pH 7.4, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5.6 mM Glc and 0.05% BSA) and stimulated with LPS (500 ng/ml). After proper times, cells were collected and lysed in Laemmli buffer 2X supplemented with 4 mM ortho-vanadate and 0.28 mM β-ME. For immunoprecipitation assays, 10 million cells per condition, in a total volume of 200 μl of Tyrodé's/BSA were utilized. All samples were stimulated with LPS and centrifuged at 800 × g at 4°C before being re-suspended in a lysis buffer containing 1% NP-40, 60 mM octyl-β-glucoside, 2 mM phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF), 10 μg/ml aprotinin, 2 μg/ml leupeptin, 5 mM pepstatin, 5 mM sodium pyrophosphate, 50 mM NaF and 1 mM sodium orthovanadate for 30 min on ice. Lysates were centrifuged for 10 min (4°C) at 15000 g and supernatants were separated from pellets and kept on ice for 1 h before use. Supernatants were incubated overnight with specific Abs pre-bound to Sepharose beads-coupled to G or A protein. After immunoprecipitation, beads were washed once with 1% NP40-containing buffer and once with 0.1% NP-40-containing lysis buffer. Proteins were recovered with an equal volume of Laemmli 2X buffer and separated in 8%, 10% or 12% SDS-PAGE gels. They were then electrophoretically transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes and blocked with either 4% dry milk and/or immunoglobulins cocktail in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20. Membranes were then probed with the desired primary Ab and an adequate secondary HRP-conjugated Ab before being visualized by chemiluminescence.

Electrophoretic mobility shift assay

NF-κB activation was measured obtaining nuclear extracts from WT and *Lyn*^{-/-} BMMCs. Briefly,

15 × 10⁶ BMMC were activated with LPS or IgE/Ag for 20 min. After this time, cells were collected and nuclear extraction was performed using the protocol provided with the TransAm Transcription Factor Kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA), supplementing the hypotonic buffer (HB) with leupeptin (10 mg/ml), pepstatin A (5 mg/ml) and aprotinin 4.7 (U/mg prot). Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed using the LightShift EMSA optimization and Control kit (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions. The NF-κB biotinylated primers sequences (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)¹⁹ were as follows: sense 5' biotin-CAA-ATG-TGG-GAT-TTT-CCCP-ATG-AGT-CTC-AAA-ATT-AGA-GAG 3' and antisense 5' biotin-CTC-TCT-AAT-TTT-GAG-ACT-CAT-GGG-AAA-ATC-CCA-CAT-TTG 3'. The samples were resolved in a 6% acrylamide/bisacrylamide gel and the bands were developed using the Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Pierce), following the instructions provided.

Intraperitoneal reconstitution of *Kit*^w/*Kit*^{wsh} mice

MC-deficient mice *Kit*^w/*Kit*^{wsh} (8–12 weeks old) were selectively reconstituted by an intraperitoneal injection with 2 × 10⁶ BMMCs from 4-week-old WT and *Lyn*^{-/-} BMMC cultures. In all adoptive transfer assays, cells were concentrated in a total volume of 200 μl of sterile isotonic saline solution and were injected in the peritoneal cavity of mice, as described.²⁰ Four weeks after injection of BMMCs, mice were used for experiments. Reconstitution of MCs was confirmed by flow cytometric analysis, toluidine blue stain of MCs obtained by peritoneal washes and TNF-α production after LPS triggering, as reported.²¹

Murine model of endotoxaemia and peritoneal washes

WT, *Lyn*^{-/-}, *Kit*^w/*Kit*^{wsh} and *Kit*^w/*Kit*^{wsh} mice reconstituted with WT or *Lyn*^{-/-} BMMCs were injected i.p. with LPS (1 mg/kg dissolved in saline solution) or control saline solution.²⁰ One hour later, peritoneal lavages were performed by euthanizing mice and injecting 2.5 ml PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, 2 mM K₂HPO₄, pH 7.4) into the peritoneal cavity. After a gentle massage of the abdominal surface, at least 1 ml of peritoneal lavage was collected from each mouse. Another group of animals were injected i.p. with LPS (1 mg/kg) as described above, and five hours later mice were euthanized and peritoneal lavages were performed as described. Samples were taken to calculate the total number of migrating cells into peritoneal lavages using the Neubauer chamber and, in parallel, total cells were labeled with an Ab against the neutrophil-specific marker, Ly6G,²² and analyzed by flow cytometry.

ELISA

TNF- α concentration in supernatant of stimulated cells or peritoneal lavages was determined with TNF- α ELISA kits from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA) and Invitrogen. For cell supernatants, two million WT and Lyn^{-/-} BMDCs were incubated with 500–1000 ng/ml LPS for different times in complete cell culture media. Cells were then collected by centrifugation and supernatants were subjected to ELISA analysis. Alternatively, TNF- α secretion of peritoneal washes from WT, Lyn^{-/-}, MC-deficient or MC-deficient reconstituted mice, stimulated or not with LPS, were centrifuged at 350g for 5 min and supernatants were collected to determine TNF- α by ELISA. All ELISA determinations were performed according to the manufacturer's instructions with the standard curve provided.

Abs and reagents

Polyclonal Abs against TLR4, Lyn, TRAF-6, pTAK-1, I κ B, p65, JNK, p38, ERK1/2, MEK3/6 and ubiquitin were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). FITC-conjugated monoclonal rat anti-mouse IgE, FITC-conjugated rat IgE1 κ monoclonal immunoglobulin isotype standard were from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). Pacific blue-labelled monoclonal anti mouse Ly6G antibody was from Biolegend (San Diego, CA, USA). HRP-conjugated extravidin and monoclonal Abs against mouse and rabbit immunoglobulins were from Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, UK). Cell culture medium (RPMI) and BMDC complete media components were from Gibco-BRL-Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA). Laemmli buffer, octyl- β -glucoside, pepstatin, leupeptin and aprotinin, 2-(ME), DNP coupled to human seroalbumin (DNP-HSA), monoclonal anti DNP IgE (clone SPE7), A23187, phorbol myristate acetate (PMA) and *Escherichia coli* LPS (serotype 026:B6) were from Sigma (St Louis, MO, USA). Murine IL-3 were from Peprotech. NP-40 was from Pierce. PVDF was from Perkin Elmer (Boston, MA, USA).

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm S.E.M. of at least three independent experiments performed with distinct cell cultures. Software Prism V4.0c was utilized for the analysis of the data.

Results

TLR4-induced TNF- α secretion is impaired in Lyn^{-/-} BMDCs

With the aim of evaluating the role of Lyn kinase on MC responsiveness to LPS we first determined the

expression of TLR4 on the plasma membrane of WT and Lyn^{-/-} BMDCs to discard any possible differences attributable to the amount of TLR4 on the surface of both cell types. WT and Lyn^{-/-} cells expressed equivalent quantities of TLR4 receptor on plasma membranes (Figure 1A). TNF- α secretion following TLR4 triggering was then determined in a time-course experiment. WT and Lyn^{-/-} BMDCs were stimulated with LPS (500 ng/ml) and cell supernatants were collected to determine TNF- α by ELISA (Figure 1B, left panel). TNF- α in the supernatant of WT and Lyn^{-/-} cells reached maximal values after 8–10 h of LPS addition; however, peak levels of TNF- α were lower in Lyn^{-/-} than in WT BMDCs (306 \pm 21 pg/ml in WT vs 190 \pm 26 pg/ml in Lyn^{-/-}). This deficiency observed in the absence of Lyn was more evident after four hours of stimulation. In order to discard any defect on the secretory machinery of Lyn^{-/-} cells, TNF- α was quantified in the supernatant of cells stimulated with the calcium ionophore A23187 plus the protein kinase C (PKC) activator phorbol myristate acetate (PMA; Figure 1B, right panel). In those conditions, it was possible to observe that, although Lyn^{-/-} BMDCs secrete slightly less TNF- α in the absence of stimulus, 4 h post-stimulation, both cell types were able to secrete equivalent maximal levels of TNF- α (approx. 1100 pg/million cells).

As MCs can secrete TNF- α from pre-formed stores but also can initiate *de novo* TNF- α synthesis after proper stimulation,²³ we decided to measure LPS-induced TNF- α secretion in the presence of the transcription inhibitor actinomycin D to locate the step on TNF- α production that was affected in Lyn^{-/-} BMDCs. As can be observed in Figure 1C (left panel), in WT BMDCs, an early actinomycin-insensitive TNF- α release was observed after LPS addition and the inhibitor blocked only late TNF- α secretion (that occurred after 4–8 h) in WT cells. In contrast, a lower amount of pre-stored TNF- α was secreted in Lyn^{-/-} cells and the release of *de novo* synthesized TNF- α obtained after 4–8 h after stimulation was significantly diminished (Figure 1C, right panel).

Defective MAPK pathway activation after LPS treatment is observed in the absence of Lyn

In different myeloid cell lineages, a functional role for NF- κ B on TNF- α gene transcription has been clearly established^{24,25} and, after LPS treatment, an important AP-1 and NF- κ B-dependent transcriptional activity leading to TNF- α synthesis is observed in human and murine immune cells.^{24,26} As this main mechanism of TNF- α regulation is conserved in MCs activated with distinct ligands,²⁷ WT and Lyn^{-/-} BMDCs were stimulated with LPS for different times and, first, MAPK activation was analyzed. As can be observed in Figure 2A, LPS treatment was able to induce the

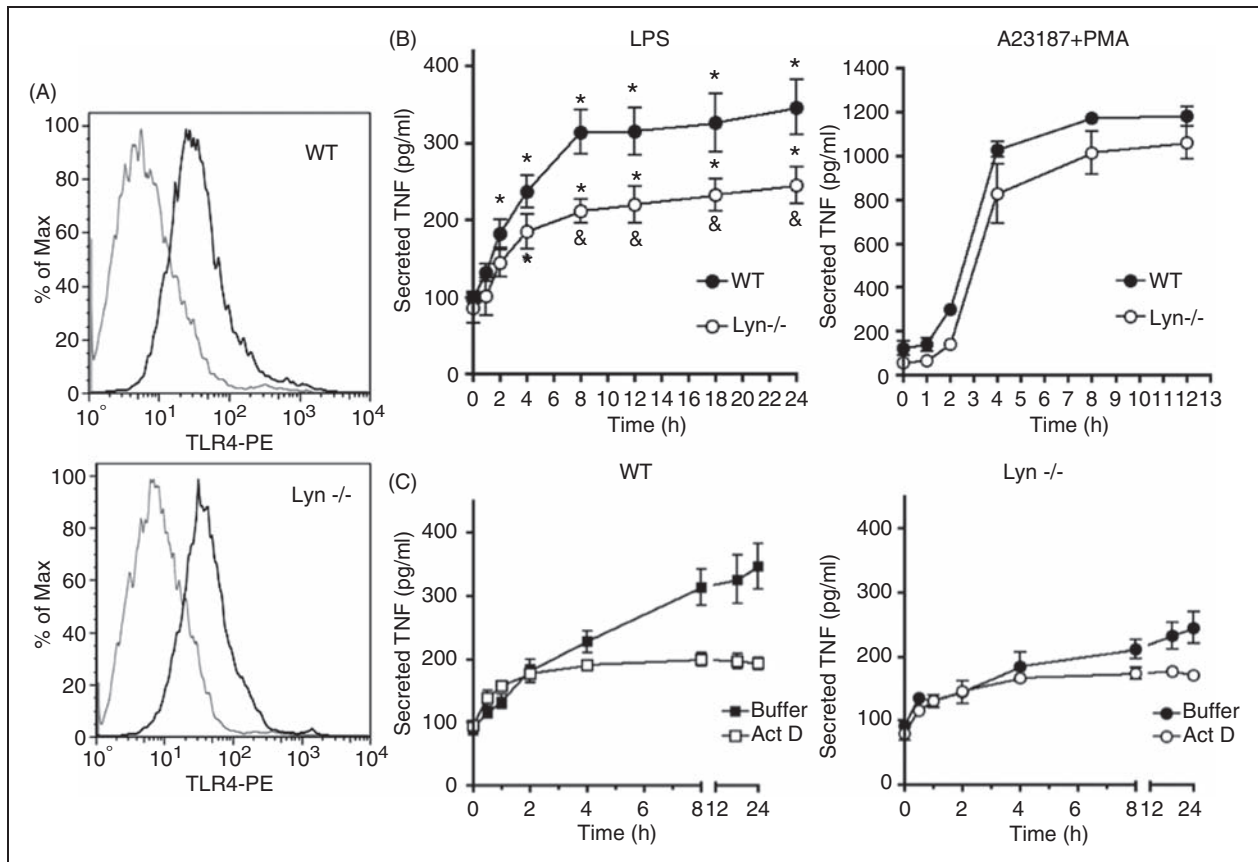


Figure 1. Lyn positively regulates LPS-induced TNF- α secretion in MCs. (A) Two million WT and Lyn^{-/-} mature BMMCs were labeled with specific, FITC-coupled anti-TLR4 Ab. Isotype control is presented in the left histogram of each graph, while the specific TLR4 signal can be observed in the right histogram of each graph. A representative experiment of at least three performed with different cell cultures is shown. (B) WT and Lyn^{-/-} BMMCs were incubated in the presence of 500 ng/ml LPS (left panel) or A23187/PMA (right panel) as described in the 'Material and methods'. After distinct times of stimulation, supernatants were collected and TNF- α concentration was determined by ELISA. (C) WT and Lyn^{-/-} BMMCs were stimulated with LPS (500 ng/ml) in the absence or presence of actinomycin D (5 μ g/ml added 15 min before LPS). TNF- α concentration in the supernatant was determined by ELISA. Data in (B) and (C) are presented as the mean \pm SEM from 3–5 different cultures. * $P < 0.05$ with respect to non-stimulated cells; $\&P < 0.01$ with respect to WT cells.

phosphorylation of MEK3/6 in WT, but not in Lyn^{-/-} BMMCs, where a slightly higher basal phosphorylation of MEK3/6 was observed in some experiments; this increase was not statistically significant (Figure 2B). Accordingly, an important increase on the phosphorylation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK), ERK1/2 and p38 MAP kinases was observed in WT, but not in Lyn^{-/-} BMMCs treated with LPS (Figure 2C). Specifically, LPS-induced p38 and JNK phosphorylation was not detected in the absence of Lyn and a lower ERK phosphorylation was observed in Lyn^{-/-} cells compared with WT. As it has been reported that LPS is able to aggregate several receptors on cell surface besides TLR4,^{28,29} a control experiment stimulating the cells with LPS in the presence of an inhibitory antibody against TLR4 was performed. In those conditions, no LPS-dependent ERK phosphorylation was detected, suggesting that in our cellular model, LPS selectively activates to TLR4 (results not shown).

Impaired IKK-NF- κ B pathway activation after TLR4 triggering is observed in Lyn^{-/-} BMMCs

To ascertain the role of Lyn on the activation of the IKK-NF- κ B pathway, WT and Lyn^{-/-} BMMCs were stimulated with LPS and IKK, I κ B and NF- κ B activation was analyzed. Figure 3A shows that IKK was phosphorylated in the Thr180/181 residues in response to LPS in WT but not in Lyn^{-/-} BMMCs. Accordingly, in WT MCs, I κ B phosphorylation was increased at 15 min after LPS addition—this state was sustained for at least 30 min after stimulation (Figure 3B). Despite that, I κ B maximal phosphorylation was severely affected in Lyn^{-/-} BMMCs, I κ B phosphorylation was detected as soon as 5 min after LPS addition in this cell type (Figure 3B). To analyze the role of Lyn kinase on NF- κ B activity, WT and Lyn^{-/-} BMMCs were treated with LPS and EMSA assays utilizing canonical κ B binding sites were performed

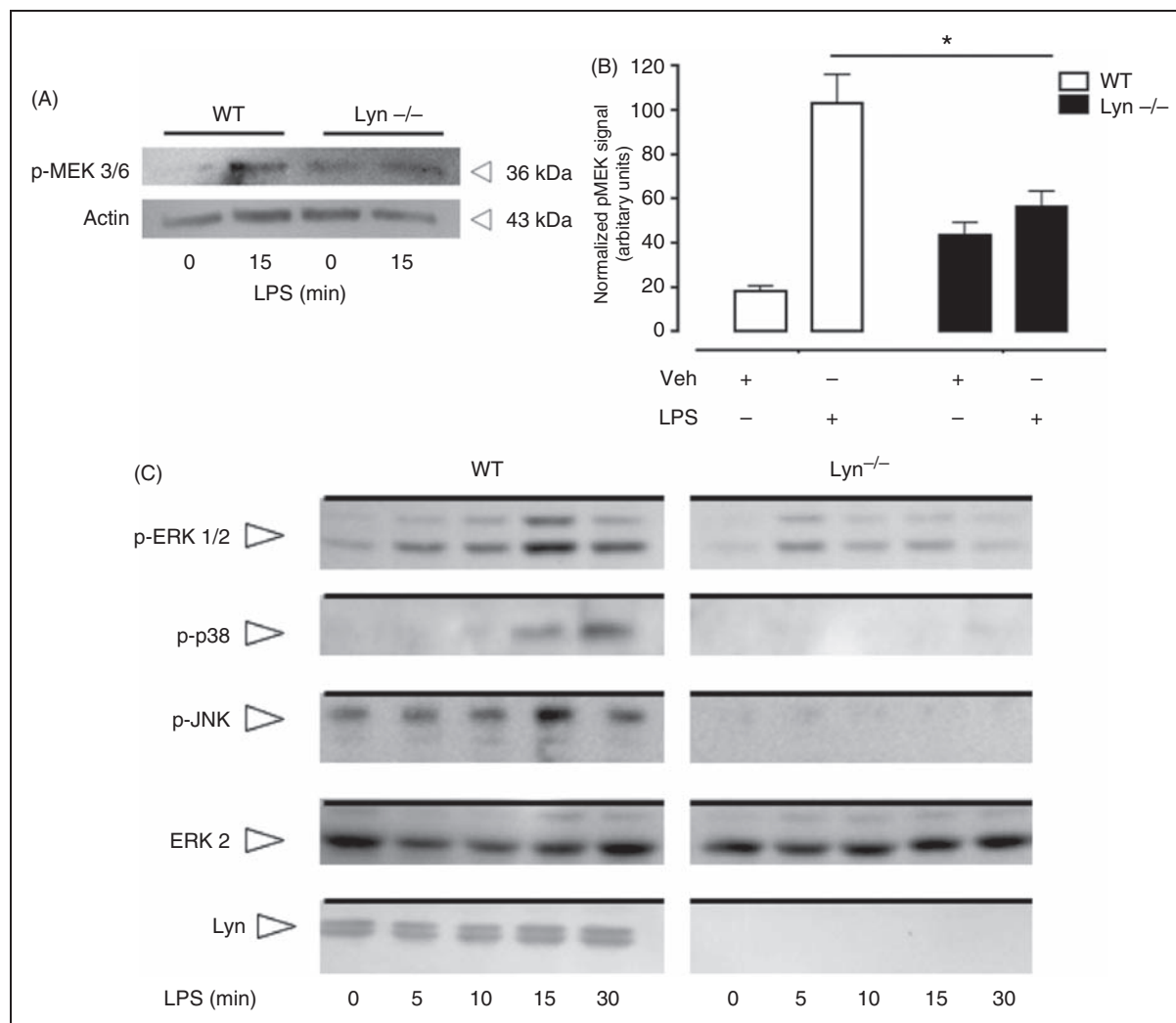


Figure 2. Lyn positively controls LPS-dependent MAPK activation in MCs. WT and *Lyn*^{-/-} BMMCs were stimulated with LPS (500 ng/ml) and, at each time, cells were collected and lysed in Laemmli buffer 2X as described in the 'Materials and methods'. Western blots were performed to detect pMEK 3/6 (A). (B) Densitometric analysis of pMEK signal in WT and *Lyn*^{-/-} cells. Data are shown as the mean \pm SEM from at least three experiments performed with different cell cultures. * $P < 0.05$. (C) Phosphorylation of ERK, JNK and p38 after LPS (500 ng/ml) stimulation of WT and *Lyn*^{-/-} BMMCs. A representative experiment, of at least four performed with different cell cultures, is shown.

(Figure 3C). LPS-induced NF- κ B (p50p65) binding activity was detected at 15 min of stimulation in WT cells; this response was maintained after 30–60 min of LPS treatment. In contrast, *Lyn*^{-/-} BMMCs showed a severely diminished response of p50p65 binding activity in response to LPS. NF- κ B binding activity after 30 min of IgE/antigen-dependent Fc ϵ RI crosslinking was determined as a positive control.

Increased basal TRAF-6/TAK-1 association and TAK-1 phosphorylation in *Lyn*^{-/-} BMMCs

As defects on MAPK and IKK activation were detected in *Lyn*^{-/-} BMMCs, we decided to explore the participation of Lyn kinase on the signalling events upstream of IKK phosphorylation. The complex formed by UBC13/UEV1A/TAB2/TRAF-6 and

TAK-1 has been involved in the important step of TLR4-dependent MEK and IKK phosphorylation in distinct myeloid immune cells.^{30,31} Co-immunoprecipitation experiments were performed to detect the interaction between TAK-1 and TRAF-6 in WT and *Lyn*^{-/-} cells. Figure 4A shows that the association between those proteins increased in WT cells after LPS addition. In contrast, in *Lyn*^{-/-} BMMCs, TRAF-6/TAK-1 association was detected in basal conditions and, interestingly, it did not increase after LPS stimulation. TRAF-6-associated TAK-1 was found to be phosphorylated in the regulatory Thr 184/187 residues³² in WT cells after LPS stimulation, but, in the absence of Lyn, TAK-1 was phosphorylated—even in basal conditions—and this state did not change with short or long-lasting treatments with LPS (Figure 4B).

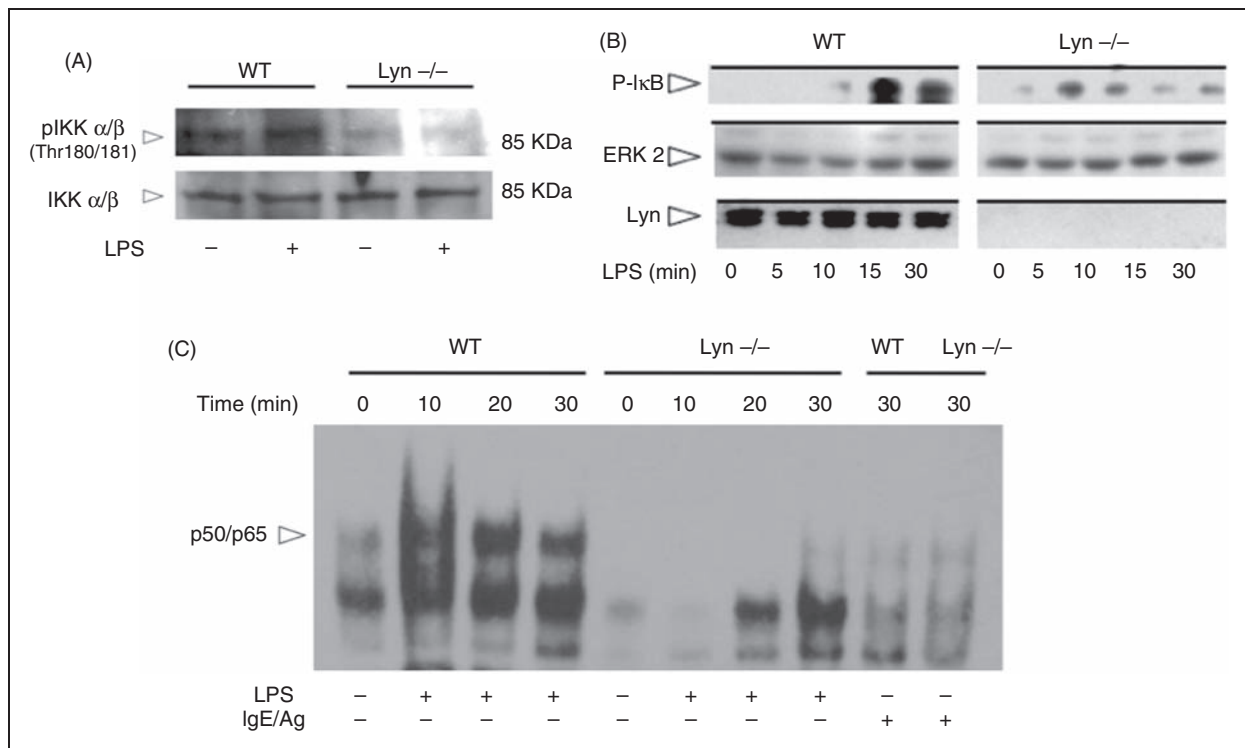


Figure 3. Lyn kinase regulates LPS-activated NF- κ B activity in MCs. WT and Lyn^{-/-} BMMCs were activated with 500 ng/ml LPS and, at the indicated times, cells were isolated and lysed to analyze IKK α/β (A) and I κ B (B) phosphorylation by Western blot. (C) EMSA essays performed with nuclear extracts from 10 million WT and Lyn^{-/-} BMMCs stimulated with LPS, as described in the 'Material and methods'. A representative experiment (from four independent assays performed with distinct cellular cultures) is shown. Specific p50/p65 complex migration was previously determined utilizing specific Abs (data not shown). Positive controls of NF- κ B activation were obtained by stimulating cells with IgE/Ag.

As it has been shown that TAK-1 phosphorylation depends on the ubiquitin ligase activity of TRAF-6, WT and Lyn^{-/-} were stimulated with LPS and TRAF-6 was immunoprecipitated to detect its ubiquitination profile. Figure 4C shows that an increase on the signal of the anti-ubiquitin Ab occurred 15 min after LPS stimulation of WT BMMCs and it was sustained to 30 min after challenge. In Lyn^{-/-} BMMCs, the change on TRAF-6 ubiquitination profile after LPS addition was slightly lower than in WT cells and did not vary with the treatment of LPS.

Lyn kinase is activated and associates with TRAF-6 after LPS stimulation

Lyn activation was evaluated after TLR4 triggering in BMMCs. WT cells were stimulated with LPS at different times, Lyn kinase was immunoprecipitated with specific anti-Lyn Abs and a Western blot was performed utilizing an Ab raised against phosphorylated Tyr 416 of Src kinase. This residue is located in the catalytic domain of Src and it has been widely utilized as a marker of kinase activity of that protein.³³ We used this Ab as that Tyr residue is conserved among all the members of the Src-family kinases. Figure 5A shows

that phosphorylation of the canonical Tyr residue located in the catalytic domain of Lyn was detected 5 min after TLR4 triggering and was still observed at 30 min after LPS addition in WT cells. This result indicates that Lyn kinase is rapidly activated after TLR4 triggering in BMMCs.

The participation of Lyn kinase in the conformation of the TRAF-6/TAK-1 protein complex was evaluated by exploring a direct interaction between TRAF-6 and Lyn. As can be observed in Figure 5B, Lyn kinase co-immunoprecipitated with TRAF-6 in WT but not in Lyn^{-/-} BMMCs after LPS treatment. Maximal TRAF-6-Lyn co-immunoprecipitation was observed 30 min after TLR4 triggering in WT BMMCs.

Lyn kinase is an important element in MC-dependent innate immune responses in vivo

Utilizing different paradigms of infection with Gram-negative bacteria and the cecal ligation and puncture model, it has been demonstrated that MCs are responsible for the early release of TNF- α in the peritoneal cavity and also for the recruitment of neutrophils to the site of inoculation, shaping the local inflammatory reaction.^{4,20,21,34-36} MC-dependent TNF- α production was

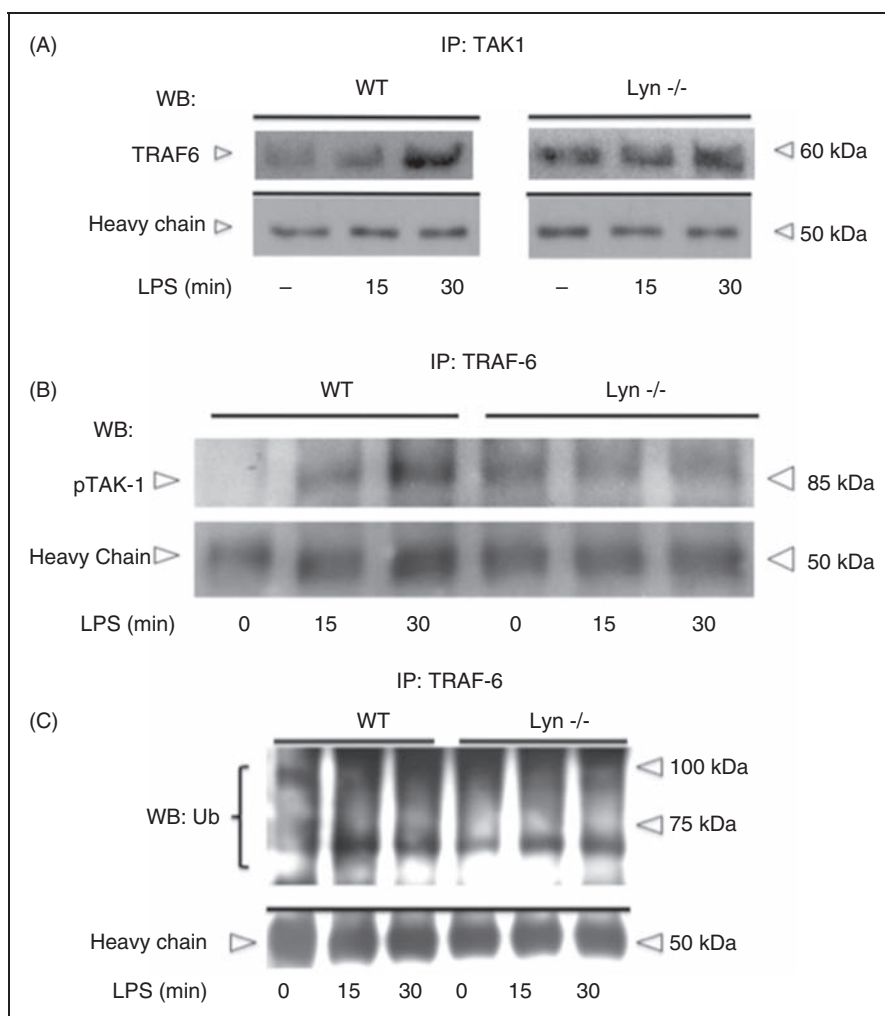


Figure 4. Lyn kinase modulates TLR4-induced formation and function of the TRAF-6/TAK-1 protein complex in MCs. Thirty million WT and Lyn^{-/-} BMMCs (per time point) were stimulated with LPS (500 ng/ml) and, after distinct times, cells were collected by centrifugation and re-suspended in the lysis buffer, as described in the 'Materials and methods'. Cell extracts were incubated with sepharose/protein A spheres coupled to Abs recognizing TAK-1 (A) or TRAF-6 (B, C). Protein samples were separated in acrylamide gels and Western blot was performed using anti TRAF-6 (A), phospho-TAK-1 (p-Thr 184/187) (B) or ubiquitin (C). A representative experiment (from at least four independent assays utilizing different cell cultures) is shown.

found to be protective against low intensity peritoneal infections.²¹ In order to evaluate the role of Lyn on MC TLR4 signaling *in vivo*, we injected mice i.p. with LPS and determined two canonical MC-mediated responses: the early synthesis of TNF- α ^{20,34,35} and the neutrophil recruitment to the peritoneum after challenge.³⁵⁻³⁸ WT, Lyn^{-/-}, MC-deficient (*Kit^w/Kit^{w-sh}*, *Wsh*) and MC-reconstituted (*Wsh Rec*) mice were injected i.p. with LPS (1 mg/kg) and, after 1 h, peritoneal lavages were obtained in order to determine TNF- α concentration by ELISA. Figure 6A shows that, as reported,^{20,34} WT mice were able to secrete TNF- α early after an i.p. LPS injection (400 ± 70 pg/p.w). However, Lyn^{-/-} mice did not secrete intraperitoneal TNF- α in the same conditions. MC-deficient *Wsh* mice showed the described defect on TNF- α production; reconstitution of those animals with WT MCs was able to restore

early TNF- α secretion in response to LPS. When *Kit^w/Kit^{w-sh}* mice were reconstituted with Lyn^{-/-} BMMCs, one-hour levels of TNF- α were not different from non-reconstituted animals. Equal amounts of TNF- α were secreted when a mixture of the calcium ionophore A23187 plus the PKC activator PMA was injected in animals reconstituted with WT or Lyn^{-/-} cells (data not shown). Figure 6B shows that i.p. recruitment of Ly6G-positive cells after LPS injection was affected in the absence of Lyn. WT or Lyn^{-/-} mice were injected with LPS (1 mg/kg) and 5 h later, peritoneal washes were performed and Ly6G²² positive cells in those washes were evaluated by flow cytometry. The number of recruited Ly6G-positive cells per peritoneal wash was found to be close to 200×10^3 in WT animals stimulated with LPS, whereas recruited cells were only around 50×10^3 in LPS-stimulated Lyn^{-/-}.

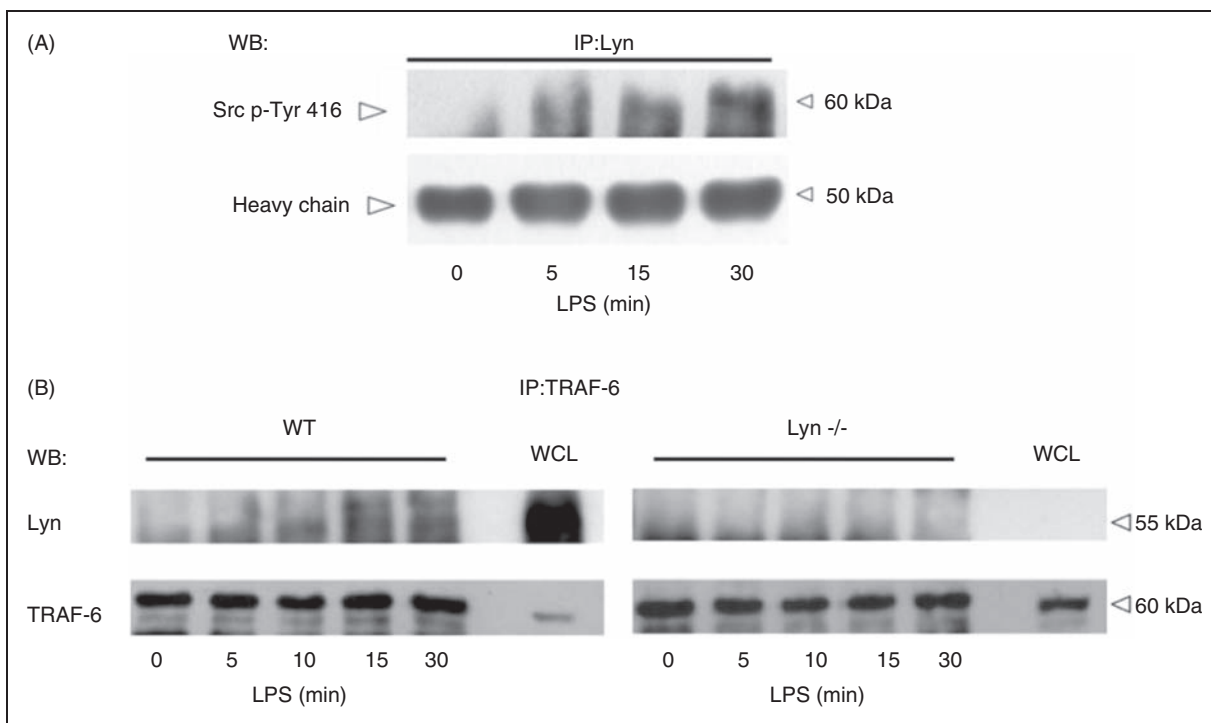


Figure 5. Lyn is activated and associates to TRAF-6 in response to LPS in MCs. (A) Lyn kinase was immunoprecipitated from LPS-treated WT BMMCs, as described in the 'Materials and methods' and a Western blot utilizing an Ab recognizing the conserved phosphorylated Tyr 416 residue of Src was performed. (B) TRAF-6 was immunoprecipitated from LPS-treated WT and *Lyn*^{-/-} BMMCs and a Western blot against Lyn kinase was performed. A sample of whole cell lysate (WCL) was included as a control for the Western blot. A representative experiment from five independent assays utilizing different cell cultures is shown.

Discussion

In this work we report that protein kinase Lyn plays a positive role in TLR4-induced production of TNF- α controlling the activity of the TRAF-6/TAK-1 protein complex in MCs. Our finding is quite relevant as, to our knowledge, this is the first time that the participation of a tyrosine kinase in TLR4 signalling system and an interaction between a Src-family kinase and a TRAF-family member are reported in this important cell type.

The TLR4 signal transduction system in MCs has been explored because of their importance on distinct innate and adaptive immune responses.³⁹ The pathway leading to TNF- α production after TLR4 activation has been characterized using different MC models, i.e. utilizing the immortalized rat cell line RBL-2H3 transfected with different dominant-negative mutant proteins, it has been shown that LPS-induced TNF- α production requires the participation of MyD88 and TRAF6 proteins,⁴⁰ and, by utilizing BMMCs, it was shown that LPS induces a rapid and intense I κ B phosphorylation.⁴ Each cellular model has given specific data about the complex response of MCs against LPS; however, as RBL-2H3 cells do not express adequate levels of MyD88 and CD14 co-receptor,^{41,42} we decided to utilize BMMCs to further analyze the signalling cascade of TLR4 and, specifically, the role of

the regulatory kinase Lyn on TLR4-dependent cytokine production in MCs.

Pre-formed and neo-synthesized TNF- α production by MCs occurs after IgE/Ag stimulation.²³ Transcription-dependent (actinomycin D-sensitive) synthesis of TNF- α has been associated with long-term secretion involved in extended regulation of immune reactions, whereas early (actinomycin D-insensitive) secretion of granule-stored TNF- α seems to be involved in acute protective responses.²³ As in the case of Fc ϵ RI-dependent stimulation, we found that TLR4-triggering induces the release of pre-stored TNF- α and also the long-term synthesis of the newly produced cytokine. Although we cannot discard a role of Lyn on the secretion of pre-formed TNF- α , the results obtained utilizing actinomycin D strongly suggest Lyn to have a role mainly in the production of the transcription-dependent TNF- α in BMMCs.

When upstream regulators of AP-1 and NF- κ B activity were analyzed in LPS-activated cells, we observed an important impairment of the events responsible for MAPK and IKK activation in *Lyn*^{-/-} MCs. IKK was not phosphorylated, MEK 3/6 was found to be unresponsive to TLR4 triggering and ERK, JNK and p38 MAP kinases were not phosphorylated in the absence of functional Lyn. As TAK-1 has been shown to phosphorylate MEK3/6⁴³ and IKK, a possible defect on the activation of TAK-1 was explored; we found a constitutive,

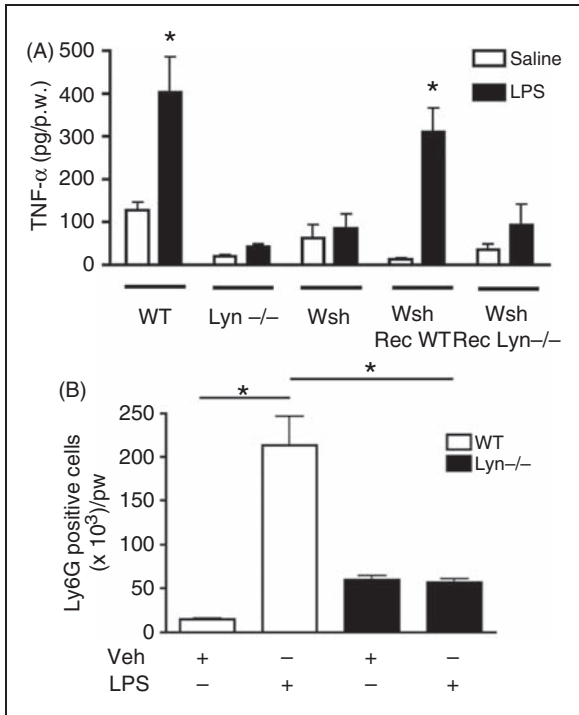


Figure 6. Lyn kinase positively controls early MC-dependent TNF- α secretion induced by LPS in the peritoneal cavity. (A) Twelve-week-old WT, Lyn^{-/-} and MC-deficient Kit^{W/Kit^{Wsh}} (Wsh) mice were injected i.p. with LPS (1 mg/kg) or saline solution and 1 later, peritoneal lavages were collected to determine TNF- α secretion by ELISA, as described in the 'Materials and methods'. MC-deficient mice were reconstituted with BMMCs derived from WT or Lyn^{-/-} animals (Wsh Rec WT or Lyn^{-/-} respectively). Four weeks after reconstitution, LPS challenge (1 mg/kg) was administered and peritoneal lavages were obtained after 1 h. Results are presented as the mean \pm SEM of at least six animals. * P < 0.001 with respect to saline solution injection in the respective group. (B) WT and Lyn^{-/-} mice were stimulated i.p. with LPS (1 mg/Kkg) and 5 h later, peritoneal lavages were performed to determine Ly6G positive neutrophils in each p.w. by flow cytometry, as described in the 'Materials and methods'. Results are presented as the mean \pm SEM of at least three animals. * P < 0.05 with respect to indicated values.

LPS-independent association between TRAF-6 and TAK-1 in the absence of Lyn.

In TLR4-dependent signalling, the formation of a molecular complex composed of UBC13/UEV1A/TAB2/TRAF-6 and TAK-1 is a fundamental step in bifurcating the signal to the IKK/NF- κ B and the MAPK/AP-1 activation pathways. The molecular basis of the interaction between TRAF-6 and TAK-1 has been explored in distinct cellular models. Recently, it has been proposed that an activating mechanism for TAK-1 in which K63-mediated TAB2 ubiquitination (induced by the TRAF-6/UBC13/UEV1A complex) leads to the autophosphorylation of TAK-1 on residues 187/184, resulting in TAK-1 activation³² and dissociation of the complex. Both K63-mediated TRAF-6 ubiquitination and phosphorylation of TAK-1 on

threonine residues 184 and 187 are considered as critical steps for TAK-1 activation;³² biochemical data indicate that TAK-1 phosphorylation occurs on the membrane; however, active TAK-1 is found only in the cytosol.⁴⁴ Our results indicate that Lyn modulates the TRAF-6/TAK-1 engagement/dissociation cycle, as an increased association between those proteins was detected in Lyn^{-/-} BMMCs and no change after LPS treatment was observed in that cell type. Accordingly, with Lyn having a role in the activity of the complex, increased phosphorylation of TAK-1 associated with TRAF-6 was detected, but a defective MAPK and IKK activity was observed in Lyn^{-/-} cells. The paradoxical increase on TAK-1 phosphorylation and the lower activity of downstream elements observed in the absence of Lyn could be explained if TAK-1 dissociation from the membrane TRAF-6-containing complex was required for downstream element activation and Lyn was necessary for active TAK-1 dissociation from the TRAF-6-containing complex. Accordingly, we observed, in some experiments, an increase in basal MEK3/6 phosphorylation and it is possible to speculate that, under our experimental conditions, MEK3/6 could form a part of the TAK-1-containing complex at the plasma membrane and that this complex should be dissociated in a Lyn-dependent manner to allow the signal to proceed. In fact, a p-MEK3/6 positive signal can be observed by Western blot in LPS-induced TRAF-6/TAK-1-containing aggregates (results not shown).

However, an indirect role of Lyn in the phosphorylation of accessory residues on TAK-1 could be possible, as it has been reported that other phosphorylation sites (i.e. positions 178 and 192) are also important for TAK-1 activation.⁴⁵ Using transfected 293 cells with distinct TAK-1 constructs, it has been shown that both Thr residues 178 and 184 can regulate AP-1 and NF- κ B activation pathways.⁴⁵ As we did not evaluate the phosphorylation of all the residues possibly involved in TAK-1 activity, or the association of Lyn with an intermediate Ser-Thr kinase able to phosphorylate them, we cannot involve Lyn kinase in the induction of full TAK-1 activity. Although our results suggest a positive role of Lyn on TAK-1-dependent downstream signalling, a discrete, but detectable, increase on I κ B phosphorylation was observed as early as 5 min post-LPS stimulation in Lyn^{-/-} cells, suggesting that, probably, TAK-1 constitutive phosphorylation in the absence of Lyn leaks to continuous, but low-level, activation of NF- κ B.

The detailed mechanism by which Lyn could modulate the activity of the TRAF-6/TAK-1 complex remains to be further analyzed, although some possibilities can be hypothesized based on recently reported functions and interactions of that kinase. Thymocyte-expressed molecule involved in selection 2 (Themis2) has been found to be a signalling scaffold that

participates in the TLR4 signal transduction system.⁴⁶ Depletion of Themis 2 protein inhibited LPS-induced TNF- α production in human macrophages. Unexpectedly, Themis 2 was shown to be tyrosine-phosphorylated after LPS challenge and interacted with Lyn kinase, the Rho guanine nucleotide exchange factor, Vav and the adapter protein Grb2.⁴⁶ Interestingly, LPS-induced ERK and p38 was enhanced in cells over-expressing Themis 2, although no change on JNK or p65 activity was detected under those conditions. Analysis of Lyn-dependent phosphorylation of Themis 2 and the consequences of this event on TRAF-6/TAK1 complex function remain to be evaluated.

On the other hand, in MCs, Lyn kinase has been found to associate with, and activate, sphingosine kinase type I (Sphk1), leading to the production of sphingosine 1 phosphate (S1P), which is necessary for initial calcium released from intracellular stores leading to degranulation.⁴⁷ In different cell lines, Sphk1 and the production of S1P was found to be necessary for Lys-63-linked polyubiquitination of receptor-interacting protein 1 (RIP1), phosphorylation of IKK, I κ B degradation and NF- κ B activation after TNF- α receptor triggering. Interestingly, it was found that S1P specifically binds TRAF2 at the amino-terminal RING domain and stimulates its E3 ubiquitin ligase activity.⁴⁸ The conserved transductional mechanisms between TNFR and TLR4 allow us to hypothesize a possible participation of Lyn kinase on TLR4-dependent Shpk1 activation. This could lead to the production of S1P and to TRAF-6 activation. This possibility is now under investigation in our laboratory.

Tyrosine phosphorylation of TLR4 and Lyn association with the receptor and CD14 after LPS treatment has been reported in distinct cellular systems. Utilizing peripheral human monocytes, an important increase in the activity of different tyrosine kinases, such as Lyn, Hck and Fgr, and direct interaction of Lyn with the CD14 co-receptor was observed.¹² In a detailed series of experiments, where HEK293 cells were transfected with different TLR4 and Lyn constructions, it was shown that TLR4 is tyrosine phosphorylated and that an important fraction of Lyn kinase co-immunoprecipitates with the receptor.⁹ Our results show that in MCs, Lyn becomes activated upon LPS stimulation and, interestingly, Lyn clearly interacts with TRAF-6. Our efforts to identify Lyn in TLR4 immunoprecipitates from stimulated cells gave only a very slight signal that was barely detectable in our cell system (data not shown). An interaction between Src and TRAF-6 has been proposed, in other cell types as an important interaction leading to Akt⁴⁹ and AP-1 activation⁵⁰ after stimulation. Some reports indicate that the SH3 domain of Src is important for its association to TRAF-6 and for the activation of downstream targets,⁴⁹ but the role of specific domains of Lyn in the interaction with TRAF-6 in MCs remains to be

analyzed. The TRAF-6/TAK-1 complex is a central regulatory module controlling the synthesis of numerous cytokines after distinct TLRs.⁵¹ Whether the activation of Lyn kinase in regulating TRAF-6/TAK-1 is a general step on the action of other TLRs is an attractive question that remains to be explored, as preliminary data also indicate lower TNF- α production after a TLR1/2 ligand addition in Lyn^{-/-} BMMCs (data not shown).

In MCs, it is known that Src-family kinases are involved in the initial steps of Fc ϵ RI activation and, particularly, it has been reported that Lyn contributes to signalling phosphorylating receptor immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs), Syk kinase and the adaptor protein linker of activated T cells (LAT), inducing the formation of membrane-associated molecular aggregates, which leads to calcium mobilization, PKC activation, degranulation and cytokine synthesis.^{52,53} However, Lyn can not only induce positive signals upon Fc ϵ RI crosslinking, as it also generates a negative control loop phosphorylating the Csk-binding protein (Cbp), which allows to the recruitment of Csk to the membrane and causes the silencing of different pathways dependent on Src-related tyrosine kinases.¹⁴ Interestingly, the positive or negative role of Lyn kinase on the Fc ϵ RI signalling system has been associated with the intensity of the stimulus, having a positive role in low-intensity stimulation and a negative role under a high level stimulation.¹³ Regarding TLR4-dependent responses, a positive role of CD14-associated Lyn⁹ and Lyn-dependent tyrosine phosphorylation of TLR4^{9,12} has been described in human monocytes. In our case, results show that Lyn also exerts this positive role on LPS-induced TNF- α production in BMMCs. However, a negative role of this kinase on TLR-induced responses was found in bone marrow-derived macrophages.¹¹ Taken together, recent research indicates a complex regulatory function that Lyn can exert on stimulus-specific cytokine production,^{33,54} systematic studies comparing low versus high stimulation of TLR4 receptors with the same ligand and in the same cell types will help to characterize the pathways for positive and negative regulation of innate immunity receptors.

The results reported here extend the observations on the role of Lyn in MCs by involving it in the process of NF- κ B activation after TLR4 triggering, indicating that this kinase could mediate a crosstalk between Fc ϵ RI and TLR4 receptors, as TRAF-6 is necessary for p38 and JNK activation and the synthesis of TNF- α after Fc ϵ RI triggering in mouse liver-derived MCs.⁵⁵ However, the fact that Lyn^{-/-} BMMCs are able to produce significant amounts of TNF- α over longer periods, suggests the participation of other signalling pathways that are active for longer in the absence of Lyn. The participation of the Bcl-10/Malt-1 complex (that has been implied

in the FcεRI-triggered synthesis of TNF-α⁵⁶) on LPS-dependent TNF-α synthesis is now under exploration in our laboratory.

Finally, it has well been documented that MCs are able to synthesize, store and secrete TNF-α in response bacterial insults into the peritoneal cavity.^{20,21,34–36} This early TNF-α production has been associated with the defence against low-intensity infections with Gram-negative bacteria.²¹ In particular, the protective role of TNF-α seems to depend on the attraction of inflammatory cells to the peritoneal cavity of mice.^{34–36} Our *in vivo* results indicate that Lyn acts as a positive regulator of peritoneal MC-dependent TNF-α secretion in response to a low dose of LPS and to the recruitment of inflammatory cells to the site of bacterial infection. Our finding is of particular interest as TNF-α secreted by MCs early on is not only synthesized *de novo*, but is stored in granular compartments. These results strongly suggest that, *in vivo*, Lyn could be also involved in the secretory mechanism leading to MC-derived TNF-α release triggered by LPS.

As Lyn^{-/-} BMDCs synthesized TNF-α at longer period of time, and the systemic increase of TNF-α during endotoxaemia is mediated by other cell types⁵⁷ (i.e. macrophages), the specific relevance of intraperitoneal MC-derived TNF-α production and the role of Lyn kinase on the whole animal response to sepsis remains to be elucidated.

MCs are important regulators of the innate and adaptive immune responses. However, in contrast with the knowledge about the machinery of cytokine synthesis and release after FcεRI-dependent signalling, the description of the molecules controlling cytokine production after TLR4 is far from complete. The TLR4 signal transduction system, at least in myeloid immune cells, has been defined as the pathway connecting the formation of the complex LPS/CD14/TLR4/MD-2 in the plasma membrane⁵ and the recruitment of adapters (MyD88/Mal or TRIF/TRAM), with NF-κB, AP-1 and IRF nuclear translocation to induce cytokine gene expression. This signalling system has been described as utilizing intermediate serine-threonine kinases such as IRAKs, TAK-1 and IKK.⁵ The participation of tyrosine kinases, although reported,⁹ has not been considered a critical step on this signalling cascade, but the complex machinery leading to the release of pre-formed and neo-synthesized inflammatory mediators in MCs strongly suggests that new pathways connecting TLR receptors to cytokine production remain to be discovered, or are differentially wired in this remarkable cell type.

Funding

This project was supported by the National Council for Science and Technology of Mexico (Conacyt) (grant no. 83079 to CGE), and scholarships no. 208218 to MA and no. 102830 to AMJ.

Acknowledgements

The authors wish to thank to Hector Espinosa for the bibliography search and Armando Resendiz for technical assistance. MA is student of the Biomedical Sciences (PDCB) PhD program of the National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City, Mexico.

References

- Galli SJ, Grimaldeston M and Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 478–486.
- Galli SJ, Nakae S and Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005; 6: 135–142.
- Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 787–799.
- Supajatura V, Ushio H, Nakao A, et al. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001; 167: 2250–2256.
- Kawai T and Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373–384.
- Husebye H, Aune MH, Stenvik J, et al. The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity* 2010; 33: 583–596.
- Kagan JC, Su T, Horng T, et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 2008; 9: 361–368.
- Keck S, Muller I, Fejer G, et al. Absence of TRIF Signaling in Lipopolysaccharide-Stimulated Murine Mast Cells. *J Immunol* 2011; 186: 5478–5488.
- Medvedev AE, Piao W, Shoenfelt J, et al. Role of TLR4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance. *J Biol Chem* 2007; 282: 16042–16053.
- Herrera-Velitz P and Reiner NE. Bacterial lipopolysaccharide induces the association and coordinate activation of p53/56lyn and phosphatidylinositol 3-kinase in human monocytes. *J Immunol* 1996; 156: 1157–1165.
- Keck S, Freudenberg M and Huber M. Activation of murine macrophages via TLR2 and TLR4 is negatively regulated by a Lyn/PI3K module and promoted by SHIP1. *J Immunol* 2010; 184: 5809–5818.
- Stefanova I, Corcoran ML, Horak EM, et al. Lipopolysaccharide induces activation of CD14-associated protein tyrosine kinase p53/56lyn. *J Biol Chem* 1993; 268: 20725–20728.
- Xiao W, Nishimoto H, Hong H, et al. Positive and negative regulation of mast cell activation by Lyn via the FcεRI. *J Immunol* 2005; 175: 6885–6892.
- Odom S, Gomez G, Kovarova M, et al. Negative regulation of immunoglobulin E-dependent allergic responses by Lyn kinase. *J Exp Med* 2004; 199: 1491–1502.
- Chan VW, Meng F, Soriano P, et al. Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity* 1997; 7: 69–81.
- Grimbaldeston MA, Chen CC, Piliponsky AM, et al. Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am J Pathol* 2005; 167: 835–848.
- The Jackson Laboratory handbook on genetically standardized mice*. 6th edn. Bar Harbor, ME: The Jackson Laboratory, 2009.
- Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, et al. Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol* 2002; 3: 741–748.
- Baccam M, Woo SY, Vinson C and Bishop GA. CD40-mediated transcriptional regulation of the IL-6 gene in B lymphocytes:

- involvement of NF-kappa B, AP-1, and C/EBP. *J Immunol* 2003; 170: 3099–3108.
20. Madera-Salcedo IK, Cruz SL and Gonzalez-Espinosa C. Morphine decreases early peritoneal innate immunity responses in Swiss-Webster and C57BL/6J mice through the inhibition of mast cell TNF-alpha release. *J Neuroimmunol* 2011; 232: 101–117.
 21. Piliponsky AM, Chen CC, Grimbaldston MA, et al. Mast cell-derived TNF can exacerbate mortality during severe bacterial infections in C57BL/6-KitW-sh/W-sh mice. *Am J Pathol* 2010; 176: 926–938.
 22. Carr KD, Sieve AN, Indramohan M, et al. Specific depletion reveals a novel role for neutrophil-mediated protection in the liver during *Listeria monocytogenes* infection. *Eur J Immunol* 2011; 41: 2666–2676.
 23. Gordon JR and Galli SJ. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *J Exp Med* 1991; 174: 103–107.
 24. Falvo JV, Tsytsykova AV and Goldfeld AE. Transcriptional control of the TNF gene. *Curr Dir Autoimmun* 2010; 11: 27–60.
 25. Udalova IA, Knight JC, Vidal V, et al. Complex NF-kappaB interactions at the distal tumor necrosis factor promoter region in human monocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 21178–21186.
 26. Kuprash DV, Udalova IA, Turetskaya RL, et al. Similarities and differences between human and murine TNF promoters in their response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 1999; 162: 4045–4052.
 27. Lawrence GM, Lichtenstein M and Galli SJ. *Mast cells and Basophils*. London: Academic press, 2000.
 28. Triantafilou K, Triantafilou M and Dedrick RL. A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat Immunol* 2001; 2: 338–345.
 29. Triantafilou M and Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 2002; 23: 301–304.
 30. Dong W, Liu Y, Peng J, et al. The IRAK-1-BCL10-MALT1-TRAF6-TAK1 cascade mediates signaling to NF-kappaB from Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2006; 281: 26029–26040.
 31. Wang C, Deng L, Hong M, et al. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001; 412: 346–351.
 32. Xia ZP, Sun L, Chen X, et al. Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* 2009; 461: 114–119.
 33. Lowell CA. Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Mol Immunol* 2004; 41: 631–643.
 34. Echtenacher B, Mannel DN and Hultner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 1996; 381: 75–77.
 35. Malaviya R, Ikeda T, Ross E and Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 1996; 381: 77–80.
 36. Malaviya R and Abraham SN. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 841–846.
 37. Ramos BF, Qureshi R, Olsen KM and Jakschik BA. The importance of mast cells for the neutrophil influx in immune complex-induced peritonitis in mice. *J Immunol* 1990; 145: 1868–1873.
 38. Zhang Y, Ramos BF and Jakschik BA. Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science* 1992; 258: 1957–1959.
 39. Shelburne CP and Abraham SN. The mast cell in innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 2011; 716: 162–185.
 40. Gon Y, Nunomura S and Ra C. Common and distinct signalling cascades in the production of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-13 induced by lipopolysaccharide in RBL-2H3 cells. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 635–642.
 41. Passante E, Ehrhardt C, Sheridan H and Frankish N. Toll-like receptors and RBL-2H3 mast cells. *Inflamm Res* 2009; 58(Suppl. 1): 11–12.
 42. Passante E and Frankish N. Deficiencies in elements involved in TLR4-receptor signalling in RBL-2H3 cells. *Inflamm Res* 2010; 59(Suppl. 2): S185–S186.
 43. Moriguchi T, Kuroyanagi N, Yamaguchi K, et al. A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem* 1996; 271: 13675–13679.
 44. Jiang Z, Ninomiya-Tsuji J, Qian Y, et al. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 7158–7167.
 45. Yu Y, Ge N, Xie M, et al. Phosphorylation of Thr-178 and Thr-184 in the TAK1 T-loop is required for interleukin (IL)-1-mediated optimal NFkappaB and AP-1 activation as well as IL-6 gene expression. *J Biol Chem* 2008; 283: 24497–24505.
 46. Peirce MJ, Brook M, Morrice N, et al. Themis2/ICB1 is a signaling scaffold that selectively regulates macrophage Toll-like receptor signaling and cytokine production. *PLoS One* 2010; 5: e11465.
 47. Urtz N, Olivera A, Bofill-Cardona E, et al. Early activation of sphingosine kinase in mast cells and recruitment to FcepsilonRI are mediated by its interaction with Lyn kinase. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 8765–8777.
 48. Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, et al. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* 2010; 465: 1084–1088.
 49. Wong BR, Besser D, Kim N, et al. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* 1999; 4: 1041–1049.
 50. Funakoshi-Tago M, Tago K, Sonoda Y, et al. TRAF6 and C-SRC induce synergistic AP-1 activation via PI3-kinase-AKT-JNK pathway. *Eur J Biochem* 2003; 270: 1257–1268.
 51. Landstrom M. The TAK1-TRAF6 signalling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 585–589.
 52. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, et al. Mast cells as 'tunable' effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 749–786.
 53. Gilfillan AM and Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 218–230.
 54. Xu Y, Harder KW, Huntington ND, et al. Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity* 2005; 22: 9–18.
 55. Yang YJ, Chen W, Carrigan SO, et al. TRAF6 specifically contributes to FcepsilonRI-mediated cytokine production but not mast cell degranulation. *J Biol Chem* 2008; 283: 32110–32118.
 56. Klemm S, Gutermuth J, Hultner L, et al. The Bcl10-Malt1 complex segregates Fc epsilon RI-mediated nuclear factor kappa B activation and cytokine production from mast cell degranulation. *J Exp Med* 2006; 203: 337–347.
 57. Grivnennikov SI, Tumanov AV, Liepinsh DJ, et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. *Immunity* 2005; 22: 93–104.

Critical Review

Signaling Through Toll-like Receptor 4 and Mast Cell-dependent Innate Immunity Responses

Martin Avila^{1,2} and Claudia Gonzalez-Espinosa¹

¹Department of Pharmacobiology, Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav), Mexico City, Mexico

²National Autonomous University of Mexico (UNAM), Biomedical Sciences PhD program, Mexico City, Mexico

Summary

Signal transduction through Toll-like receptors (TLRs) has been one of the main topics in immunology research in recent years. Because of their signaling particularities based on the homotypic recognition of protein domains in multiple adaptors and selective activation of protein kinases, TLRs have become a paradigm to study ligand recognition coupled to dynamic and highly specific transcriptional and secretory responses in immune cells. Particularly, deleterious effects of Gram-negative bacteria-associated immune reactions has promoted intense research in the field, leading to the description of a number of canonical molecules connecting lipopolysaccharide-induced TLR4 activation with NF κ B-dependent transcription. However, the diversity of immune cell phenotypes and the activity of distinct immune receptors in the same cell, strongly suggest that a number of elements in TLR4 signaling cascade, such as novel coreceptors, tyrosine kinases, and molecules regulating the secretion of preformed mediators remain to be described. Recent investigations have placed the mast cells, widely known by their role on allergic responses, as important effectors of innate immunity reactions against Gram-negative bacteria. Their remarkable capacity of cytokine storage, synthesis and release, and the large number of inflammatory reactions controlled by their activation, suggest the existence of new modulators of TLR4 signaling in this particular cell type. © 2011 IUBMB

IUBMB *Life*, 63(10): 873–880, 2011

Keywords mast cells; signal transduction by proinflammatory cytokines (TNF α); stimulus–response coupling in mast cells; type 1 Fc epsilon receptor; NF-kBAP-1.

Received 25 April 2011; accepted 12 July 2011

Address correspondence to: Claudia Gonzalez-Espinosa, Department of Pharmacobiology, Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav), South Campus, Calzada de los Tenorios # 235, Col. Granjas Coapa. Tlalpan, D.F. CP.14330, Mexico City, Mexico.

E-mail: cgonzal@cinvestav.mx

ISSN 1521-6543 print/ISSN 1521-6551 online
DOI: 10.1002/iub.555

INTRODUCTION

Toll-like receptor 4 (TLR4) is an integral membrane protein that contains leucine-rich region motifs located in the extracellular domain of the receptor, one transmembrane domain and an intracellular Toll/IL-1 receptor (TIR) domain. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein recognizes LPS released from Gram-negative bacterial wall and presents it to the coreceptor CD14, a generally glycosylated phosphatidylinositol-anchored protein that helps to engage LPS to a complex formed by TLR4 and the myeloid differentiation protein 2 (MD-2). The formation of a receptor multimer composed of two TLR4–MD2–LPS complexes initiates the recruitment of a number of adaptors and signal transduction through Ser–Thr kinases (1).

At present, there is an important number of studies about the molecules activated during downstream TLR4, triggering in different myeloid immune cells. Mast cells (MCs), responsible for type I hypersensitivity reactions, have been recently associated with protective immune reactions against Gram-negative bacteria. Because of the MC's capacity of cytokine synthesis, storage and release, they have emerged as a cell type where new molecules or interactions could participate in the canonical TLR4 signal transduction system.

In this article, we present a brief description of the signaling cascade activated by TLR4 in immune cells, with special emphasis on those molecules which are not directly associated with the control of early events of adapter recognition. Also, we will review the evidence that MCs are main participants on innate immunity against bacteria and the special features of TLR4 signal transduction system, which is described in this particular cell type. Finally, we will discuss on recent data showing an important crosstalk between the high affinity IgE receptor (Fc ϵ RI) and TLR4 signaling on MC-dependent inflammatory reactions.

CANONICAL SIGNALING PATHWAYS ACTIVATED BY TLR4

MyD88-dependent Signaling Pathway

TLR4 complex activation leads to the recruitment of TIR-containing adaptor proteins, such as TIR-domain-containing adaptor

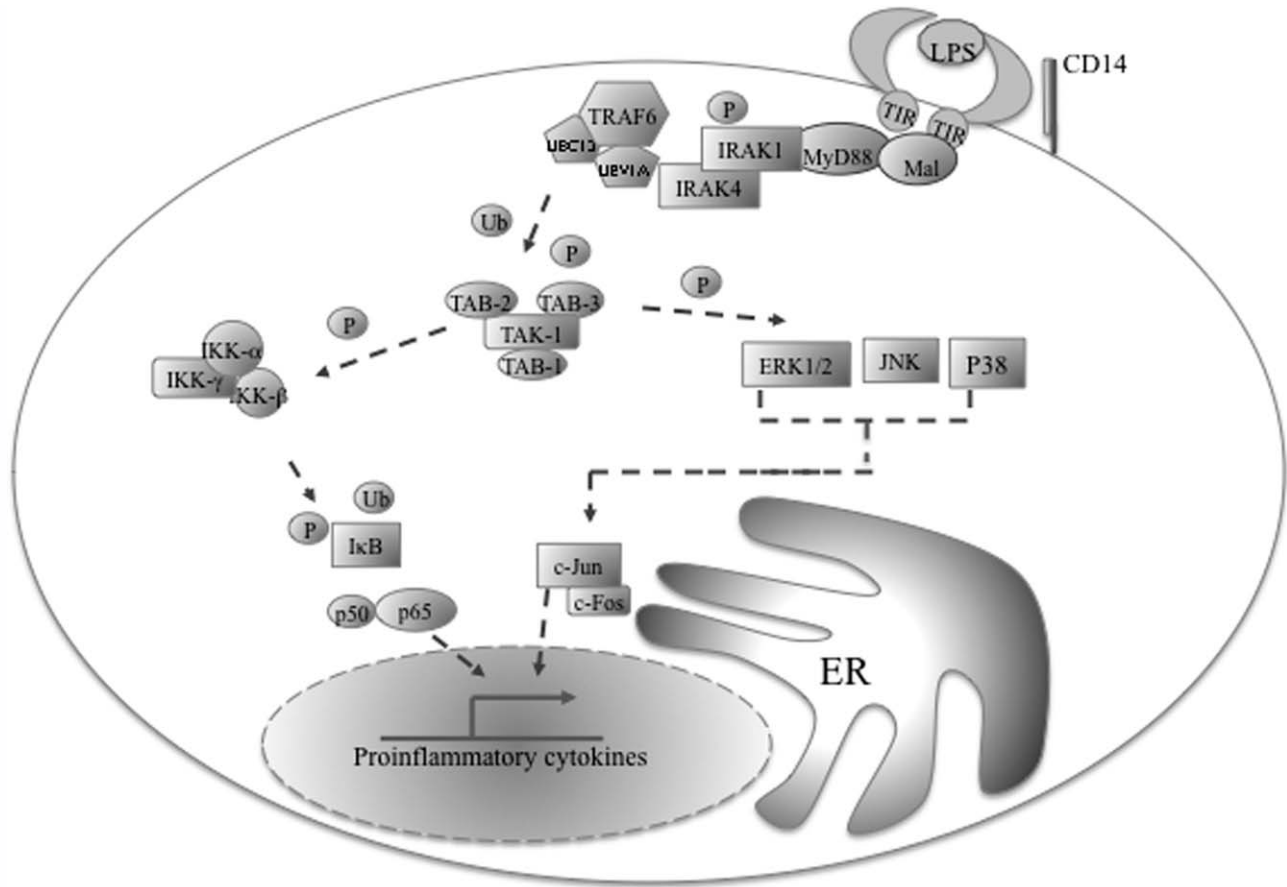


Figure 1. MyD88-dependent signaling pathway. After CD14-TLR4-MD2 complex formation, MyD88 binds to receptor TIR domains, initiating a signaling cascade that includes IRAK kinases and the formation of the TRAF6 complex (see text for details). TRAF6 complex bifurcates the signal to IKK and MAPK activation, to activate NF κ B (p50/p65) and AP-1 (cFos/cJun) transcription factors. ER, endoplasmic reticulum; P, phosphorylation; U, ubiquitination.

protein (also known as Mal) and myeloid differentiation primary response See Figure 1. Once bound to the receptor, adapters recruit IL-1R-associated kinases (IRAKs) through homotypic recognition of death domains (DDs). IRAK4 phosphorylates IRAK1, leading to the formation of a complex composed of a member of the E3 ubiquitin-ligase tumor necrosis factor (TNF)-receptor associated factor family of proteins, (TRAF)-6, with UBEV1A (ubiquitin conjugating enzyme E2 variant 1) and UBC13 (ubiquitin conjugating enzyme 13; *1*). In turn, ubiquitin ligases activate a preformed complex composed of a transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1), and TAK-1 binding (TAB) proteins 1, 2, and 3. In this step, signal bifurcates to activate 1) the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and 2) the inhibitor of nuclear factor- κ B-kinase (IKK) complex.

IKK has a crucial role in activation of the transcription factor NF κ B by phosphorylating the molecule I κ B α , which is polyubiquitinated and degraded through the proteasome. The derepressed NF κ B then binds κ B sites on target genes to regulate the expression of multiple genes involved in cell proliferation, survival, and cytokine response. The pathway that starts with the interaction of

LPS with the complex TLR4-CD14-MD-2 and finishes with the activation of NF κ B (via IKK) and AP-1 (via MAPK) transcription factors is the most studied in immune cells. TNF, IL-6, IL-1 β , and other important proinflammatory cytokines are produced after TLR4 triggering, following MyD88-dependent pathway (*2*).

The IKK complex targets not only a I κ B α , but also a number of substrates, such as B-cell lymphoma 10 (Bcl10) and caspase recruitment domain family, member 11 (CARD11, also known as CARMA1; two proteins involved in NF κ B signaling after immunoreceptor activation), β catenin, IRS-1 (an inhibitory molecule of insulin actions), Dok-1 (and inhibitor of MAPK and promoter of cell motility), 14-3-3 β (a stabilizer of mRNAs coding for cytokines and chemokines), among other proteins (*3*).

MyD88-Independent Signaling Pathways

After activation of the MyD88-dependent pathway, the TLR4-MD2-LPS complex is then internalized and retained in the early endosome, where it triggers a secondary signal transduction system by recruiting the TIR-containing adaptors TRAM and TRIF(*4*; Fig. 2). In this MyD88-independent path-

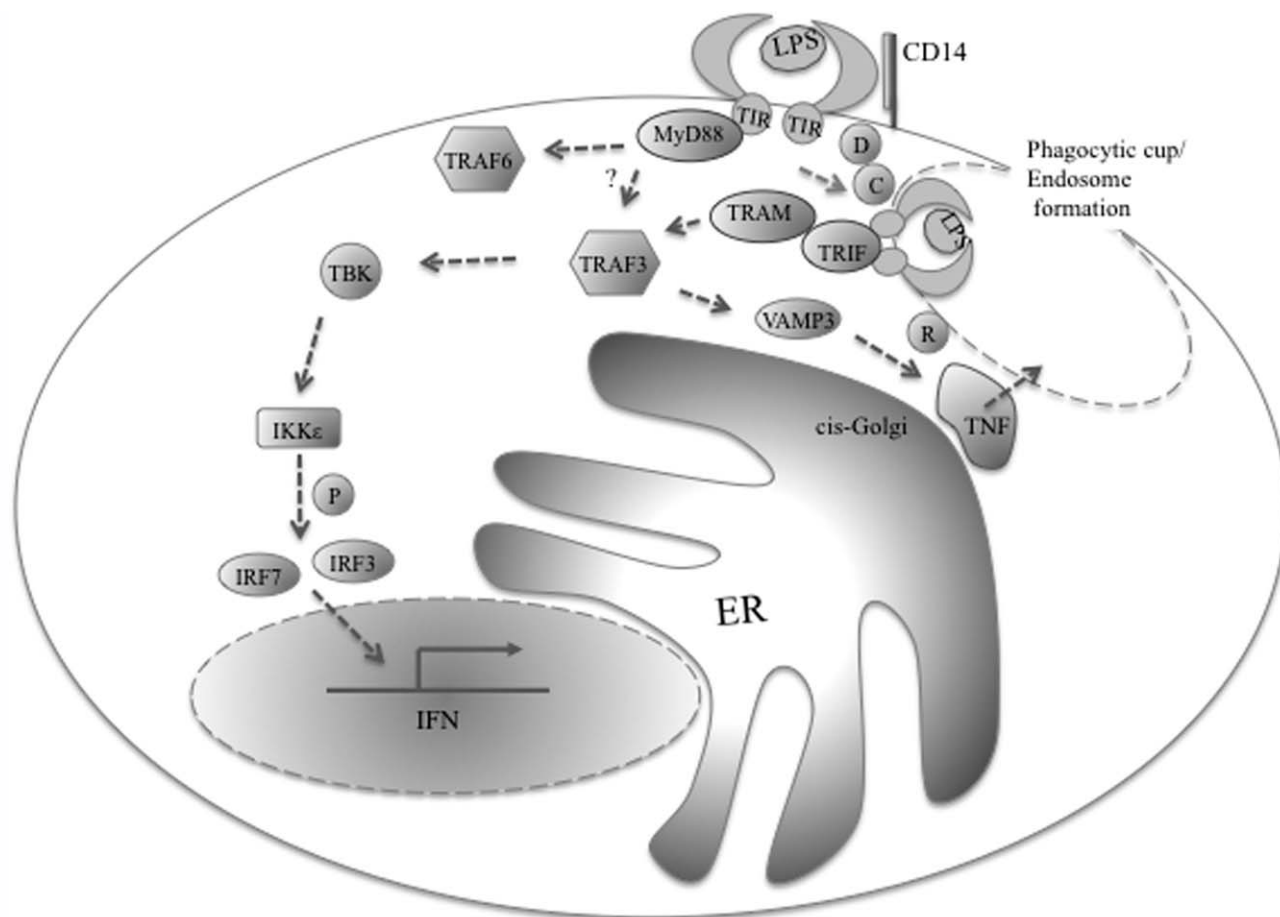


Figure 2. TRIF-dependent signaling pathway. Shortly after TLR4 activation, TRIF and TRAM adapters are recruited to the receptor complex and coordinate endosome formation and signaling through TRAF3 activation. TBK and IKK ϵ are activated and IRF3/7 is phosphorylated (P) to induce IFN β synthesis. As the endosome forms, evidence small GTPases and other proteins are recruited. Dynamin (D), Cdc42/Rac (C), Rab11a, and Rab5 (R) are implicated in TLR4 endocytosis. See text for details.

way, a nonconventional IKK complex known as IKKi and TANK-binding kinase 1 (TBK1) induce activation of interferon-regulating factor 3 (IRF3), which promotes in conjunction with NF- κ B and AP-1, the expression of Type I IFN (IFN β ; 4).

One distinctive characteristic of this late signaling pathway is its dependence on the internalization process of TLR4-adaptor complexes. TRAM has been localized in Rab5-positive endosomes and couples TLR4 endocytosis to IFN- β gene expression through a mechanism involving dynamin, a well-characterized protein involved in receptor internalization via the recycling endosome (5). More recently, it was shown that small GTPase Rab11a, whose activity is related to the endocytic recycling compartment, is detected inside the cis-Golgi, colocalizing with TLR4 after LPS or *E. coli* addition (6).

TLR4 CONTROL OF CYTOKINE SECRETION

Contrasting with the knowledge obtained on the signaling pathway connecting TLR4 activation with NF κ B-dependent transcrip-

tion, the elements leading to cytokine secretion are poorly described. Phagosome generation and TNF secretion take place during the formation of the so-called phagocytic cup, a distinctive cellular structure highly regulated by cytoskeletal rearrangement and vesicular fusion (7). In macrophages activated with LPS, phagocytic cup formation and secretion of TNF are highly tied events. The TNF converting enzyme is located at the phagocytic cups and cleaves and releases TNF before the closure of the cup (8). A variety of soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) proteins are involved in endosome trafficking and TNF secretion after TLR4 triggering. In macrophages, cytokines are first transported out of the Golgi complex to the recycling endosome via pairing of the trans-Golgi network (TGN) Q-SNARE complex of syntaxin 6-syntaxin-7-Vit1b with the R-SNARE vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP3). This VAMP3 helps to transport cytokines to the cell surface by pairing with SNAP-23 Q-SNARE complex on the plasma membrane (9). Recent evidence connects the transport of cytokine-containing vesicles to the TLR signal transduction system at the point of acti-

vation of TRAF proteins. It has been observed that VAMP3 binds the PH domain of TRAF3 to directly promote cytokine secretion (10; Fig. 2).

OTHER EFFECTOR MOLECULES IN TLR4 SIGNALING

A number of molecules nondirectly related to canonical adapter complex formation participate in the TLR4 signal transduction system. For example, it is known that distinct coreceptors control specific cellular responses after TLR4 triggering. In CD11b/CD18-deficient macrophages, a reduction of NF κ B activation and p38 phosphorylation after LPS addition was detected. On the other hand, phosphorylation of p38, ERK, and JNK was detected in CD14-deficient macrophages, suggesting that both CD11b/CD18 and CD14 have differential roles on MAPK activation (11). Other coreceptor, CD36 is involved in enhancing specific TLR4-dependent reactive oxygen species formation and nitric oxide synthesis (12).

CARD-containing adaptors from the membrane-associated guanylate kinase family are a group of adaptor proteins that are essential for NF κ B activation in many immune cells after TLR4 triggering. In dendritic cells (DCs), CARD9 was activated downstream of TLR4 and its absence caused a diminished TNF and IL-6 secretion (13). Bcl-10 protein interacts with TLR4 upon LPS stimulation, and the signaling leading to NF κ B activity was shown to be dependent of Pellino2, TAK1, and IKK complexes (14).

Pathways encompassing CARD-containing proteins for NF κ B activation requires of PKC activity, and the role of distinct members of this family has been investigated, that is, in neutrophils, LPS-induced TNF secretion is dependent of the α/β isoforms of PKC, which participate in IKK phosphorylation and NF κ B activity (15). Novel PKC isoforms also participate on TLR4 signaling (16).

Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) is one of the most enigmatic molecules activated after LPS-dependent TLR4 triggering. In human DCs, inhibition of PI3K specifically enhances TRIF-dependent NF κ B activation and IFN- β synthesis downstream TLR4 (17), whereas other studies shown that PI3K is activated in a MyD88-dependent fashion, and that sustained interaction of MyD88/PI3K with TLR4 negatively regulates signaling (18). The data propose that PI3K pathway exerts a negative control of the TLR4 signaling pathway. However, results indicating a positive role of PI3K on JNK activation after TLR4 triggering, were found in human neutrophils (19).

A number of tyrosine kinases are activated after TLR4 triggering. Bruton's tyrosine kinase (Btk) is activated downstream of TLR4, controlling p38 MAPK activation and NF κ B nuclear translocation. Btk binds TLR4 and early molecules, such as MD-2, Mal, and IRAK-1 in monocytes and also controls LPS-induced cytokine secretion (20).

Src-family kinases increase its phosphotyrosine activity upon LPS addition. Inhibition of this type of kinases resulted in down regulation of LPS-induced I κ B α phosphorylation and NF κ B binding activity (21). Specifically, the Src-family kinase Lyn has been

found associated to TLR4 after a prolonged exposition to LPS in HEK293 cells overexpressing a TLR4-MD2 fusion protein (22), but its particular role in signaling or its downstream events are not defined yet. Finally, the spleen tyrosine kinase (Syk) also activates shortly after LPS treatment in THP-1 cells (23).

MAST CELLS, CYTOKINE SYNTHESIS, AND INNATE IMMUNITY RESPONSES AGAINST BACTERIA

MCs are myeloid cells derived from bone marrow progenitors that migrate as immature precursors to all the vascularized tissues of the body, where finish their differentiation under the influence of tissue-specific produced mediators (24). They are characterized by a cytoplasm filled with granules where preformed inflammatory mediators are stored. Granule content is rapidly secreted after distinct stimuli, such as the crosslinking of the high affinity IgE receptor (Fc ϵ RI) in a process, that is, known as degranulation. This event involves granule-granule and granule-plasma membrane fusion steps, requires calcium mobilization, cortical actin depolymerization, and microtubule formation (25). Other stimuli (characterized by their low intensity), causes inflammatory mediator release without appreciable degranulation. In this process, called picomal secretion, granule content is secreted without obvious granule-granule fusion events and does not seem to be dependent on intracellular calcium rise. Because of the fact MCs initiate allergic reactions, their role in host defense was elusive for long time. However, their anatomical localization (skin, lung, gastrointestinal and urogenital tracts, blood vessel surface, and periphery nerve terminals) suggested a role on the host-environment interface to protect the host against external invaders.

Utilizing mice defective on MCs, it has been possible to define the specific in vivo contributions of this cell type and their products to host defense. The most utilized MC-null mice show modifications on *c-Kit* promoter region, which results in the absence of stem cell factor-mediated signaling and hence affects MC and melanocyte differentiation. MC-deficient mice can be reconstituted with bone marrow-derived MC (BMMCs) differentiated in vitro from WT animals and constitute an important tool to decipher the role of MCs in vivo. MC-deficient mice are unable to synthesize TNF shortly after an intraperitoneal (i.p.) injection of Gram-negative bacteria and they succumb rapidly after infection. However, when reconstituted with WT BMMCs, rapid intraperitoneal TNF production and mice survival can be recovered (26). Ex vivo experiments using MCs purified from peritoneum of WT animals, have confirmed that resident intraperitoneal MCs store TNF and rapidly secrete it after LPS challenge (27). The MC capacity of TNF secretion after bacterial challenge to initiate protective immune response against Gram-negative bacteria depends on the TLR4 receptor present on plasma membrane of this cell type (28).

TLR4 SIGNALING IN MCS

Several cellular models have been used to characterize the signaling cascade activated by TLR4 receptor in MCs. BMMCs

and the murine MC line MC/9 express mRNA for TLR4, MyD88, and MD-2 but not for CD14 proteins (29). Other wide utilized MC cellular model (RBL 2H3 cells) do not express CD14 or MD-2 (30). In BMMCs, MD-2 is essential for LPS responsiveness (31) and distinct ligands, such as heat shock proteins (32) or the extra domain A of fibronectin activate TLR4 in this MC model (33).

Variable results have been obtained analyzing TLR4 expression and function in human MCs. Human cord blood-derived MCs express MD-2 accessory molecule and MyD88 adapter, but very low levels of TLR4 mRNA receptor were detected by RT-PCR (34). Basal TLR4 expression was greatly improved when human lung MCs (HLMCs) were treated with the regulatory cytokine IFN γ (35). In two human MC lines, HMC-1 and LAD2, LPS augmented the TLR4 protein expression and prolonged treatment of LAD2 cells resulted in 2-fold increased TNF secretion after a second LPS stimulation (36). Utilizing human MCs derived from CD34⁺ precursors of peripheral blood, it was shown that long-term stimulation of TLR4 receptor with LPS changed cytokine production profile and protease composition of MC granules (37). Interestingly, high levels of Fc γ RI and TLR4 receptors in MCs have been associated with increased inflammatory activity, such as in the intestine of Crohn's disease patients (38).

After activation of TLR4, BMMCs produced TNF and IL-6 (29), IL-1 β , and IL-13, but not IL-4 nor IL-5 (39). Whereas phosphorylation of I κ B was maximally detected at 15 min post-LPS addition, TLR4 stimulation did not induce calcium mobilization or degranulation (39), and this result indicated that cytokine secretion after TLR4 in MC is more similar to picemal than to anaphylactic degranulation. Accordingly, HLMCs were able to secrete TNF but not histamine after TLR4 triggering (35). MAP kinases are activated by LPS stimulation of MCs (40).

Important differences between TLR4 signaling in monocytes and MCs have been reported. For example, Btk participates in TLR4-mediated signal transduction in monocytes/macrophages (20) but Btk deficiency moderately enhances or has no influence on the LPS-induced TNF and IL-6 release in BMMCs (41). Regarding to PI3K, recent data indicate that this enzyme negatively controls TLR4-dependent IL-1 β production, but it is necessary for TNF secretion in MCs, suggesting a distinct role of PI3K on TLR4 activity in this cell type compared with monocytes. In MCs, a specific PI3K isoform seems to be involved in the production of a particular profile of cytokines after LPS activation (42).

A recent report has documented that MCs do not show any activity regarding to TRIF-dependent signaling (43). LPS-treated murine BMMCs showed several defects on IRF3 phosphorylation, histone H4 acetylation on IFN- β promoter, and IFN- β secretion due to the absence of TRIF. Those results indicate that the canonical TRIF/TRAM signaling pathway is specific to immune cell type and the lack of this pathway in MCs (located where commensal Gram-negative bacteria are present

too) could be involved in the avoidance of excessive cytokine production and sterile inflammation in those anatomical sites (43). This evidence suggests that, contrary on what occurs in monocytes, TLR4-dependent cytokine secretion in MC could depend on a yet nonreported MyD88 pathway.

COMPLEX CONTROL OF MC CYTOKINE PRODUCTION: CROSSTALK BETWEEN THE HIGH AFFINITY IGE (Fc ϵ RI) AND TLR4 RECEPTORS SIGNALING CASCADE

The relationship between responses to bacterial ligands and allergic diseases have been addressed from long time ago. Recently, certain polymorphisms on CD14 coreceptor were associated with high titers of IgE and atopic reactions (44), and evidence indicating a correlation between some of those polymorphisms on the effect of endotoxin exposure on allergic reactions has been found (45), but no evidence of changes of MCs function has been collected in those reports.

Regarding the studies on isolated MCs, binding of monomeric IgE to the Fc ϵ RI activates a low-intensity but continuous signaling cascade leading to increase survival and maturation of this cell type (46). When antigen is recognized by Fc ϵ RI-bound IgEs, receptor aggregation initiates a complex signaling cascade that activates secretion of preformed mediators, synthesis of eicosanoids, and gene transcription, causing both acute and long-lasting exocytosis of cytokines and chemokines. As activation of TLR4 receptor in MCs activates synthesis and secretion of some of the cytokines also induced after Fc ϵ RI crosslinking, distinct studies have explored the potential crosstalk and the common molecules participating in the signaling after both receptors.

Recent reviews have been published describing the complex Fc ϵ RI signaling cascade (47). Briefly, Fc ϵ RI signals through a system that requires the Lyn-dependent phosphorylation of immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) on the cytoplasmic regions of the signaling subunits of the receptor. Syk is then recruited to the phosphorylated ITAMs and, in turn, phosphorylates some adapters (such as linker of activation of T cells (LAT)) responsible for the formation of supra-molecular aggregates that disseminates the initial signal inside the cell. LAT-dependent activation of phospholipase C- γ leads to inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) and diacylglycerol formation, resulting on intracellular calcium influx and PKC activation necessary for degranulation. A complementary pathway controlled by Fyn-kinase leads to phosphorylation of the adapter non-T cell activation linker and activates PI3K, contributing to calcium mobilization and degranulation (47).

As a number of molecules participating on the Fc ϵ RI signal transduction system in MCs (Lyn, Syk, Btk, PI3K) are also activated after TLR4 triggering in other cell types, it is possible to hypothesize that TLR4-dependent activation of MC utilize those proteins to induce preformed or de novo synthesized cytokine secretion. In this regards, some proximal and distal crosstalk

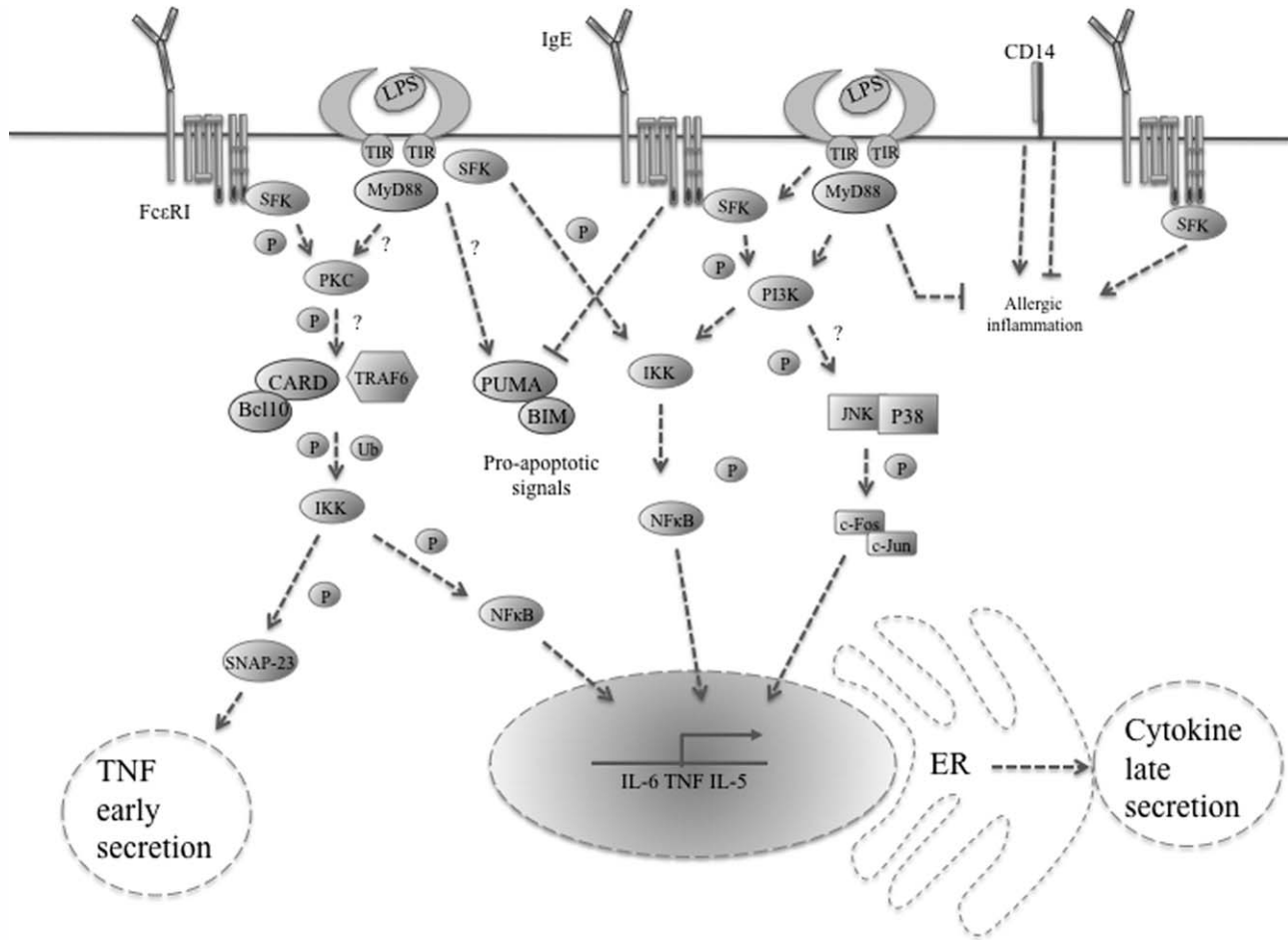


Figure 3. Potential points of crosstalk between Fc ϵ RI and TLR4 in MCs. Both Fc ϵ RI and TLR4 activate AP-1 and NF κ B pathways sharing some common elements such as TRAF6, Bcl10, and MAPK. Fc ϵ RI and TLR4 receptors activate Src family kinases, although substrates of these proteins' downstream TLR4 triggering are not defined yet. Both receptors activate distinct isoforms of PKC leading to Bcl10-CARMA1 complex formation. After Fc ϵ RI crosslinking, IKK (which also can be activated by TLR4) is able to mediate SNAP23 phosphorylation, resulting in early secretion of TNF. Monomeric IgE and LPS can, however, generate opposite signals by inhibiting or activating PUMA and BIM. CD14, it is a coreceptor that can mediate protective or deleterious effects in the development of allergic inflammation.

events between Fc ϵ RI and TLR4 receptor have been described. Recently, it was observed that monomeric IgE increases pro-survival signals by inhibiting the proapoptotic proteins PUMA and BIM that are induced by LPS (48). Other results indicate that monomeric IgE on MCs increases LPS-induced IKK and I κ B phosphorylation, which is reflected in higher secretion of TNF after TLR4 triggering (49). TLR4 and Fc ϵ RI activation can synergistically augment cytokine production (IL-6 and TNF), due to a selective increase on c-Fos and c-Jun phosphorylation. Interestingly, no such synergism was observed on ERK or NF κ B activity (50).

Fc ϵ RI crosslinking provokes the formation of complexes containing CARD domain-containing proteins, such as Bcl10 and CARMA1, to activate IKK complex (51). This classical immunoreceptor pathway to activate NF κ B seems to depend on

the canonical TLR4 signaling protein, TRAF-6. BMDCs derived from TRAF6-deficient mice show decreased LPS-induced IL-6 and TNF secretion, whereas degranulation and C4 leucotriene production remained without change. In the absence of TRAF-6, I κ B phosphorylation and p65 nuclear translocation were diminished, indicating that TRAF6 plays a role in upstream of IKK activation after Fc ϵ RI triggering in MCs. Interestingly, TRAF6 deficiency affected differentially MAPK activity: whereas phosphorylation of p38 and JNK2 was diminished, phosphorylation of ERK1/2 and JNK1 remained without any change (52).

An important recent finding indicates that IKK constitutes an important point of crosstalk between cytokine secretion triggered by Fc ϵ RI and TLR4 receptors in MCs. After Fc ϵ RI activation, IKK phosphorylates SNAP23, a protein responsible for

granule fusion to plasma membrane (53). As IKK is too necessary for NF κ B activation after TLR4 activation, this finding indicates that LPS-dependent activation of IKK could activate some secretion of prestored mediators in MCs. If this is the case, a MyD88-dependent pathway (which leads to the activation of IKK) could be connected with rapid cytokine secretion without the necessity of the TRIF/TRAM-dependent pathway, which seems to be absent of MCs. A summary of the most important interactions between Fc ϵ RI and TLR4 receptors in MCs is presented in Fig. 3.

CONCLUDING REMARKS

MCs have been recently recognized as important elements in innate immune responses against Gram-negative bacteria but signaling through TLR4 receptor in this cell type is far from being fully characterized. Because of their amazing capacity of inflammatory mediator synthesis, storage and release, and the presence of a highly organized secretory machinery operated through the Fc ϵ RI receptor, TLR4 signal transduction cascade can be diversified by new routes of cytokine production controlled by proteins that are yet not a part of the canonical signaling pathway of TLR4 receptor. Characterization of the crosstalk between TLR4 and Fc ϵ RI, and the pathways connecting TLR4 with de novo synthesis of cytokines and secretion of prestored mediators in MCs, will help to understand the mechanisms underlying the numerous protective and deleterious inflammatory reactions where this cell type is involved.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors want to thank Hector Espinosa for reference search. Supported by Conacyt (Grant 83079) to CGE and Scholarship 208218 to AM.

REFERENCES

- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* **30**, 16–34.
- Kawai, T. and Akira, S. (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384.
- Chariot, A. (2009) The NF-kappaB-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer. *Trends Cell Biol.* **19**, 404–413.
- Barton, G. M. and Kagan, J. C. (2009) A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 535–542.
- Kagan, J. C., Su, T., Homg, T., Chow, A., Akira, S., et al. (2008) TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat. Immunol.* **9**, 361–368.
- Husebye, H., Aune, M. H., Stenvik, J., Samstad, E., Skjeldal, F., et al. (2010) The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity* **33**, 583–596.
- Touret, N., Paroutis, P., and Grinstein, S. (2005) The nature of the phagosomal membrane: endoplasmic reticulum versus plasmalemma. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 878–885.
- Murray, R. Z., Kay, J. G., Sangermani, D. G., and Stow, J. L. (2005) A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science* **310**, 1492–1495.
- Murray, R. Z., Wylie, F. G., Khromykh, T., Hume, D. A., and Stow, J. L. (2005) Syntaxin 6 and Vti1b form a novel SNARE complex, which is up-regulated in activated macrophages to facilitate exocytosis of tumor necrosis Factor-alpha. *J. Biol. Chem.* **280**, 10478–10483.
- Sasai, M., Linehan, M. M., and Iwasaki, A. (2010) Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science* **329**, 1530–1534.
- Perera, P. Y., Mayadas, T. N., Takeuchi, O., Akira, S., Zaks-Zilberman, M., et al. (2001) CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J. Immunol.* **166**, 574–581.
- Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., van Gils, J. M., Deng, J., et al. (2010) CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.* **11**, 155–161.
- Hara, H., Ishihara, C., Takeuchi, A., Imanishi, T., Xue, L., et al. (2007) The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **8**, 619–629.
- Liu, Y., Dong, W., Chen, L., Xiang, R., Xiao, H., et al. (2004) BCL10 mediates lipopolysaccharide/toll-like receptor-4 signaling through interaction with Pellino2. *J. Biol. Chem.* **279**, 37436–37444.
- Asehounne, K., Strassheim, D., Mitra, S., Yeol Kim, J., and Abraham, E. (2005) Involvement of PKCalpha/beta in TLR4 and TLR2 dependent activation of NF-kappaB. *Cell Signal.* **17**, 385–394.
- McGettrick, A. F., Brint, E. K., Palsson-McDermott, E. M., Rowe, D. C., Golenbock, D. T., et al. (2006) Trif-related adapter molecule is phosphorylated by PKC{epsilon} during Toll-like receptor 4 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 9196–9201.
- Aksoy, E., Vanden Berghe, W., Detienne, S., Amraoui, Z., Fitzgerald, K. A., et al. (2005) Inhibition of phosphoinositide 3-kinase enhances TRIF-dependent NF-kappa B activation and IFN-beta synthesis downstream of Toll-like receptor 3 and 4. *Eur. J. Immunol.* **35**, 2200–2209.
- Laird, M. H., Rhee, S. H., Perkins, D. J., Medvedev, A. E., Piao, W., et al. (2009) TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 966–977.
- Arndt, P. G., Suzuki, N., Avdi, N. J., Malcolm, K. C., and Worthen, G. S. (2004) Lipopolysaccharide-induced c-Jun NH2-terminal kinase activation in human neutrophils: role of phosphatidylinositol 3-Kinase and Syk-mediated pathways. *J. Biol. Chem.* **279**, 10883–10891.
- Jefferies, C. A. and O'Neill, L. A. (2004) Bruton's tyrosine kinase (Btk)-the critical tyrosine kinase in LPS signalling? *Immunol. Lett.* **92**, 15–22.
- Kang, J. L., Lee, H. W., Kim, H. J., Lee, H. S., Castranova, V., et al. (2005) Inhibition of SRC tyrosine kinases suppresses activation of nuclear factor-kappaB, and serine and tyrosine phosphorylation of IkappaB-alpha in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health A* **68**, 1643–1662.
- Medvedev, A. E., Piao, W., Shoenfelt, J., Rhee, S. H., Chen, H., et al. (2007) Role of TLR4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance. *J. Biol. Chem.* **282**, 16042–16053.
- Chaudhary, A., Fresquez, T. M., and Naranjo, M. J. (2007) Tyrosine kinase Syk associates with toll-like receptor 4 and regulates signaling in human monocytic cells. *Immunol. Cell Biol.* **85**, 249–256.
- Gillfillan, A. M., Austin, S. J., and Metcalfe, D. D. (2011) Mast cell biology: introduction and overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* **716**, 2–12.
- Blank, U. and Rivera, J. (2004) The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol.* **25**, 266–273.
- Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., and Abraham, S. N. (1996) Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* **381**, 77–80.
- Gordon, J. R. and Galli, S. J. (1990) Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* **346**, 274–276.

28. Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Okumura, K., Ra, C., et al. (2001) Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* **167**, 2250–2256.
29. McCurdy, J. D., Lin, T. J., and Marshall, J. S. (2001) Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 977–984.
30. Passante, E. and Frankish, N. (2010) Deficiencies in elements involved in TLR4-receptor signalling in RBL-2H3 cells. *Inflamm. Res.* **59**(Suppl 2), S185–S186.
31. Ushio, H., Nakao, A., Supajatura, V., Miyake, K., Okumura, K., et al. (2004) MD-2 is required for the full responsiveness of mast cells to LPS but not to PGN. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 491–498.
32. Mortaz, E., Redegeld, F. A., Nijkamp, F. P., Wong, H. R., and Engels, F. (2006) Acetylsalicylic acid-induced release of HSP70 from mast cells results in cell activation through TLR pathway. *Exp. Hematol.* **34**, 8–18.
33. Gondokaryono, S. P., Ushio, H., Niyonsaba, F., Hara, M., Takenaka, H., et al. (2007) The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via toll-like receptor 4. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 657–665.
34. McCurdy, J. D., Olynych, T. J., Maher, L. H., and Marshall, J. S. (2003) Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J. Immunol.* **170**, 1625–1629.
35. Okumura, S., Kashiwakura, J., Tomita, H., Matsumoto, K., Nakajima, T., et al. (2003) Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and FcepsilonRI. *Blood* **102**, 2547–2554.
36. Kubo, Y., Fukuishi, N., Yoshioka, M., Kawasoe, Y., Iriguchi, S., et al. (2007) Bacterial components regulate the expression of Toll-like receptor 4 on human mast cells. *Inflamm. Res.* **56**, 70–75.
37. Kirshenbaum, A. S., Swindle, E., Kulka, M., Wu, Y., and Metcalfe, D. D. (2008) Effect of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on human mast cell numbers, cytokine production, and protease composition. *BMC Immunol.* **9**, 45.
38. Kobayashi, R., Okamura, S., Ohno, T., Saito, H., Mori, M., et al. (2007) Hyperexpression of FcgammaRI and Toll-like receptor 4 in the intestinal mast cells of Crohn's disease patients. *Clin. Immunol.* **125**, 149–158.
39. Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Akira, S., Okumura, K., et al. (2002) Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J. Clin. Invest.* **109**, 1351–1359.
40. Masuda, A., Yoshikai, Y., Aiba, K., and Matsuguchi, T. (2002) Th2 cytokine production from mast cells is directly induced by lipopolysaccharide and distinctly regulated by c-Jun N-terminal kinase and p38 pathways. *J. Immunol.* **169**, 3801–3810.
41. Zorn, C. N., Keck, S., Hendriks, R. W., Leitges, M., Freudenberg, M. A., et al. (2009) Bruton's tyrosine kinase is dispensable for the Toll-like receptor-mediated activation of mast cells. *Cell Signal.* **21**, 79–86.
42. Hochdorfer, T., Kuhny, M., Zorn, C. N., Hendriks, R. W., Vanhaesebroeck, B., et al. (2011) Activation of the PI3K pathway increases TLR-induced TNF-alpha and IL-6 but reduces IL-1beta production in mast cells. *Cell Signal.* **23**, 866–875.
43. Keck, S., Muller, I., Fejer, G., Savic, I., Tchaptchet, S., et al. (2011) Absence of TRIF signaling in lipopolysaccharide-stimulated murine mast cells. *J. Immunol.* **186**, 5478–5488.
44. Williams, L. K., Ownby, D. R., Malirak, M. J., and Johnson, C. C. (2005) The role of endotoxin and its receptors in allergic disease. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **94**, 323–332.
45. Simpson, A., John, S. L., Jury, F., Niven, R., Woodcock, A., et al. (2006) Endotoxin exposure, CD14, and allergic disease: an interaction between genes and the environment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**, 386–392.
46. Kawakami, T. and Kitauro, J. (2005) Mast cell survival and activation by IgE in the absence of antigen: a consideration of the biologic mechanisms and relevance. *J. Immunol.* **175**, 4167–4173.
47. Gilfillan, A. M. and Tkaczyk, C. (2006) Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 218–230.
48. Jayawardana, S. T., Ushio, H., Niyonsaba, F., Gondokaryono, S. P., Takenaka, H., et al. (2008) Monomeric IgE and lipopolysaccharide synergistically prevent mast-cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **365**, 137–142.
49. Medina-Tamayo, J., Ibarra-Sanchez, A., Padilla-Trejo, A., and Gonzalez-Espinosa, C. (2011) IgE-dependent sensitization increases responsiveness to LPS but does not modify development of endotoxin tolerance in mast cells. *Inflamm. Res.* **60**, 19–27.
50. Qiao, H., Andrade, M. V., Lisboa, F. A., Morgan, K., and Beaven, M. A. (2006) FcepsilonRI and toll-like receptors mediate synergistic signals to markedly augment production of inflammatory cytokines in murine mast cells. *Blood* **107**, 610–618.
51. Klemm, S., Gutermuth, J., Hultner, L., Sparwasser, T., Behrendt, H., et al. (2006) The Bcl10-Malt1 complex segregates Fc epsilon RI-mediated nuclear factor kappa B activation and cytokine production from mast cell degranulation. *J. Exp. Med.* **203**, 337–347.
52. Yang, Y. J., Chen, W., Carrigan, S. O., Chen, W. M., Roth, K., et al. (2008) TRAF6 specifically contributes to FcepsilonRI-mediated cytokine production but not mast cell degranulation. *J. Biol. Chem.* **283**, 32110–32118.
53. Suzuki, K. and Verma, I. M. (2008) Phosphorylation of SNAP-23 by IkkappaB kinase 2 regulates MC degranulation. *Cell* **134**, 485–495.

Review Article

Signaling through the high affinity IgE receptor and conditions able to modify IgE-antigen responsiveness of mast cells

Claudia Gonzalez-Espinosa¹, Jaciel Medina-Tamayo¹, Elizabeth Sanchez-Miranda¹, Juan Pablo Benitez-Garrido¹, Alejandro Martin Avila-Hernandez¹, A ■ Padilla², and Jonathan Garcia-Roman¹

¹ Pharmacobiology Department, Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV), South Campus, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

² Immunology Department, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

Signaling through the high affinity receptor for IgE (FcεRI) on mast cells comprises an intricate network of protein-protein modifications and interactions leading to mast cell degranulation, lipid-derived mediator production and cytokine release. Depending on the tissue where mast cells are activated, mediator release can induce distinct allergy symptoms. FcεRI receptor mainly couples to at least two Src family kinases (Lyn and Fyn), which are responsible for the initiation of the signaling cascade. Distinct membrane bound adapters couple the initial signal to the formation of particular multi-molecular complexes that, in turn, will mediate a specific final response. In this review we summarize the molecular mechanisms initiated by the FcεRI receptor on mast cells that have been involved in cytokine expression. At the same time, some conditions where the main signal transduction mechanism is modified will be analyzed in order to understand how locally produced mediators could alter IgE-antigen-induced allergic responses.

Keywords: IgE / Mast cell / FcεRI receptor / Infection / LPS / signal transduction

Received: ■, 2007; accepted: November 19, 2007

DOI 10.1002/sita.200700142

Introduction

Cell-to-cell communication is essential for immune system function. Signal transduction mechanisms have to ensure effective, specific and intensity-controlled responses in order to induce coordinated actions against (pathogenic or non pathogenic) non-self agents, and also must guarantee the correct differentiation and localization of the different immune cell types. Signal transduction in the immune system cannot be dissociated from the cell in which it is studied and, frequently, the knowledge of a specific cell function helps to elucidate out the design of a signaling pathway. Plastic changes on the signal transduction mechanism under study are also fre-

quently found, since the presence of many mediators in a given microenvironment alters the final response of a cell to a specific ligand. This happens sometimes because one activated pathway alters the concentration of a limiting enzyme of another pathway, or sometimes because ligands promote immune cell differentiation, which normally means the expression of new response capabilities. This review will summarize some aspects of mast cell biology, the main characteristics of the high affinity IgE receptor (FcεRI) signal transduction system, and will discuss how the presence of microenvironmental mediators can alter the final outcome of FcεRI activation.

Mast cells

Mast cells (MC) were discovered by Paul Ehrlich and described in his doctoral thesis presented on June 17, 1878. The first description of the mast cell came when he discussed some histological applications of the aniline

Correspondence: Claudia Gonzalez-Espinosa, Pharmacobiology Department, Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav), South Campus, Calzada de los Tenorios #235, Col. Granjas Coapa, Tlalpan, D.F. CP 14330, Mexico City, Mexico
E-mail: cgonzal@cinvestav.mx
Fax: +55 50 612863

dyes: he found those compounds showed metachromasia when interacting with mast cell granules. Paul Ehrlich described those cells as “Mastzellen” due to their tendency to be found around “developing preformed structures in the connective tissue” [1].

Almost 130 years after their official discovery, mast cells are still intriguing elements of the immune system, mainly associated with allergies and hypersensitivity reactions, but also clearly involved in innate immune responses, vascular permeability control, inflammation triggering and wound repair processes [2]. It is now accepted that mast cells derive from CD34⁺, CD43⁺, CD13⁺ and *c-kit*⁺ bone marrow precursors, which migrate to all vascularized tissues finishing their differentiation under the influence of locally produced mediators [3]. Mast cells reside in the proximity of blood vessels, nerves and epithelia but they are also abundant in the gastrointestinal tract and in the airways [4]. Although the human peritoneal cavity is practically free of mast cells, in rodents peritoneal mast cells are abundant and can be collected for *in vitro* research [5]. In general, mast cells can be easily recognized by the presence of numerous granules containing distinct inflammatory mediators, such as histamine, proteases and several preformed cytokines. The granules are released after mast cell activation in a process known as degranulation and the liberated substances exert different actions depending on the surrounding tissues.

Mast cells came onto stage as one important piece of the puzzling anaphylactic reactions when, in 1953, Riley and West demonstrated the relationship between the tissue contents of mast cells and histamine release, proposing the mast cell as the source of tissue histamine [6]. In the 1960s and 70s an important effort was directed towards understanding mast cell biology with the expectation of finding more effective treatments against allergic diseases. It was recognized that mast cells are indeed key effector cells in IgE-dependent hypersensitivity reactions, since mast cells express on their surface a high affinity receptor for the Fc fraction of the IgE (named the FcεRI receptor). This receptor becomes active after the crosslinking mediated by the interaction of IgE with a specific allergen (antigen) [7]. In people with a tendency to allergies (atopic individuals), IgE levels usually are elevated [8], and the FcεRI of their mast cells are occupied by IgE antibodies ready to respond to the presence of antigen [9]. When allergen appears, receptor activation induces inflammatory mediator release even with very low amounts of antigen, producing the symptoms of any of the most common allergic diseases, such as rhinitis, allergic asthma, atopic eczema or, even, anaphylactic shock [10]. All biological and pathological functions of mast cells are considered to be a consequence of the release of

substances belonging to three main groups: 1. preformed mediators contained in secretory granules, such as histamine, neutral proteases, and β-hexosaminidase, among others; 2. *de novo* synthesized lipid-derived inflammatory mediators (such as prostaglandins and leukotrienes), and 3. preformed and *de novo* synthesized cytokines, growth factors and chemokines [10].

One of the most striking features of the FcεRI-induced activation of mast cells is the long-lasting induction of synthesis of multiple cytokines. Diverse mediators such as interleukin (IL) -1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, GM-CSF (granulocyte and monocyte colony stimulating factor), IFN-γ (interferon γ), TCA3, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), MIP-1α, MIP-1β, MIP-2, TGF-β (transforming growth factor β), TNF-α (tumor necrosis factor α), RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted), MIF, ET-1, and MARC [11] have been reported as newly synthesized mRNAs or secreted proteins after FcεRI activation. Those findings indicated that signal transduction through the FcεRI receptor was able to induce rapid and controlled changes in mast cell metabolism, from enzyme activation and granule release to gene transcription, leading to the production of inflammatory mediators that are able to recruit more cells. Depending on the tissue and the temporal pattern where those cytokines are produced, distinct rapid and long-lasting changes can occur, such as acute and chronic inflammation or tissue remodeling, in the case of asthma [10].

Not only detrimental roles (triggering allergies) have been associated with mast cell function. Mice deficient in mast cells rapidly die after bacterial infections in lung and body cavities or are unable to rid themselves of parasite invasion. Release of inflammatory cytokines, particularly TNF-α from mast cells, and the associated recruitment of inflammatory cells, are an important component of the protective action of mast cells against infection [12]. The activation of mast cells during infections with microorganisms is dependent on the direct action of bacterial products on “pattern recognition receptors” (Toll-like receptors, TLRs), that recognize structural patterns in molecules common to microorganisms. Particularly, the discovery of the protective role of mast cell TLR-4 activation [13], has led to what seems to be the main physiological role of this cell type: to provide a first-line defense mechanism against acute bacterial and parasitic infections.

In contrast with the responses observed with IgE-antigen stimulation, TLR responses seem to be more dependent not on degranulation, but on selective and long lasting cytokine production, which mediates long-term changes in the surrounding tissues, inducing primarily

cell recruitment and inflammation. Given the fact that mast cells are important players in IgE mediated adaptive immune responses and also play an essential role in host defense against different pathogens, this cell type occupies a central place in the orchestration of immune system responses, and the study of the mechanisms that control its activation *via* Fc ϵ RI and TLR-4 receptors is nowadays a challenging and promising research field.

Distinct mast cell preparations have been used to elucidate the Fc ϵ RI signal transduction system [14], particularly freshly isolated peritoneal mast cells, immortalized mast cell lines (like RBL-2H3, MC-9, MHC-1), and murine bone marrow-derived-mast cells (BMMCs) from wildtype or specific knock out mice. Data obtained from those preparations have shown a remarkably sensitive and specific mechanism connecting antigen recognition through IgE, with selective gene expression.

The Fc ϵ RI and its signal transduction mechanism

The Fc ϵ RI receptor is a multimeric protein that binds Fc fraction of IgE and subsequently can be aggregated by the interaction of the receptor-bound IgE with a specific antigen. This receptor belongs to the immunoglobulin-receptor superfamily, in which the B-cell receptor (BCR) and the T-cell (TCR) receptor are also classified. Several complete reviews have been published recently to address the complexity of the signal transduction pathways activated by the high affinity IgE receptor [15,16], so, in this section, we only will give a brief description of the main molecular events that occur after receptor triggering.

Murine Fc ϵ RI receptor structure comprises four polypeptides, an IgE binding α chain, a β chain that serves to amplify its signaling capacity, and two disulfide-linked γ chains [17]. In humans, $\alpha\gamma_2$ and $\alpha\beta\gamma_2$ complexes exist in the membrane of mast cells and basophils. In humans, β chain expression is highly restricted and its principal role is to amplify receptor expression by promoting maturation and trafficking of an associated α chain [18]. The β and γ chains of Fc ϵ RI contain immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs), which, after tyrosine phosphorylation, initiates a complex signaling cascade [19]. The presence of antigen causes crosslinking of the receptor, mast cell degranulation, intracellular calcium mobilization, cytoskeletal re-arrangements and activation of different transcription factors that induce cytokine gene transcription culminating with cytokine secretion.

The cascade initiates with the crosslinking of the receptor, which, in turn, induces the phosphorylation of the

ITAMs by Src family kinases (Lyn and Fyn) [20], creating docking sites for proteins containing SH2 domains, such as Syk kinase, (Figure 1). Syk binding to the phosphorylated γ ITAM causes its autophosphorylation and, at the same time, converts Syk into a substrate of Lyn kinase. The result of this group of interactions is a fully active form of Syk, able to phosphorylate distinct proteins inside the cell, like the adapter protein LAT (linker of activation of T-cells) [21]. LAT phosphorylation creates docking sites for other proteins that translocate from the cytosol and form a supramolecular activating complex (SMAC) at the lipid rafts in the plasma membrane. LAT scaffolded proteins include Phospholipase C (PLC) γ 1 and γ 2, Vav1, SLP 76 (SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa), Gads (Grb2-related adaptor protein), Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), and Sos (son of sevenless) among others, like Ras [22]. A large signal transduction complex can thus form at the plasma membrane in which tyrosine phosphorylation, allosteric effects of binding, and membrane localization of new elements contribute to functional activation of its enzymatic components. This is exemplified by the case of Bruton's tyrosine kinase (BTK), which, cooperatively with Syk, activates PLC γ , leading to diacylglycerol (DAG) generation and inositol 1,4,5 triphosphate (InsP $_3$)-induced Ca $^{2+}$ mobilization [23]. The fundamental role of Lyn kinase in this pathway has been demonstrated by the study of signal transduction in mast cells derived from Lyn $-/-$ mice: those cells have a remarkable decrease in Ca $^{2+}$ mobilization after Fc ϵ RI crosslinking [24].

After Fc ϵ RI receptor crosslinking, an alternative (non LAT-containing) complex is formed upon activation of the Src family kinase Fyn. This complex is scaffolded by another adapter, named Gab2 (GRB2-associated binding protein 2) and includes PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase) and SHP-2 (SH2-containing protein phosphatase 2) [24] (Figure 1). Fyn associates to the Fc ϵ RI β chain and, after receptor crosslinking, Fyn becomes activated and phosphorylates Gab2. Phosphorylated Gab2 binds to the SH2 domain of the p85 subunit of PI3K, recruiting the p110 catalytic subunit to the membrane, where it phosphorylates PI-4,5-P2 (PIP2) to generate PI-3,4,5-P3 (PIP3). This messenger recruits a number of PH domain-containing proteins, including Btk (which is then phosphorylated by Lyn and autophosphorylates for full activation), PLC γ 1, PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase 1, which phosphorylates Akt), and Akt (which enhances cell survival and cytokine production). This complementary pathway has been shown to be important for mast cell degranulation, leukotriene production and for the activation of NF κ B (nuclear factor κ B) transcription factor [25], but seems to have a minor role (if any) on calcium

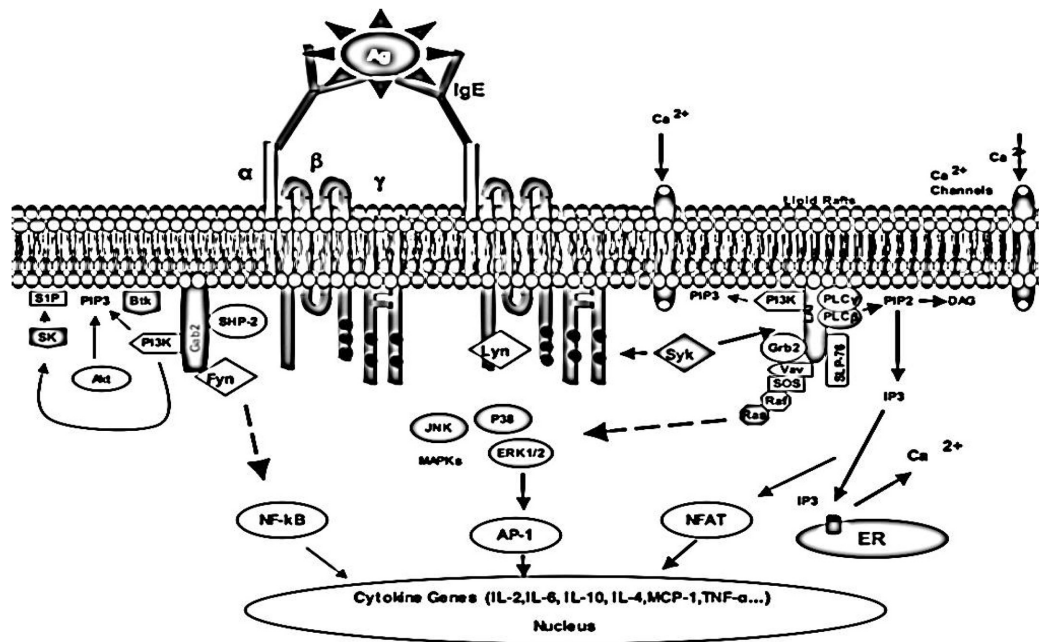


Figure 1. Early complexes and signaling pathways activated after Fc ϵ RI crosslinking. Receptor crosslinking activates Lyn which phosphorylates ITAM sequences located in the β and γ subunits of the Fc ϵ RI (black circles). Syk translocates to the phosphorylated ITAMs and becomes active, phosphorylating adapter protein LAT. Phosphorylated residues in LAT serve as docking site for proteins involved in MAP kinase activation, IP $_3$ production, PKC activation, calcium mobilization and NFAT dephosphorylation. Fyn kinase initiates the formation of a second complex (outside lipid rafts) scaffolded by Gab2. This complex seems to be responsible for PI3K activation and NF κ B translocation to the nucleus, where, together with AP-1, NFAT and other transcription factors, it activates the synthesis of multiple inflammatory cytokines. See text for details.

mobilization [24]. The role of Syk in this particular pathway remains to be addressed, since it is clear that degranulation, calcium mobilization and cytokine expression are abolished in Syk-deficient mast cells [26]. The Fyn/Gab2/RhoA pathway plays a critical role in the calcium independent microtubule polymerization, which is necessary for a correct granule mobilization to the plasma membrane and degranulation [27]. On the other hand, some pieces of evidence show that a Fyn-dependent PI3K/Rac2- pathway is involved in F-actin reorganization, polarization and chemotaxis of mast cells [28].

Some protein kinase C (PKC) family members have an essential role in IgE-antigen mast cell activation. PKC α , β , δ , and ϵ translocate to the membrane after Fc ϵ RI stimulation [29]. Distinct isoforms can mediate specific actions in the signaling process, for example: PKC δ is involved in γ chain phosphorylation and mast cell secretion [30], PKC β is involved in the synthesis of Fos-interacting protein [31] and the synthesis of IL-6 and IL-2 [32]. PKC ϵ is responsible for c-Fos and c-Jun expression [33] and PKC α has been recently identified as the isoform regulating TNF- α production [34]. In BMMC derived from Fyn $-/-$ mice, degranulation is impaired and PKC δ is less phosphorylated in basal and IgE-antigen stimulated condi-

tions [24]. On the other hand, it has been demonstrated that PKC δ associates with Lyn in RBL cells after Fc ϵ RI stimulation and that PKC δ phosphorylation in Lyn $-/-$ BMMCs is increased even under basal conditions [24].

Other enzymes have been recently involved in degranulation control, such as sphingosine kinase 2 (SPHK2). This enzyme has been described as the main regulator of intracellular Sphingosine 1 phosphate (S1P) levels in mast cells, leading to PKC and NF κ B activation, degranulation, lipid mediator production and cytokine synthesis. SPHK2 controls degranulation through the modulation of extracellular Ca $^{2+}$ influx to the cell after Fc ϵ RI crosslinking [35].

Mitogen-activated-protein (MAP) kinase activation has been described after Fc ϵ RI crosslinking; ERK1 and 2 (extracellular-signal-regulated kinases 1 and 2), p38 and JNK (JUN amino terminal kinase) become active after LAT complex formation [36], primarily because Ras shifts to its active (GTP-bound) state [37] and positively regulates Raf.

Activation of different pathways and MAP kinases activate transcription factors such as AP1 (activator protein 1), NFAT (nuclear factor of activated T cells) and NF κ B, controlling multiple cytokine gene transcription. How-

ever, additional pathways can be engaged by receptor crosslinking in the membrane and some transcription factors (such as NF κ B) can be activated using specific membrane adapters, such as B cell lymphoma 10 (Bcl10) and mucosa-associated lymphoid tissue 1 (Malt1) [38]. Malt1 deficient mast cells show normal tyrosine phosphorylation patterns and activation of MAPK p38, ERK1-2, JNK or Akt, after Fc ϵ RI crosslinking, or direct PKC activation. In contrast, both Bcl-10 and Malt1-deficient cells are totally defective in Fc ϵ RI and PKC mediated, IKK-induced I κ B-phosphorylation and its subsequent proteasomal degradation [38]. Bcl10 and Malt-1 operate as key regulators of Fc ϵ RI or PKC induced NF κ B activation and control a specific PKC-downstream pathway in mast cells that is dispensable for degranulation and leukotriene synthesis, but essential for inflammatory cytokine production.

Calcium signals result in the activation of transcription factors, such as NFAT. Probably the best studied Ca²⁺-responsive signaling pathway in mast cells involves the phosphatase Calcineurin, which dephosphorylates NFAT proteins, following an increase in intracellular Ca²⁺ concentration, and leads to its nuclear translocation [39]. In some mast cell preparations, calcium-dependent transcription is associated with the expression of distinctive isoforms of NFAT transcription factor [40].

Functional characteristics of the Fc ϵ RI signal transduction system.

The intensity of the signal determines specific cell responses

The signal transduction mechanism of the Fc ϵ RI contrasts with others in which the intermediate steps do not involve the interactions of so many proteins (*i.e.* the nicotinic acetylcholine receptor, in which ligand binding opens an ion channel upon ligand binding). The signal is not immediately generated in a receptor that utilizes an itinerant tyrosine kinase for signaling [41]. Instead, several intermediate steps must occur in order to generate the signals producing required cellular responses. Given the fact that multiple proteins are recruited and activated forming distinct aggregates in the plasma membrane, signal generation is diverse, but it is not an immediate event.

This structure of the Fc ϵ RI signal transduction system allows the cell to discriminate among ligands depending on the time that the ligand-receptor interaction occurs (given by the ligand-receptor dissociation constant). Kinetic proofreading [42] is a theoretical model that has been proposed to explain the characteristics of the Fc ϵ RI

receptor and other members of the immunoreceptor family. In this model of cell signaling, full cell responses occur only when a bound receptor undergoes a complete series of modifications or complex formation, and short-lived (nonspecific) complexes should usually fail to signal before dissociating. On the contrary, stable, (specific) complexes will remain associated for a long time and will generate effective intracellular signals. If the ligand dissociates before all the modifications occur, the receptor returns to its basal state and signaling does not occur [43].

The stability of the initial complexes is important to form large aggregates of multiple receptors and associated proteins in the plasma membrane. The fraction of complexes in large aggregates will be high in the presence of a high affinity ligand and they will generate signals capable of inducing full cell activation. Small aggregates would have more problems to sustain the modifications required to grow and form large aggregates; however, a few early enzymes could be associated to the scaffolding proteins and could become active before the large aggregate forms. An impressive conclusion of the application of this model is that small clusters (formed by a few crosslinked receptors, adapters and enzymes) are predicted to generate signals *distinct* from those of larger aggregates (with many receptors, adapters and enzymes) [43]. *Specificity* in this signal transduction system is given by the life span of the aggregates, which will reflect their size and the amount of different proteins associated to them.

The role of signaling molecules that are generated by aggregated receptors, but do not remain associated with the receptor complex has been investigated [44]. It has been shown that when the signal for certain cellular events depends on a diffusible messenger (*i.e.* calcium ions), which diffuse early in the signaling process, the response can escape from the classical kinetic proofreading model, and cellular effects can be observed to be exactly the same for a high affinity or a low affinity ligand (or for large or small aggregates). However, it is possible that the amounts of messenger produced are quite different for the two ligands, but both are above the threshold amount needed for maximal induction of the equally-induced cellular responses [44].

Thus, the main result of the Fc ϵ RI-signal transduction mechanism is that some signals depend on large, fully constituted aggregates, while the other depends on intermediate states of aggregation. For a low affinity ligand, concentrations of larger aggregates are lower, but concentrations of some smaller aggregates are higher than those for the high affinity ligand [44]. According with this, some responses, initiated by intermediate states,

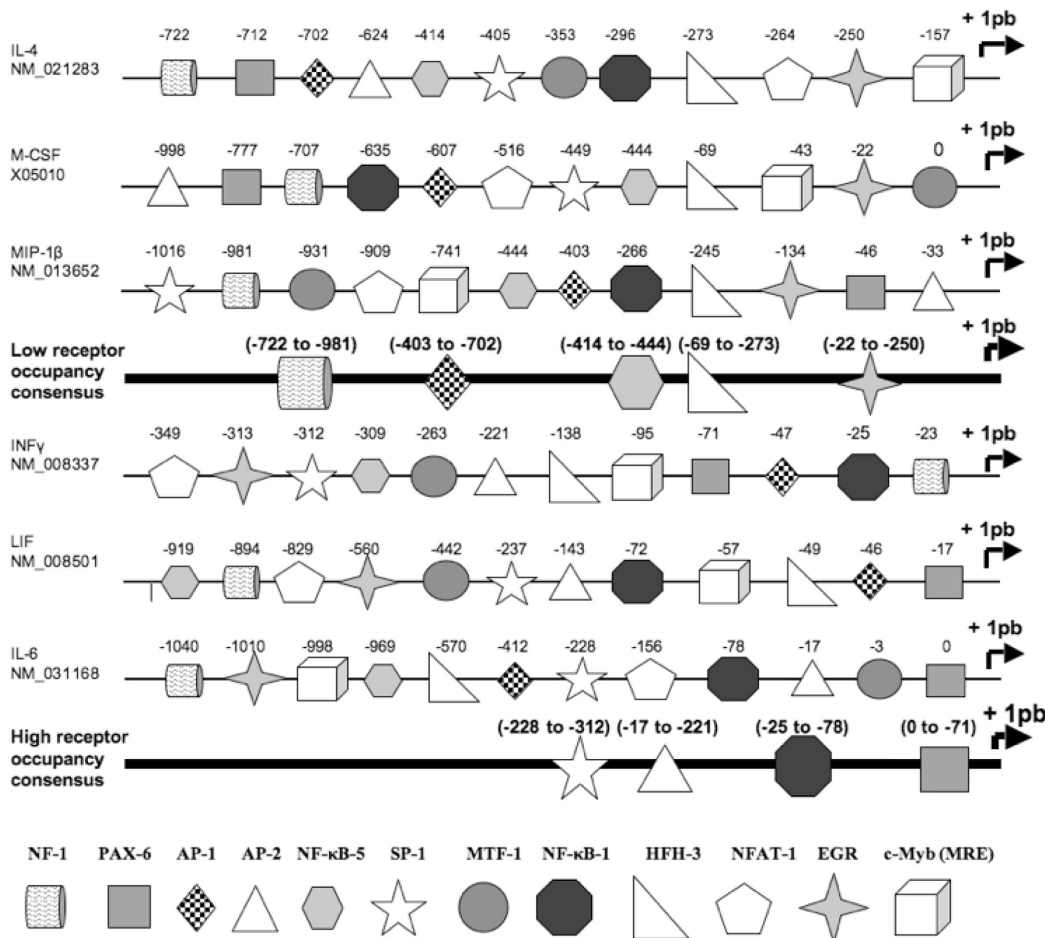


Figure 2. Bioinformatic analysis of murine cytokine promoters. Cytokine gene sequences were downloaded from the GenBank data base and promoter regions were located using tools located on the PromoSer website http://cagt.bu.edu/page/Promoser_submit. Promoter sequences were scanned for 52 different transcription factor sequences using the BioEdit program <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. Transcription factor sequences located in each promoter were aligned, looking for a specific pattern of sequences common to cytokine genes induced with low or high levels of Fc ϵ RI stimulation in murine mast cells. For clarity purposes, only 12 transcription factor sequences are shown. Accession numbers of the analyzed sequences are: IL-2, NM_008366, analyzed promoter region 1000pb; MIP-1 α , NM_011337, analyzed promoter region 1000pb; MCP-1 NM_002982, analyzed promoter region 1000pb; IL-3, NM_010556, analyzed promoter region 304pb; IL-10, NM_010548, analyzed promoter region 603pb; IL-13, NM_008355, analyzed promoter region 491pb; MIP-2, NM_009140, analyzed promoter region 302pb; TNF α , NM_013693, analyzed promoter region 1000pb. Only three cytokines induced with low-level of stimulation of Fc ϵ RI and three cytokine gene promoters induced with high-level of Fc ϵ RI crosslinking are shown. Consensus recognition sequences for specific transcription factors were taken from the literature: for NF κ B1, gggattccc; NF κ B5, ggggcttccc; AP-1, ctgactaa; NFAT, gaggaaattgtttcatcagaag; AP-2, ccccgaggc; SP-1, ccccggggocgg; EGR, gcgggggtg; NF-1, aaactgcagcca; MTF-1, ctctgcacacggccc; HFH-3, cgtgtttatgta; c-Myb (MRE), taacgg; PAX-6, tcaccg.

can be as high for the low affinity ligand as those for the high affinity ligand, and they can be *specific* for *some* cellular responses.

A detailed study on cytokine expression, in distinct conditions of Fc ϵ RI crosslinking, revealed that a very distal response, like gene expression, reflects the complexity of this signal transduction system [45]. Stimulating murine BMMCs, differences in antigen concentrations or the

extent of Fc ϵ RI occupancy with antigen-specific IgE were reflected in differential cytokine mRNA production. Results indicate that lymphokines which promote allergic inflammation, like MIP-1 α , MIP-1 β , and MCP-1, are induced at low antigen concentrations or at low receptor occupancy with IgE, whereas other lymphokines that down regulate this response, like IL-10, required high receptor occupancy. The "low occupancy" -induced cyto-

kines included also IL-4 and M-CSF, whereas the “high occupancy” -induced group included IFN γ , LIF, IL-6 and TNF- α .

Weak stimulation of Fc ϵ RI causes minimal degranulation but a half-maximal secretory response for inflammatory mediators. Weak stimulation also favored the phosphorylation of Gab2 and p38 MAPK, while LAT and ERK2 phosphorylation was induced by a stronger stimulus. Gab2 deficient mast cells were severely impaired in chemokine mRNA induction (genes induced with a low-intensity stimulus) whereas LAT-deficient mast cells showed a more pronounced defect on regulatory cytokines (genes induced with a high intensity stimulus) [45].

A bioinformatic analysis has been done on the promoters of the two different groups of cytokine genes, in order to find common elements for gene transcription among the genes induced with low or high intensity signals (Figure 2). Cytokine promoters containing NF-1 binding sites around -700 to -1000 pb, AP-1 binding sites around -400 to -700 pb, SP-1 binding sites around -400 to -450 pb, HFH-3 binding sites around -60 to -280 bp, and EGR binding sites around -20 to -250, were induced with low intensity signals. Cytokine gene promoters containing SP-1 binding sites around -220 to -320 bp, NF κ B1 binding sites around -20 to -80 bp, AP-2 consensus sites around -10 to 220 bp and PAX-6 binding sites around -1 to -80 bp, were induced at higher levels of stimulation. The organization of cytokine genes shows a high degree of complexity, suggesting that many different factors can differentially contribute to full promoter activity; and the functional activity of all these sites in mast cells after Fc ϵ RI crosslinking has not been reported. However, the concerted participation of specific transcription factors, depending on the strength of the signal coming from the aggregates in the plasma membrane, cannot be ruled out.

Inhibitory signals can be produced early in the activation process

One of the most intriguing results in the Fc ϵ RI signal transduction research field was the observation that mast cells derived from Lyn $-/-$ mice were hyperresponsive to IgE-antigen stimulation [46], this was caused by hyperactivation of the second Src-family kinase coupled to the receptor (Fyn). When negative regulatory pathways of Src kinase activity were analyzed in those cells, it was found that Lyn $-/-$ cells were unable to get Cbp phosphorylated, which in turn, abrogates the negative control that Csk kinase has on Fyn. The consequences of this defect were hyper-degranulation of *in vitro* cultured BMMCs and increased levels of histamine in the plasma of Lyn $-/-$ mice challenged with IgE-antigen [46]. Lyn activation is one of the earliest events of Fc ϵ RI signaling process, and

it is associated with the receptor even under resting conditions. However, it has become clear that it is able to generate negative signals for the pathways leading to degranulation.

Assuming a signal transduction mechanism where distinct aggregate size determines the specific composition of supra-molecular aggregates, and that the function of one enzyme can be distinct depending on the amount of the signal applied, a series of experiments were done where upon low intensity stimulation of Fc ϵ RI on BMMCs derived from Lyn $-/-$ animals [47]. It was found that Lyn positively regulates degranulation, cytokine production and survival, through Akt and p38 activation, only in conditions of low intensity stimulation [47]. On the other hand, under high-intensity stimulation, Lyn exerted a negative control on the measured parameters. Studies of mutant β chain-containing Fc ϵ RI receptors, suggested that Lyn associated to the β subunit ITAM motif regulates degranulation and cytokine production positively and negatively depending on the intensity of Fc ϵ RI stimulation [47].

The molecular organization of the Fc ϵ RI-signal transduction system allows the cell to take decisions based on the amount of signal generated at the plasma membrane. Different responses of mast cells seem to show specific thresholds of activation (survival or chemokine synthesis seems to require a weaker strength of stimulation than degranulation). However, intensity is not only regulated by the amount of antigen: it also depends on the generation of positive or negative signals coming from membrane complexes and sometimes, from the same enzymes. This has special relevance if it is considered that allergies are nothing else than *hypersensitivity* reactions, in which the threshold of activation looks different between a healthy and an allergic individual. The causes of such hypersensitivity could be located on the kinetics of receptor aggregation or in the lack of negative early signals in Fc ϵ RI crosslinking. A successful therapy for allergic diseases must consider the fact that inhibition of one element of the pathway could change the equilibrium exactly in the opposite direction that has been predicted.

Remodeling the main signal transduction mechanism: the influence of locally-produced mediators

One of the most exciting aspects of cell signaling in the immune system is the capacity of the immune cells to adapt their response mechanisms to the local environment where they are found. Tissue-specific mediators contribute to the final maturation of distinct immune cell lineages, such as mast cells. Once located in a particu-

lar microenvironment, the main Fc ϵ RI signal transduction mechanism can be modified, suffering some adaptive changes, which, in turn, will define the final and specific response against IgE-antigen complexes.

Influence of TGF- β on mast cell responsiveness to Fc ϵ RI stimulation

Resident pulmonary mast cells and their activation *via* the Fc ϵ RI receptor have been involved in the development of allergic asthma [48]. After the initial inflammatory reaction, triggered by the release of mediators, distinct cell types (especially eosinophils) are attracted to the lung [48]. Those cells also secrete inflammatory mediators that advance the reaction to a chronic stage. Under those conditions, local production of TGF- β occurs and has been involved in lung remodeling during prolonged allergen challenge [49]. An antibody against TGF- β 1 administered during the chronic phase of allergen-induced airway inflammation, reduced airway remodeling decreasing the mean density of peribronchiolar and subepithelial matrix deposition, but had no effect on established inflammation, probably initiated by mast cell activation [50]. The existence of those conditions, where remodeling and inflammation converge in the same tissue, has motivated the study of the influence of TGF- β on mast cell function and responsiveness to IgE-antigen complexes.

The TGF- β superfamily, including TGF- β , activins and bone morphogenetic proteins, play a prominent role in the development, homeostasis, and repair of virtually all tissues in organisms, from nematodes to vertebrates, which accounts for a substantial portion of the intercellular signals governing cell fate [51]. TGF- β 1 first binds to T β RII, which then alters its conformation so that it can be recognized by T β RI. This sequential binding of TGF- β brings the two receptors in close proximity and the type II receptor, which is constitutively active, phosphorylates three serine and two threonine residues in the BS domain of T β RI. With this change, the dormant serine-threonine protein kinase of T β RI becomes activated and forms an active receptor complex. Smad 2 is bound to a type I receptor in association with SARA (Smad anchor for receptor activation). Upon activation of the receptor complex, Smad 2 becomes phosphorylated, detaches from the receptor and associates with the common mediator Smad4. Together they translocate to the nucleus and bind to DNA at the SBE (Smad Binding Element). Binding also occurs through the interaction of Smads with transcriptional co-factors [52].

TGF- β is a potent chemoattractant for mast cells facilitating their migration to sites of inflammation. Using a microchemotaxis assay, it has been demonstrated that

TGF- β stimulates human mast cell migration [53]. This migration toward TGF- β requires the interaction with extracellular matrix, and integrins are the major molecules involved in this process. TGF- β mediates expression of α_E integrin in mucosal mast cells, which facilitates the retention of cells inside the epithelium [54]. TGF- β stimulates adhesion of PMA-stimulated mast cells to laminin-1; and expression of laminin-binding integrin α_7 was observed when TGF- β was added [55].

The TGF- β -Smad3 pathway is important for mast cell growth. The doubling time of mast cells derived from Smad3 null mice was longer than those coming from WT mice, and an inhibitor of TGF- β type I receptors (SB431542) blocked cell proliferation in WT BMMC [56]. In a particular microenvironment like the murine gut, the specific mucosal mast cell phenotype is importantly driven by the presence of TGF- β [57], as judged by the presence of the mast cell protease mMCP-1.

Controversial data have been reported about the effects of TGF- β on the Fc ϵ RI receptor signal transduction system. In rat peritoneal and human intestinal mast cells, long-term incubation with TGF- β induced a reduction in histamine and TNF- α production after IgE-antigen stimulation [58, 59]. When mouse BMMC were incubated for 3 days in the presence of TGF- β , an inhibition of membrane Fc ϵ RI receptor expression was observed. Lower levels of the α , β and γ receptor subunits were detected but there was no change in their mRNA expression [60]. However, the presence of TGF- β did not affect β -hexosaminidase release induced by IgE-antigen or by calcium ionophore A23187, nor leukotriene C $_4$ secretion in BMMCs treated acutely (24-48hrs) or chronically (7-14 days) with TGF- β [61].

Effect of LPS on mast cell responsiveness to Fc ϵ RI stimulation

Toll-like receptors (TLR) are a family of pattern recognition receptors known to play an important role in host defense. TLR4 is the major signaling molecule for most types of bacterial lipopolysaccharides (LPS) [62].

TLRs have a conserved region of 200 aminoacids in their cytoplasmic tails, which is known as the Toll/IL-1R (TIR) domain. Stimulation of the TLRs triggers the association of MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) which, in turn, recruits IRAK4 (IL-1R associated kinase 4), thereby allowing the association of IRAK1. TRAF 6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6) is also recruited to the receptor complex, by associating with phosphorylated IRAK 1. Phosphorylated TRAF 6 and IRAK 1 then dissociate from the receptor and form a complex with TAK1 (transforming growth β activated kinase), TAB1 (TAK binding protein 1) and TAB2 in

the plasma membrane, which induces the phosphorylation of TAB2 and TAK1, IRAK is degraded in the plasma membrane and the remaining complex (consisting on TRAF6, TAK1, TAB1 and TAB2) translocates to the cytosol where it associates with the ubiquitin ligases UBC13 (ubiquitin conjugase 13) and UEV1A (ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1). This leads to the ubiquitination of TRAF6, which induces the activation of TAK1, TAK 1, in turn, phosphorylates both mitogen-activated protein (MAP) kinases and the IKK complex, which consists of IKK- α , IKK- β and IKK- γ . The IKK complex then phosphorylates I κ B, which leads to its ubiquitination and subsequent degradation. This allows NF- κ B to translocate to the nucleus and induce the expression of its target genes [63, 64].

Bone marrow-derived mast cells express mRNAs for TLRs 2, 4, 6, and 8 but not TLR5, allowing these cells to respond to many bacterial products such as Peptidoglycan from different Gram positive and Lipopolysaccharide from Gram negative bacteria. Distinct studies have tried to elucidate the signaling pathways activated by the TLRs expressed in BMMCs and now it is known that LPS from *E. coli* (a TLR4 activating ligand) does not provoke BMMC degranulation or calcium release, but stimulates cells, in a TLR4 dependent manner, to produce TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-13 but not IL-4 or IL-5 [13, 65].

The interesting observation, that LPS induces cytokine expression without degranulation, indicates that mast cells possess the capacity to modulate independently those two events. The physiological consequence is evident, as TLR4 activation could induce inflammation in the surrounding tissue without the damage due to the release of granule proteases. In a model of experimental asthma in mice, it has been shown that the presence of bacterial LPS enhances the levels of eosinophilic airway inflammation after mast cell activation, and the activation of TLR-4 receptors in pulmonary mast cells is mainly responsible for this effect [66].

To date, no clear crosstalk has been described between the TLR4 and the Fc ϵ RI-signal transduction systems, and no description of molecular influence of one over the other has been made. However, since a common feature of those systems is the activation of NF- κ B, it is possible that the presence of LPS could sensitize the Fc ϵ RI signal transduction system in order to respond earlier and stronger to lower amounts of antigen, providing a molecular explanation of the data indicating a worsening in the allergic symptoms during or after bacterial infection [67]. On the other hand, earlier activation of NF- κ B (*via* LPS) could partially desensitize the Fc ϵ RI signal transduction pathway leading to inflammatory cytokine synthesis.

An interesting point of crosstalk between the TLR4 and Fc ϵ RI signal transduction systems is the activation of PI3K. PI3K can interact with MyD88 in response to LPS in a TAK1 and TRAF6 dependent fashion [68]. Experimental evidence indicates that PI3K activation, after TLR4 triggering, can positively or negatively control cytokine gene expression. In HMEC, a dominant negative mutant of p85 inhibited most NF- κ B luciferase activity, IL-6 production and I κ Ba degradation elicited by LPS [69]. In RAW 264.7 cells, which are transfected with an isoform-specific kinase-dead mutant of class I PI3K (Mp110- Δ kin-myc), LPS treatment reduced NF- κ B luciferase activity as well as IL-6 and TNF- α secretion [70]. Despite that positive role of PI3K on NF- κ B activation, in splenic dendritic cells (DC) and in bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) isolated from PI3K-/- mice, IL-12 mRNA synthesis and secretion, as well as p38 activity, were enhanced with LPS treatment. IL-12 mRNA increase was mimicked by the treatment of the cells with wortmannin, an inhibitor of PI3K activity [72]. In monocyte-derived dendritic cells the pre-treatment with wortmannin or LY294002 enhanced IFN- β expression, IKK α / β phosphorylation, I κ Ba degradation and p65/p50 translocation to the nucleus after a treatment with LPS [72]. Prolonged LPS treatment of murine BMMCs causes changes in specific cytokine gene expression after IgE-antigen stimulation, and Fyn kinase seems to be involved in a LPS-induced remodeling of the Fc ϵ RI signaling pathway (unpublished results). Future work, on this particular area, will help to understand how the activation of several pathways contributes to increase the response to distinct ligands, *i.e.* enhanced LPS responsiveness has been associated with an increased activation of NF- κ B, but also with a reduced activation of the PI3K-Akt pathway [73].

Concluding remarks

During the last years, significant advances have contributed to our understanding of how the high affinity IgE receptor forms distinct supramolecular aggregates on mast cell plasma membrane and transduces signals causing degranulation and cytokine synthesis. A still incomplete but, at the same time, quite detailed description of the molecular events leading from Fc ϵ RI crosslinking to Src kinase activation, adapter phosphorylation, enzyme translocation and production of diffusible second messengers has emerged from distinct biochemical studies. However, some questions are still elusive and remain as future challenges. One of them is formed by the numerous mechanisms of negative control that must exist in order to turn off signaling once the large aggregates are

formed. A number of lipid and protein phosphatases are incorporated to distinct complexes. Their activation, together with other non-typical negative regulators, seems to downregulate signals from the FcεRI receptor [16]. A novel recently obtained result is that the same Src family kinase that generates the initial positive signal (Lyn), is able to promote loops of negative regulation on mast cell activation, turning off the Fyn kinase pathway, responsible for degranulation [45]. The idea that the same initial kinases are those responsible for downregulation of a specific set of signals, is quite interesting, since those enzymes could alter the timing and extent of the partial responses induced by the FcεRI receptor. How those positive and negative signals are sequentially generated during the process of large aggregate formation, and how they modify the final outcome is also a problem that will be addressed in the near future. Detailed studies on signal transduction in other cellular systems, especially in those aspects involving the setting of the thresholds for specific responses, will help to understand how the signaling through this Fc receptor can be translated in gradual responses. On the other hand, microenvironmental conditions, like the presence of LPS or TGF-β, are able to modify IgE-antigen responses in mast cells, altering the amount of IgE receptor or changing the basal activation state of enzymes and transcription factors. Future studies on the influence of locally produced mediators on FcεRI receptor function, will help to understand changes in mast cell responsiveness, depending on the different pathophysiological conditions in which they are involved, such as innate immunity, allergy and chronic inflammation.

The authors want to thank the National Council of Science and Technology (CONACYT) for the scholarships awarded to JMT (176582), ESM (203556), JGR (207003), JPBG (183383) and AMAH (208218). CGE wants to thank the Miguel Aleman Foundation (Mexico) for a Research Grant and Héctor Vázquez Espinoza for reference localization. AP wants to thank DGAPA for a Research Grant. JMT, ESM, JGR, and JPBG are regular students of the Neuropharmacology and Experimental Therapeutics PhD Program from the Pharmacobiology Department, at CINVESTAV. AMAH is a regular student of the Biomedical Sciences PhD Program, Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico.

References

- [1] Crivellato, E., Beltrami, C., Mallardi, F., and Ribatti, D. (2003) Paul Ehrlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells. *Br. J. Haematol.* **123**: 19–21.
- [2] Metcalfe, D. D., Baram, D., Mekori, Y. A. (1997) Mast cells. *Physiol. Rev.* **77**: 1033–1079.
- [3] Galli, S. J., Kalesnikof, J., Grimbaldeston, M. A., Piliponski, A. M., Williams, C. M. M., Tsai, M. (2005) Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* **23**: 749–86.
- [4] Galli, S. J. (1990) New insights into “the riddle of the mast cells”: microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab. Invest.* **62**: 5–33.
- [5] Kitamura, Y., (1989) Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Ann. Rev. Immunol.* **7**: 59–76.
- [6] Riley, J. F., and West, G. B. (1953) The presence of histamine in tissue mast cells. *J. Physiol.* **120**: 528–537.
- [7] Kinet, J. P. (1999) The high affinity IgE receptor (FcεRI): from physiology to pathology. *Annu. Rev. Immunol.* **17**: 931–972.
- [8] Jansen, D. F., Rijcken, B., Schouten, J. P., Kraan, J., Weiss, S. T., Timens, W., Postma, D. S. (1999) The relationship of skin test positivity, high serum total IgE levels and peripheral blood eosinophilia to symptomatic and asymptomatic airway hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**: 924–931.
- [9] Skov, P. S., Permin, H., Malling H. J. (1977) Quantitative and qualitative estimations of IgE bound to eosinophil leukocytes from hay fever patients. *J. Immunol.* **54**: 1021–1028.
- [10] Galli, S. J., Metcalfe, D. F., Arber, D. A., Dvorak, A. M. (2005) Basophils and mast cells and their disorders. In *Williams Hematology*, ed. E. Beutler, MA Litchman, BS Collier, TJ Kipps, U Seligsohn. New York: Mc. Graw Hill pp. 879–888.
- [11] Gordon, J. R. (1997) FcεRI-induced cytokine production and gene expression. In *IgE receptor (FcεRI) function in mast cells and basophils*, ed. M. M. Hamawy. Austin, TX: R. G. Landes Company pp. 209–242.
- [12] Echtenacher, B., Mannel, D. N., Hultner, L. (1996) Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* **381**: 75–77.
- [13] Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Okumura, K., Ra, C., Ogawa, H. (2001) Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll like receptor 4. *J. Immunol.* **167**: 2250–2256.
- [14] Bienenstock, J., Befus, D., Denburg, J., Goto, T., Lee, T., et al. (1985) Comparative aspects of mast cell heterogeneity in different species and sites. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **77**: 126–129.
- [15] Gilfillan, A. M., Tkaczyk, C. (2006) Integrated signaling pathways for mast-cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 218–230.
- [16] Kraft, S., Kinet, J. P. (2007) New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **7**: 365–378.

- [17] German, S. C., Wurzburg, B. A., Trachevskaya, S. S., Kinet, J. P., Jardetzky, T. S. (2000) Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high affinity receptor FcεRIα. *Nature* **406**: 259–266.
- [18] Donnadieu, E., Jouvin, M. H. and Kinet, J. P. (2000) A second amplifier function for the allergy-associated FcεRIβ subunit. *Immunity* **12**: 515–523.
- [19] Cambier, J. C. (1995) Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J. Immunol.* **155**: 3281–3285.
- [20] Eiseman, E., Bolen, J. B. (1992) Engagement of the high affinity IgE receptor activates Src protein-related tyrosine kinases. *Nature* **355**: 78–80.
- [21] Saitoh, S., Arudchandran, A., Manetz, S., Zhang, C. L., Sommers, C. L., Love, P. E., Rivera, J., Samelson, L. E. (2000) LAT is essential for FcεRI-mediated mast cell activation. *Immunity* **12**: 525–535.
- [22] Rivera, J. (2002) Molecular adapters in FcεRI signaling and the allergic response. *Curr. Opin. Immunol.* **14**: 688–693.
- [23] Saito, K., et al. (2003) Btk regulates PtdIns-4,5-P₂ synthesis: importance for calcium signaling and PI3K activity. *Immunity* **19**: 669–678.
- [24] Parravicini, V., Gadina, M., Kovarova, M., Odom, S., Gonzalez-Espinosa, C., Furumoto, Y., Saitoh, S., Samelson, L. E., O'Shea, J., and Rivera, J. (2002) Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE dependent mast cell degranulation. *Nat. Immunol.* **3**: 741–748.
- [25] Gomez, G., Gonzalez-Espinosa, C., Odom, S., Baez, G., Cid, M. E., Ryan, J., and Rivera, J. (2005) Impaired FcεRI dependent gene expression and defective eicosanoid and lymphokine production as a consequence of Fyn-deficiency in mast cells. *J. Immunol.* **175**: 7602–7610.
- [26] Benhamou, M., Ryba, N. J., Kihara, H., Kishikata, H., and Siraganian, R. (1993) Protein tyrosine kinase p72^{Syk} in high affinity IgE receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **268**: 23318–23324.
- [27] Nishida, K., Yamasaki, S., Ito, Y., Kabu, K., Hattori, K., Tezuka, T., Nishizumi, H., Kitamura, D., Goitsuka, R., Geha, R. S. (2005) FcεRI mediated mast cell degranulation requires calcium independent microtubule dependent translocation of granule to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **170**: 115–126.
- [28] Samayawardhena, L. A., Kapur, R., Craig, A. W. B. (2007) Involvement of Fyn kinase in Kit and integrin mediated rac activation, cytoskeletal reorganization and chemotaxis of mast cells. *Blood* **109**: 3679–3686.
- [29] Chang, E. Y., et al. (1997) Functional effects of over expression of protein kinase C α, β, δ, ε and η in the mast cell line RBL-2H3. *J. Immunol.* **159**: 2624–2632.
- [30] Germano, P., Gomez, J., Kazanietz, M. G., et al (1994) Phosphorylation of the γ chain of the high affinity receptor of immunoglobulin E by receptor associated protein kinase C-δ. *J. Biol. Chem.* **269**: 23102–23107.
- [31] Lewin, I., Jacob-Hirsch, J., Zang, Z. Ch., Kuperstein, V., Szallasi, Z., Rivera, J. And Razin, E. (1996) Aggregation of the FcεRI in mast cells induces the synthesis of Fos-interacting protein and increases its DNA binding activity: the dependence of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **271**: 1514–1519.
- [32] Nechushtan, H., Leitges, M., Cohen, C., Kay, G., Razin, E. (2000) Inhibition of degranulation and interleukin 6 production in mast cells derived from mice deficient in protein kinase C β. *Blood* **95**: 1752–1757.
- [33] Razin, E., Szallasi, Z., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Rivera, J. (1994) Protein kinase C-β and C-link the mast cell high receptor for IgE to the expression of c-fos and c-jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 7722–7726.
- [34] Abdel-Raheem, I., Hide, I., Yanasse, Y., Shigemoto, Y., Sakai, N., Shirai, Y., Saito, N., Hamada, F., El Mahdy, N., El-Din E. Elsis A., Sokar, S. S., Nakata, Y. (2005) Protein kinase C α mediates TNF release process in RBL-2H3 mast cells. *Br. J. Pharmacol.* **145**: 415–423.
- [35] Olivera, A. M. K. (2007) The sphingosine kinase-sphingosine-1-phosphate-axis is a determinant of mast cell function and anaphylaxis. *Immunity* **26**: 287–297.
- [36] Saitoh, S. (2003) The four distal tyrosines are required for LAT-dependent signaling in FcεRI-mediated mast cell activation. *J. Exp. Med.* **198**: 831–843.
- [37] Rosman, K. L., Der, C., Sondek, J. (2005) GEF means going on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**: 167–180.
- [38] Klemm, S., Guterth, J., Hultner, L., Sparwasser, T., Behrendt, H., Peschel, C., Mak, T. W., Jakob, T., Ruland, J. (2006) The Bcl10-Malt1 complex segregates FcεRI-mediated nuclear factor κB activation and cytokine production from mast cell degranulation. *J. Exp. Med.* **203**: 337–347.
- [39] Hutchinson, L. E., Mc Closkey, M. A. (1995) Fc epsilon RI-mediated induction of nuclear factor of activated T-cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 16333–16338.
- [40] Baumruker and Prieschl, E. (1998) FcεRI-mediated activation of NF-AT. In *Signal transduction in mast cells and basophils*, ed. E. Razin and J. Rivera. New York: Springer-Verlag pp. 328–336.
- [41] Gomperts, B. D., Kramer, I., Tatham, P (2002) Signaling pathways operated by non receptor tyrosine kinases. In *Signal Transduction*, ed. B. Gomperts, I. Kramer and P. Tatham. London: Academic Press, pp. 283–297.
- [42] McKeithan TW. (1995) Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 5042–5046.
- [43] Faeder, J. R., Hlavacek, W. S., Rieschl, I., Blinov, M. L., Metzger, H., Redondo, C., Wofsy, C., Goldstein, B. (2003) Investigation of early events in FcεRI mediated signaling using a detailed mathematical model. *J. Immunol.* **170**: 3769–3781.
- [44] Liu, Z. J., Haleem-Smith, H., Chen, X., and Metzger, H. (2001) Unexpected signals in a system subject to kinetic proofreading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 7289–7294.

- [45] Gonzalez-Espinosa, C., Odom, S., Olivera, A., Hobson, P., Cid-Martinez, M. E., Oliveira-dos-Santos, A., Barra, L., Spiegel, S., Penninger, J. M., Rivera, J. (2003) Preferential signaling and induction of allergy-promoting lymphokines upon weak stimulation of the high affinity IgE receptor on mast cells. *J. Exp. Med.* **197**: 1453–1465.
- [46] Odom, S., Gomez, G., Kovarova, M., Furumoto, Y., Ryan, J. J., Wright, H. V., Gonzalez-Espinosa, C., Hibbs, M. L., Harder, K. W., Rivera, J. (2004) Negative regulation of immunoglobulin E-dependent allergic responses by Lyn kinase. *J. Exp. Med.* **199**: 1–13.
- [47] Xiao, W., Nishimoto, H., Hong, H., Kitaura, J., Nunomura, S., Maeda-Yamamoto, M., Kawakami, Y., Lowell, C., Ra, C., Kawakami, T. (2005) Positive and negative regulation of mast cell activation by Lyn via the Fc ϵ RI. *J. Immunol.* **175**: 6885–6892.
- [48] Bousquet, J. P. K., Jeffrey, W. W., Busse, M., Johnson, M., Vignola, A. M. (2000) Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**: 1720–1732.
- [49] Mc Millan, S., and Lloyd, C. (2004) Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodeling. *Clin Exp Allergy* **34**: 497–501.
- [50] Mc Millan, S. J., Xanthou, G., Lloyd C. M. (2005) Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF- β antibody: effect on the smad signaling pathway. *J. Immunol.* **174**: 5774–5780.
- [51] Shi, Y., Massagué, J. (2003) Mecanismos of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**: 685–700.
- [52] Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A-K, L., and Flavell, R. (2006) Transforming growth factor β regulation of immune responses. *Ann. Rev. Immunol.* **24**: 99–146.
- [53] Olsson, N., Piek, E., Ten, P., Nilsson, G. (2000) Human mast cell migration in response to members of the transforming growth factor- β family. *J. Leukoc.* **67**: 350–356.
- [54] Smith, T., Ducharme, L., Shaw, S., Parker, C., Brenner, M., Kilshaw, P., Weiss, H. (1994) Murine M290 integrin expression modulated by mast cell activation. *Immunity* **1**: 393.
- [55] Rosbottom, A., Scudamore, C., Von der Mark, D., Thornton, E., Wright, S., Miller, H. (2002) TGF- β 1 regulates adhesion of mucosal mast cells homologues to laminin-1 through expression of integrin α 7. *J. Immunol.* **169**: 5689–5695.
- [56] Funaba, M., Nakaya, K., Ikeda, T., Murakami, M., Tsuchida, K., Sugino, H. (2006) Requirement of Smad3 for mast cell growth. *Cell. Immunol.* **240**: 47–52.
- [57] Miller, H., Wright, S., Knight, P., Thornton, E. (1999) A novel function of transforming growth factor β 1: upregulation of the expression and the IgE-independent extracellular release of a mucosal mast cell granule-specific β -chymase, mouse mast cell protease-1. *Blood* **93**: 3473–3486.
- [58] Bissonette, E., Enciso, J., Befus, A., (1997) TGF- β 1 inhibits the release of histamine and tumor necrosis- α factor mast cell through an autocrine pathway. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol* **16**: 275–282.
- [59] Gebhardt, T., Lorentz, A., Detmer, F., Trautwein, T., Bektas, H., et al. (2005). Growth, fenotype and function of human intestinal mast cells are tightly regulated by transforming growth factor β 1. *Gut* **54**: 928–934.
- [60] Gomez, G., Ramirez, C., Rivera, J., Patel, M., Norozian, F., et al. (2005) TGF- β 1 inhibits mast cell expression. *J. Immunol.* **174**: 5987–5993.
- [61] Broide, D., Wasserman, S., Alvaro-Garcia, J., Zvaifler, N., Firestein, G. (1989) Transforming growth factor β 1selectively inhibits IL-3 dependent mast cell proliferation without affecting mast cell function or differentiation. *J. Immunol.* **143**: 1591–1597.
- [62] Akira, S., Takeda, K. (2004) Toll-like receptors signaling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 499–511.
- [63] Kawai, T., Akira, S. (2006) Toll-Like Receptors Signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **13**: 816–825.
- [64] Janeway, C., Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 197–216.
- [65] Supajatura, V., Ushuo, H., Nakao, A., Akira, S., Okumura, K., et al. (2002) Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J. Clin. Invest.* **109**: 1351–1359.
- [66] Nigo, Y., Yamashita, M., Hirahara, K., Shinnakasu, R., Inami, M., et al. (2006) Regulation of allergic airway inflammation through Toll-Like receptor 4-mediated modification of mast cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 2286–2291.
- [67] Kraft, M. (2000) The role of bacterial infections in asthma. *Clin. Chest. Med.* **21**:301–313.
- [68] Fukao, T., Koyasu, S. (2003) PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol.* **24**: 358–363.
- [69] Li, X., Tupper, J., Bannerman, D., Winn, R., Rhodes, C., et al. (2003) Phosphoinositide 3 kinase medates Toll-like receptor 4-induced activation of NF-kappa B in endothelial cells. *Infect. Immunol.* **71**: 4414–4420.
- [70] Kuo, C., Lin, W., Liang, C., Liang, S. (2006) Class I and III phosphoinositol 3'-kinase play distinct roles on TLR signaling pathway. *J. Immunol.* **176**: 5943–5949.
- [71] Fukao, T., Tanabe, M., Terauchi, Y., Ota, T., Matsuda, S., et al. (2002) PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat. Immunol.* **3**: 875–881.
- [72] Aksoy, E., Vanden, W., Detienne, S., Amraoui, Z., Fitzgerald, K., et al. (2005) Inhibition of phosphoinositide 3-kinase enhances TRIF-dependent NF-kappa B activation and INF-beta synthesis downstream of Toll-like receptor 3 and 4. *Eur. J. Immunol.* **35**: 2200–2209.
- [73] Zhang, T. Y., Daynes, R. A. (2007) Glucocorticoid conditioning of myeloid progenitors enhances TLR4 signaling via negative regulation of the Phosphatidylinositol 3 kinase Akt pathway. *J. Immunol.* **178**: 2517–2526.

ARTÍCULO EN PREPARACIÓN

Tolerance to LPS increases pro-inflammatory cytokine production after FcεRI crosslinking through the inhibition of a Fyn-dependent negative loop in mast cells.

Medina-Tamayo, J.¹., Avila, M.¹, Padilla-Trejo, J. A.², Ibarra-Sanchez, A.¹, Yamashita, Y.³, Odom, S.³, Rivera, J.^{3*}, and Gonzalez-Espinosa, C.^{1*}

¹Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), IPN, Sede Sur. ² Departamento de Inmunología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. ³ Laboratory of Molecular Immunogenetics, Molecular Immunology Section, NIAMS, NIH. * Corresponding authors.

Running Title: LPS tolerance modifies IgE-antigen induced responses in mast cells.

Corresponding authors

1. Claudia Gonzalez-Espinosa, PhD

Departamento de Farmacobiología

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Sede Sur

Calzada de los Tenorios # 235, Col. Granjas Coapa

Tlalpan, 14330 Mexico City, Mexico

Tel. (52-55) 5483-2875; Fax: (52-55) 5483-2865

E-m: cgonzal@cinvestav.mx

2. Juan Rivera, PhD

Laboratory of Molecular Immunogenetics

Molecular Immunology Section, NIAMS-NIH

Building 10 Rm 13C103

Bethesda, MD 20892-1930

Tel. (301) 496-7592; Fax (301) 480-1508

E-m: juan_rivera@nih.gov

Abstract

Mast cells (MC) are central players on allergic diseases due to its capacity of degranulate and secrete numerous cytokines and lipid-derived compounds after IgE-antigen-dependent activation of the high affinity IgE receptor (Fc ϵ RI). Src family kinase Fyn connects Fc ϵ RI triggering with the synthesis of pro-inflammatory cytokines controlling NF κ B activation. MCs also play an essential role in the innate response against gram-negative bacteria, being able to produce pro-inflammatory cytokines after lipopolysaccharide (LPS)-triggered activation of the Toll-like receptor (TLR) 4 through the activation of NF κ B. As other immune cells, MCs develop the transient unresponsive state known as endotoxin tolerance after a prolonged exposure to LPS, characterized by the synthesis of a number of proteins able to prevent exaggerated cytokine synthesis. The influence of endotoxin tolerance on the IgE-antigen-triggered responses in MC is far from being full described. We decided to study the effects of endotoxin tolerance on the IgE-antigen-mediated responses in MCs and the role of the NF κ B-controlling kinase Fyn in the potential crosstalk between the TLR-4 and the Fc ϵ RI receptor signal transduction systems in conditions of endotoxin tolerance. We found that tolerance to endotoxin provokes a sensitization of particular IgE-antigen-elicited responses, increasing the amount of TNF- α and IL-6 produced after Fc ϵ RI crosslinking in bone marrow-derived mast cells (BMMCs). Endotoxin tolerance provoked an increased NF κ B activity after Fc ϵ RI triggering that positively correlates with the PKC-dependent phosphorylation of Ser 476 of Akt, elevated PKC α activity and the inhibition of PP2A phosphatase in tolerant cells. Fyn kinase was found to be a negative regulator of the sensitizing effects of endotoxin tolerance on the Fc ϵ RI-dependent responses, since a higher degree of sensitization was observed in BMMCs derived from Fyn $-/-$ mice. Finally, Fyn was also found to phosphorylate and inactivate PP2A after Fc ϵ RI crosslinking in WT cells. *In vivo* intraperitoneal injection of LPS induced a higher TNF- α secretion and cell recruitment after IgE/antigen stimulation. Our results indicate that prolonged stimulation of the TLR-4 receptor in MC can induce a remodeling of the Fc ϵ RI signal transduction system, lowering the amount and the activity of PP2A and provoking higher inflammatory responses after IgE-antigen addition.

La defensa de esta tesis doctoral se llevó a cabo el día 26 de abril de 2012 a las 11 horas en el Auditorio No. 2 del Edificio de Neurociencias, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (IFC-UNAM).