



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultat de Medicina

Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències

Unitat d'Immunoreceptors

Paper del receptor CD84 en l'activació mastocitària

Tesi doctoral presentada per:

Irene Oliver Vila

Per optar al grau de:

Doctora per la Universitat de Barcelona

Directora de la tesi: **Dra. Margarita Martín Andorrà**

Barcelona, Juny del 2009

A la meva família.

“La vida és el que et passa mentre fas plans per tenir-ho tot lligat”

Lluís Gavalrà

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat possible gràcies a l'atenta direcció de la Doctora Margarita Martín. Per aquest motiu vull agrair-li la seva dedicació, paciència i perseverança, fins i tot en moments delicats, durant aquests anys de feina. Vull fer extensiu el meu agraïment al Doctor César Picado, per confiar en la meva persona i per tot el suport i l'ajuda rebuda; i també al Doctor Pablo Engel, per donar-me l'oportunitat de poder realitzar la tesi al seu grup.

La realització de la tesi és com un viatge d'aventures. Hi ha moments per gaudir, per espantar-se, per plorar i per riure. Però sobretot suposa una experiència d'aprenentatge, de superació personal i de creixement professional. Com en tots els viatges, el suport de la gent, tant la que vas coneixent pel camí, com la que sempre ha estat al teu costat, és fonamental per acabar l'etapa amb èxit. En el meu cas, han estat moltes les persones que han aportat el seu granet de sorra per ajudar a fer-me més planer i agradable el viatge. Vull agrair a totes aquestes persones el seu suport i la seva ajuda. Espero no deixar-me ningú i si això passa, no era la meva intenció i ho lamento moltíssim.

En primer lloc, dono les gràcies a tots els meus companys de feina, pels bons moments compartits i per la complicitat. De tots he après alguna cosa, tant dels que em van donar la mà per iniciar aquest camí: el Xavi, la Sandra, la Ifigènia i la Miriam; com dels que han compartit la part final del viatge, i han tingut la paciència de suportar l'estrès que això comporta: el Jordi, l'Erola, la Ivonne, el Nel, la Laia, l'Adriana (els dinars no serien el mateix sense ella), la Jessica i la Natàlia. Gràcies amics per fer-me costat. Agraïxo especialment el suport donat als meus tres companys de fatigues: al Jordi, que sempre ha significat per mi molt més que un company de laboratori, i sense l'humor del qual tot això hagués estat molt més difícil i segurament les meves bromes una mica més incompreses. Més enllà de les bones estones, també vull agrair-li la complicitat i tota l'ajuda que m'ha donat. A l'Erola, per l'amistat que em va brindar des del primer moment i que s'ha anat consolidant dia a dia. Per ser tan dolça i perquè trobar-me amb ella ha estat una de les millors experiències. A més a més, conèixer-la m'ha permès aprendre un nou "diccionari" de termes científics (i redescobrir les utilitats de la parafina). I a la Ivonne (toc, toc), l'alegria personificada i el motiu per

somriure cada matí. Per ajudar-me a cuidar les nostres "nenes" i intentar sempre que vegi el costat positiu de les coses. I per regalar-me mitja portada de la tesi. El suport, l'ajuda i la companyia de la "trigueña" més encantadora ha fet molt més agradable la feina dia a dia. No m'oblido dels seus nois, el Borja i el Siscu, els seus "cuidadors", per ajudar-la a fer més fàcil la seva estada i per preocupar-se sempre dels avenços de la meva tesi.

Més enllà de les portes del laboratori del nostre grup, he conegut també molta gent que amb un somriure, una abraçada, o unes paraules, ha ajudat a que tot això es convertís en una experiència inoblidable, començant pels nostres "veïns": el Lluís, el Joan, la Bàrbara, la Laura, la Susana, la Núria, la Raquel i, com no, l'Anna (Molitas), companya de lluites fins el final i artífex d'unes sessions de teràpia impagables. Aquesta última etapa no hagués estat possible sense la seva ajuda. També incloc en aquest grup les meves companyes de berenar, l'Anna Boronat, per ser tan encantadora i estupenda i la Trini; mai un anticòs havia donat tants bons resultats.

No seria just en tots aquests agraïments oblidar-me d'aquells que fa anys que conec i que han "crescut" al meu costat. Gràcies a les meves amigues inseparables, a les dues que han fet que el terme "millor amiga" deixi de sonar ridícul i infantil, per convertir-se en una cosa realista i bonica: l'Eva, la persona més dolça del món, i la Laura, que em va ajudar a entendre què era la simbiosi. Dues persones amb les que he compartit molts moments de la meva vida, alguns d'inoblidables i plens d'alegria, i d'altres cops durs i difícils. Però, sempre han estat al meu costat i això les converteix en persones indispensables a la meva vida. A elles, i als seus companys: el Xavi, tot un *gentelman*; i el Cristian, un rondinaire entranyable, que han augmentat, si cap encara més, la cohesió que ens uneix.

També volia agrair a la resta d'amics els moments viscuts, les experiències compartides, diferents a mesura que passen els anys, però estimulants igualment, i els moments de desconexió tan necessaris durant els anys dedicats a aquesta tesi. Gràcies Blanca, Miguel, David F., Cristina, Oriol, Ana, David D., Iban i Mari. I gràcies a la Sonia i el Carlos; els seus sopars són la millor manera de culminar la setmana.

No voldria deixar de dedicar unes paraules a totes les persones, que més enllà del cercle professional o d'amistat, han participat en el meu creixement personal. Entre totes aquestes agreixo la devoció amb que sempre m'han cuidat els meus avis, la

Ramona, el Ramon, la Teresa i el Vicente. El destí ha volgut que cap d'ells sigui físicament amb mi en aquests moments, però la dedicació i l'esforç invertit en convertir-me en una persona de bé han fet que hagi pogut arribar fins aquí. En aquest sentit, no m'oblido als meus "tercers" avis, la Clara i l'Emilio (i les seves filles, la Sabi i la Pepi), que sempre es preocupen per mi i han participat en la meva educació des que tenia tres mesos de vida. Espero que avui puguin estar orgullosos del seu resultat. I evidentment, també agraeixo la resta de la família, tiets i cosins (Dolors, Vicente, Elvira, Meri, Víctor, Raul, Miguel i Lucía), que m'han inculcat perquè és tan important fer pinya; i a la meva família política, la Júlia, l'Albert, la Mireia i "associats", per acollir-me com una més i fer-me sentir part dels seus cada dia.

He deixat pel final l'agraïment a la meva família directa. No perquè fos menys important, sinó tot el contrari, perquè vull que en llegir això, l'última idea que vingui a la memòria siguin les paraules que els hi dedico. Gràcies als meus pares per tot el que m'han cuidat. Pel suport incondicional que m'han donat a cada pas de la meva vida i pels bons consells que sempre han tingut per mi. Són el meu exemple i el meu model a seguir i espero que algun dia algú arribi a estimar-me com jo els estimo a ells. Gràcies a la Marteta, la petitona, la meva nena. Per tots els moments viscuts juntetes i els que ens queden. I perquè ens estimem molt. Espero que la seva història es converteixi en tot un exemple de superació personal. I finalment, l'ocasió es mereix que agraeixi degudament tot el suport rebut a la persona que ha estat, està i estarà sempre al meu costat. La persona que m'ha ajudat en tot moment, que m'ha escoltat, que m'ha abraçat quan necessitava consol, que m'ha fet riure quan estava decaiguda i també que ha rigut amb mi, que ha gaudit amb els moments que hem passat junts i de qui he après tantíssimes coses. I el millor, que tot això ho seguirem fent sempre. Gràcies, Jordi.

ÍNDEX

	<u>Pàgina</u>
<u>I. INTRODUCCIÓ</u>	1
1. CARACTERÍSTIQUES DELS MASTÒCITS	3
1.1 Biologia bàsica dels mastòcits	3
1.2 Funcions dels mastòcits	5
1.2.1 Funcions immunomoduladores dels mastòcits	6
2. FISIOPATOLOGIA DEL MASTÒCIT	8
2.1 Paper dels mastòcits en la inflamació al·lèrgica	8
2.2 Paper dels mastòcits en les malalties al·lèrgiques	9
2.2.1 Asma	9
2.2.2 Rinitis al·lèrgica	10
2.2.3 Dermatitis atòpica	11
2.2.4 Anafilaxi	12
2.2.5 Mastocitosi	13
2.2.6 Malaltia al·lèrgica de l'ull	13
2.3 Paper dels mastòcits en les malalties no al·lèrgiques	14
3. RECEPTOR D'ALTA AFINITAT PER LA IgE (FcεRI)	14
3.1 Estructura del FcεRI	15
3.2 Regulació de l'expressió del FcεRI	16
3.3 Funcions biològiques del FcεRI	17
4. TRANSDUCCIÓ DE SENYALS EN MASTÒCITS A TRAVÉS DEL FcεRI	18
4.1 Via primària de LYN	20
4.1.1 LAT	20
4.1.2 PLCγ	21
4.1.3 GRB2-SOS I GADS-SLP76-VAV	22
4.2 Via complementària de FYN	24
4.2.1 NTAL	24
4.2.2 PI3K	25
4.2.3 BTK i SK-S1P	26
4.2.4 AKT i PDK1	27
4.2.5 GRB2, SOS i VAV	27
5. REGULACIÓ DE LA TRANSDUCCIÓ DE SENYALS A TRAVÉS DEL FcεRI	30

5.1 Molècules potenciadores de l'activació dels mastòcits	30
5.1.1 KIT	30
5.1.2 Receptors acoblats a proteïna G (GPCRs): S1P ₁ , S1P ₂ , receptor d'adenosina A ₃ i receptor de C3a	31
5.2 Molècules inhibidores de l'activació dels mastòcits	32
5.2.1 Efecte dual de les cadenes β i γ del FcεRI	32
5.2.2 Regulació negativa a través de PTKs: LYN, FPS/FES i FER	33
5.2.3 Regulació negativa a través de fosfatases lipídiques: SHIP i PTEN	35
5.2.4 Regulació negativa a través de fosfatases de tirosines en proteïnes: SHP-1 i SHP-2	36
5.2.5 Regulació negativa a través de molècules adaptadores: LAT, NTAL, LAX, DOK, RabGEF1, Cbl i CIN85	37
5.2.6 Regulació negativa a través de receptors que contenen ITIMs: FcγRIIB	42
5.2.7 Regulació negativa a través de receptors que no contenen ITIMs: CD200R, FcαRI i CD63	43
6. PERSPECTIVES I IMPLICACIONS TERAPÈUTIQUES	44
7. FAMÍLIA DE RECEPTORS SLAM I FAMÍLIA D'ADAPTADORS SAP	47
7.1 Família de receptors SLAM o família del CD150	47
7.1.1 CD84	50
7.2 Família d'adaptadors SAP i EAT-2	52
7.2.1 SAP	53
7.2.2 EAT-2	56
7.3 XLP: Malaltia limfoproliferativa lligada al cromosoma X	57
7.3.1 Identificació de <i>SH2D1A</i> com el gen responsable de la malaltia XLP	59
7.3.2 Defectes en la funció dels limfòcits i implicació de les alteracions en la senyalització a través dels receptors de la família SLAM en la malaltia XLP	59
<u>II. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT</u>	63
1. Objectius generals	65
2. Objectius específics	65
<u>III. MATERIALS I MÈTODES</u>	67
1. LÍNIES CEL·LULARS I REACTIUS	69
1.1 Línies cel·lulars	69
1.2 Reactius	69
1.2.1 Anticossos	69

1.2.2 Reactius	70
1.2.3 Reactius per DNA	71
2. CONSTRUCCIÓ DE PLÀSMIDS	72
2.1 Construcció de quimeres: CD244-CD84	72
2.2 Construcció de mutants puntuals: CD84 Y262F, CD84 Y279F i CD84 Y299F .	73
2.3 Construcció de dobles mutants: CD84 Y262F/Y299F	74
2.4 Construcció de mutants de deleció: CD84 Δ cua citoplasmàtica i CD84 Δ Y324	75
2.5 Seqüenciació del DNA.....	75
3. SISTEMES DE TRANSFECCIÓ	76
3.1 Transfeccions transitòries	76
3.1.1 Electroporació de cèl·lules COS amb el sistema AMAXA	76
3.2 Transfeccions estables	77
3.2.1 Electroporació de cèl·lules RBL-2H3	77
3.2.2 Selecció de poblacions positives mitjançant boles magnètiques conjugades a un anticòs anti-immunoglobulines de ratolí	78
4. ANÀLISI DE FLUX DE CALCI PER CITOMETRIA	79
5. ASSAIG D'ALLIBERACIÓ DE β -HEXOSAMINIDASA	80
5.1 Assaig d'alliberació de β -hexosaminidasa en RBL-2H3	81
5.2 Assaig d'alliberació de β -hexosaminidasa en LAD-2	82
6. ANÀLISI D'EXPRESSIÓ DE GENS	83
6.1 Aïllamentt del RNA missatger d'una línia cel·lular	83
6.2 Retrotranscripció de RNA a cDNA	84
6.3 Amplificació per PCR	85
7. ANÀLISI DE PROTEÏNES	86
7.1 Activació cel·lular	86
7.1.1 Activació per a la línia RBL-2H3	86
7.1.2 Activació per a la línia LAD-2	86
7.2 Biotinilació	87
7.2.1 Biotinilació en cèl·lules RBL-2H3	87
7.2.2 Biotinilació en cèl·lules LAD-2	88
7.3 Immunoprecipitació	88
7.4 Assaigs d'activitat d'ERK, P38, JNK i AKT	90
7.5 Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE)	91
7.6 Western-Blot	92
8. CITOMETRIA DE FLUX	94
8.1 Anàlisi d'expressió de proteïnes de membrana	94

9. ESTUDIS DE REORGANITZACIÓ DEL CITOESQUELET PER INCORPORACIÓ DE PHALLOIDINA	96
9.1 Estudis de reorganització del citoesquelet en cèl·lules adherents per microscopia de fluorescència	96
9.2 Estudis de reorganització del citoesquelet per citometria de flux	97
10. ANÀLISI DE L'ACTIVACIÓ DE GENS	98
10.1 Estudi de l'activació de gens reporters de luciferasa en cèl·lules RBL-2H3 ..	98
IV. RESULTATS	101
A. RESULTATS OBTINGUTS AMB LA LÍNIA CEL·LULAR RBL-2H3	103
1. Transfecció de la línia cel·lular RBL-2H3 amb el receptor CD84 humà	103
1.1 Generació de la línia cel·lular transfectant CD84 RBL-2H3.....	103
1.2 Modulació de l'expressió del receptor CD84 en cèl·lules CD84 RBL-2H3 després de l'activació	104
2. El receptor CD84 altera el flux de calci depenent d'IgE	105
3. El receptor CD84 altera el procés de <i>ruffling</i> de la membrana cel·lular induït per l'activació a través del FcεRI	106
4. El receptor CD84 inhibeix la desgranulació depenent d'IgE en cèl·lules RBL-2H3 ..	107
4.1 Perfil d'alliberació de β-Hexosaminadasa a diferents dosis d'IgE anti-DNP en cèl·lules RBL-2H3 control i cèl·lules CD84 RBL-2H3	108
4.2 Perfil d'alliberació de β-Hexosaminadasa a diferents dosis de DNP-HSA en cèl·lules RBL-2H3 control i cèl·lules CD84 RBL-2H3	109
5. La inhibició de la desgranulació està mitjançada per la interacció homotípica CD84-CD84	110
5.1 Efecte de la interacció homotípica CD84-CD84 en la desgranulació	110
5.2 La substitució del domini extracel·lular del CD84 reverteix la inhibició de la desgranulació depenent d'IgE	111
6. La senyalització a través del receptor CD84 mitjança la inhibició de la desgranulació	113
6.1 L'eliminació de la cua citoplasmàtica del CD84 reverteix la inhibició de la desgranulació	113
6.2 La generació de nous mutants del receptor CD84, confirmen l'efecte inhibitori d'aquest receptor	114
7. La proteïna adaptadora SAP és independent del mecanisme d'inhibició del CD84 en cèl·lules CD84 RBL-2H3	116

7.1 Determinació de la unió de la molècula adaptadora SAP i la fosfatasa SHP-2 al receptor CD84	116
7.2 Efecte dels mutants dels dominis d'unió a SAP del receptor CD84 en la desgranulació de cèl·lules RBL-2H3	117
8. Els mutants per les tirosines 279 i 324 reverteixen l'efecte inhibitori del CD84 observat en la desgranulació	118
9. El CD84 es fosforila després de la lligació de la IgE: fosforilació diferencial de proteïnes en cèl·lules RBL 2H3 control i cèl·lules CD84 RBL-2H3	121
9.1 La lligació de la IgE potencia la fosforilació del receptor CD84 en cèl·lules CD84 RBL-2H3	121
9.2 L'activació a través del FcεRI potencia la fosforilació de les proteïnes c-CBL i DOK-1 en cèl·lules CD84 RBL-2H3 respecte cèl·lules control	122
9.3 La fosforilació de les proteïnes c-CBL i DOK-1 és proporcional a l'efecte inhibitori del CD84	123
9.4 La fosforilació de les proteïnes c-CBL i DOK-1 es troba disminuïda en els mutants del CD84 que reverteixen la seva funció inhibidora (Y279F i ΔY324)	124
10. La fosforilació de les MAPK ERK1/2, P38 i JNK es troba afectada en cèl·lules CD84 RBL-2H3	126
10.1 Les cèl·lules CD84 RBL-2H3 presenten alteracions en l'activació de la cascada de MAPK	126
10.2 Els mutants que reverteixen l'efecte inhibitori del receptor CD84 presenten una fosforilació de MAPK normal en comparació amb cèl·lules RBL-2H3 control .	127
11. La fosforilació d'AKT es troba afectada en cèl·lules CD84 RBL-2H3	127
11.1 Les cèl·lules CD84 RBL-2H3 presenten alteracions en l'activació d'AKT	128
11.2 Els mutants que reverteixen l'efecte inhibitori del receptor CD84 presenten una fosforilació d'AKT normal en comparació amb cèl·lules RBL-2H3 control	128
12. La secreció de citocines es troba alterada en cèl·lules CD84 RBL-2H3	129
<u>B. RESULTATS OBTINGUTS AMB LA LÍNIA CEL·LULAR COS</u>	132
1. La cinasa LYN participa en la fosforilació del receptor CD84	132
2. Fosforilació diferencial de les tirosines de la cua citoplasmàtica del receptor CD84 per la cinasa LYN	133
2.1 La mutació puntual de la tirosina 279 i la deleció de la tirosina 324 redueixen la fosforilació del CD84 per la cinasa mLYN	133
2.2 La combinació de les mutacions Y279F i ΔY324 inhibeix completament la fosforilació del CD84 per la cinasa mLYN	135

3. La cinasa FES participa en la fosforilació del receptor CD84	136
4. Fosforilació diferencial de les tirosines de la cua citoplasmàtica del receptor CD84 per la cinasa FES	137
4.1 La mutació puntual de la tirosina 279 i la deleció de la tirosina 324 redueixen la fosforilació del CD84 per la cinasa FPS/FES	137
4.2 La combinació de les mutacions Y279F i Δ Y324 inhibeix completament la fosforilació del CD84 per la cinasa FPS/FES	139
5. La cinasa FYN fosforila totes les tirosines del receptor CD84	140
 <u>C. RESULTATS OBTINGUTS AMB LA LÍNIA CEL·LULAR LAD2</u>	 143
 1. Estudi d'expressió dels receptors de família del CD150 en la línia cel·lular LAD-2: Elevada expressió del receptor CD84 i expressió induïble del receptor CD150	 143
1.1 La línia cel·lular LAD-2 presenta una elevada expressió del receptor CD84 ...	143
1.2 Expressió d'altres receptors de la família SLAM: CD244 i CD229	144
1.3 Modulació de l'expressió dels receptors CD84 i CD150 després de l'activació	145
2. Estudi d'expressió de molècules de senyalització intracel·lular en cèl·lules LAD-2 .	146
2.1 La molècula adaptadora SAP no es troba expressada en cèl·lules LAD-2	146
2.2 La línia cel·lular LAD-2 expressa la cinasa FPS/FES	147
3. La lligació de la IgE comporta una disminució de la polimerització del citoesquelet d'actina en cèl·lules LAD-2	148
3.1 Determinació de l'expressió del Fc ϵ RI en cèl·lules LAD-2	148
3.2. Alteració de la polimerització del citoesquelet d'actina en cèl·lules LAD-2 després de l'activació a través del Fc ϵ RI	149
4. El tractament amb un anticòs monoclonal contra el CD84 altera la despolimerització del citoesquelet d'actina en cèl·lules LAD-2, després de la lligació de la IgE	150
5. Corba dosi-resposta en la desgranulació dependent d'IgE en cèl·lules LAD-2	151
6. El tractament amb un anticòs monoclonal contra el CD84 afecta la desgranulació dependent d'IgE, però no la desgranulació dependent d'estímuls osmòtics, en cèl·lules LAD-2	152
6.1 Alteració de la desgranulació dependent d'IgE en cèl·lules LAD-2 tractades amb un anticòs monoclonal anti-CD84	152
6.2 El tractament amb un anticòs monoclonal anti-CD84 no afecta la desgranulació dependent d'estímuls osmòtics (Manitol) en cèl·lules LAD-2	153
7. El tractament amb un anticòs monoclonal contra el CD84 potencia la fosforilació de la proteïna DOK-1 en l'activació dependent de la IgE	154

8. El tractament amb un anticòs monoclonal contra el CD84 afecta la fosforilació de la MAPK ERK en cèl·lules LAD-2, després de la lligació de la IgE	155
9. El tractament amb un anticòs monoclonal contra el CD84 afecta la fosforilació d'AKT en cèl·lules LAD-2 després de la lligació de la IgE	156
V. DISCUSSIÓ	159
1. Identificació del receptor CD84 com una nova molècula inhibidora de la senyalització mitjançada pel FcεRI en mastòcits	162
1.1 El receptor CD84 inhibeix la desgranulació mastocitària	162
1.2 Les tirosines 262 i 299, que es troben dins de motius d'unió a la família d'adaptadors SAP, no participen en el mecanisme inhibitori del CD84; mentre que les tirosines 279 i 324 es troben involucrades en la inhibició mitjançada pel receptor CD84	164
2. Les proteïnes DOK-1 i c-CBL es troben implicades en el mecanisme de senyalització del receptor CD84	166
3. El receptor CD84 disminueix l'activació de les MAPK ERK, JNK i P38 i la secreció de citocines induïdes per l'activació a través del FcεRI	168
4. El receptor CD84 altera la fosforilació d'AKT induïda pel FcεRI	171
5. El receptor CD84 altera el flux de calci en cèl·lules CD84 RBL-2H3	172
6. El receptor CD84 afecta la reorganització del citoesquelet	173
7. Les cinases LYN i FPS/FES fosforilen de manera diferencial les tirosines presents a la cua citoplasmàtica del receptor CD84. La cinasa FYN fosforila totes les tirosines del CD84	176
8. Possibles molècules directament implicades en el mecanisme inhibitori del CD84 .	178
9. L'activació mastocitària comporta una disminució de l'expressió del receptor CD84	182
10. Implicacions funcionals del receptor CD84	183
VI. CONCLUSIONS	185
VII. BIBLIOGRAFIA	189
VIII. ANNEX	221

ABREVIATURES

- AICD: *Activation-induced cell death* (Mort cel·lular induïda per activació).
- ALLN: *N-Acetyl-Leucinyl-Leucinyl-Norleucinal*.
- AP1: *Activation protein 1* (Proteïna d'activació 1).
- APC: Cèl·lula presentadora d'Antigen.
- APS: *Ammonium Persulfate* (Persulfat d'amoni).
- Arg (R): Arginina.
- Asn (N): Asparagina.
- Asp (D): Aspartat.
- BCR: Receptor per la cèl·lula B.
- BMMC: *Bone Marrow-derived Mast Cell* (Mastòcit derivat de la medul·la òssia).
- BSA: *Bovine serum albumin* (Albúmina sèrica bovina).
- BTK: *Burton's Tyrosine Kinase* (Cinasa de tirosines de Burton).
- CBA: *Cytometric Bead Array* (Selecció per boles mitjançant citometria).
- CD40L: *CD40 Ligand* (Lligand del CD40).
- cDNA: Àcid desoxiribonucleic complementari.
- CSH: Hipersensibilitat cutània.
- DC: Cèl·lula dendrítica.
- DNA: Àcid desoxiribonucleic.
- DNP-HSA: *2,4-Dinitrophenyl- Human Serum Albumin* (2,4-Dinitrofenil-Albúmina sèrica humana).
- DOK1: *Docking protein 1*.
- DTH: *Delayed-Type Hypersensitivity* (Hipersensibilitat de tipus retardat).
- EBV: Epstein-Barr Virus.
- ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (Assaig per immunoabsorció lligat a enzims).
- ERK: *Extracellular-signal-regulated kinase 1* (Cinasa regulada per senyals extracel·lulars).
- ERT: *EAT-2-related transducer* (Transductor relacionat a EAT-2).
- FACS: *Fluorescence Analyzer Cell Sorter* (Separador de cèl·lules analitzades per fluorescència).
- F-actina: *Filamentous actin* (Actina Filamentosa).

FcεRI: Receptor d'alta afinitat per la IgE.

FcεRIα: Cadena alfa del receptor d'alta afinitat per la IgE.

FcεRIβ: Cadena beta del receptor d'alta afinitat per la IgE.

FcεRIγ: Cadena gamma del receptor d'alta afinitat per la IgE.

FCH: *FPS/FES/FER/CIP4 Homology*.

FCS: Sèrum Boví Fetal.

GAB2: *Grb2-associated binding protein 2* (Proteïna 2 d'unió associada a GRB2).

GADS: *GRB2-related adaptor downstream of SHC protein* (Adaptador relacionat a GRB2 per sota de la proteïna SHC).

Glu (E): Glutamat.

GDP: *guanosine diphosphate* (Difosfat de Guanosina).

GPCRs: *G-protein-coupled receptors* (Receptors acoblats a proteïna G).

GPI: *Glycosyl-phosphatidylinositol* (Glicosil fosfatidilinositol).

GRB2: *growth-factor-receptor-bound protein 2* (Proteïna 2 unida al receptor del factor de creixement).

GTP: *guanosine triphosphate* (Trifosfat de guanosina).

HSC: Cèl·lula mare hematopoiètica.

ICOS: *Inducible Co-Stimulator* (Co-estimulador induïble).

I_{CRAC}: *Calcium-release-activated calcium current* (Corrent de calci activada per alliberació de calci).

Ig: Immunoglobulina.

IgE: Immunoglobulina E.

IL: Interleucina.

Ile (I): Isoleucina.

IP: Immunoprecipitació.

IP₃ (InsP₃): *Inositol 1,4,5-trisphosphate* (Inositol 1,4,5-trifosfat).

ITAM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif* (Motius d'activació dels immunoreceptors basats en tirosina).

ITIM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif* (Motius d'inhibició dels immunoreceptors basats en tirosina).

ITSM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif* (Motius de canvi basats en tirosina).

JNK: *JUN amino-terminal kinase* (cinasa amino-terminal de JUN).

Kd: Constant de dissociació.

KLRG1: *Killer Cell Lectin-like Receptor G1* (Receptor G1 de tipus lectina de mort cel·lular).

LAD-2: *Laboratory of allergic diseases 2* (Laboratori 2 de malalties al·lèrgiques).

LAT: *Linker for Activation of T cells* (Connector per a l'activació de cèl·lules T).

LCMV: *Lymphocytic Choriomeningitis Virus* (Virus de la coriomeningitis limfocítica).

Leu (L): Leucina.

LPS: Lipopolisacàrid.

mAb: Anticòs monoclonal.

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases* (Cinases de proteïnes activades per mitogen).

MCMV: *Murine Cytomegalovirus* (Citomegalovirus de ratolí).

NFAT: *Nuclear factor of activated T cells* (Factor nuclear de cèl·lules T activades).

NF- κ B: *Nuclear factor- κ B* (Factor nuclear κ B).

NGF: *Nerve Growth Factor* (Factor de creixement nerviós).

NK: *Natural killer* (Cèl·lula citotòxica natural).

NTAL: *Non-T-cell activation Linker* (Connector d'activació de cèl·lules no-T).

PAF: *Platelet-activation factor* (Factor d'activació plaquetari).

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacció en cadena de la polimerasa).

PDK1: *3-phosphoinositide dependent protein kinase 1* (Proteïna cinasa 1 depenent de 3-fosfoinositol).

PE: *Phytoerythrin* (Ficoeritrina).

Phe (F): Fenilalanina.

PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase* (Fosfoinositol 3-cinasa).

PIP₂ (PtdIns(4,5)P₂): *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* (Fosfatidil inositol 4,5-bifosfat).

PIP₃ (PtdIns(4,5)P₃): *Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate* (Fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfat).

PIP5K: *Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase* (Fosfatidilinositol-4-fosfat 5-cinasa).

PIX: *PAK-interacting exchange factor* (Factor d'intercanvi d'interacció amb PAK).

PLC: Fosfolipasa C.

PMA: *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate* (Forbol 12-Miristat 13-Acetat).

PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (Fenilmetilsulfonil Fluorós).

PLD: Fosfolipasa D.

PTB: *Phosphotyrosine Binding Domain* (Domini d'unió a tirosines fosforilades).

PtdIns(4,5)P₂: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate* (Fosfatidil inositol-4,5-bifosfat).

PTEN: *Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10* (Fosfatasa i homòloga de tensina deleccionada al cromosoma 10).

PTK: Proteïna tirosina cinasa.

PTP: *Protein-Tyrosine Phosphatases* (Fosfatases de tirosines en proteïnes).

PVDF: *Polyvinylidene fluoride* (Polivinilidè fluoròs).

RBL: *Rat Basophilic Leukemia* (Leucèmia de basòfils de rata).

RNA: Àcid ribonucleic.

RT-PCR: *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (Reacció en cadena de la polimerasa a temps real).

S1P: *Sphingosine 1-phosphate* (Esfingosina 1-fosfat).

SAP: *SLAM-Associated Protein* (Proteïna associada a SLAM).

SCF: *Stem cell factor* (Factor de cèl·lules mare).

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate* (Sulfat dodecil de sodi).

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Electroforesis de gels de poliacrilamida de sulfat dodecil de sodi).

SFM: *Serum Free Media* (Medi lliure de sèrum).

SH2: *SRC homology 2* (Domini 2 d'homologia a les cinases SRC).

SHC: *SH2-domain containing transforming protein C* (Proteïna C transformant que conté un domini SH2).

SHIP: *SH2-domain-containing inositol-5-phosphatase* (Inositol-5-fosfatasa que conté un domini SH2).

SHP: *SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase* (Fosfatasa de tirosines en proteïnes que conté un domini SH2).

SK: *Sphingosine kinase* (esfingosina cinasa).

SLAM: *Signaling Lymphocyte Activation Molecule* (Molècula senyalitzadora d'activació dels limfòcits).

SLP76: *SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa* (Proteïna leucocitària de 76 kDa que conté un domini SH2).

SOCs: *Store-operated channels* (Canals operats per reserves).

SOS: *Son of sevenless homologue*.

STIM1: *Sensor stromal interaction molecule 1* (Molècula 1 d'interacció al sensor estromal).

TBS-T: *Tris-Buffered Saline Tween-20* (Solució salina amb Tween-20 tamponada amb Tris).

TCR: Receptor de la cèl·lula T.

T_{FH}: *T Follicular Helper*.

TGFβ1: *Transforming Growth Factor β1* (Factor β1 de creixement transformant).

T_H: *T Helper*.

Thr (T): Treonina.

TKB: *Tyrosine Kinase Binding* (Cinasa d'unió a tirosines).

TLR: *Toll-Like Receptor*.

TNF: *Tumor-necrosis factor* (Factor de necrosis tumoral).

TRITC: *Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate* (Tetrametil rodamina iso-tiocianat).

Tyr (Y): Tirosina.

Val (V): Valina.

WB: *Western Blot*.

WCL: *Whole Cell Lysate* (Lisats cel·lulars totals).

XLP: *X-linked Lymphoproliferative Disease* (Malaltia limfoproliferativa lligada al cromosoma X).

ZAP70: *Zeta-chain-associates protein kinase 70* (Proteïna cinasa 70 associada a la cadena zeta).

I. INTRODUCCIÓ

I. INTRODUCCIÓ

Els mastòcits són cèl·lules efectores que participen com a mecanisme de defensa del sistema immunitari innat i que també actuen com a cèl·lules reguladores de la resposta immunitària adaptativa, on funcionen a través de receptors de la superfície cel·lular. Entre aquests receptors, els més estudiats són els que reconeixen el fragment Fc de les immunoglobulines (Galli et al., 2005a; Marshall and Jawdat, 2004; Mekori, 2004; Rivera et al., 2008). L'activació dels mastòcits requereix de la coordinació d'una sèrie d'esdeveniments que comencen amb l'agregació depenent d'al·lèrgen del receptor d'alta afinitat per la IgE (FcεRI) ocupat per anticossos IgE, i es propaga a l'interior de la cèl·lula per ensamblar una sofisticada xarxa de molècules senyalitzadores que controlen la resposta de la cèl·lula en front de certs estímuls o exposicions a al·lèrgens determinades (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). La xarxa de senyalització pot diferir segons el tipus i la força de l'estímul (Gonzalez-Espinosa et al., 2003) i la seva regulació es pot donar a molts nivells, empleant proteïnes i lípids que poden tenir rols positius, negatius o duals en la coordinació i regulació de les respostes (Gilfillan and Tkaczyk, 2006; Kraft and Kinet, 2007; Rivera and Gilfillan, 2006).

1. CARACTERÍSTIQUES DELS MASTÒCITS

1.1 Biologia bàsica dels mastòcits

Els mastòcits són cèl·lules derivades de cèl·lules mare hematopoiètiques pluripotencials CD34⁺ i es desenvolupen a partir d'un progenitor de cèl·lula mieloide sota la influència de factors de creixement, SCF (*Stem Cell Factor*) i citocines, que també regulen el desenvolupament dels diversos subtipus de mastòcits. Aquest tipus cel·lular circula a la sang en forma de precursors, i la seva maduració es dona posteriorment a la seva migració a teixits vascularitzats o cavitats seroses, on resideixen finalment aquests mastòcits (Kawakami and Galli, 2002; Kirshenbaum et al., 1991; Kitamura, 1989; Metcalfe et al., 1997; Mitsui et al., 1993; Toru et al., 1998). Els mastòcits es troben ben posicionats, a la pell o les barreres vasculars i mucoses, per ser uns dels primers tipus cel·lulars del sistema immunitari que interaccionen amb antígens i al·lèrgens ambientals, patògens invasors i toxines (Bischoff, 2007; Galli et al., 2008).

Els mastòcits sovint s'han considerat l'equivalent tissular dels basòfils, donat que ambdós tipus cel·lulars contenen grànuls plasmàtics basofílics, alliberen histamina i expressen el receptor d'alta afinitat per la IgE (FcεRI), però anàlisis morfològics i funcionals més detallats indiquen que els mastòcits humans són més propers als monòcits i macròfags, mentre que els basòfils comparteixen propietats principalment amb els eosinòfils (Agis et al., 1996; Denburg, 1992; Foster et al., 2002; Huang et al., 1993; Nakajima et al., 2001).

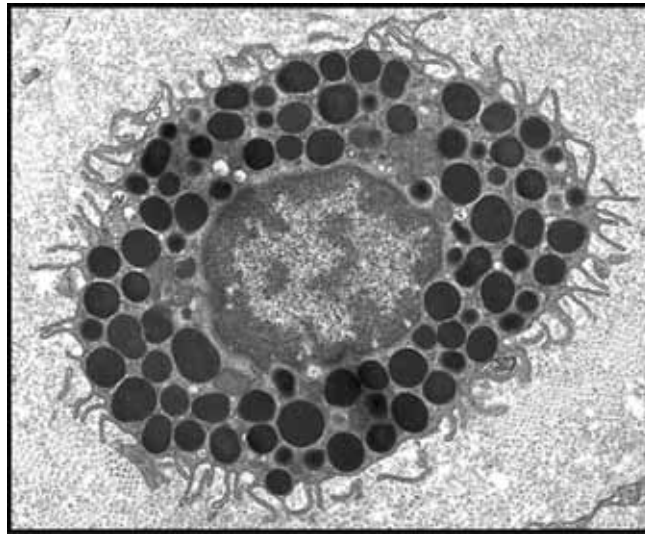


Fig 1. Imatge d'un mastòcit. Imatge obtinguda per microscopia confocal d'un mastòcit. Pertany a un tall histològic de teixit connectiu. Imatge extreta de la base de dades d'imatges del *Histology Learning System* de la Universitat de Boston (<http://www.bu.edu/histology/>).

Els mastòcits poden proliferar després d'una estimulació adequada, de l'augment del seu reclutament i de la maduració local dels seus progenitors. Per altra banda, processos de remodelació tissular, processos inflamatoris i respostes de cèl·lules T helper 2 (T_H2) poden donar lloc a un augment del nombre de mastòcits, a canvis en la seva distribució tissular, i a canvis en les seves característiques fenotípiques. Tots aquests processos estan finament regulats a través de diversos factors de creixement (ex: TGFβ1, *Transforming Growth Factor β1*), citocines (ex: IL-13, IL-4, IL-9), quimiocines i el principal factor de desenvolupament i supervivència en mastòcits, el SCF (Kawakami and Galli, 2002; Kitamura, 1989; Metcalfe et al., 1997; Miller et al., 1999; Ryan et al., 2007).

Els mastòcits secreten una gran varietat de productes biològicament actius que poden potenciar funcions pro-inflamatòries, antiinflamatòries i/o immunosupressores (Galli et

al., 2005a; Galli et al., 2005b; Mekori and Metcalfe, 2000; Sayed et al., 2008). La força i la natura de la resposta mastocitària a diversos estímuls activadors pot ser influenciada per factors genètics i microambientals que poden afectar el patró d'expressió o les propietats funcionals dels receptors de superfície o de les molècules senyalitzadores que contribueixen a aquesta resposta (Blank and Rivera, 2004; Galli et al., 2005a; Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

Els mastòcits es consideren les cèl·lules efectores claus en la inflamació al·lèrgica (Bischoff and Crowe, 2005; Bradding et al., 2006; Gurish and Austen, 2001; Leung et al., 2004), tot i que també presenten moltes altres funcions als teixits (Bischoff, 2007).

1.2 Funcions dels mastòcits

Entre les funcions fisiològiques dels mastòcits, es troben la regulació de funcions epitelials (secreció i permeabilitat epitelial); de funcions del múscul llis (peristalsis i broncoconstricció); de funcions endotelials (flux sanguini, coagulació i permeabilització vascular); de funcions immunitàries (regulació de respostes innates i adaptatives, tolerància perifèrica i reclutament i activació de neutròfils, eosinòfils i limfòcits); de funcions neuronals (interaccions neuroimmunes, peristalsis i dolor) i d'altres funcions tissulars (cicatrització i fibrosis). Les funcions realitzades pels mastòcits es troben mitjançades per l'ampli ventall de mediadors alliberats per aquest tipus cel·lular (Fig 2.) (Bischoff, 2007; Galli et al., 2005b; Lu et al., 2006; Vliagoftis and Befus, 2005). La implicació dels mastòcits en aquest gran nombre de funcions explica perquè aquest tipus cel·lular es troba implicat en diferents tipus de patologies, a més dels desordres al·lèrgics (veure apartat 2., Fisiopatologia del mastòcit) (Bischoff, 2007).

Pel que fa a les funcions immunitàries, s'ha descrit que els mastòcits tenen un paper central en la defensa de l'hoste en front de bacteris i paràsits, mitjançant l'alliberació de citocines i altres mediadors que recluten neutròfils, eosinòfils i cèl·lules T helper 2 a llocs d'infecció (Malaviya and Georges, 2002; Marshall, 2004). Gran part de les funcions que realitzen els mastòcits al sistema immunitari consisteixen, més que en funcions efectores, en funcions immunomoduladores.

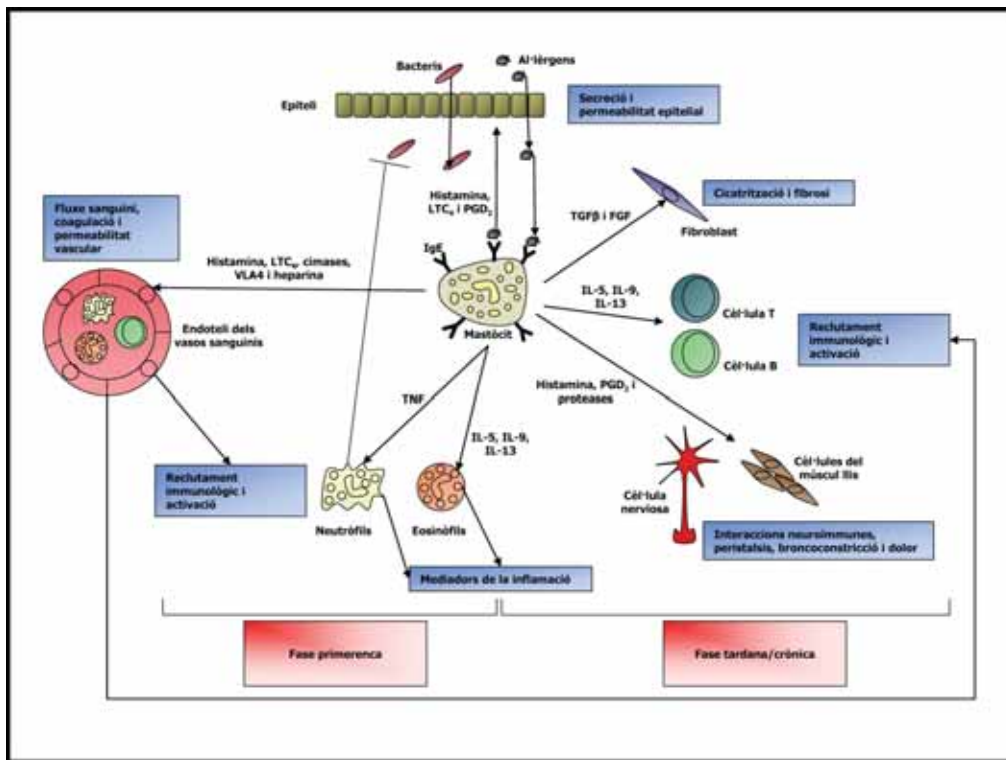


Fig 2. Funcions dels mastòcits humans i paper en la inflamació al·lèrgica. Resum de les funcions dels mastòcits. FGF, *Fibroblast growth factor*; IL, interleucina; LTC₄, leucotriè 4; PGD₂, prostaglandina 2; TGFβ, *Transforming growth factor-β*; TNF, *Tumor-necrosis factor*; VLA4, *Very late antigen 4*. Basat en el model de (Bischoff, 2007).

1.2.1 Funcions immunomoduladores dels mastòcits

A part de les seves funcions com a cèl·lules efectores, els mastòcits expressen diverses molècules co-estimuladores que els permeten funcionar com a cèl·lules immunomoduladores, és a dir, que poden realitzar efectes sobre altres cèl·lules del sistema immunitari (DCs, cèl·lules T, cèl·lules B, monòcits, macròfags i granulòcits) i sobre altres cèl·lules estructurals (cèl·lules endotelials vasculares, cèl·lules epitelials i cèl·lules del múscul llis). En aquest sentit, els mastòcits poden tenir un paper immunomodulador positiu i un paper immunomodulador negatiu (Galli et al., 2008). S'han descrit tres possibles hipòtesis que determinen el motiu pel qual els mastòcits tenen la capacitat d'exercir funcions immunomoduladores tan positives com negatives: a) que les funcions immunomoduladores positives o negatives depenen del llinatge dels mastòcits; b) que els mastòcits poden tant potenciar com més tard limitar certes respostes immunes innates i adaptatives; i c) que les funcions immunomoduladores positives o negatives depenen en gran part del marc biològic de l'individu (Galli et al., 2008). A favor de la segona hipòtesi (b) es troba el fet que els mastòcits són

importants per promoure l'homeòstasi, fins i tot en els casos en què inicialment i amb la finalitat de promoure la defensa de l'hoste, han estat els mateixos mastòcits els qui han pertorbat aquesta homeòstasi (Maurer et al., 2004; Metz et al., 2006; Piliponsky et al., 2008; Schneider et al., 2007).

Funcions immunomoduladores positives

Els mastòcits presenten funcions immunoreguladores positives que poden promoure la defensa de l'hoste o promoure una malaltia, i que reflecteixen l'acció dels seus mediadors emmagatzemats o de les seves citocines. Entre els efectes immunomoduladors positius dels mastòcits podem trobar les següents funcions, revisades a (Galli et al., 2008):

- Promoure la migració, maduració, diferenciació i funció de cèl·lules del sistema immunitari a través de la secreció de factors com el TNF (*Tumor-Necrosis Factor*), quimiocines, leucotriens, proteases i mediadors com la histamina.
- Presentar antígens a les cèl·lules T o incrementar la presentació d'antigen mitjançant la captura d'antígens units a IgE a través del FcεRI, posteriorment a la qual entren en un procés d'apoptosi.
- Promoure la producció d'IgE per part de les cèl·lules B (secretant IL-4, IL-13 i CD40L).
- Promoure el reclutament de cèl·lules del sistema immunitari mitjançant la producció de TNF i altres mediadors que incrementen l'expressió de molècules d'adhesió per part de cèl·lules endotelials vasculares.
- Promoure respostes de cèl·lules T helper 2 a través dels efectes que tenen certes prostaglandines en la maduració de les DC.
- Promoure la producció de quimiocines i citocines per part de cèl·lules del múscul llis de les vies aèries, mitjançant la secreció de TNF, IL-4 i IL-13.
- Contribució a la hiper-reativitat i la inflamació en models d'inflamació al·lèrgica de les vies aèries (Kim et al., 2007; Nakae et al., 2007; Reuter et al., 2008).
- Promoure la supervivència de l'hoste en models d'infecció bacteriana i la resistència de l'hoste en certes infeccions parasitàries (Echtenacher et al., 1996; Malaviya et al., 1996; Matsuda et al., 1990; Maurer et al., 1998; Maurer et al., 2006).

- Promoure la supervivència de l'hoste en certs models d'immunitat innata i adaptatius, per mitjà de proteases (Thakurdas et al., 2007).

Funcions immunomoduladores negatives

Els mastòcits presenten també funcions immunoreguladores negatives que limiten la magnitud i/o la durada de les respostes innates o adaptatives del sistema immunitari. Gran part d'aquestes funcions es donen a través de la producció de IL-10, tot i que poden haver altres productes responsables. Entre els efectes immunomoduladors negatius dels mastòcits podem trobar les següents funcions, revisades a (Galli et al., 2008):

- Suprimir la sensibilització en la hipersensibilitat per contacte, a través de la producció d'histamina induïda per la llum ultraviolada (Hart et al., 1998).
- Suprimir la producció de citocines per part de les cèl·lules T i monòcits, a través de la secreció de IL-10.
- Suprimir la producció de citocines i quimiocines pro-inflamatòries per part dels queratinòcits, a través de la secreció de IL-10.
- Potenciar l'habilitat de les DCs per disminuir la proliferació de cèl·lules T i la seva producció de citocines, a través de la secreció de IL-10.

2. FISIOPATOLOGIA DEL MASTÒCIT

2.1 Paper dels mastòcits en la inflamació al·lèrgica

En les reaccions al·lèrgiques d'hipersensibilitat de tipus I, els mastòcits humans mitjancen la fase primerenca a través de l'alliberació de grànuls pre-formats i mediadors com la histamina, els leucotriens, proteases i altres mediadors, que apareix minuts després de la lligació de la IgE (mitjançant l'al·lergen) unida al receptor d'alta afinitat per la IgE (FcεRI) (Bischoff and Crowe, 2005; Bradding et al., 2006; Cole et al., 2001; Leung et al., 2004; Marone et al., 2005; Wood, 2004). Posteriorment, tenen lloc les reaccions de fase tardana, entre les 6 i les 12h posteriors a l'activació, que són les causants dels símptomes crònics i recurrents dels individus al·lèrgics. Aquesta fase ve mitjançada per la producció de citocines i quimiocines, en part també alliberades pels eosinòfils, neutròfils i basòfils que s'han infiltrat al lloc d'inflamació (Brown et al., 2008;

Krishna et al., 2001). Els mastòcits humans indueixen el reclutament i l'activació local dels eosinòfils mitjançant l'expressió de factors com la IL-5, i indueixen el reclutament de neutròfils mitjançant l'alliberació de IL-8 i TNF. Aquest últim factor seria el responsable de la infiltració de neutròfils en llocs d'inflamació al·lèrgica (Bischoff et al., 1999a; Lorentz et al., 1999; Lorentz et al., 2000). Els mastòcits, a més, també participen en la regulació de les funcions dels limfòcits en el curs de les inflamacions al·lèrgiques, mitjançant l'alliberació de prostaglandines, com la PGD₂ i citocines, com la IL-13. L'alliberació de citocines té diferents efectes: per una banda, genera un canvi d'isotip per tal que les cèl·lules B produeixin IgE; i per una altra banda, l'alliberació de IL-13 a més s'incrementa amb la presència de IL-4, que ahora té capacitat per canviar el patró de citocines pro-inflamatòries produïdes pels mastòcits (TNF, IL-1 i IL-6) a citocines T_H2. Els efectes descrits es troben resumits a la Fig 2. (Dahlen and Kumlin, 2004; Gauchat et al., 1993; Huels et al., 1995; Lorentz et al., 2000; Pawankar et al., 1997).

2.2 Paper dels mastòcits en les malalties al·lèrgiques

2.2.1 Asma

L'asma és un desordre inflamatori complex associat amb alteracions en la reactivitat i el remodelatge del múscul llis de les vies aèries, una producció excessiva de moc, un augment en la disposició de col·lagen, una hiper-resposta de la broncoconstricció i una infiltració de limfòcits, neutròfils i eosinòfils. L'asma té un component al·lèrgic caracteritzat per una sensibilitat a al·lèrgens i un augment dels nivells d'IgE específica i IgE total al sèrum. Els mastòcits semblen tenir un paper important en l'etiologia de l'asma, donat que en el múscul llis de les vies respiratòries dels pacients asmàtics, es troben incrementats el nombre de mastòcits, el seu receptor KIT i el lligand d'aquest receptor, el SCF (Al-Muhsen et al., 2004; Amin et al., 2005; Begueret et al., 2007; Berger et al., 2003; Brightling and Bradding, 2005; Brightling et al., 2002; El-Shazly et al., 2006).

La localització dels mastòcits en el múscul llis de les vies respiratòries facilita la hiper-resposta a través de l'alliberació localitzada de mediadors i/o a través del contacte directe cèl·lula-cèl·lula. Les cèl·lules del múscul llis de les vies respiratòries poden reclutar i retenir els mastòcits, a través de l'alliberació de quimiocines i factors de

creixement per receptors expressats en els mastòcits dels pulmons, i també a través de la producció de SCF, que indueix el reclutament, la supervivència i la diferenciació dels mastòcits (Bradding et al., 2006; Brightling et al., 2005a; Brightling et al., 2005b). Per altra banda, s'ha descrit que els mastòcits del pulmó s'adhereixen a les cèl·lules de múscul llis de les vies respiratòries, a través de molècules d'adhesió que aquestes presenten a la seva superfície (Brightling et al., 2002; Yang et al., 2006). S'ha descrit que els mastòcits també s'infiltraen a l'epiteli bronquial en pacients asmàtics, i que això augmenta el seu accés als al·lèrgens (Bradding et al., 1994; Laitinen et al., 1993; Pesci et al., 1993).

Els mastòcits tenen diversos efectes sobre les cèl·lules del múscul llis de les vies aèries. Per una banda, indueixen la seva contracció a través de l'alliberació de mediadors (histamina, triptasa, IL-4, IL-13, PGD₂, LTC₄) (Berger et al., 1999; Berger et al., 2002; Sekizawa et al., 1989). De fet, s'ha observat la presència de mastòcits desgranulats en el múscul llis de les vies aèries dels pacients asmàtics, i es creu que podria existir una correlació entre el nombre de mastòcits desgranulats i el grau de severitat de la malaltia (Beguirer et al., 2007; Carroll et al., 2002a). Per altra banda, l'alliberació de citocines per part dels mastòcits és un mecanisme important d'activació de les cèl·lules del múscul llis de les vies aèries (Brightling et al., 2003; Wills-Karp, 2004). Els mastòcits també tenen capacitat per estimular les glàndules secretores de moc, i el nombre de mastòcits localitzats a prop de les glàndules mucoses, correlaciona amb el grau de producció de moc (Bradding, 2003; Carroll et al., 2002a; Carroll et al., 2002b).

Una altra via d'activació dels mastòcits que podria ser important en la patogènesi de l'asma és a través de la IgE monomèrica, que s'ha demostrat que, en absència d'al·lèrgen pot induir flux de calci, desgranulació, supervivència i producció de citocines i quimiocines (Cruse et al., 2005; Kalesnikoff et al., 2001; Matsuda et al., 2005). A més, també s'ha descrit una correlació entre els nivells d'IgE en sèrum, la hiperresposta bronquial i l'asma (Burrows et al., 1989; Sears et al., 1991).

2.2.2 Rinitis al·lèrgica

La rinitis al·lèrgica és una malaltia molt comú i la seva fisiopatologia comparteix moltes similituds amb l'asma (Gelfand, 2004). Els mastòcits resideixen de manera constitutiva en la mucosa nasal i generalment no surten a l'epiteli superficial de les vies aèries.

Amb l'exposició a l'al·lergen, els mastòcits migren a l'epiteli, on proliferen (Kawabori et al., 1995).

En el líquid dels rentats nasals de pacients amb rinitis al·lèrgica s'observen evidències de desgranulació dels mastòcits després de l'aplicació d'un al·lergen, ja que es detecten nivells elevats de triptasa, histamina, leucotriens i prostaglandines (Creticos et al., 1984; Freeland et al., 1989; Proud et al., 1992; Shaw et al., 1985). Tots aquests mediadors són els causants dels símptomes principals de la fase primerenca de la rinitis al·lèrgica: esternuts, prurit i congestió nasal. La histamina és el mediador principal que indueix vasodilatació, augmenta la permeabilitat vascular i la secreció glandular, i actua sobre les terminacions dels nervis sensorials del nervi trigemin, per causar esternuts. Després de l'activació mastocitària, en la rinitis al·lèrgica s'observa un fort patró d'expressió de citocines T_H2 (TNF α , IL-4, IL-5, IL-6 i IL-13) que es considera clau en la fase tardana de la malaltia, on s'observa infiltració d'eosinòfils i de cèl·lules T, que comporten un augment d'espessor de la mucosa nasal i una disminució de la resistència de les vies aèries nasals (Baraniuk, 1997). En la rinitis al·lèrgica també s'observa una hiper-resposta nasal, que vindria donada per una reactivitat neuronal exagerada, on estaria involucrat el factor NGF (*Nerve Growth Factor*). El NGF podria ser un factor de creixement addicional en el desenvolupament dels mastòcits que es troba alterat en el cas de la rinitis al·lèrgica, ja que els nivells de NGF basals en el líquid del rentat nasal de pacients amb aquesta malaltia es troben elevats, i s'incrementen després de l'exposició a l'al·lergen (Sanico et al., 1999; Sanico et al., 2000; Welker et al., 2000; Wu et al., 2006).

2.2.3 Dermatitis atòpica

Els mastòcits es troben elevats en una gran varietat de desordres crònics inflamatoris de la pell, incloent la dermatitis atòpica (Damsgaard et al., 1997). Els mastòcits resideixen a la dermis papil·lar i migren a través de la làmina basal cap a l'epidermis en les lesions produïdes per la dermatitis atòpica. Un cop a l'epidermis, els mastòcits poden induir l'activació dels queratinòcits i l'estimulació del creixement endotelial, donant lloc a la neoangiogènesi (Groneberg et al., 2005a).

En el cas de la dermatitis atòpica, no s'observen nivells elevats d'histamina (mediador important en altres malalties atòpiques), mentre que els nivells de triptasa són força

elevats (Steinhoff et al., 2003). La cimasa, un altra proteasa dels mastòcits, també sembla jugar un paper important en la generació i el manteniment de la inflamació crònica observada en la dermatitis atòpica, debilitant la barrera de la pell i incrementant d'aquesta manera la permeabilitat d'al·lèrgens i microbis (Badertscher et al., 2005). En la majoria de pacients amb dermatitis atòpica s'observen nivells elevats d'IgE total, no unida al receptor d'alta afinitat per la IgE. Això fa pensar que potser en aquesta malaltia existeix un mecanisme d'activació mastocitària diferent al de l'activació clàssica a través del receptor d'alta afinitat per la IgE i independent d'IgE (Fischer et al., 2006). Per altra banda, en la fisiopatologia de la dermatitis atòpica també semblen tenir importància els contactes entre els mastòcits i els nervis. En aquest aspecte una varietat de neuropèptids (substància P, calcitonina, pèptid intestinal vasoactiu, NGF) poden donar lloc a la inflamació (Ansel et al., 1996; Groneberg et al., 2005b; Groneberg et al., 2003; Jarvikallio et al., 2003; Welker et al., 2000).

2.2.4 Anafilaxi

L'anafilaxi és una reacció sistèmica aguda i severa enfront d'un estímul forani, sovint associat amb una activació mastocitària. La implicació dels mastòcits en aquesta malaltia, ve donada pel fet que els nivells de triptasa en sèrum, que predominantment venen de la desgranulació dels mastòcits, augmenten considerablement entre 1 i 2 hores després de l'aparició de l'anafilaxi mitjançada per IgE (Schwartz et al., 1989), tot i que també s'han descrit casos d'anafilaxi amb nivells de triptasa normals (Schwartz, 2004). L'anafilaxi clàssica depenent d'IgE es dona posteriorment a l'exposició a antigens específics, tot i que també podrien existir certs agents o estímuls que poden activar els mastòcits d'una manera independent de la IgE (Brown et al., 2008).

Tot i que l'anafilaxi es considera una reacció sistèmica, la presència i l'activació dels mastòcits en òrgans específics jugaria un paper important en la severitat de la malaltia (Brown et al., 2008). En el cor, els mastòcits es localitzen entre les fibres del miocardi, al voltant dels vasos sanguinis i de les arteries. Aquets mastòcits cardíacs poden secretar *in vitro* diversos mediadors de l'anafilaxi, com el PAF (*Platelet-activation factor*), que indueix hipotensió i disfunció cardíaca, conduint a un *shock* anafilàctic (Genovese et al., 1996; Marone et al., 2004; Montrucchio et al., 2000). Per altra

banda, el nombre de mastòcits també és important en l'anafilaxi. S'ha descrit que els individus amb anafilaxi recurrents presenten un nombre de mastòcits dèrmics superior als pacients sans. A més, la mastocitosi, que és un malaltia caracteritzada per una acumulació de mastòcits als teixits sovint s'associa amb episodis espontanis d'hipotensió (Brown et al., 2008).

2.2.5 Mastocitosi

El terme mastocitosi correspon a aquells desordres caracteritzats per un augment patològic del nombre de mastòcits als teixits. L'elevat nombre d'aquest tipus cel·lular, així com l'augment dels seus mediadors, comporta una sèrie de conseqüències que donen lloc a malalties amb característiques clíniques comuns. Entre aquestes, les característiques patològiques més remarcables són les acumulacions de mastòcits a la pell, al tracte gastrointestinal, a la medul·la òssia, al fetge, a la melsa i als nòduls limfàtics; així com la freqüent associació de l'augment de mastòcits amb desordres hematològics (Metcalfe, 2008).

Les mastocitosis es classifiquen en dos tipus principals: cutànies i sistèmiques, tot i que existeix alhora subclassificacions d'aquestes dues categories en funció de les seves característiques clíniques, de la seva patologia i del seu pronòstic (Valent et al., 2007; Valent et al., 2001).

La majoria de pacients amb mastocitosi presenten mutacions en el receptor KIT, detectables bàsicament quan s'examinen les cèl·lules mononuclears de la medul·la òssia. Hi ha diferents tipus de mutacions, tot i que la més freqüent consisteix en el canvi del residu d'àcid aspàrtic 816 per una valina (D816V) (Metcalfe, 2008; Nagata et al., 1995). A part de la via dependent del receptor KIT, existeixen altres mecanismes biològics, com la inhibició de l'apoptosi dels mastòcits, que poden conduir al desenvolupament de la mastocitosi (Lahortiga et al., 2008).

2.2.6 Malaltia al·lèrgica de l'ull

Hi ha diferents tipus de malalties al·lèrgiques oculars, tot i que la més freqüent és la conjuntivitis (Ono and Abelson, 2005). La localització dels mastòcits en proximitat a l'ambient extern de la mucosa de l'ull permet que s'exposin a al·lèrgens, facilitant

d'aquesta manera la lligació de la IgE unida a la membrana dels mastòcits, conduint a la desgranulació i l'alliberació de mediadors inflamatoris (Brown et al., 2008; Ono and Abelson, 2005).

En pacients al·lèrgics simptomàtics, s'ha descrit un augment dels mastòcits amb evidències de desgranulació en biòpsies de la conjuntiva (Macleod et al., 1997).

2.3 Paper dels mastòcits en les malalties no al·lèrgiques

La rellevància de l'activació mastocitària en absència de processos al·lèrgics encara no està gaire determinada. S'ha descrit que poden tenir un paper en la defensa contra microorganismes, en malalties proliferatives, en malalties autoimmunes, en malalties vasculars i en malalties del sistema nerviós central (Lindstedt and Kovanen, 2004; Silver et al., 2004; Theoharides et al., 2005; Valent et al., 2002; Woolley, 2003; Zappulla et al., 2002).

S'ha proposat que l'agregació del FcεRI a través de la lligació de la IgE mitjançant paràsits específics podria ser un mecanisme per al reconeixement de paràsits, conduint a un reacció immune antiparasitària. En la defensa de l'hoste contra la infecció per paràsits, són importants els mediadors alliberats pels mastòcits com les citocines T_H2, la IL-5 i la IL-13 (Bischoff, 2007; Finkelman et al., 2004).

Els mastòcits humans podrien tenir un efecte protector en la defensa de l'hoste contra infeccions virals. S'ha vist que l'estimulació *in vitro* en mastòcits humans del receptor TLR3 (*Toll-like receptor 3*) (que té capacitat per reconèixer virus de doble cadena de RNA) disminueix l'alliberació de mediadors i l'adhesió de les cèl·lules a les proteïnes de la matriu extracel·lular, tot i que genera un augment en la producció de IFN γ (Kulka et al., 2004).

3. RECEPTOR D'ALTA AFINITAT PER LA IgE (FcεRI)

L'estímul clàssic i possiblement el més efectiu per l'activació dels mastòcits és la lligació de la IgE (mitjançant un al·lergen) unida al receptor d'alta afinitat per la IgE (FcεRI) (Bischoff, 2007). Hi ha altres mecanismes independents d'IgE que poden desencadenar l'activació mastocitària, però no són tan coneguts. Se sap que l'IFN γ fa que els

mastòcits augmentin la seva expressió del receptor Fc γ RI fins a un nivell que els permeti activar l'alliberació de mediadors a través de l'agregació d'aquest receptor (Okayama et al., 2001). També s'ha descrit que certes substàncies com les proteïnes del complement C3a i C5a, la substància P i altres neuropèptids poden funcionar com a desencadenants de l'alliberació de mediadors (el-Lati et al., 1994; Guhl et al., 2005), tot i que generalment els mastòcits requereixen de la cooperació entre dos senyals per assolir una activació òptima: un senyal depenent d'antigen (que majoritàriament seria el transmès per la IgE a través del Fc ϵ RI) i un altre senyal mitjançant per una molècula co-estimuladora (Bischoff, 2007).

3.1 Estructura del Fc ϵ RI

El Fc ϵ RI és un receptor multimèric de la superfície cel·lular que uneix el fragment Fc de la IgE amb una afinitat molt elevada. Existeix en dues formes: una tetramèrica i una trimèrica. En la forma tetramèrica completa, el Fc ϵ RI està compost per una cadena α (Fc ϵ RI α) que uneix la IgE, una cadena β (Fc ϵ RI β) que creua quatre cops la membrana cel·lular (i que es troba absent la forma trimèrica del Fc ϵ RI) i un homodímer de cadenes γ (Fc ϵ RI γ), unides per un pont disulfur (Fig 3.) (Kraft and Kinet, 2007; Nadler et al., 2000; Rivera et al., 2008). Mentre que la forma trimèrica del Fc ϵ RI pot expressar-se en diversos tipus cel·lulars del sistema immunitari (cèl·lules presentadores d'antigen (APC), monòcits, macròfags, eosinòfils, cèl·lules dendrítiques (DCs) (incloses les cèl·lules de Langerham), etc.), la forma tetramèrica s'expressa bàsicament en mastòcits i basòfils (Blank and Rivera, 2004; Kraft and Kinet, 2007; Nadler et al., 2000; Rivera et al., 2008). També s'ha descrit l'expressió del Fc ϵ RI, amb una composició no determinada de les seves unitats, en plaquetes i neutròfils humans (Hasegawa et al., 1999; Joseph et al., 1997; Kraft and Kinet, 2007).

La cadena α pertany a la superfamília de les immunoglobulines i està compresa per dos dominis extracel·lulars de tipus immunoglobulina que uneixen una única molècula d'IgE, un domini transmembrana i una cua citoplasmàtica. A més presenta 7 llocs de N-glicosilació. El Fc ϵ RI presenta una afinitat molt elevada per la IgE ($K_d=10^{-10}M$) (Kraft and Kinet, 2007).

Les cadenes β i γ no tenen cap rol en la unió de lligands extracel·lulars, sinó que la seva funció és iniciar la senyalització (Gilfillan and Tkaczyk, 2006; Kraft and Kinet,

2007). Ambdues cadenes presenten motius d'activació d'immunoreceptor basats en tirosina (ITAMs), essencials per una senyalització competent del receptor i que presenten la següent seqüència consens: (Asp/Glu)-X-X-**Tyr**-X-X-Leu-(X)₇₋₁₁-**Tyr**-X-X-(Leu/Ile), on la X representa un aminoàcid qualsevol (Rivera et al., 2008). Aquests ITAMs són fosforilats després de la unió de l'antigen a les molècules d'IgE unides al receptor, donant lloc a l'associació de les cadenes β i γ amb molècules de senyalització intracel·lular a través dels seus dominis SH2 (*SRC homology 2*). La cadena β humana funciona com a amplificadora dels senyals del Fc ϵ RI i de l'expressió a la superfície cel·lular, mentre que les cadenes γ són les unitats de senyalització principals i indispensables del Fc ϵ RI (Kraft and Kinet, 2007). En absència de la cadena β , l'activació del mastòcit dependent del receptor es redueix només de manera parcial (Ra et al., 1989), mentre que en absència de la cadena γ , aquesta activació s'aboleix completament (Repetto et al., 1996; Takai et al., 1994).

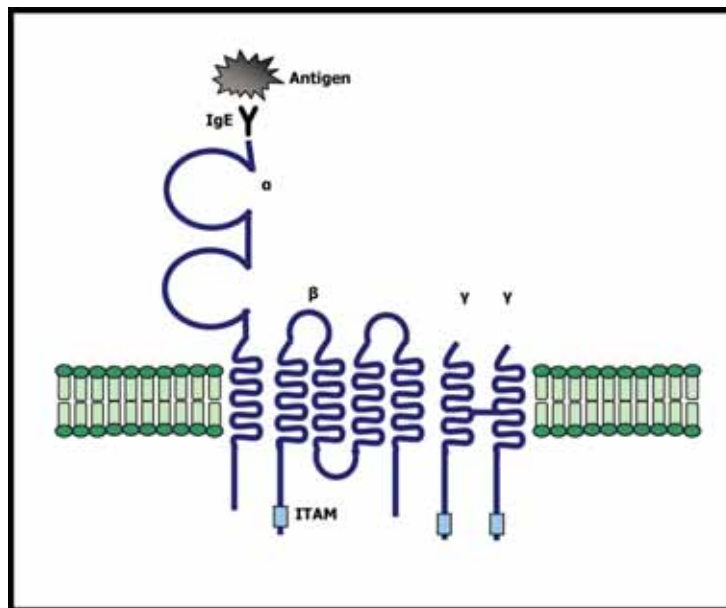


Fig 3. Estructura del receptor d'alta afinitat per la IgE (Fc ϵ RI).

3.2 Regulació de l'expressió del Fc ϵ RI

L'expressió a la superfície cel·lular del Fc ϵ RI està regulada per la disponibilitat dels components específics del receptor (per *splicing* alternatiu es pot generar una cadena β a la qual li manquen una sèrie d'aminoàcids (cadena β T), que competeix per unir-se

a la cadena α , fent disminuir l'expressió del receptor) i per la quantitat del seu lligand (IgE). S'ha descrit que la forma monomèrica de la IgE fa augmentar l'expressió del Fc ϵ RI a la superfície cel·lular, estabilitzant el complex a la membrana i evitant així la seva degradació. Aquest augment de l'expressió del Fc ϵ RI, mediat per la IgE, condueix a un augment en les funcions efectores dels mastòcits (Kraft and Kinet, 2007).

3.3 Funcions biològiques del Fc ϵ RI

El Fc ϵ RI expressat en la membrana dels mastòcits i els basòfils és un conegut regulador clau tant en les reaccions al·lèrgiques immediates mitjançades per la IgE (vasodilatació, augment de la permeabilitat vascular, augment de les molècules d'adhesió, broncoconstricció, etc.), com en les reaccions al·lèrgiques tardanes (vasodilatació, augment de la permeabilitat vascular, augment de les molècules d'adhesió, broncoconstricció, reclutament de leucòcits, activació de les cèl·lules T, etc.). Això queda reflectit per l'alliberació de mediadors preformats (com la histamina, l'heparina, proteases, etc.), la generació de leucotriens i prostaglandines, i la síntesi *de novo* de citocines i quimiocines, quan el receptor unit a la IgE és activat per l'antigen. Recentment, també s'ha establert que el Fc ϵ RI expressat en mastòcits i basòfils, juga un paper en la hipersensibilitat cutània (CHS), que és una mena d'hipersensibilitat de tipus retardat (DTH: *Delayed-Type Hypersensitivity*) (Kraft and Kinet, 2007).

El receptor Fc ϵ RI unit a IgE pot actuar independentment de la lligació d'aquesta IgE per l'antigen. Certs estudis avalen que la IgE sola o monomèrica pot potenciar la supervivència dels mastòcits després d'una privació de factors de creixement (Asai et al., 2001; Kalesnikoff et al., 2001; Kraft and Kinet, 2007). Alguns clons d'IgE poden produir baixos nivells d'agregació del Fc ϵ RI sense lligació amb l'antigen. La incubació amb aquests clons d'IgE indueix senyalitzacions intracel·lulars que generalment se solen donar després d'una lligació "clàssica" del receptor unit a IgE amb el seu antigen, donant lloc a esdeveniments induïts pel Fc ϵ RI, com la síntesi i l'alliberació d'histamina (Kraft and Kinet, 2007).

S'han descrit altres funcions biològiques del Fc ϵ RI en la seva forma trimèrica, expressada per APCs, monòcits, macròfags, eosinòfils, DCs, etc. (Kraft and Kinet, 2007; Rivera et al., 2008). El receptor que es troba en la superfície cel·lular de les APCs, té un rol en la patogènesi i la fase efectora de les malalties al·lèrgiques, i de la

mateixa manera que el receptor dels mastòcits i els basòfils, també pot tenir una funció pro-inflamatòria en pacients al·lèrgics (Kraft and Kinet, 2007). En el cas dels eosinòfils, el FcεRI dóna lloc a la citotoxicitat mitjançada per la IgE, que representa un mecanisme de defensa enfront de paràsits (helminths) (Kojima et al., 1985).

4. TRANSDUCCIÓ DE SENYALS EN MASTÒCITS A TRAVÉS DEL FcεRI

Després de la lligació del FcεRI unit a IgE amb l'antigen s'inicia una complexa cascada de senyalització intracel·lular, que condueix finalment a les funcions efectores dels mastòcits (Kraft and Kinet, 2007).

El FcεRI manca d'activitat tirosina cinasa pròpia i en la seva senyalització participen activament les seves cadenes β i γ , a través dels ITAMs, presents a les seves cues citoplasmàtiques. Després de ser fosforilats, els ITAMs uneixen els dominis SH2 de proteïnes tirosina cinases (PTKs), principalment les cinases LYN i FYN, de la família de les SRC cinases; i SYK, de la família SYK de cinases de tirosina (Kinet, 1999; Kraft and Kinet, 2007; Rivera et al., 2002; Rivera et al., 2008; Turner and Kinet, 1999). LYN i FYN s'associen a la cadena β del receptor, mentre que SYK o fa a la cadena γ (Kraft and Kinet, 2007). Per una eficient fosforilació del receptor, es requereix la fusió d'aquest receptor amb microdominis especialitzats de la membrana plasmàtica, coneguts com a *lipid rafts* (Field et al., 1999; Gilfillan and Tkaczyk, 2006). Aquests microdominis estan enriquits amb colesterol, esfingolípids, i altres fosfolípids saturats, així com amb una varietat de proteïnes senyalitzadores que inclouen la cinasa LYN, la qual resideix bàsicament en aquests *lipid rafts* (Gilfillan and Tkaczyk, 2006; Rivera et al., 2008). L'activitat de la cinasa LYN present en els *lipids rafts* és considerablement superior a la de la cinasa LYN que es troba fora d'aquests microdominis, degut a l'exclusió de fosfatases inactivadores d'aquestes regions (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). LYN és clau en la fosforilació dels residus tirosina dels ITAMs a través de transfosforilació (Pribluda et al., 1994; Rivera et al., 2008). Després de la lligació del receptor, té lloc una via principal, a través de la cinasa LYN, la qual s'activa i fosforila les cadenes β i γ del FcεRI. SYK llavors és reclutada a la cadena γ . La cinasa SYK es considera essencial per la propagació del senyal (Benhamou et al., 1993; Kihara and Siraganian, 1994). La unió de SYK a la cadena γ del FcεRI condueix a la seva pròpia activació i fosforilació d'una manera dependent de LYN (El-Hillal et al., 1997; Kraft and

Kinet, 2007). Entre els substrats de la cinasa SYK es troben els residus tirosina de les proteïnes adaptadores LAT (*Linker for activation of T cells*) i NTAL (*Non-T-cell activation linker*), proteïnes fonamentals per a l'organització, coordinació i regulació dels senyals generats (Iwaki et al., 2005; Rivera, 2002; Rivera, 2005; Rivera et al., 2008), ja que participen, un cop fosforilats, en l'assemblatge de grans complexos de senyalització que inclouen altres molècules com: GAB2 (*Grb2-associated binding protein 2*); SLP76 (*SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa*); fosfolipasa C 1 i 2 (PLC₁ i PLC₂); fosfatases SHP-1 i SHP-2 (SHP: *SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase*); cinases de proteïnes i lípids, com LYN, FYN, BTK (*Burton's Tyrosine Kinase*), PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*), PIP5K (*phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase*); etc. Tots aquests adaptadors serveixen per coordinar i localitzar senyals que condueixen a la producció de segons missatgers lipídics. Entre aquestes molècules es poden trobar moltes implicades en la mobilització de calci, com: IP₃ o InsP₃ (*inositol 1,4,5-trisphosphate*), PIP₂ o PtdIns(4,5)P₂ (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*), PIP₃ o PtdIns (3,4,5)P₃ (*phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*), S1P (*sphingosine-1-phosphate*) (Rivera et al., 2008; Rivera and Olivera, 2007). Aquests segons missatgers lipídics, juntament amb d'altres com el DAG (diacilglicerol), juguen un paper clau en la regulació del reclutament a membrana d'altres proteïnes (com la fosfolipasa C (PLC) i la proteïna cinasa C (PKC)) i també serveixen com a lligands que interactuen amb receptors intracel·lulars i extracel·lulars proveint senyals que condueixen a respostes efectores. La coordinació entre totes aquestes proteïnes i lípids és el que dona lloc a respostes efectores i immunomoduladores en mastòcits (Galli et al., 2008; Rivera et al., 2008). La importància de moltes de les molècules de senyalització que participen en aquest complex s'ha determinat mitjançant la generació de ratolins deficients per cadascuna d'aquestes molècules. Els efectes de l'anul·lació dels gens que codifiquen per aquestes proteïnes es troben resumits a la taula 1.

S'ha descrit que en l'activació dels mastòcits a través del FcεRI existeixen dues vies de senyalització: una via primària, en la que es troben involucrades les cinases LYN i SYK i la molècula LAT; i una via complementària, on participa la cinasa FYN enlloc de la cinasa LYN, que no requereix l'adaptador LAT per l'inici de la seva senyalització. Ambdues vies requereixen l'activació de la cinasa SYK (Kraft and Kinet, 2007).

4.1 Via primària de LYN

La via primària de LYN és crucial per a la senyalització de calci (Kraft and Kinet, 2007). En aquesta via participa la molècula adaptadora LAT. Després de la lligació del receptor, la cinasa LYN s'activa i fosforila les cadenes β i γ del Fc ϵ RI. SYK llavors és reclutada a la cadena γ i fosforilada d'una manera dependent de LYN. L'activació de SYK, permet doncs que es fosforili l'adaptador LAT, molècula fonamental per a l'organització, coordinació i regulació de la senyalització a través del Fc ϵ RI, ja que participa en l'assemblatge de grans complexos de senyalització que inclouen moltes altres molècules.

4.1.1 LAT

La molècula LAT es va identificar originalment com una molècula de 36-38 kDa, substrat de la cinasa ZAP70 (*zeta-chain-associated protein kinase 70*) en cèl·lules T activades (Zhang et al., 1998). LAT es troba bàsicament en *lipid-rafts* (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). LAT és indispensable per al desenvolupament de les cèl·lules T (Sommers et al., 2001) i per als esdeveniments de senyalització induïts per la lligació del receptor de la cèl·lula T (TCR) (Zhang et al., 2000). Però, tot i el requeriment indispensable d'aquesta molècula adaptadora en les respostes de la cèl·lula T, en el cas de mastòcits derivats de la medul·la òssia (BMMCs) deficientes per LAT, encara s'observa una certa desgranulació, producció de citocines i mobilització de calci residual mediat pel Fc ϵ RI (Saitoh et al., 2000). Això implicaria la presència en els mastòcits d'una molècula adaptadora transmembrana funcional, diferent de LAT (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). Una candidata podria ser NTAL (Gilfillan and Tkaczyk, 2006), que participaria en la via complementària de senyalització dels mastòcits (Kraft and Kinet, 2007).

Els quatre residus tirosina de la cua citoplasmàtica de LAT (Y132, Y171, Y191 i Y226), són crucials i suficients per l'habilitat de LAT per regular la senyalització, la desgranulació i la producció de citocines i quimiocines en mastòcits (Saitoh et al., 2003). La seva fosforilació dóna lloc al reclutament de diversos tipus de molècules: molècules adaptadores citosòliques, com GRB2 (*growth-factor-receptor-bound protein 2*), GADS (*GRB2-related adaptor downstream of SHC protein*), SHC (*SH2-domain containing transforming protein C*) i SLP76 (*SH2-domain-containing leukocyte protein*

of 65 kDa); factors intercanviadors de nucleòtids de guanina, com SOS (*son of sevenless homologue*) i VAV; i enzims de senyalització, com la PLC γ (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). Aquestes interaccions amb l'adaptador LAT es poden donar de manera directa, com és el cas de GADS, GRB2 i PLC γ ; o de manera indirecta, com és el cas de SOS, SLP76, VAV i SHC, que s'uneixen a través de GRB2, GAD2, SLP76 i GRB2, respectivament (Gilfillan and Tkaczyk, 2006) (Fig 6.). L'enzim principal en la senyalització de LAT és la PLC γ , que s'uneix a la Y132 de la cua citoplasmàtica de LAT (Gilfillan and Tkaczyk, 2006; Zhang et al., 2000).

4.1.2 PLC γ

PLC γ és un enzim de senyalització, que un cop activat, catalitza la hidròlisi del PIP $_2$ a la membrana plasmàtica en dos productes resultants: l'IP $_3$, que indueix la mobilització del calci citosòlic, ja que provoca la seva alliberació del reticle endoplasmàtic; i el DAG, que activa la PKC (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). Quan es detecta depleció del calci acumulat al reticle endoplasmàtic, s'obren canals a la membrana plasmàtica per permetre l'entrada de calci (Kraft and Kinet, 2007). Aquests canals s'anomenen SOCs (*store-operated channels*) i el corrent que transporta el calci a l'interior de la cèl·lula es coneix com I $_{CRAC}$ (*calcium-release-activated calcium current*) (Parekh and Penner, 1997). Recentment, s'ha identificat el canal que produeix I $_{CRAC}$ i s'ha anomenat CRACM1 (Vig et al., 2006b). Consisteix en una proteïna transmembrana que multimeritza per formar un SOC i coopera amb la molècula STIM1 (*sensor stromal interaction molecule 1*), que funciona com un sensor de calci, per mitjançar el flux d'entrada de calci (Peinelt et al., 2006; Prakriya et al., 2006; Vig et al., 2006a; Yeromin et al., 2006). Aquests estímuls donen lloc a un procés de desgranulació (Kraft and Kinet, 2007). La inhibició de la PLC γ mitjançant l'inhibidor U73122 aboleix completament els processos de mobilització de calci i desgranulació mediats pel Fc ϵ RI en mastòcits humans. Així doncs, tant l'augment en el calci lliure citosòlic com l'activació de la PKC són senyals essencials perquè tingui lloc la desgranulació (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

La PLC γ s'uneix directament a l'adaptador LAT a través de la Y132, tot i que també se li pot unir de manera indirecta interaccionant amb el complex GADS-SLP76. Ambdós tipus d'interaccions són essencials per a la localització de la PLC γ a la membrana

plasmàtica (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). Tant els BMMCs deficients per LAT (Saitoh et al., 2000), com els BMMCs deficients per SLP76 (Pivniouk et al., 1999), mostren una inhibició en la fosforilació depenent del FcεRI de l'enzim PLCγ.

4.1.3 GRB2-SOS I GADS-SLP76-VAV

GRB2 i GADS, molècules de 25kDa i 40 kDa, respectivament, pertanyen a una família d'adaptadors citosòlics i estan constituïts per un domini SH2 central, flanquejat per dos dominis SH3. GADS a més a més presenta un domini ric en prolines amb un motiu entre l'SH2 i l'SH3 carboxi-terminal (Fig 4.) (Koretzky and Myung, 2001). Tant GRB2 com GADS s'uneixen a la molècula adaptadora LAT fosforilada a través dels seus dominis SH2 i recluten diferents proteïnes mitjançant els seus dominis SH3 (Samelson, 2002).

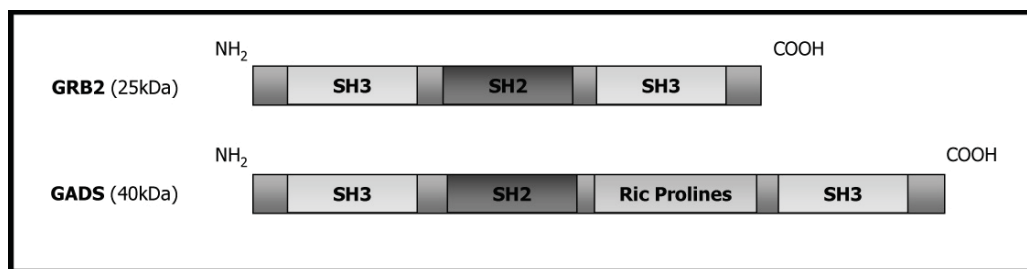


Fig 4. Esquema de l'estructura de les molècules adaptadores GRB2 i GADS.

Per una banda, GRB2 recluta el factor intercanviador de guanina SOS, acoblant-lo a la complexa xarxa de senyalització que es desencadena amb la lligació del FcεRI. Per una altra banda, GADS uneix la molècula adaptadora citoplasmàtica SLP76 (Fig 5.), que al seu torn, acobla el factor intercanviador de guanina VAV (Fig 6.) (Kalesnikoff and Galli, 2008).

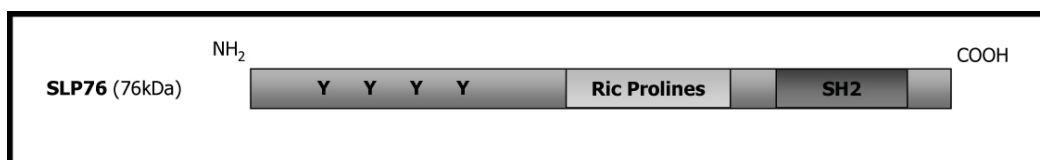


Fig 5. Esquema de l'estructura de la molècula adaptadora SLP76.

VAV i SOS participen en la via d'activació de gens de citocines, fent passar la proteïna RAS de la seva forma inactiva (unida a GDP: *guanosine diphosphate*) a la seva forma activa (unida a GTP: *guanosine triphosphate*) (Rossman et al., 2005). Un cop activat,

RAS regula positivament la via dependent de RAF que condueix a la fosforilació i activació de les MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) ERK1 (*extracellular-signal-regulated kinase 1*) i ERK2 (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). Les MAPKs JNK (*JUN amino-terminal kinase*) i P38 s'activen en els mastòcits d'una manera similar dependent de LAT (Saitoh et al., 2003). La cascada de MAPK (ERK1, ERK2, P38 i JNK) activa al seu torn factors de transcripció, entre els qual trobem els components de l'AP1 (*activation protein 1*) FOS i JUN, NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) i NF- $\kappa\beta$ (*nuclear factor- $\kappa\beta$*), que condueixen a la generació de citocines (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). L'activació de FOS i JUN està regulada també per la PKC (Razin et al., 1994) i la de NFAT és dependent de calci (Hao et al., 2003), de manera que la PLC γ , com a regulador de la mobilització de calci i l'activació de PKC, participa alhora en la regulació de l'expressió dependent d'antigen de gens de citocines en mastòcits (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

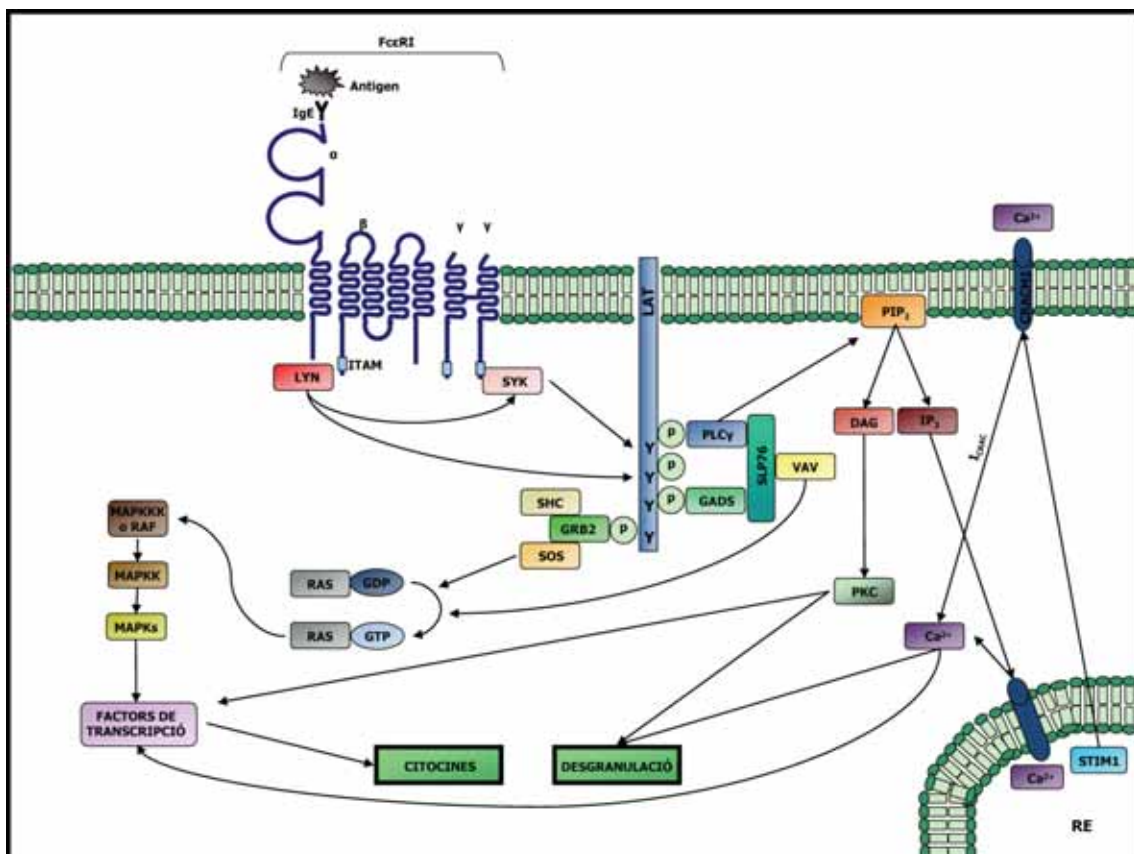


Fig 6. Via primària de LYN. Model d'actuació de la via primària de senyalització en mastòcits. Seguir text 2.1 Via primària de LYN. Basat en els models de (Gilfillan and Tkaczyk, 2006; Kalesnikoff and Galli, 2008; Kraft and Kinet, 2007; Rivera et al., 2008).

4.2 Via complementària de FYN

La via complementària de FYN és necessària per a la desgranulació del mastòcit (Parravicini et al., 2002). En aquesta via, sembla que la molècula adaptadora homòloga a LAT podria ser NTAL (Kraft and Kinet, 2007). La lligació del FcεRI condueix a la fosforilació i activació de les cinases LYN, FYN i SYK, que al seu torn comporten la fosforilació de NTAL (Brdicka et al., 2002; Kraft and Kinet, 2007; Tkaczyk et al., 2004). Aquesta molècula, de la mateixa manera que LAT, participa en l'acoblament de grans complexos de senyalització amb altres molècules, ja que la fosforilació dels múltiples residus de tirosina que són presents en la seva cua citoplasmàtica, proveeixen llocs potencials d'unió a moltes molècules (Brdicka et al., 2002; Janssen et al., 2003).

4.2.1 NTAL

La molècula NTAL s'expressa en cèl·lules B, cèl·lules NK (*natural killer*) i mastòcits, però no ho fa en cèl·lules T en repòs (Brdicka et al., 2002; Janssen et al., 2003). El rol de la molècula NTAL en la funció dels mastòcits es va determinar per la seva ràpida fosforilació d'una manera depenent de LYN i SYK, tant en mastòcits de ratolins (Brdicka et al., 2002; Tkaczyk et al., 2004), com d'humans (Tkaczyk et al., 2004), després de la lligació del FcεRI (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). La molècula NTAL és estructuralment molt similar a l'adaptador LAT, però li manca el motiu d'unió per a la PLCγ. NTAL funciona en la via complementària de la senyalització dels mastòcits, on conjuntament amb la molècula LAT, regula la desgranulació. Això ho indica el fet que les funcions residuals de desgranulació i mobilització de calci que s'observen en BMMCs deficients per LAT, pràcticament s'aboleixen en el cas de BMMCs deficients per ambdues molècules, LAT i NTAL (Tkaczyk et al., 2004; Volna et al., 2004). Els BMMCs deficients únicament per la molècula NTAL mostren una capacitat superior de desgranulació i producció de citocines específiques en resposta a un antigen determinat que els BMMCs normals. Això semblaria indicar que NTAL podria funcionar com un regulador negatiu de l'activació dels mastòcits mitjançada pel FcεRI (Tkaczyk et al., 2004; Volna et al., 2004). S'ha proposat que aquesta regulació negativa seria conseqüència de la competició entre les molècules NTAL i LAT pel mateix conjunt de molècules de senyalització que es troben als *lipid rafts* (Volna et al., 2004).

La fosforilació de les tirosines de NTAL dóna lloc al reclutament de diversos tipus de molècules: molècules adaptadores citosòliques, com GRB2, GAB2, factors intercanviadors de nucleòtids de guanina, com SOS i VAV; i enzims de senyalització, com la PI3K (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). Tal com succeeix amb la molècula LAT en la via primària, les interaccions amb l'adaptador NTAL també es poden donar de manera directa com és el cas de GRB2; o de manera indirecta, com és el cas de GAB2, SOS, VAV i PI3K, que s'uneixen a través de GRB2 (GAB2, SOS i VAV) i GAB2 (PI3K)(Gilfillan and Tkaczyk, 2006)(Fig 7.). L'enzim PI3K sembla tenir un rol important en aquesta via complementària (Kraft and Kinet, 2007).

4.2.2 PI3K

La PI3K és un enzim de senyalització que actua generant segons missatgers lipídics. La PI3K participa en la via d'activació complementària dels mastòcits i és reclutada al complex de senyalització organitzat per la molècula NTAL a través de la seva unió a la molècula citosòlica adaptadora GAB2, quan aquesta és fosforilada (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). La PI3K actua fosforilant el PIP_2 que es troba a la membrana plasmàtica i dóna com a resultat el PIP_3 , proveint d'aquesta manera d'un lloc d'unió per dominis d'homologia a plextrina (PH), que permet reclutar molècules a la membrana plasmàtica, iniciant un complex de senyalització, mitjançant la seva interacció amb altres molècules (Gilfillan and Tkaczyk, 2006; Kraft and Kinet, 2007). Hi ha diverses molècules senyalitzadores que contenen dominis d'homologia a plextrina i són importants per l'activació dels mastòcits, entre les quals es troben PLC γ , BTK (Iwaki et al., 2005; Rivera, 2002), AKT i PDK1 (*3-phosphoinositide dependent protein kinase 1*). Així doncs, aquestes molècules poden ser reclutades a la membrana plasmàtica d'una manera depenent de PI3K després de l'agregació del Fc ϵ RI (Iwaki et al., 2005; Rivera, 2002). Tanmateix, la PI3K no sembla essencial per la funció d'aquestes molècules de senyalització, ja que la majoria d'elles contenen altres dominis d'unió addicionals (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

S'ha descrit que la PI3K és la principal responsable del manteniment, però no de l'inici del senyal de calci necessari per una desgranulació òptima (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). El mecanisme pel qual la PI3K regula la mobilització de calci no està clar. Hi ha diverses hipòtesis al respecte. Una d'elles proposa que el mecanisme de regulació de la

PI3K funciona a través del reclutament que aquest enzim fa de les molècules BTK i PLC γ a la membrana plasmàtica. Una altra hipòtesi proposada és la de la via de la esfingosina cinasa (SK: *sphingosine kinase*)-S1P.

4.2.3 BTK i SK-S1P

Entre les hipòtesis proposades per la regulació que la PI3K duu a terme en la mobilització de calci, una d'elles involucra la cinasa BTK i l'enzim PLC γ . Segons aquesta hipòtesi, l'activació de la PI3K comporta un reclutament a la membrana plasmàtica de les molècules BTK i PLC γ , on la PLC γ seria fosforilada i activada per la cinasa BTK (Gilfillan and Tkaczyk, 2006; Hata et al., 1998). De totes maneres, segons descriu la via primària de l'activació dels mastòcits, la mobilització de calci generada per la PLC γ ve generada per un mecanisme independent de PI3K (Tkaczyk et al., 2003).

Per altra banda, una altra hipòtesis en el mecanisme de regulació de la mobilització de calci per part de la PI3K, advoca per la via de la SK-S1P. SK s'activa posteriorment a l'agregació del Fc ϵ RI d'una manera depenent de LYN i FYN (Urtz et al., 2004). LYN té un rol en el reclutament primerenc de SK al Fc ϵ RI, permetent la seva posterior activació, mentre que FYN seria el responsable d'una activació perllongada de la SK (Olivera et al., 2006; Urtz et al., 2004). SK fosforila l'esfingosina associada a *lipid-rafts*, i dóna lloc a la formació de S1P (*sphingosine 1-phosphate*) (Baumruker and Prieschl, 2000; Olivera and Rivera, 2005), que és un segon missatger per la funció dels mastòcits i la mobilització de calci (Kraft and Kinet, 2007). S'ha descrit que S1P pot ser alliberat pels mastòcits (Jolly et al., 2004) i unir-se als receptors de la superfície cel·lular S1P $_1$ (participa en la reorganització del citoesquelet) i S1P $_2$ (participa en l'augment de la desgranulació) (Kalesnikoff and Galli, 2008; Urtz et al., 2004) per transactivar altres mastòcits (Jolly et al., 2004; Kraft and Kinet, 2007). Pel que fa al rol intracel·lular de S1P en l'activació dels mastòcits, consisteix en la inducció de la mobilització de calci d'una manera independent a la dels IP $_3$ (Choi et al., 1996; Melendez and Khaw, 2002). L'activitat de la cinasa SK està regulada per mitjà de la fosfolipasa D (PLD) (Melendez and Khaw, 2002). La PLD s'activa en mastòcits després de l'agregació del Fc ϵ RI d'una manera depenent de PI3K. Aquest fet explica de quina manera la PI3K pot ajudar a regular el senyal de calci en mastòcits després de la lligació del receptor (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

4.2.4 AKT i PDK1

La via complementària d'activació dels mastòcits (depenent de PI3K) també participa en la regulació de l'expressió de gens de citocines mitjançada pel FcεRI, sumant els seus efectes als de la via primària d'activació (depenent de LAT i PLCγ) (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). La producció de citocines induïda pel FcεRI en aquesta via és conseqüència de l'activació de factors de transcripció com NFAT, AP1 (FOS i JUN) i NF-κβ, tal com succeeix en la via de LAT-PLCγ (Kraft and Kinet, 2007), tot i que hi ha certes diferències en els mecanismes que condueixen a aquesta activació (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

L'activació de la PI3K i la resultant formació de PIP₃, permet que es recluti a la membrana plasmàtica la serina/treonina PDK1, gràcies al seu domini d'homologia a plextrina. PDK1, al seu torn, fosforila i activa una altra serina/treonina cinasa, AKT (Stephens et al., 1998), considerada com un marcador indirecte de la PI3K. AKT regula positivament la funció del factor de transcripció NF-κβ, actuant a nivells superiors sobre els seus reguladors: IKK (*inhibitor of NF-κβ kinase*) i Iκβ (*inhibitor of NFκβ*) (Kraft and Kinet, 2007), claus en la funció de NF-κβ (Kitaura et al., 2000). Aquest mecanisme, juntament amb els efectes que té la PI3K sobre l'habilitat de la PLCγ en la regulació de l'activació del factor de transcripció NFAT (Jascur et al., 1997), permeten a la PI3K regular la producció de citocines (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

S'ha descrit que la fosforilació d'AKT mitjançada per l'antigen, es troba inhibida en mastòcits humans que han estat tractats amb siRNA dirigits contra la molècula NTAL. Aquesta inhibició no es dona en la fosforilació de la PLCγ (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

4.2.5 GRB2, SOS i VAV

En la via complementària, GRB2 (Fig 4.) s'uneix a la molècula adaptadora NTAL fosforilada i recluta diferents molècules, acoblant-les a la xarxa de senyalització desencadenada per la lligació del FcεRI en resposta a l'antigen.

Per una banda, la fosforilació de GRB2 permet reclutar GAB2. Quan GAB2 és fosforilat, recluta la PI3K al complex de senyalització, donant lloc a tots els efectes comentats que aquest enzim té sobre la desgranulació, la mobilització de calci i la producció de

citocines. Per una altra banda, GRB2 també recluta directament els factors intercanviadors de guanina SOS i VAV, que tal com s'explica en la via primària, participen en la via d'activació de gens de citocines, activant la proteïna RAS, que regula de manera positiva la via dependent de RAF. Aquesta via condueix a la fosforilació i activació de les MAPK ERK, P38 i JNK, que al seu torn activen els factors de transcripció AP1 (FOS i JUN), NFAT i NF- κ B, regulant l'expressió dels gens de citocines (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

VAV sembla controlar tant l'activació de la PLC γ , com l'activació de la PI3K. Per aquest motiu, VAV podria tenir un paper en la coordinació de les respostes de la via primària i la via complementària (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

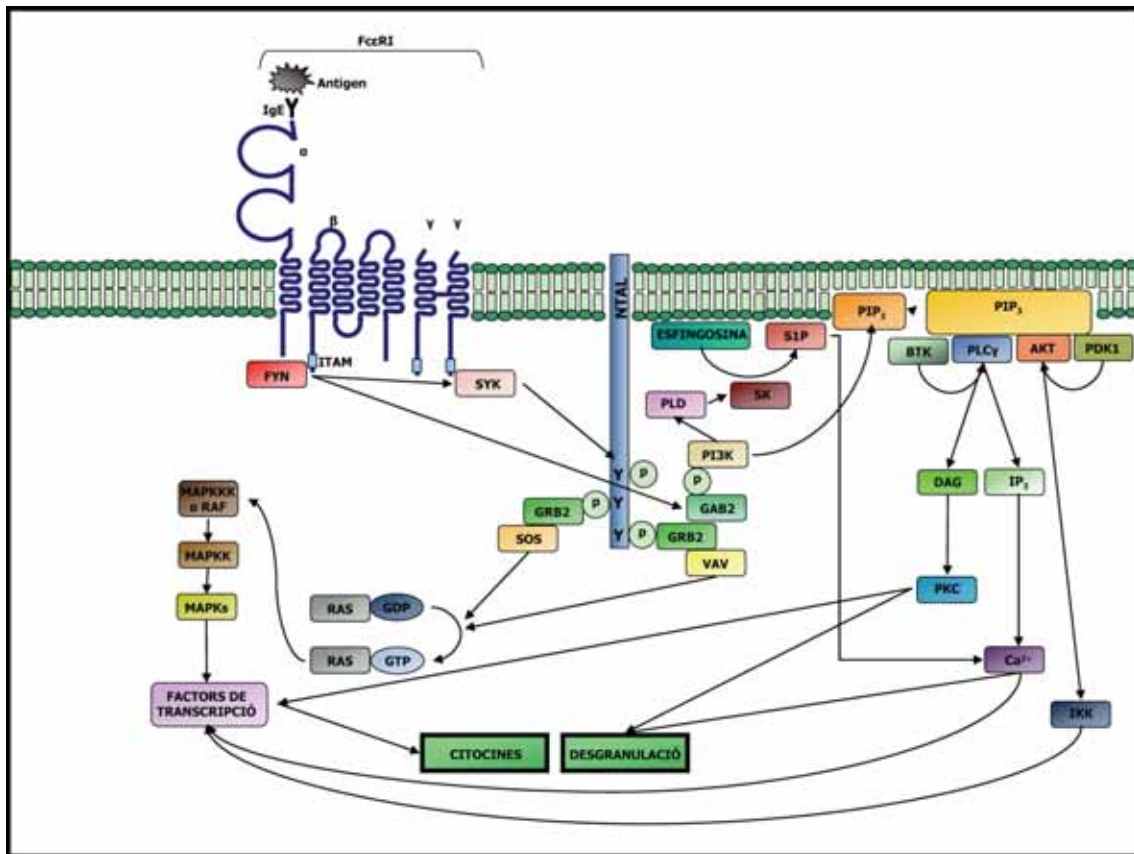


Fig 7. Via complementària de FcγR1. Model d'actuació de la via complementària de senyalització en mastòcits. Seguir text 2.2 Via complementària de FcγR1. Basat en els models de (Gilfillan and Tkaczyk, 2006; Kalesnikoff and Galli, 2008; Kraft and Kinet, 2007; Rivera et al., 2008).

Taula 1. Importància de les molècules implicades en les vies d'activació dels mastòcits a través de la generació de *knockouts*, *knockdowns* i mutacions genètiques. Basada en la taula de (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

Knockout, knockdown, mutacions genètiques	Efecte en la desgranulació	Efecte en l'alliberació de citocines	Efecte en la senyalització
<i>Knockout</i> de LYN	Disminuïda	Incrementada	Disminució de la fosforilació del FcεRI Fosforilació perllongada de les MAPK
	Incrementada	Sense dades	Augment en l'activitat de la PI3K, degut a augment en la fosforilació de GAB2 i a la disminució de l'activitat de SHIP Compensació per FYN
	Sense canvis	Sense dades	Alteració en la fosforilació en tirosines i disminució del senyal de Calci
<i>Knockout</i> de FYN	Disminuïda	Disminuïda	Disminució de l'activitat de la PI3K Sense canvis en el senyal de calci
<i>Knockout</i> de SYK	Abolida	Abolida	Sense dades
<i>Knockout</i> de VAV	Disminuïda	Disminuïda	Disminució del senyal de calci mediat per la PLCγ i de l'activitat de la PI3K
<i>Knockout</i> de SLP76	Disminuïda	Disminuïda	Disminució de la fosforilació de la PLCγ i del senyal de calci
<i>Knockout</i> de GAB2	Disminuïda	Disminuïda la síntesi de mRNA de IL6	Bloqueig en la via de la PI3K
<i>Knockout</i> de LAT	Disminuïda	Disminuïda	Disminució de la fosforilació de SLP76, i PLCγ Disminució de l'activitat de les MAPK i del senyal de calci Sense canvis en la fosforilació de SYK i VAV
<i>Knockdown</i> de LAT	Disminuïda	Sense dades	Sense dades
<i>Knockout</i> de NTAL	Incrementada (sense canvis en l'anafilaxi <i>in vivo</i>)	Incrementada	Hiperfosforilació de LAT, PLCγ i ERK
<i>Knockdown</i> de NTAL	Disminuïda	Sense dades	Sense dades
<i>Knockout</i> de LAT i NTAL	Disminuïda	Disminuïda	Bloqueig de la fosforilació de PLCγ i del senyal de calci
<i>Knockout</i> de BTK	Disminuïda	Disminuïda	Disminució de la producció de IP ₃ i del senyal de calci
<i>Knockout</i> de BTK i LYN	Disminuïda	Disminuïda	Disminució de les vies de senyalització de PLCγ, d'ERK i de JUN
<i>Knockout</i> de p85a (subunitat de la PI3K)	Sense canvis	Sense dades	Bloqueig de l'activitat de la PI3K
Mutació de p110d (subunitat de la PI3K)	Disminució (bloqueig de les respostes mitjançades per KIT)	Disminució	Bloqueig de l'activitat de la PI3K

5. REGULACIÓ DE LA TRANSDUCCIÓ DE SENYALS A TRAVÉS DEL FcεRI

La senyalització a través del FcεRI es troba sotmesa al control d'altres molècules de superfície (Kraft and Kinet, 2007). Aquestes molècules poden tenir una funció inhibidora (Kraft and Kinet, 2007), o bé poden activar-se sota les condicions apropiades i conduir a un augment en l'activació basal dels mastòcits mitjançada pel FcεRI (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). A part de totes aquestes molècules, en l'activació a través del FcεRI, la IgE no solament mitjança l'activació dels mastòcits, sinó que també regula les funcions mastocitàries per si mateixa. La IgE monomèrica fa que els mastòcits de ratolí siguin més resistents a l'apoptosi induïda per la privació de factors de creixement *in vitro*, i pot promoure la producció de citocines sense induir la desgranulació o l'alliberació de leucotriens (Kalesnikoff et al., 2001).

5.1 Molècules potenciadores de l'activació dels mastòcits

5.1.1 KIT

KIT és un receptor de superfície d'una sola cadena, que té activitat proteïna tirosina cinasa inherent (Linnekin, 1999). El lligand de KIT és el SCF (*stem cell factor*), considerat com el factor de creixement més rellevant en mastòcits. L'activació de KIT a través del SCF és crucial per al desenvolupament, la diferenciació i la supervivència dels mastòcits. També és important per l'adhesió a proteïnes de la matriu extracel·lular. Així doncs, l'activació mastocitària a través del FcεRI *in vivo* sembla donar-se sobre un fons d'activació de KIT mitjançada per SCF (Bischoff et al., 1999b; Gilfillan and Tkaczyk, 2006; Lorentz et al., 2002; Mierke et al., 2000). L'addició de SCF sol no té cap efecte sobre la desgranulació, però si s'afegeix de manera simultània amb l'antigen s'augmenta el procés de desgranulació i les concentracions de mRNA i/o proteïna de múltiples citocines (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). La inhabilitat que el SCF per si sol té per iniciar la desgranulació podria explicar-se per la seva manca de capacitat de fosforilar en tirosines la molècula LAT (Tkaczyk et al., 2004). Així doncs, el SCF sol, en absència d'antigen, no pot activar la via regulada per LAT, tot i que sí activa la fosforilació de NTAL i la via complementària dependent de la PI3K (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

5.1.2 Receptors acoblats a proteïna G (GPCRs): S1P₁, S1P₂, receptor d'adenosina A₃ i receptor de C3a

Els receptors S1P₁ i S1P₂ pertanyen als anomenats GPCRs (*G-protein-coupled receptors*), receptors acoblats a proteïna G. El receptor S1P₁ participa en la reorganització del citoesquelet, potenciant la quimiotaxis del mastòcit; mentre que el receptor S1P₂ potencia el procés de desgranulació (Jolly et al., 2004). S'ha descrit que diferents gradients de concentració d'antigen poden influir en la funció del mastòcit a través de la unió del lligand S1P als seus receptors (Olivera and Rivera, 2005). Baixes concentracions d'antigen suposen l'alliberació de S1P per part del mastòcits activats, induint la seva quimiotaxis a través de la unió de S1P al receptor S1P₁ (Olivera and Rivera, 2005). La posterior exposició a elevades concentracions d'antigen afavoririen la inducció de l'expressió del receptor S1P₂, conduint a un augment de la desgranulació (Olivera and Rivera, 2005).

El receptor d'adenosina A₃ té capacitat per amplificar i/o mantenir els processos de desgranulació i producció de citocines mediats pel FcεRI quan s'uneix al seu lligand, l'adenosina (Laffargue et al., 2002). De la mateixa manera, la unió de la proteïna C3a al seu receptor fa que es potenciï un augment de la desgranulació mitjançada pel FcεRI (Laffargue et al., 2002). La molècula clau que estaria implicada en els processos d'amplificació lligats a aquests GPCRs sembla ser la PI3K (Laffargue et al., 2002). Així doncs, tot i que es desconeix si els GPCRs necessiten una molècula adaptadora com LAT o NTAL per coordinar la seva influència en mastòcits, la integració de la senyalització a través dels GPCRs i el FcεRI es dona en última instància a nivell de la PI3K (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). És a dir, els GPCRs actuen, tal com succeeix amb el receptor KIT, sobre la via complementària de l'activació dels mastòcits (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

Segons les dades descrites, semblaria que un dels papers de la via complementària de l'activació dels mastòcits pot ser permetre integrar a la xarxa de senyalització promoguda pel FcεRI, cascades de senyalització iniciades per altres receptors amb la finalitat de modular l'alliberació de mediadors en mastòcits depenent d'antigen (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

5.2 Molècules inhibidores de l'activació dels mastòcits

El complex que condueix a l'activació mastocitària es troba àmpliament regulat per un sofisticat conjunt de mecanismes inhibidors, proveint d'aquesta manera una coordinada xarxa de molècules que permeten assolir la resposta desitjada i limitar les possibles lesions d'una resposta excessiva o persistent. L'agregació del FcεRI genera un conjunt de senyals positives que condueixen a l'activació i les funcions efectores del mastòcits. Però més enllà dels senyals positius, l'agregació del FcεRI també genera senyals intracel·lulars negatives capaces de limitar les respostes funcionals dels mastòcits (Molfetta et al., 2007). Les funcions que els mastòcits realitzen a través del FcεRI estan regulades per diverses molècules, entre les quals es troben receptors inhibidors de la superfície cel·lular (que sovint actuen quan són co-ligats juntament amb el FcεRI i que es troben expressats de manera constitutiva o induïble a la membrana dels mastòcits), PTKs, fosfatases de lípids i proteïnes, molècules adaptadores i lligases d'ubiquïtines (Bruhns et al., 2005; Katz, 2002; Kraft and Kinet, 2007; Molfetta et al., 2007).

A més a més de les molècules inhibidores, en la regulació de l'activació dels mastòcits també intervenen altres factors, com la força de l'estímul. La desgranulació dels mastòcits després de la lligació amb la IgE unida a concentracions cada cop majors d'antigen, genera una corba dosi-resposta en forma de campana. A dosis supraòptimes d'antigen s'observa una resposta reduïda que depèn de l'excés de lligació del FcεRI i l'augment d'immobilització del receptor deguda a interaccions del citoesquelet. També s'ha vist, a més, que la lligació del FcεRI amb dosis supraòptimes d'antigen pot afavorir l'acció negativa dels reguladors en la propagació dels senyals (Gibbs et al., 2006; Gimborn et al., 2005; Magro and Alexander, 1974; Molfetta et al., 2007; Robertson et al., 1986).

5.2.1 Efecte dual de les cadenes β i γ del FcεRI

Segons dades recents, es creu que a més a més de senyals positius, les cadenes β i γ del FcεRI poden actuar com a subunitats reguladores de l'activació dels mastòcits i com a efectores de funcions negatives (Furumoto et al., 2004; Kimura et al., 1997a; Kimura et al., 1997b; Pasquier et al., 2005a). Estudis recents demostren que la cadena β fosforilada pot unir les fosfatases SHIP, SHP-1 i SHP-2, i que aquestes fosfatases són

fosforilades llavors després de la lligació del receptor (Kimura et al., 1997a; Kimura et al., 1997b).

Per altra banda, altres estudis també mostren una contribució directa a una senyalització negativa de la cadena β del Fc ϵ RI, per mitjà d'una tirosina no canònica (Y225), localitzada entre els dos residus tirosina canònics de la seqüència consens dels ITAMs: (Asp/Glu)-X-X-**Tyr**-X-X-Leu-(X)₇₋₁₁-**Tyr**-X-X-(Leu/Ile). La mutació d'aquest residu causa un augment en la producció de citocines de mastòcits derivats de la medulla òssia (BMMCs); associat a un augment de les MAPK ERK i P38 i de l'activació del factor de transcripció NF- κ B; i una disminució de la fosforilació en tirosines de SHIP (Furumoto et al., 2004). En aquest cas, doncs, s'observa un efecte inhibitori posterior a l'agregació del Fc ϵ RI, com a resultat del reclutament i l'activació de fosfatases (Molfetta et al., 2007).

També s'han trobat papers reguladors negatius per la cadena γ , però en aquest cas, no dins el complex Fc ϵ RI, sinó dins un altre receptor, el Fc α RI. En aquest últim cas, la cadena γ té capacitat per unir la fosfatasa SHP-1 (Pasquier et al., 2005a).

Així doncs, la força de l'estímul i/o el context del receptor on es dona la lligació de les cadenes β i γ poden determinar la seva funció positiva o negativa com a regulador de les funcions dels mastòcits (Molfetta et al., 2007).

5.2.2 Regulació negativa a través de PTKs: LYN, FPS/FES i FER

LYN

A més del paper descrit de LYN en l'inici de la senyalització dels mastòcits, també s'ha identificat un paper com a regulador negatiu d'aquesta cinasa. S'ha descrit que BMMCs provinents de ratolins deficients per la cinasa LYN mostren un augment de la desgranulació, un augment de l'expressió de gens de citocines, una major activitat de la cinasa FYN, una menor activitat de la fosfatasa SHIP, i una activació perllongada de les MAPK ERK i P38 (Hernandez-Hansen et al., 2004; Kawakami et al., 2000; Odom et al., 2004; Parravicini et al., 2002). Altres estudis determinen que la cinasa LYN pot assumir un paper negatiu o positiu en l'activació dels mastòcits, en funció de la força de l'estímul. Segons aquests estudis, el paper negatiu de LYN es dona específicament a

través de la cadena β del Fc ϵ RI, després de l'estimulació amb una dosi elevada d'antigen (Xiao et al., 2005).

Cal dir, però, que els resultats sobre el paper negatiu de la cinasa LYN no estan clars, ja que la generació de ratolins deficients per LYN (LYN^{-/-}) ha donat resultats controvertits en diferents grups d'investigació. Tot i els estudis citats anteriorment, on s'observa un augment en la desgranulació en ratolins LYN^{-/-} (Hernandez-Hansen et al., 2004; Odom et al., 2004; Parravicini et al., 2002), hi ha altres grups que observen l'efecte oposat, una disminució en la desgranulació (Kawakami et al., 2000). Altres grups no observen diferències en la desgranulació en ratolins LYN^{-/-} (Nishizumi and Yamamoto, 1997). Per altra banda, els efectes sobre l'expressió de gens de citocines i la senyalització també són poc clarificadors: certs grups observen un augment en l'alliberació de citocines (Kawakami et al., 2000), que no es detecta en altres estudis.

FPS/FES i FER

FPS/FES i FER formen part de la família de "*non-receptors protein tyrosine kinase*" i constitueixen una subfamília de proteïnes cinases (Alcalay et al., 1990; Hao et al., 1989; Letwin et al., 1988; Roebroek et al., 1985; Wilks and Kurban, 1988). Ambdues proteïnes, són estructuralment molt similars, fet que indica que probablement tenen rols biològics molt similars, i es diferencien perquè FER té una expressió més ubíqua, mentre que FPS/FES es troba en cèl·lules de llinatge mieloide, en cèl·lules endotelials vasculares, en cèl·lules epitelials i en cèl·lules neuronals (Care et al., 1994; Feldman et al., 1985; Greer, 2002; Greer et al., 1994; Haigh et al., 1996; Letwin et al., 1988; MacDonald et al., 1985; Penhallow et al., 1995). Tan FPS/FES com FER s'activen per fosforilació després de l'agregació del Fc ϵ RI (Craig and Greer, 2002), i en aquest cas en la seva fosforilació no participa la pròpia activitat cinasa que presenta (Senis et al., 2003), sinó que és bàsicament dependent de la cinasa LYN (Udell et al., 2006).

Aquesta família de cinases participa en la reorganització del citoesquelet, afectant així els complexos de senyalització creats pels receptors; en la inflamació i en la immunitat (Greer, 2002). FPS/FES i FER estan constituïdes bàsicament per quatre dominis: a) Un domini FCH (*FPS/FES/FER/CIP4 Homology*) amino-terminal, que participa en la interacció amb el citoesquelet i la regulació de la seva reorganització, en el transport vesicular i en l'endocitosi (Aspenstrom, 1997; Modregger et al., 2000; Qualmann and

Kelly, 2000; Tian et al., 2000; Yeung et al., 1998); b) Tres regions de dominis *coiled coils*, que participen en l'oligomerització de la cinasa i tenen una funció autoreguladora de la seva funció (Craig et al., 1999; Greer, 2002; Read et al., 1997); c) Un domini SH2 (SH2: *SRC homology 2*), que uneix residus de tirosina fosforilats, permetent així la regulació d'interaccions intermoleculares i intramoleculares (Hjermstad et al., 1993; Koch et al., 1989). Hi ha diverses proteïnes que s'uneixen a aquestes cinases, com per exemple la cortactina (*Filamentous (F)-actin-crosslinking protein*), de la qual s'ha descrit la seva unió amb FER i la disminució de la seva activitat en ser fosforilada per FER (Greer, 2002; Kim and Wong, 1998). El motiu consens d'unió al domini SH2 de la proteïna FPS/FES es basa en la seqüència **Tyr**-Glu-X-Val/Ile, on la X representa un aminoàcid qualsevol (Songyang et al., 1994); i d) Un domini cinasa carboxi terminal, amb activitat catalítica (Greer, 2002).

La proteïna FPS/FES s'expressa àmpliament en macròfags i neutròfils. Ratolins deficients per la proteïna FPS/FES mostren un augment a la sensibilitat al shock induït per lipopolisacàrid (LPS) en aquests tipus cel·lulars, tot i que aquest defecte desapareix quan s'afegeixen transgens humans de FPS/FES (Zirngibl et al., 2002). Aquestes dades semblen assignar a la proteïna FPS/FES un paper regulador de la inflamació, potser mitjançant la inhibició de vies de senyalització pro-inflamatòries, o promovent vies de senyalització antiinflamatòries (com per exemple activació del factor de transcripció STAT3, i en conseqüència de la producció de la citocina IL-10, que té efectes antiinflamatoris) (Greer, 2002; Kuhn et al., 1993; O'Farrell et al., 2000).

5.2.3 Regulació negativa a través de fosfatases lipídiques: SHIP i PTEN

Un dels passos claus en l'activació dels mastòcits, ve mitjançant per l'activitat enzimàtica de la PI3K, durant la via complementària de FYN (veure apartat 2.2). El producte de la PI3K, els PIP₃, poden ser defosforilats per les fosfatases SHIP i PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*), en la posició 5' i 3', respectivament; afectant d'aquesta manera, la propagació del senyal (Deane and Fruman, 2004).

SHIP

En el cas de la fosfatasa SHIP, s'ha vist que BMMCs provinents de ratolins deficients per la fosfatasa SHIP mostren un augment de la desgranulació i la producció de

citocines pro inflamatòries en resposta a la lligació del FcεRI. Aquests resultats donen suport a un paper de la fosfatasa SHIP en la limitació de l'activació dels mastòcits de ratolí (Huber et al., 1998; Kalesnikoff et al., 2002).

PTEN

PTEN és reconegut com un supressor de tumors i un regulador clau en l'apoptosi i el creixement cel·lular (Cantley and Neel, 1999). Es creu a més que la fosfatasa PTEN té un paper en el control de l'homeòstasi dels mastòcits, ja que la pèrdua de PTEN en mastòcits humans comporta un augment dels nivells de PIP₃ fins i tot després de la lligació del FCεRI, un augment de les MAPK JNK i P38 i una secreció constitutiva de citocines (Furumoto et al., 2006).

5.2.4 Regulació negativa a través de fosfatases de tirosines en proteïnes: SHP-1 i SHP-2

SHP-1 i SHP-2 formen part d'un subgrup de fosfatases de tirosines en proteïnes (PTP: *Protein-Tyrosine Phosphatases*) citosòliques, caracteritzades per la presència de dos dominis SH2 a l'extrem N-terminal, i d'un domini fosfatasa de tirosines de proteïnes a l'extrem C-terminal. SHP-2 a més conté un domini ric en prolines a l'extrem C-terminal, que li permet interaccionar amb proteïnes que contenen dominis SH3. SHP-1 es troba expressada de manera predominant en cèl·lules hematopoietiques, mentre que l'expressió de SHP-2 és més ubiqua (Yi et al., 1992). Per altra banda, tant SHP-1 com SHP-2 es troben expressades en diverses parts del sistema nerviós (Horvat et al., 2001; Suzuki et al., 1995). Ambdues fosfatases estan involucrades en moltes activitats cel·lulars, com el manteniment del citoesquelet; la divisió, creixement i diferenciació cel·lulars; l'activació de MAPKs i les respostes quimiotàctiques (Bialy and Waldmann, 2005; Feng et al., 1994; Kim et al., 1999; Pani et al., 1995; Yi et al., 1993). La funció que tenen les fosfatases SHP-1 i SHP-2 durant el dany cel·lular i la inflamació no està ben definida, ja que sembla que aquestes PTPs podrien tenir papers duals tan en l'activació com en la inhibició de la supervivència cel·lular, degut a la varietat de les condicions microambientals (Chong and Maiese, 2007). L'activitat de SHP-1 i SHP-2 s'ha associat amb la modulació de senyals cel·lulars que involucren la via PI3K/AKT, la via de les MAPKs i factors de transcripció com NF-κβ (Chong and Maiese, 2007).

Les fosfatases de tirosines en proteïnes SHP-1 i SHP-2, regulen negativament l'activació dels mastòcits depenent d'IgE. Tot i que el seu mecanisme d'acció encara no està ben definit, s'ha suggerit que ambdues fosfatases actuen sobre la via de senyalització del FcεRI després de la seva lligació, probablement a través de receptors inhibidors que tenen capacitat per reclutar SHP-1 o SHP-2 (Daeron et al., 2008; Gilfillan and Rivera, 2009); tot i que també s'ha descrit que tant SHP-1, com SHP-2, co-immunoprecipiten amb el FcεRI. La fosfatasa SHP-1 es troba associada de manera constitutiva amb el FcεRI, mentre que SHP-2 es recluta després de la lligació del FcεRI (Benhamou et al., 1993; Kihara and Siraganian, 1994). Segons un estudi recent, les fosfatases de tirosines en proteïnes, com SHP-1 i SHP-2, semblen tenir un paper clau en la regulació de l'activació de SYK, i per tant, en la resposta del mastòcit. Per altra banda, SHP-1 i SHP-2 semblen exercir un paper potencial en la defosforilació de les tirosines de l'ITAM de la cadena γ del FcεRI (Yamashita et al., 2008).

S'ha reportat que la sobre-expressió de la fosfatasa SHP-1 en la línia cel·lular RBL-2H3 comporta una disminució de la fosforilació del FcεRI i de SYK, però, per contra, també suposa un augment de la fosforilació de JNK i la producció de TNFα (Xie et al., 2000). Un altre estudi suggereix que la fosfatasa SHP-1 regula la senyalització del FcεRI tant de manera negativa, fent les funcions de fosfatasa de tirosines en proteïna; com de manera positiva, funcionant com una proteïna adaptadora que contribueix en la formació de complexos de senyalització, en BMMCs (Nakata et al., 2008). Per una banda, s'ha proposat que SHP-1 defosfororila les molècules LAT i SLP-76; mentre que regula positivament la fosforilació de PLCγ, la mobilització de calci i la desgranulació (Nakata et al., 2008).

5.2.5 Regulació negativa a través de molècules adaptadores: LAT, NTAL, LAX, DOK, RabGEF1, Cbl i CIN85

LAT

S'ha proposat que la molècula adaptadora LAT podria tenir un paper tant positiu com negatiu com a regulador de les funcions dels mastòcits, depenent del teixit d'origen del mastòcit i de la força de l'estímul. Les tirosines que conté la molècula LAT en la seva cua citoplasmàtica contribueixen a més de manera diferencial a la desgranulació i la secreció de citocines: la tirosina Y132 que uneix la PLCγ té un efecte negatiu en la

desgranulació quan les altres tres tirosines que uneixen molècules adaptadores estan mutades; mentre que aquestes tres tirosines presenten també un efecte negatiu quan la tirosina que uneix la PLC γ està mutada. En el mateix estudi també es determina que la molècula LAT té un efecte regulador diferencial de les funcions biològiques del mastòcits que es troben a la mucosa i els mastòcits que es troben al sèrum (Malbec et al., 2004).

NTAL

Els ratolins deficients per a la molècula NTAL mostren una major mobilització de calci mitjançada per antigen, un augment en l'activació d'ERK, un augment en la desgranulació i una major producció de citocines (Tkaczyk et al., 2004; Volna et al., 2004; Zhu et al., 2004). Aquestes dades indiquen que la molècula NTAL podria participar en un mecanisme de regulació negativa de la funció dels mastòcits. El primer esdeveniment afectat en ratolins deficients per la molècula NTAL és una major fosforilació en tirosina de la molècula LAT i un conseqüent augment de la fosforilació i l'activitat enzimàtica de la PLC γ (Volna et al., 2004). No s'han reportat associacions directes entre fosfatases i la molècula NTAL que puguin explicar la funció inhibidora observada. Tanmateix s'ha proposat que potser la molècula NTAL podria competir amb l'adaptador LAT pel dipòsit de molècules que es troben als *lipid rafts*, intentant d'aquesta manera disminuir la funció de LAT (Zhu et al., 2004).

LAX

LAX és una molècula adaptadora recentment identificada tant en limfòcits, com en mastòcits. A diferència de LAT i NTAL, l'adaptador LAX no es localitza en els *lipid rafts*. LAX és fosforilada posteriorment a la lligació del Fc ϵ RI i interacciona amb GRB2 i PI3K. BMMCs provinents de ratolins deficients per la molècula LAX mostren un augment de l'activació de la PI3K i un augment de la desgranulació en resposta a l'estimulació per via del Fc ϵ RI. Es coneix que aquesta major resposta mastocitària es deu a una inhibició de la molècula NTAL, però es desconeix el mecanisme pel qual LAX regula l'expressió de NTAL. Totes aquestes dades suggereixen un paper regulador negatiu de la molècula LAX en la senyalització i les funcions del mastòcit mitjançades pel Fc ϵ RI (Zhu et al., 2002b; Zhu et al., 2006).

DOK

DOK correspon a una família de 5 membres de molècules adaptadores, on només les proteïnes DOK-1, DOK-2 i DOK-3 són específiques de teixit hematopoiètic. Aquestes molècules estan formades per un domini PH a l'extrem amino, un domini central d'unió a tirosines fosforilades (PTB: *phosphotyrosine binding domain*) i un carboxi terminal amb tirosines fosforilables (Fig 8.). Dok es transloca a membrana mitjançant el seu domini PH en resposta a la producció de PIP₃ per activitat de la PI3K. Aquesta translocació permet que Dok es fosforili en tirosines i es creen motius d'unió per proteïnes amb dominis SH2, com la fosfatasa SHIP i la proteïna Ras-GAP (Janssen and Zhang, 2003; Veillette, 2004; Veillette et al., 2002).

S'ha descrit que DOK-1 s'associa de manera constitutiva amb el FcεRI en la línia cel·lular mastocitària de rata RBL-2H3 (*Rat Basophilic Leukemia-2H3*). DOK es fosforila després de la lligació amb el FcεRI. Un cop fosforilat, s'uneix a Ras-GAP, que correspon a la proteïna activadora de la GTPasa encarregada d'inactivar la proteïna Ras. D'aquesta manera, es regula negativament la via depenent de Raf, conduint a la inhibició de les MAPK ERK, JNK i P38, i a la producció de TNFα (Abramson et al., 2003).

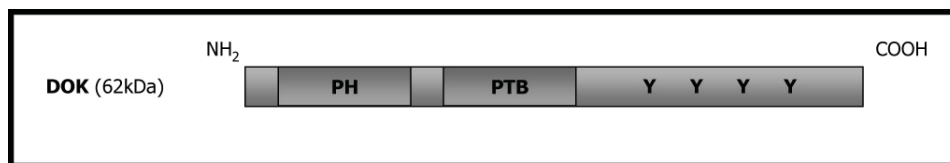


Fig 8. Esquema de l'estructura de la molècula adaptadora DOK.

RabGEF1

RabGEF1 és una molècula adaptadora amb capacitat per regular de manera negativa la via de les MAPK depenent de Raf. BMMCs provinents de ratolins deficients per la proteïna RabGEF1 mostren una major desgranulació i un augment en l'alliberació de citocines després de la lligació del FcεRI (Tam et al., 2004b). Altres estudis han determinat que BMMCs provinents de ratolins deficients per RabGEF1 mostren un retardament en la internalització del FcεRI induïda per antigen. Això suggereix que la proteïna RabGEF1 podria tenir un paper en el control de l'endocitosi del receptor (Kalesnikoff et al., 2007).

Proteïnes Cbl

La família de proteïnes Cbl són molècules adaptadores que funcionen com a reguladors negatius dels senyals mitjançats per immunoreceptors (Duan et al., 2004; Ryan et al., 2006; Thien and Langdon, 2005). S'han identificat tres membres d'aquesta família: c-Cbl, Cbl-b i Cbl-c (també anomenat Cbl-3), caracteritzats estructuralment per la presència de molts dominis d'interacció proteïna-proteïna: un domini N-terminal d'unió a cinases de tirosines, que inclou un domini SH2 modificat (TKB: *Tyrosine Kinase Binding*); un domini *RING finger* (motiu de 8 cistidines o histidines amb una funció de lligasa, unint enzims d'ubiquitinació als seus substrats), un domini ric en prolines, i motius tirosina a l'extrem C-terminal (Fig 9.). La funció de les proteïnes Cbl com a reguladores de les vies de transducció de senyals es basa en la seva activitat com a lligasa d'ubiquitina (Koretzky and Myung, 2001; Molfetta et al., 2007). Les proteïnes Cbl poden interaccionar amb molècules involucrades en la senyalització: família Src i Syk (a través del domini PTK); i molècules com PI3K, Vav, PLC γ , Grb2 (a través de dominis rics en prolines i de tirosines fosforilades en Cbl durant l'activació) (Veillette et al., 2002). Actuen com a lligases d'ubiquitina a través del seu dit RING, tot acostant aquestes proteïnes enllaçades amb l'enzim de conjugació d'ubiquitina E2. Per tant estan activant un segrest proteic i/o degradació depenent de proteosoma (Koretzky and Myung, 2001).

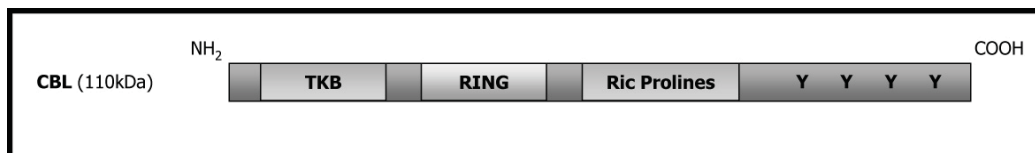


Fig 9. Esquema de l'estructura de la molècula adaptadora CBL.

Gràcies a la presència dels diversos dominis d'interacció, la proteïna Cbl reconeix els seus substrats, que poden ser proteïnes de senyalització citoplasmàtiques o receptors de membrana, tant de manera depenent com independent de fosforilació. S'ha descrit que c-Cbl i Cbl-b es troben expressades en BMMCs i en la línia cel·lular RBL-2H3, que es fosforilen en tirosines després de la lligació del Fc ϵ RI i que es transloquen a *lipid rafts* (Lafont and Simons, 2001; Ota et al., 1996; Qu et al., 2004; Zhang et al., 2004). S'ha descrit que la sobrepressió de c-Cbl inhibeix l'activitat de la cinasa Syk i l'alliberació de serotonina mitjançada pel receptor en cèl·lules RBL-2H3, sense afectar

l'activitat de LYN i la fosforilació del receptor (Ota and Samelson, 1997). També s'ha vist la implicació de c-Cbl en la ubiquïtinització de les subunitats del FcεRI i de la cinasa SYK en cèl·lules RBL-2H3 (Lafont and Simons, 2001; Paolini et al., 2002). En el cas del receptor, les subunitats β i γ es troben sotmeses a ubiquïtinització després de l'estimulació amb IgE i un antigen multivalent en cèl·lules RBL-2H3. Es coneix que aquestes subunitats colocalitzen amb la proteïna c-Cbl en els *lipid rafts* després de la lligació del receptor. Aquest fet suggereix que c-Cbl podria estar involucrada en la ubiquïtinització del receptor (Lafont and Simons, 2001; Paolini and Kinet, 1993). En el cas de la cinasa SYK, la proteïna c-Cbl és la responsable de la seva ubiquïtinització, i l'activitat de SYK alhora és la que controla la seva pròpia ubiquïtinització, així com la ubiquïtinització de les subunitats β i γ del FcεRI. La interacció entre SYK i c-Cbl, constitutivament associades en cèl·lules RBL-2H3, és important perquè permet que ambdues proteïnes es tornin substrat una de l'altra. A més, permet que la cinasa SYK apropi c-Cbl al receptor, per tal d'ubiquïtinitzar les seves subunitats (Molfetta et al., 2007; Ota et al., 1996; Paolini et al., 2002).

També s'ha descrit que les proteïnes Cbl poden ubiquïtinitzar les cinases LYN i FYN posteriorment a l'agregació del FcεRI en cèl·lules RBL-2H3 (Kyo et al., 2003). Així doncs, les proteïnes Cbl poden regular de manera negativa ambdues vies d'activació dels mastòcits: la via primària de LYN i la via complementària de FYN (Molfetta et al., 2007).

Les proteïnes c-Cbl i Cbl-b semblen tenir un paper regulador negatiu molt similar en la senyalització mitjançada pel FcεRI, tot i que alguns estudis han descrit un paper prominent de la forma Cbl-b en la regulació negativa de la senyalització mitjançada pel FcεRI. Aquesta predominança de Cbl-b seria deguda a una major expressió d'aquesta proteïna, més que a diferències funcionals amb c-Cbl. S'ha reportat que l'absència de Cbl-b incrementa la fosforilació del receptor, la mobilització de Calci, l'alliberació d'histamina i la inducció de citocines pro-inflamatòries (Gustin et al., 2006; Zhang et al., 2004).

CIN85

CIN85 és una molècula adaptadora, membre d'una subfamília de proteïnes adaptadores àmpliament expressada, caracteritzades per la presència de diversos

dominis, entre els quals es troben 3 dominis SH3 i una regió central rica en prolines (Dikic, 2002). La presència de diferents dominis permet a la proteïna CIN85 formar diverses interaccions proteïna-proteïna i ensamblar complexos multimèrics amb proteïnes involucrades en la transducció de senyals, en el tràfic endocític i en la reorganització del citoesquelet (Molfetta et al., 2007).

Les proteïnes Cbl-b i c-Cbl indueixen la internalització de receptors tirosina cinasa a través de la seva interacció amb CIN85. Aquesta via és independent de l'activitat lligasa d'ubiquitina que tenen les proteïnes Cbl (Petrelli et al., 2002; Soubeyran et al., 2002; Szymkiewicz et al., 2002).

S'ha descrit que CIN85 es troba expressat en cèl·lules RBL-2H3 i que interacciona amb c-Cbl després de la fosforilació del FcεRI (Molfetta et al., 2005). Posteriorment a la lligació del receptor, el complex Cbl/CIN85 es recluta a la membrana cel·lular, on condueix a la internalització dels complexos de FcεRI a compartiments endocitoplasmàtics. Aquest procediment és necessari per la degradació del receptor (Molfetta et al., 2007).

5.2.6 Regulació negativa a través de receptors que contenen ITIMs: FcγRIIB

La característica comú de molts receptors inhibidors de la superfície cel·lular és la presència a la seva cua citoplasmàtica d'un o més motius d'inhibició dels immunoreceptors basats en tirosina (*Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibitory Motif*), que presenten la següent seqüència consens: Ile/Val/Leu/Ser-X-**Tyr**-X-X-Leu/Val, on la X representa un aminoàcid qualsevol. A través del seu ITIM, aquests receptors supprimeixen l'activació cel·lular, reclutant molècules de senyalització negatives, com SHIP i SHP. Així doncs, el seu mecanisme d'acció respecte la supressió de la senyalització del FcεRI es basa en promoure esdeveniments de defosforilació. Tot i que s'han descrit els efectes inhibitoris d'alguns lligands d'aquests receptors, com la citocina IL-10 i el factor de creixement TGFβ (*Transforming growth factor beta*), que pot canviar el patró d'alliberació de mediadors després de l'agregació del FcεRI (Gebhardt et al., 2005; Royer et al., 2001), moltes de les funcions inhibidores d'aquests receptors s'han descobert mitjançant l'ús d'anticossos, ja que molts dels seus lligands encara es desconeixen. Per aquest motiu, la rellevància fisiològica de molts d'aquests receptors encara està per determinar (Kraft and Kinet, 2007). Aquests

receptors travessen la membrana plasmàtica un cop i es classifiquen en dos grups segons l'estructura de la seva part extracel·lular (domini N-terminal), que pot consistir en: dominis lectina de tipus C, dependents de calci (exemples: KLRG1, *killer cell lectin-like receptor G1*); o dominis de tipus immunoglobulina (exemples: FcγRIIB, gp49B1, PIR-B (*paired Ig-like receptor B*), proteïna reguladora α) (Molfetta et al., 2007). Es creu que aquest tipus de receptors amb ITIMs també tenen un paper en la disminució immediata de les reaccions d'hipersensibilitat (Katz, 2002). La integració dels senyals del FcεRI i dels receptors inhibidors assegura una resposta mastocitària equilibrada (Molfetta et al., 2007).

Entre els receptors inhibidors que contenen ITIMs a la seva cua citoplasmàtica, un dels més estudiats és el FcγRIIB, que correspon al receptor de baixa afinitat per la IgG. El FcγRIIB uneix IgG lligada a antigen específic, i la seva co-agregació amb el FcεRI també unit a IgE lligada a antigen específic, inhibeix la senyalització del FcεRI i les funcions efectores en mastòcits i basòfils (Katz, 2002). El receptor FcγRIIB actua reclutant SHIP a través del seu ITIM a la membrana plasmàtica, on al seu torn SHIP degrada els PIP₃ a PIP₂, conduint en última instància a una reducció de l'activació de la BTK i de la mobilització de calci mitjançada per la PLCγ (Kraft and Kinet, 2007). També s'ha descrit que SHIP realitza la seva funció inhibidora a través de la proteïna adaptadora DOK1 (*docking protein 1*), que s'uneix a la proteïna activadora de la GTPasa de RAS, inactivant per tant RAS i inhibint la cascada de senyalització les MAPKs (ERK, P38 i JNK) (Isnardi et al., 2004; Kepley et al., 2004).

5.2.7 Regulació negativa a través de receptors que no contenen ITIMs: CD200R, FcαRI i CD63

També existeixen altres molècules de superfície que manquen de motius ITIM, però que igualment poden inhibir la senyalització a través del FcεRI (Kraft and Kinet, 2007).

CD200R

El receptor CD200, membre de la superfamília de les immunoglobulines i receptor pel lligand CD200, té capacitat per suprimir la desgranulació dels mastòcits i l'anafilaxi cutània induïdes pel FcεRI, tot i que el mecanisme d'aquesta inhibició és desconegut (Cherwinski et al., 2005).

FcαRI

El receptor FcαRI, que té com a lligand la IgA, s'associa amb la cadena γ del FcεRI i pot inhibir la desgranulació dels mastòcits induïda pel FcεRI, tot i que conté un motiu ITAM (d'activació) en la seva cua citoplasmàtica (Pasquier et al., 2005a). S'ha descrit que anticossos específics contra el receptor FcαRI poden disminuir la severitat de la inflamació de les vies aèries i de la hiper-reativitat bronquial en un model de ratolí asmàtic (Pasquier et al., 2005a). El mecanisme inhibitori d'aquest receptor sembla involucrar el reclutament de la fosfatasa SHP-1 (Kraft and Kinet, 2007).

CD63

El CD63 és una proteïna transmembrana que pertany a una família de molècules que es caracteritzen per travessar quatre cops la membrana plasmàtica (*tetraspanin molecules*). S'ha vist que anticossos específics contra el CD63 poden inhibir la desgranulació dels mastòcits induïda pel FcεRI en la línia cel·lular mastocitària de rata RBL-2H3 (Kitani et al., 1991; Nishikata et al., 1992). Aquest tipus de molècules no tenen lligands extracel·lulars o capacitat de senyalització intrínseca, però formen xarxes localitzades a membrana amb altres molècules del mateix tipus, o bé amb proteïnes de la membrana plasmàtica com les β-integrines (Boucheix and Rubinstein, 2001; Hemler, 2001). Estudis amb la línia cel·lular RBL-2H3 demostren que l'ús d'anticossos específics contra el CD63 inhibeix la via complementària d'activació dels mastòcits dependent de PI3K, mentre que els esdeveniments proximals al FcεRI i els processos de mobilització de calci resten intactes. Per altra banda, l'ús d'aquests anticossos contra el CD63 inhibeix també l'anafilaxi *in vivo* en un model de rata (Kraft et al., 2005).

6. PERSPECTIVES I IMPLICACIONS TERAPÈUTIQUES

Les diferents aproximacions terapèutiques es poden classificar d'una manera molt general en tres grups: les que van dirigides a dianes extracel·lulars (mediadors alliberats, lligands), a dianes intracel·lulars (molècules de senyalització, expressió de gens) i a dianes de la membrana cel·lular (receptors) (Brown et al., 2008).

Dianes extracel·lulars

Moltes aproximacions terapèutiques parteixen de la base que per tractar desordres associats als mastòcits, un bon mecanisme podria ser inhibir el FcεRI, ja que és una potent via de senyalització per les funcions efectores dels mastòcits (Kraft and Kinet, 2007). Un exemple de tractament podria ser l'ús d'anticossos monoclonals contra la IgE, teràpia efectiva per pacients que pateixen asma (Busse et al., 2001; Holgate et al., 2005; Soler et al., 2001). Els anticossos específics contra IgE condueixen a una reducció de les molècules de IgE lliures al sèrum dels pacients al·lèrgics i per tant a una reducció dels nivells de FcεRI expressat en mastòcits, basòfils i cèl·lules dendrítiques (Djukanovic et al., 2004; Prussin et al., 2003). Això redueix la probabilitat que la IgE entri en contacte amb l'al·lergen o que s'uneixi al FcεRI (Kraft and Kinet, 2007).

Segons s'ha descrit, l'activació mastocitària *in vivo* mitjançada per l'antigen pot ser potenciada per altres factors, com l'addició de SCF, tot i que contribució relativa d'aquests factors a les respostes al·lèrgiques *in vivo* es desconeix (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). També s'han descrit mastòcits hipersensibles en condicions on hi ha elevades concentracions d'altres lligands (com l'adenosina i la proteïna C3a) per receptors de mastòcits que incrementen les respostes mitjançades per antigen (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). Aquests fenòmens fan que s'hagi de considerar la contribució dels processos d'amplificació sobre l'activació dels mastòcits *in vivo*. Actuar sobre receptors com KIT, o sobre altres molècules que puguin interferir en la via complementària de l'activació dels mastòcits, podria ser una aproximació terapèutica pel tractament de pacients amb desordres associats als mastòcits (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

Dianes intracel·lulars

Altres aproximacions terapèutiques advoquen per dissenyar estudis sobre la manera en què les vies de senyalització de receptors que activen o actuen de manera sinèrgica amb el FcεRI, s'integren per regular l'activació del mastòcit. També és important conèixer quina és la contribució exacta d'aquests receptors als desordres associats als mastòcits (com per exemple l'asma), ja que això ajudaria a desenvolupar noves estratègies pel tractament d'aquest tipus de malalties (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). L'augment en el nombre de molècules implicades en la xarxa de senyalització del FcεRI

conegudes, augmenta alhora el nombre de possibles dianes terapèutiques. S'ha de tenir en compte, però, que moltes d'aquestes molècules de senyalització actuen sovint de manera redundant. Per tant, la selecció de les molècules diana essencials per la funció del FcεRI és un procés que s'ha de fer amb molta cura (Kraft and Kinet, 2007).

Una de les dianes intracel·lulars que es troba en assajos clínics, és la cinasa SYK. S'ha descrit que un inhibidor d'aquesta cinasa, R112, afecta la senyalització del FcεRI i podria representar un nou mecanisme terapèutic per l'al·lèrgia (Guyer et al., 2006; Meltzer et al., 2005).

Dianes de la membrana cel·lular

Existeixen estratègies terapèutiques que utilitzen els receptors inhibidors com a dianes pel tractament. De fet, decantar la balança potenciant l'impacte de senyals inhibidors en individus al·lèrgics és una bona promesa terapèutica (Kraft and Kinet, 2007; Molfetta et al., 2007). Per exemple, Tam *et al.* (Tam et al., 2004a) utilitza un anticòs biespecífic que consisteix en un fragment Fab' específic per la IgE humana lligat a un fragment Fab' específic pel receptor FcγRII humà. Això permet inhibir la desgranulació de basòfils i mastòcits induïda pel FcεRI unit a IgE. Una altra estratègia, la de Zhu *et al.* (Zhu et al., 2002a), va generar una molècula quimèrica, consistent en el fragment Fc d'una IgG₁ humana, fusionat amb el fragment Fc d'una IgE humana. Aquesta estratègia també permet inhibir la desgranulació induïda pel FcεRI, unit a IgE. Recentment, han refinat la molècula quimèrica, fent que contingui el fragment Fc de la IgG₁ humana unit a un al·lèrgen específic. Així s'aconsegueix inhibir la desgranulació de basòfils i mastòcits induïda pel FcεRI unit a IgE específica d'al·lèrgen.

Donat que els mastòcits són cèl·lules efectores que participen com a mecanisme de defensa del sistema immunitari innat i que també actuen com a cèl·lules reguladores de la resposta immunitària adaptativa, seria interessant estudiar quin podria ser el paper d'altres receptors que s'expressin bàsicament al sistema immune i que puguin col·laborar en la resposta mastocitària actuant de manera sinèrgica amb la senyalització a través del FcεRI. Entre els candidats a aquest estudi es troba la família de receptors SLAM (CD150), que conjuntament amb la família de molècules adaptadores SAP, juguen un paper important en el desenvolupament de les funcions

del sistema immune i en el control de les respostes del sistema immunitari innat i adaptatiu (Calpe et al., 2008).

7. FAMÍLIA DE RECEPTORS SLAM I FAMÍLIA D'ADAPTADORS SAP

7.1 Família de receptors SLAM o família del CD150

La família de receptors SLAM, o família del CD150, ha estat clàssicament englobada dins de la família del CD2 tot i que per si mateixa constitueix una família (Engel et al., 2003). La família CD2 de receptors de superfície cel·lular de tipus immunoglobulina està formada per receptors expressats a la superfície dels leucòcits. Es tracta de glicoproteïnes de tipus I (extrem amino-terminal extracel·lular), pertanyents a la superfamília de les immunoglobulines (Ig) amb homologia en els seus dominis extracel·lulars (Engel et al., 2003; Ma et al., 2007). Les molècules de la família del CD2 es caracteritzen per la presència d'un domini de tipus immunoglobulina variable (V) en l'extrem N-terminal, i un domini de tipus immunoglobulina constant-2 (C2) en l'extrem C-terminal de la part extracel·lular del receptor (Davis and van der Merwe, 1996). Tots els membres d'aquesta família juguen un paper en la funció cel·lular (Engel et al., 2003; Nichols et al., 2005b). Actualment es coneixen onze membres que integren la família del CD2: CD2, CD58, CD150 (SLAM), CD244, CD229, CD84, CD48, NTB-A, CD319, BLAME i CD84-H1. Els nou últims membres citats són els integrants de la família SLAM (Fig 10.).

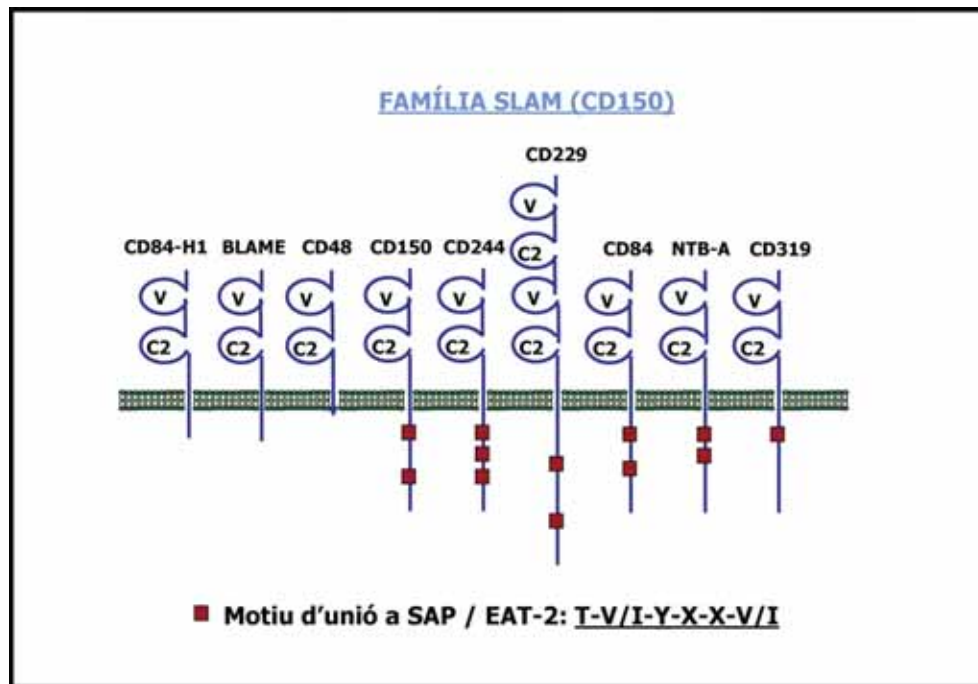


Fig 10. Membres de la família SLAM o família del CD150.

Els onze membres de la família del CD2 es localitzen al cromosoma 1 humà: CD2 i CD58 al braç curt (regió 1p13), i la resta (família SLAM) es concentren al braç llarg (regions 1q21-24) (Davis and van der Merwe, 1996; Engel et al., 2003; Sidorenko and Clark, 2003; Tangye et al., 2000). Sis d'aquests receptors (SLAM, CD244, CD229, CD84, NTB-A i CD319) contenen una o més còpies del motiu ITSM que recluta els adaptadors SAP i EAT-2 i que presenta la següent seqüència consens: Thr-Val/Ile-**Tyr**-X-X-Val/Ile, on la X representa un aminoàcid qualsevol (Engel et al., 2003; Ma et al., 2007; Veillette, 2006). Mutacions en el gen *SH2D1A* que codifica per la proteïna SAP, involucrada en la senyalització intracel·lular duta a terme per diversos receptors de la família SLAM, condueix una immunodeficiència anomenada XLP (*X-linked lymphoproliferative disease*) (Coffey et al., 1998; Nichols et al., 1998; Sayos et al., 1998).

Basats en les similituds que presenten els gens de la família SLAM pel que fa a seqüència, organització genòmica, localització gènica i motius ITSM, es creu que tots provenen d'un gen ancestral comú (Conrad and Antonarakis, 2007; Davis and van der Merwe, 1996; Engel et al., 2003; Sidorenko and Clark, 2003). L'estructura exònica en tots els membres és molt semblant: un exó pel pèptid "leader", domini extracel·lular i transmembrana; però diferents exons que codifiquen pel domini citoplasmàtic. Cada

gen pot donar lloc d'aquesta manera a més d'un transcrit degut a processos de "splicing" alternatiu. Això fa que tots els membres puguin aparèixer amb diferents isoformes de membrana, solubles o citosòliques (Boles et al., 2001).

Pel que fa als membres de la família SLAM en concret, vuit d'ells són glicoproteïnes de membrana de tipus I, amb un domini citoplasmàtic. Un dels membres, però, el CD48 es troba ancorat a la membrana plasmàtica mitjançant un GPI (*glycosyl-phosphatidylinositol*) (Staunton and Thorley-Lawson, 1987; Yokoyama et al., 1991). Tal com s'ha citat abans, els dominis extracel·lulars de la majoria dels membres de la família SLAM estan compostats per un domini de tipus immunoglobulina variable (V) en l'extrem N-terminal, al qual li manca els pont disulfur canònic; i un domini de tipus immunoglobulina constant-2 (C2) en l'extrem N-terminal, caracteritzat per les cisteïnes conservades (Davis and van der Merwe, 1996). La única excepció és la part extracel·lular del receptor CD229, que consisteix en una repetició en tàndem de dos sets de dominis V-Ig/C2 (Sandrin et al., 1992) (Fig 10.). Els receptors de la família SLAM interaccionen de manera específica amb els seus lligands a través dels seus dominis extracel·lulars. La majoria d'ells (CD150, CD84, CD229, NTB-A i CD319) presenten interaccions homofílques, on els lligands són ells mateixos (Falco et al., 2004; Flaig et al., 2004; Kumaresan et al., 2002; Martin et al., 2001; Punnonen et al., 1997; Romero et al., 2005). Per altra banda, el receptor CD244 interacciona de manera heterotípica amb el CD48 (Brown et al., 1998; Latchman et al., 1998). Els dominis citoplasmàtics dels receptors SLAM, CD229, CD84, CD244, NTB-A i CD319 contenen tant dominis ITSM, com dominis no ITSM que contenen residus tirosina que poden ser fosforilats. D'aquesta manera poden reclutar moltes molècules senyalitzadores, ja sigui de manera dependent o independent dels adaptadors SAP i EAT-2 que poden conduir tant a senyals activadors, com inhibidors (Calpe et al., 2008). La integració de les xarxes de senyalització determina el resultat de diverses funcions efectores, depenent del tipus cel·lular i del seu estat d'activació (Engel et al., 2003; Ma et al., 2007; Morra et al., 2001a; Veillette, 2006). Les funcions dels diferents membres de la família CD150 es troben resumides a la Taula 2. El receptor CD84, altament expressat en mastòcits, es troba descrit en detall a l'apartat 7.1.1.

7.1.1 CD84

El receptor CD84 és una glicoproteïna de membrana de tipus I composta per una part extracel·lular de 199 aminoàcids amb dos dominis immunoglobulina (domini immunoglobulina V N-terminal i domini immunoglobulina C2 C-terminal), amb 4 llocs potencials per N-glicosilació; un segment transmembrana de 25 aminoàcids; i una cua citoplasmàtica de 83 aminoàcids, amb 4 tirosines, dues de les quals (Y262 i Y299) es troben dins de motius ITSM (Fig 11.) (de la Fuente et al., 1997; de la Fuente et al., 1999; Sayos et al., 2001).

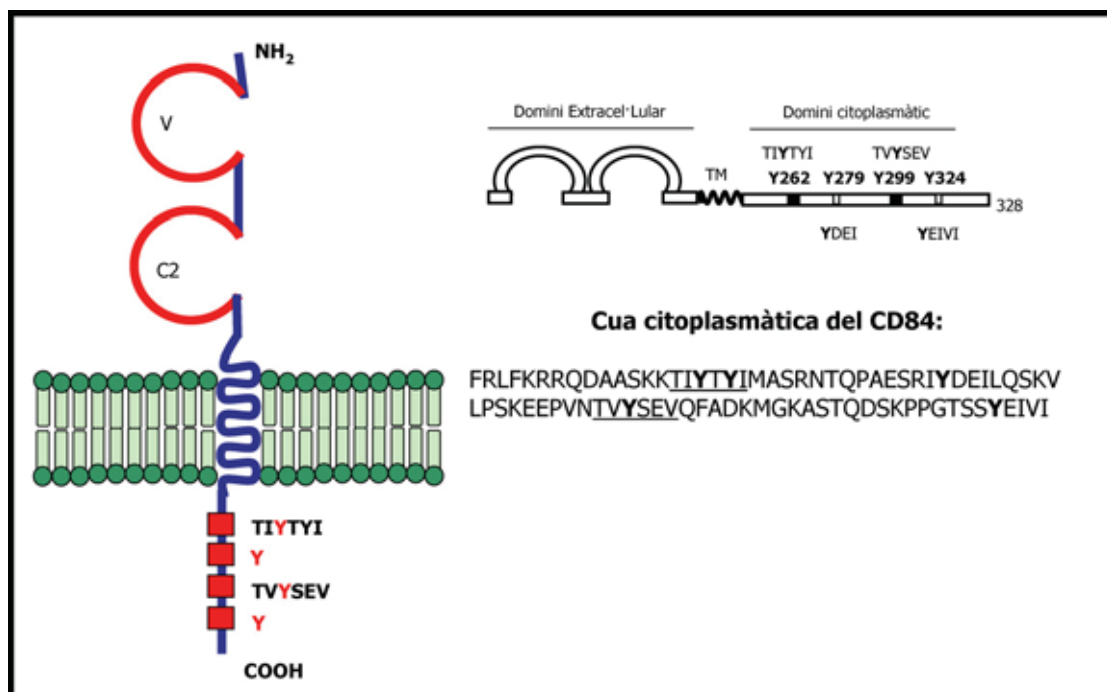


Fig 11. Estructura del receptor CD84. Esquema de l'estructura del CD84 i seqüència aminoacídica de la seva cua citoplasmàtica.

El receptor CD84 s'expressa en cèl·lules B, cèl·lules T, plaquetes, granulòcits (neutròfils, eosinòfils i basòfils), mastòcits, monòcits, macròfags, DCs, HSCs i timòcits humans (s'expressa en timòcits CD4⁻CD8⁻, CD4⁺ i CD8⁺, però no en els dobles positius CD4⁺CD8⁺) (de la Fuente et al., 1997; Kruse et al., 2001; Martin et al., 2001; Nanda et al., 2005; Romero et al., 2004; Tangye et al., 2002; Zaiss et al., 2003). Les cèl·lules NK humanes no expressen CD84, però les de ratolí sí (Romero et al., 2005; Roncagalli et al., 2005; Tangye et al., 2002). Segons el nivell d'expressió del CD84, les cèl·lules B es poden dividir en dues subpoblacions: CD84^{hi} i CD84^{lo}. La població CD84^{hi} representa un grup de cèl·lules B memòria, que tenen com a característica la co-expressió del

CD27, i que presenten un alt nombre de mutacions somàtiques i una elevada proliferació en resposta a CD40L i IL-4, en comparació a la població de cèl·lules B CD84^{lo} (Martin et al., 2001; Tangye et al., 2002).

Una característica sorprenent del CD84 és la complexa expressió de les seves isoformes amb diverses cues citoplasmàtiques en la línia tumoral de cèl·lules T CEM (Palou et al., 2000). Les isoformes del CD84 es generen per diversos mecanismes, que inclouen l'ús alternatiu d'exons, canvis en la pauta de lectura o absència de "splicing". L'expressió i la rellevància funcional d'aquestes isoformes és encara desconeguda. En ratolins s'han detectat també 2 transcrits del CD84 (Calpe et al., 2008).

Funcions

El receptor CD84 presenta una forta interacció homotípica, on ell és el propi lligand, mitjançada pel domini immunoglobulina V, formant un dímer homofílic ortogonal (Martin et al., 2001; Romero et al., 2005; Yan et al., 2007). Tot i que l'estructura del CD84 és molt similar a la del dímer homofílic que forma el receptor NTB-A, hi ha certs detalls estructurals i químics en la interfície d'ambdues interaccions homofíliques que proveeixen un mecanisme per prevenir la formació d'heterodímers indesitjats entre ambdós receptors (Calpe et al., 2008).

Cèl·lules T: S'ha descrit que la co-ligació del CD84 i el CD3 en cèl·lules T augmenta la proliferació (Tangye et al., 2003) i la secreció de IFN γ (Martin et al., 2001). Tanmateix, la lligació del CD84 per ell mateix no dona lloc a un augment de la proliferació o a la secreció de IFN γ , indicant que el receptor CD84 actua bàsicament com una molècula co-estimuladora (Martin et al., 2001; Tangye et al., 2003).

Cèl·lules B: El receptor CD84 participa en l'activació de les cèl·lules B, ja que s'ha descrit que es fosforila ràpidament en tirosines, després de la lligació amb un mAb anti-CD84. La població de cèl·lules CD84^{hi} presenta una major proliferació en resposta a CD40L que la població CD84^{lo}. Aquestes dades semblen indicar que les interaccions homotípiques del receptor CD84 podrien activar vies de senyalització addicionals en cèl·lules B, que contribuirien a una major activació, proliferació i diferenciació d'aquestes cèl·lules (Tangye et al., 2002).

Plaquetes: S'ha demostrat que el receptor CD84, altament expressat en aquest tipus cel·lular, és important per l'estimulació de les plaquetes, i que la interacció homotípica entre molècules del CD84 augmenta l'agregació plaquetària. Aquesta funció seria dependent de la fosforilació del receptor, ja que s'ha demostrat que el CD84 és fosforilat posteriorment a l'agregació plaquetària (Nanda et al., 2005).

Mecanismes moleculars

La lligació del CD84 mitjançada per anticossos en cèl·lules T o plaquetes dóna lloc a la fosforilació del ITSM del receptor i el posterior reclutament de SAP (Nanda et al., 2005; Sayos et al., 2001; Tangye et al., 2003). La tirosina 262 del primer motiu ITSM és essencial pel reclutament de SAP, mentre que ambdós motius ITSM poden unir la proteïna EAT-2 (Sayos et al., 2001; Tangye et al., 2003; Tangye et al., 2002). Aquest procés està mediat per src-cinases com FYN (Sayos et al., 2001) i LCK (Tangye et al., 2003). La fosforilació del CD84 no requereix l'expressió de SAP en cèl·lules T, ja que també es dóna en línies cel·lulars deficientes per SAP i en cèl·lules T de pacients amb XLP (Tangye et al., 2003; Tangye et al., 2002). La senyalització intracel·lular del CD84 encara no es coneix amb detall, tot i que es creu que SAP facilita el reclutament de FYN al CD84 i al complex format per SAP, i això alliberaria senyals a l'interior de les cèl·lules T activades (Ma et al., 2007).

7.2 Família d'adaptadors SAP i EAT-2

Les proteïnes citoplasmàtiques SAP i EAT-2 conformen una família de molècules adaptadores constituïdes per un domini SH2 amb una petita cua carboxi-terminal (Morra et al., 2001b). Els gens que codifiquen per SAP i EAT-2 es troben en cromosomes diferents, però presenten una mateixa distribució exó-intró. Aquest fet podria indicar que ambdós gens deriven probablement d'un ancestre comú (Fig 12.) (Veillette, 2002).

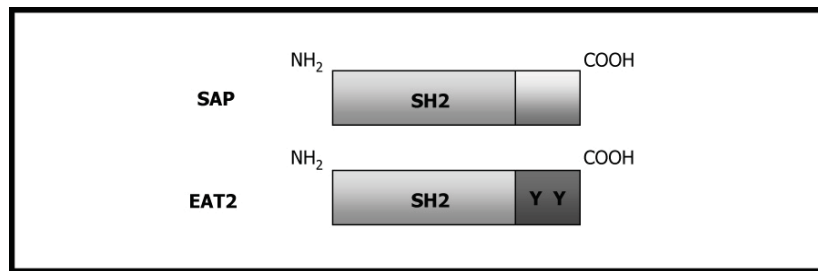


Fig 12. Esquema de l'estructura de la família d'adaptadors SAP i EAT-2.

7.2.1 SAP

La proteïna SAP es va clonar a través del sistema dels 2 híbrids, usant una llibreria d'expressió en llevats de cèl·lules T humanes i, com a esquer, la cua citoplasmàtica del receptor SLAM humà (Sayos et al., 1998). SAP és una proteïna constituïda per un sol domini SH2 amb una petita cua citoplasmàtica de 28 aminoàcids (Fig 12.). El gen que codifica per la proteïna SAP s'anomena *SH2D1A* i es localitza en el braç llarg del cromosoma X, entre les regions Xq24 i Xq25 (Sayos et al., 1998). La proteïna SAP s'expressa en timòcits, cèl·lules T, cèl·lules NK, cèl·lules NKT, eosinòfils i plaquetes, tant en humans, com en ratolins (Engel et al., 2003; Latour and Veillette, 2004; Ma et al., 2007; Morra et al., 2001a; Sidorenko and Clark, 2003). Hi ha controvèrsia sobre l'expressió de SAP en cèl·lules B, ja que certs estudis indiquen que SAP s'expressa en alguns limfòcits B memòria i del centre germinal (Morra et al., 2005), mentre que d'altres descriuen que SAP no es troba present en cèl·lules B (Nichols et al., 2005b).

Funció de SAP com a proteïna adaptadora intracel·lular

SAP regula la senyalització intracel·lular gràcies a la seva habilitat per unir el domini SH3 de la cinasa FYN. El residu responsable de la unió de SAP a FYN és una arginina que es troba en la posició 78 (R78) del domini SH2 de la proteïna SAP, diferent al residu R32 que participa en la unió de SAP al motiu ITSM del receptor SLAM, donant lloc a la formació d'un complex trimolecular SLAM-SAP-FYN (Chan et al., 2003; Latour et al., 2003; Li et al., 2003). No s'han detectat més complexos trimoleculars amb altres receptors de la família SLAM, tot i que sí s'ha descrit que SAP facilita la fosforilació per mitjà de FYN d'altres receptors de la família, com el CD229 i el CD244 (Chen et al., 2006; Simarro et al., 2004).

SAP té capacitat per unir-se a altres molècules de transducció de senyals, com per exemple LAT i LCK (Poy et al., 1999). En el cas de LCK, SAP s'uneix de manera directa a aquesta cinasa (Simarro et al., 2004). LCK té capacitat per fosforilar diversos receptors de la família SLAM: SLAM, CD84, CD244 i CD229 (Howie et al., 2002; Martin et al., 2005; Nakajima et al., 1999; Sayos et al., 2000).

Ratolins deficients en SAP

Tot i que els ratolins deficients per la proteïna SAP (SAP^{-/-}), són viables i fèrtils i el desenvolupament limfocitari és majoritàriament normal, s'han detectat diversos defectes en la funció de diferents poblacions de limfòcits.

Cèl·lules T

S'ha descrit que ratolins SAP^{-/-} augmenten el nombre de cèl·lules T CD8⁺ específiques d'antigen i secretores d' IFN γ , així com la producció d' IFN γ , després de la infecció amb LCMV (Crotty et al., 2006; Czar et al., 2001). Les cèl·lules T CD8⁺ dels ratolins SAP^{-/-}, també mostren una major citotoxicitat després de la infecció (Chen et al., 2005; Crotty et al., 2006; Czar et al., 2001; Wu et al., 2001), però aquest resultat es contradiu amb les funcions de les cèl·lules T CD8⁺ de pacients amb XLP, que mostren una lisi defectuosa de les cèl·lules B infectades pel EBV i una disminució en el nombre de cèl·lules productores de IFN γ (Harada et al., 1982a; Ma et al., 2005; Sharifi et al., 2004). En qualsevol cas, les cèl·lules T dels ratolins SAP^{-/-} s'activen de manera aberrant i no poden controlar de manera apropiada la infecció, mostrant una sensibilitat augmentada, similar a la que mostren els pacients de XLP a la infecció amb EBV i un dany tissular provocat per les cèl·lules T (Ma et al., 2007).

Els ratolins SAP^{-/-} mostren una habilitat alterada de les cèl·lules T CD4⁺ per diferenciar-se en cèl·lules Th2. Després d'una activació *in vitro*, mostren un augment en les citocines Th1, com l'IFN γ ; i una disminució de la producció de citocines Th2, com IL-4, IL-10 i IL-13 (Czar et al., 2001; Wu et al., 2001). Després de l'estimulació amb antigen, les cèl·lules T CD4⁺ també mostren nivells reduïts de la inducció de la molècula ICOS (Cannons et al., 2006; Ma et al., 2005), i nivells elevats i perllongats de l'expressió de CD40L (*CD40 Ligand*) (Cannons et al., 2006). Per altra banda, les cèl·lules T CD4⁺ de ratolins SAP^{-/-}, presenten una producció defectuosa d'IgE (Czar et

al., 2001; Wu et al., 2001). Aquests resultats difereixen una mica dels obtinguts en pacients amb XLP, on no s'observen diferències pel que fa a la secreció d'IL-4 (Ma et al., 2005).

Cèl·lules B

Pel que fa a les cèl·lules B, tant els ratolins $SAP^{-/-}$ infectats amb LCMV, com els pacients amb XLP, presenten defectes en la resposta humoral, així com una manca de centres germinals. Aquest defecte en la formació de centres germinals podria explicar la reducció significativa que s'observa de cèl·lules B memòria, que resulta alhora en una disminució dels nivells d'IgG en sèrum (Cannons et al., 2006; Crotty et al., 2003; Czar et al., 2001; Hron et al., 2004; Kamperschroer et al., 2006; Ma et al., 2005; Ma et al., 2006; Malbran et al., 2004; Morra et al., 2005). Hi ha moltes evidències que donen suport a la hipòtesi que els defectes en la formació de centres germinals en ratolins $SAP^{-/-}$ és conseqüència dels defectes en les cèl·lules T helper $CD4^{+}$, concretament en la seva incorrecta polarització cap a Th2 (Crotty et al., 2003; Czar et al., 2001; Davidson et al., 2004; Wu et al., 2001). També, s'han descrit, però altres factors que podrien contribuir a aquests defectes en la formació de centres germinals, com per exemple, la reducció en l'expressió de la molècula ICOS en les cèl·lules T $CD4^{+}$ (Cannons et al., 2006), ja que aquesta molècula participa en el desenvolupament dels centres germinals i de les cèl·lules B memòria, tant en ratolins, com en humans (Dong et al., 2001; Grimbacher et al., 2003; McAdam et al., 2001). Hi ha certs estudis que advoquen també per un defecte intrínsec de les cèl·lules B (Al-Alem et al., 2005; Morra et al., 2005). Pel que fa als nivells d'immunoglobulines, les cèl·lules B de ratolins $SAP^{-/-}$ mostren nivells normals d'IgM, IgG i IgA en sèrum abans de la infecció, però un cop són estimulats in vitro mostren una alteració en el canvi d'isotip, que condueix a una reducció dels nivells d'IgG i IgA (Al-Alem et al., 2005).

Cèl·lules NKT

Els ratolins $SAP^{-/-}$ no tenen cèl·lules NKT, reflectint d'aquesta manera el defecte en el desenvolupament d'aquest tipus cel·lular en pacients amb XLP (Nichols et al., 2005a; Nichols et al., 2005b; Pasquier et al., 2005b). Donat que les cèl·lules NKT representen una població de limfòcits amb característiques tant de limfòcit T com de cèl·lula NK, aquest resultat és en certa manera sorprenent, ja que el desenvolupament de les

cèl·lules NK i les cèl·lules T és completament correcte en absència de SAP funcional (Argov et al., 1986; Czar et al., 2001; Lindsten et al., 1982; Nichols et al., 2005a; Wu et al., 2001) i la majoria d'aberracions genèriques que anul·len el desenvolupament de les cèl·lules NKT, afecten també les cèl·lules T CD8⁺ i/o les cèl·lules NK (Kronenberg and Gapin, 2002). Les cèl·lules NKT tenen un paper en l'establiment de la immunitat humoral i les respostes immunes antitumorals citotòxiques (Galli et al., 2003; Kronenberg and Gapin, 2002), per això, l'absència d'aquest llinatge podria contribuir a la hipogammaglobulinèmia i els limfomes en pacients amb XLP (Ma et al., 2007). Sembla que les cèl·lules NKT estan relacionades en l'inici i regulació de la resposta immunològica, actuant de pont entre la immunitat innata i adquirida.

7.2.2 EAT-2

La molècula EAT-2 va ser clonada a partir de cèl·lules NIH3T3 transformades amb el DNA (àcid desoxiribonucleic) del sarcoma de Ewing (Thompson et al., 1996). El gen que codifica per EAT-2 es localitza al braç llarg del cromosoma 1, a la regió 1q23, molt propera al lloc ocupat per la família SLAM (Engel et al., 2003). EAT-2 és una proteïna de baix pes molecular, de 123 aminoàcids, composta per un domini SH2 i una petita cua en l'extrem carboxi-terminal. Presenta una homologia amb la proteïna SAP del 47% en el domini SH2, tot i que les cues citoplasmàtiques d'ambdues molècules són totalment diferents, ja que en la cua de la proteïna EAT-2 s'hi troben dues tirosines susceptibles a ser fosforilades (Fig 12.) (Chan et al., 2003; Latour et al., 2003; Morra et al., 2001b). El patró d'expressió d'EAT-2 és diferent al de la proteïna SAP. En humans, EAT-2 es troba en cèl·lules NK, cèl·lules T (CD4⁺ i CD8⁺) activades i cèl·lules T TCRγδ (Bouchon et al., 2001; Tangye et al., 2003; Tassi and Colonna, 2005). En ratolins, existeixen dos gens pràcticament idèntics per EAT-2: l'original *SH2D1B*, que codifica per la proteïna EAT-2A; i el seu duplicat *SH2D1C*, que codifica per la proteïna EAT-2B o ERT (Calpe et al., 2006; Roncagalli et al., 2005; Thompson et al., 1996). Tant EAT-2A com EAT-2B es troben predominantment en cèl·lules NK, tot i que també se n'han trobat transcrits en cèl·lules B, plaquetes, mastòcits i macròfags (Calpe et al., 2006; Morra et al., 2001b; Nanda et al., 2005; Roncagalli et al., 2005).

EAT-2A

La proteïna EAT-2 pot unir-se amb molta afinitat a les cues citoplasmàtiques dels receptors de la família SLAM: CD150 (SLAM), CD244, CD229, CD84, hCD319, i NTB-A (així com la seva forma en ratolí, LY108) (Fraser et al., 2002; Morra et al., 2001b; Roncagalli et al., 2005). La fosforilació d'aquests receptors es potencia amb la seva unió a EAT-2A (Calpe et al., 2006; Calpe et al., 2008; Morra et al., 2001b). EAT-2A interacciona, de manera similar a la proteïna SAP, amb el primer ITSM del receptor SLAM (Latour et al., 2003; Morra et al., 2001b), però degut a la manca del residu R78, EAT-2 no té capacitat per unir el domini SH3 de la cinasa FYN (Latour et al., 2003).

Ratolins deficients per la proteïna EAT-2A (*SH2D1B*^{-/-}) mostren un augment de la citotoxicitat i de la producció d'IFN γ (Roncagalli et al., 2005), suggerint que les proteïnes SAP i EAT-2A podrien tenir papers oposats en l'activació limfocitària, on EAT-2A actuaria com un regulador negatiu de les funcions de les cèl·lules NK (Ma et al., 2007). El mecanisme bioquímic pel qual EAT-2A regula de manera negativa l'activació dels limfòcits es desconeix, però sembla ser depenent de la fosforilació dels dos residus tirosina que es troben en l'extrem carboxi-terminal de la seva cua citoplasmàtica, ja que la funció inhibidora de EAT-2A s'aboleix quan es muten aquests dos residus (Roncagalli et al., 2005; Veillette, 2006).

7.3 XLP: Malaltia limfoproliferativa lligada al cromosoma X

La malaltia XLP, també anomenada malaltia de Duncan, és una immunodeficiència lligada al cromosoma X que afecta a 1 de cada 500000 a 1000000 de mascles caucàsics (Purtilo et al., 1975). En un 90% dels casos, la infecció pel virus del Epstein-Barr (EBV) és la causa de la presentació clínica de la malaltia de XLP (Harada et al., 1982b; Purtilo et al., 1982).

El EBV entra al cos humà a través de la orofaringe i estructures adjacents i infecta les cèl·lules B madures via el receptor de complement CD21 (Hislop et al., 2007) i el MHC de classe II (Mullen et al., 2002). Les cèl·lules infectades proliferen i algunes pateixen transformació. Posteriorment a la infecció aguda del EBV, les cèl·lules NK llisen algunes de les cèl·lules infectades. Les cèl·lules NK són la primera línia efectora i eliminen les cèl·lules infectades pel virus via la producció de citocines i l'alliberació de grànuls

citolítics. Seguidament, segueix una resposta de les cèl·lules T CD8⁺ citotòxiques específiques d'antigen restringit a l'MHC, que limita la proliferació de les cèl·lules B infectades (Lee et al., 2007; Ma et al., 2007). Generalment, el EBV és un virus innoeu per la població sana (les cèl·lules B infectades persisteixen de per vida, però es mantenen sota control mitjançant les cèl·lules T CD8⁺ específiques pel EBV i per altres limfòcits citotòxics). En canvi, quan els pacients amb XLP pateixen una infecció aguda pel EBV, tot i mostrar-se asimptomàtics prèvia exposició al virus, generen una resposta immunitària desregulada que condueix en el 60% dels casos a una mononucleosi infecciosa fulminant (FIM), causada per una expansió descontrolada de cèl·lules B policlonals, cèl·lules T, macròfags i monòcits, que els provoca una esplenomegàlia severa (Ma et al., 2007). La majoria dels pacients moren entre 1 i 2 mesos després de contraure el virus (Calpe et al., 2008; Gilmour and Gaspar, 2003), ja que sovint aquesta expansió condueix a una infiltració dels limfòcits a diversos òrgans com el fetge, els ronyons, el timus i la medul·la òssia, causant una fallida multiorgànica (Morra et al., 2001a; Nichols et al., 2005b). Els pacients de XLP que sobreviuen a una infecció pel EBV desenvolupen posteriorment desordres limfoproliferatius (20%) (tals com limfomes de cèl·lules B i T malignes) i disgammaglobulinèmia (30%) (Calpe et al., 2008; Engel et al., 2003). La majoria de pacients amb XLP moren abans dels 40 anys, i un 70% ho fa abans d'assolir els 10 anys (Moretta et al., 2001).

Tot i que el EBV desencadena la progressió de la malaltia, no és la única causa de malaltia en pacients amb XLP (Morra et al., 2001a). Això suggereix que el gen responsable de la malaltia, el gen *SH2D1A* que codifica per la proteïna SAP, no està involucrat sols en la resposta immunitària contra el EBV, sinó també en la homeòstasi del sistema immune en general; i que altres estímuls antigènics, a part del EBV, estan involucrats en la patogènesi de la malaltia XLP. La majoria dels pacients de XLP presenten mutacions en el gen *SH2D1A*, que codifica per la proteïna SAP, tot i que hi ha un cert percentatge, aproximadament el 20%, que mostren nivells normals l'expressió de SAP, però que presenten mutacions en XIAP (*X-linked inhibitor apoptosis*) (Latour, 2007; Rigaud et al., 2006). Recentment s'ha proposat doncs, que la deficiència provocada pel gen *SH2D1A* s'anomeni XLP-1 i la provocada per la deficiència de XIAP s'anomeni XLP-2 (Marodi and Notarangelo, 2007).

7.3.1 Identificació de *SH2D1A* com el gen responsable de la malaltia XLP

El gen *SH2D1A*, que codifica per la proteïna SAP es va identificar per primer cop com el gen responsable de la malaltia XLP el 1998 per tres grups independents (Coffey et al., 1998; Nichols et al., 1998; Sayos et al., 1998).

La majoria de les mutacions en el gen *SH2D1A* que s'han trobat en malalts amb XLP s'han pogut classificar en tres categories: micro o macro delecions; mutacions que interfereixen en la transcripció o en el procés de "splicing", conduint a un processament inadequat del RNA; i mutacions puntuals que donen lloc a un codó d'aturada o a la substitució d'un aminoàcid, la majoria d'elles en aminoàcids que es conserven en la proteïna SAP aïllada d'humans, ratolins i altres espècies. L'estudi de les mutacions demostren que SAP es veu alterat per dos mecanismes diferents. Per una banda, hi ha mutacions que afecten la vida mitjana de la proteïna i que per tant demostren que la proteïna SAP s'ha de trobar en nivells òptims pel seu funcionament correcte; i per altra, hi ha mutacions que afecten el lloc d'unió de SAP amb els motius tirosina, inhabilitant aquesta proteïna en la seva funció de transmissió de senyals. No ha estat possible establir cap correlació entre aquestes mutacions i la presència d'un fenotip determinat de malaltia XLP. De fet s'han descrit mutacions idèntiques en una mateixa família que han donat lloc a fenotips diferents (Calpe et al., 2008; Morra et al., 2001c; Sumegi et al., 2002).

7.3.2 Defectes en la funció dels limfòcits i implicació de les alteracions en la senyalització a través dels receptors de la família SLAM en la malaltia XLP

La malaltia XLP és una síndrome complexa que comporta alteracions en les cèl·lules T CD4⁺, cèl·lules T CD8⁺, cèl·lules B, cèl·lules NK i cèl·lules NKT, tot i que el desenvolupament de cèl·lules T, cèl·lules B i cèl·lules NK és normal en pacients amb XLP (Nichols et al., 2005b). Mitjançant l'associació amb 6 membres de la família SLAM, l'adaptador SAP juga un paper significatiu en la regulació de l'activació i de les funcions efectores de molts tipus de cèl·lules del sistema immunitari. El fenotip que presenten els pacients amb XLP es deu doncs a defectes en la senyalització a través dels diversos receptors que s'associen a SAP.

Hipogammaglobulinèmia

Els pacients amb XLP mostren una severa deficiència en l'habilitat de les cèl·lules T CD4⁺ per diferenciar-se a cèl·lules efectores que proveeixen ajut a les cèl·lules B, i una disminució de la producció de citocines importants per a la diferenciació de les cèl·lules B. Part d'aquesta deficiència ve donada per la disminució de molècules co-estimuladores importants, com la molècula ICOS (*Inducible co-stimulator*). Com a resultat d'aquestes mancances, els pacients amb XLP no poden formar Centres Germinals i presenten també una deficiència en el nombre de cèl·lules B memòria. Aquest dèficit de les cèl·lules T CD4⁺ efectores i cèl·lules B memòria podria explicar l'aparició de la hipogammaglobulinèmia en pacients amb XLP (Ma et al., 2007). Una altra explicació podria basar-se en defectes en cèl·lules T helper fol·liculars (T_{FH}) (Vinuesa et al., 2005). Les cèl·lules T_{FH} expressen una varietat de molècules, incloses l'adaptador SAP i els receptors de la família SLAM que s'associen a SAP, que poden contribuir directament a l'habilitat de les cèl·lules T_{FH} per promoure la diferenciació de les cèl·lules B.

Susceptibilitat al EBV

Les mutacions en el gen que codifica per la proteïna SAP fan que els pacients amb XLP tinguin una sensibilitat molt elevada a una infecció pel EBV, cosa que no succeeix amb les infeccions per altres herpes virus (Ma et al., 2007). Això suggereix que l'adaptador SAP i els receptors de la família SLAM que s'associen a SAP, es troben involucrats preferentment en una resposta immune anti-EBV. Les cèl·lules NK d'aquests pacients mostren una citotoxicitat reduïda (Benoit et al., 2000). Per altra banda, també es troben reduïts els nivells de cèl·lules T CD8⁺ específiques contra el EBV, així com la seva habilitat per llisar les cèl·lules B infectades pel EBV (Sharifi et al., 2004). Aquestes dades semblen indicar que l'elevada susceptibilitat que presenten els pacients amb XLP de patir una infecció pel EBV es deu a la branca citotòxica del sistema immunitari.

Limfoma de cèl·lules B

L'alteració de la senyalització o la disminució de l'activació a través del receptor CD244 en les cèl·lules NK, facilita la supervivència i la persistència de les cèl·lules B infectades amb el EBV. D'aquesta manera, les cèl·lules B poden adquirir alteracions genètiques

addicionals i donar lloc a cèl·lules B malignes (Ma et al., 2007). La funció defectuosa del CD244 en cèl·lules T CD8⁺ es manifesta probablement com una susceptibilitat augmentada al desenvolupament de limfomes (Dupre et al., 2005; Ma et al., 2007).

Desenvolupament de les cèl·lules NKT

S'ha descrit un paper crucial per SAP i FYN en el desenvolupament de cèl·lules NKT, ja que aquest tipus cel·lular es troba absent tant en ratolins deficients per la proteïna adaptadora SAP, com per la cinasa FYN, de manera similar al que succeeix en pacients amb XLP (Chung et al., 2005; Eberl et al., 1999; Gadue et al., 1999; Nichols et al., 2005a; Pasquier et al., 2005b). Així doncs, probablement la proteïna SAP regula les vies de senyalització durant el desenvolupament de cèl·lules NKT, en part a través d'una senyalització depenent de FYN.

Taula 2. Resum de les funcions dels membres de la família SLAM. Taula resum amb l'expressió, el lligand extracel·lular i la funció dels diferents membres de la família SLAM. El receptor CD84 es troba descrit en detall a l'apartat 7.1.1.

FAMÍLIA DE RECEPTORS SLAM				
Receptor	Expressió	Lligand	Funció	Referències
CD84	Cèl·lules B i T, plaquetes, granulòcits, mastòcits, monòcits, macròfags, DCs, HSCs i timòcits	CD84	Cèl·lules T: Augment de proliferació i de secreció d'IFN γ . Plaquetes: Augment de l'agregació plaquetària.	(de la Fuente et al., 1997; Kruse et al., 2001; Martin et al., 2001; Nanda et al., 2005; Romero et al., 2004; Sintès et al., 2008; Tangye et al., 2003; Tangye et al., 2002)
CD150	Cèl·lules B i T, plaquetes, macròfags, DCs madures, HSCs i timòcits	CD150	Cèl·lules T CD4⁺: Regulació de la proliferació i la producció d'IFN γ induïda pel TCR. Redirecció de la resposta cap a Th1. Cèl·lules T CD8⁺: Augment de la citotoxicitat i l'alliberació de grànuls induïda pel TCR. Cèl·lules B: Regulació de la producció d'Ig, la proliferació i l'apoptosi. Macròfags i DCs: Regulació de la producció de citocines. Plaquetes: Estabilització dels agregats plaquetaris. HSCs: Identificació i purificació de poblacions potencials de HSCs.	(Cocks et al., 1995; Henning et al., 2001; Kiel et al., 2005; Kruse et al., 2001; Mikhailap et al., 1999; Munitz et al., 2005; Nanda et al., 2005; Ono et al., 1997; Romero et al., 2004; Sayos et al., 2000; Wang et al., 2004)
CD244	Cèl·lules NK, T $\gamma\delta$ i T CD8 ⁺ , monòcits, basòfils, eosinòfils i HSCs	CD48	Cèl·lules NK: Augment de la citotoxicitat, la producció d'IFN γ , la secreció de grànuls i de citocines. Participació en el desenvolupament de les funcions efectores. Cèl·lules T CD8⁺: Augment de la citotoxicitat i la producció d'IFN γ . Eosinòfils: Inducció de la producció de citocines i la lisi de cèl·lules diana.	(Boles and Mathew, 2001; Dupre et al., 2005; Garni-Wagner et al., 1993; Kubota, 2002; Kubota et al., 1999; Ma et al., 2007; Munitz et al., 2005; Nakajima et al., 1999; Romero et al., 2004; Saborit-Villarroya et al., 2005; Saborit-Villarroya et al., 2008; Sharifi et al., 2004; Sintès et al., 2008)
CD229	Cèl·lules B i T	CD229	Cèl·lules T: Reducció de la producció d'IFN γ i reducció parcial de l'activació d'ERK induïdes pel TCR.	(de la Fuente et al., 2001; Del Valle et al., 2003; Martin et al., 2005; Romero et al., 2004)
NTB-A (LY108 EN RATOLÍ)	Cèl·lules NK, B i T	NTB-A	Cèl·lules NK: Augment de la citotoxicitat i de la secreció de citocines (IFN γ , IL8 i TNF α). Cèl·lules T CD8⁺: Augment de la citotoxicitat i de la producció d'IFN γ induïdes pel TCR. Cèl·lules T CD4⁺: Polarització de la resposta cap a Th1.	(Bottino et al., 2001; Falco et al., 2004; Flaig et al., 2004; Fraser et al., 2002; Peck and Ruley, 2000; Valdez et al., 2004)
CD319 (NOVEL LY9 EN RATOLÍ)	Cèl·lules NK, T i B i DCs madures	CD319	Cèl·lules NK: Inducció de la citotoxicitat. Cèl·lules B: Inducció de la proliferació.	(Bouchon et al., 2001; Kumaresan et al., 2002; Lee et al., 2004; Lee et al., 2007; Stark and Watzl, 2006; Tassi and Colonna, 2005; Tovar et al., 2002)
CD48	Cèl·lules B, T i NK, DCs, monòcits i granulòcits	CD244	Cèl·lules T: Disminució de la proliferació i la producció de citocines. Cèl·lules B, NK i DCs: Regulació de l'activació i la proliferació.	(Assarsson et al., 2005; Assarsson et al., 2004; Boles et al., 2001; Brown et al., 1998; Gao et al., 2005; Gonzalez-Cabrero et al., 1999; Kambayashi et al., 2001; Kubin et al., 1999; Latchman et al., 1998; Messmer et al., 2006; Valiante and Trinchieri, 1993)
BLAME	Cèl·lules B, DCs, macròfags i monòcits.	Desconegut	Desconeguda	(Calpe et al., 2008; Kingsbury et al., 2001)
CD48-H1	Cèl·lules B i T, DCs, macròfags, monòcits	Desconegut	Desconeguda	(Calpe et al., 2008; Fennelly et al., 2001; Fraser et al., 2002; Zhang et al., 2001)

II. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT

II. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT

Donada la participació dels mastòcits en el mecanisme de defensa del sistema immunitari innat i en la regulació de la resposta immunitària adaptativa; i donada l'elevada expressió del receptor CD84 en mastòcits i la seva participació, com a membre de la família SLAM, en la modulació de les funcions i el control de les respostes del sistema immunitari innat i adaptatiu; es va considerar estudiar el paper del receptor CD84 en l'activació mastocitària.

1. OBJECTIUS GENERALS

- Caracteritzar la funció del receptor CD84 en l'activació dels mastòcits a través de mecanismes dependents o independents d'IgE.
- Disseccionar el mecanisme bioquímic de les vies de senyalització proximals (mecanismes de fosforilació) i distals (estudis de la cascada de MAPKs i de la producció de citocines) del receptor CD84.

2. OBJECTIUS ESPECÍFICS

- Estudiar els efectes de la interacció homotípica del receptor CD84 mitjançant estudis de sobre-expressió d'aquesta molècula en una línia mastocitària de rata.
- Generació de mutants puntuals per cadascuna de les tirosines presents a la cua citoplasmàtica del CD84 i creació de transfectants estables amb les construccions obtingudes.
- Dissecció de les tirosines implicades en el mecanisme de senyalització i els efectes del CD84.
- Estudi de fosforilació del receptor CD84 mitjançant la seva interacció amb diferents cinases importants en l'activació mastocitària.
- Caracterització de les molècules implicades en les vies de senyalització del receptor CD84.
- Anàlisi de la funció del CD84 en una línia mastocitària humana mitjançant l'ús d'anticossos agonistes.

III. MATERIALS I MÈTODES

III. MATERIALS I MÈTODES

1. LÍNIES CEL·LULARS I REACTIUS

1.1 Línies cel·lulars

Línia cel·lular RBL-2H3 (*Rat Basophilic Leukemia*): Mastòcits de rata. Condicions de cultiu: Medi RPMI 1640 complementat amb 10% de sèrum boví fetal (FCS) inactivat per calor, 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina, 2mM d'L-glutamina i 1% d'HEPES (degut a la tendència que tenen aquestes cèl·lules d'acidificar el medi). Tots els reactius són de Invitrogen Life Technologies.

Línia cel·lular LAD-2 (*Laboratory of allergic diseases 2*): Mastòcits humans. Condicions de cultiu: Medi StemPro-34 Serum Free Media (SFM) complementat amb StemPro-34 Nutrient Supplement, 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina, 2mM d'L-glutamina i 100µg/ml de SCF. Tots els reactius són de Invitrogen Life Technologies, excepte el SCF, que va ser un obsequi d'Amgen.

Línia cel·lular COS-7 (Creticos et al.): Fibroblasts de mico verd africà. Condicions de cultiu: Medi DEMEM complementat amb 10% de sèrum boví fetal (FCS) inactivat per calor, 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina i 2mM d'L-glutamina. Tots els reactius són de Invitrogen Life Technologies.

Línies JURKAT (77 i E 6.1), usades com a control positiu per la presència de SAP: Limfòcits T humans. Condicions de cultiu: Medi RPMI 1640 complementat amb 10% de sèrum boví fetal (FCS) inactivat per calor, 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina i 2mM d'L-glutamina. Tots els reactius són de Invitrogen Life Technologies.

1.2 Reactius

1.2.1 Anticossos

Anticòs monoclonal contra el CD84 humà (clon 1.7 IgG₁) biotinitat i no biotinitat. Aquest anticòs es va generar al nostre laboratori prèviament (Martin et al., 2001)

Anticòs monoclonal contra el CD229 (clon 1.25 IgG₁). Aquest anticòs va ser generat al nostre laboratori prèviament (de la Fuente et al., 2001).

Anticòs monoclonal contra el CD244 humà (clon 69 IgG₁). Aquest anticòs es va generar prèviament al nostre laboratori (Saborit-Villarroya et al., 2005).

Anticòs monoclonal contra el CD229 humà (clon 1.84 IgG₁) biotinitat i no biotinitat. Aquest anticòs es va generar prèviament al nostre laboratori (Martin et al., 2001) i es va usar com a control isotípic, ja que és una IgG₁, tant en cèl·lules RBL, com en cèl·lules LAD-2.

Anticòs contra tirosines fosforilades per immunoprecipitació (barreja d'anticossos monoclonals anti-tirosines fosforilades), anticòs contra tirosines fosforilades conjugat a Peroxidasa per *western blot* (barreja d'anticossos monoclonals anti-tirosines fosforilades) i anticòs anti-TOTAL ERK de Zymed Laboratoris.

Anticossos anti-ERK fosforilat i anti-P38 fosforilada de Cell Signaling Technologies.

Anticossos anti-AKT fosforilat, anti-DOK-1, anti-LYN, anti-FPS/FES i anti-SHP-2 de Santa Cruz.

Anticòs anti-c-CBL de Upstate Biotechnology.

Anticòs anti-mouse IgG conjugat a peroxidasa, de DAKO.

Anticòs anti-rabbit IgG conjugat a peroxidasa de BioRad.

Anticòs anti-FcεRI, de eBioscience.

Anticòs anti-SAP cedit pel Doctor Terhorst i generat prèviament al seu laboratori (Sayos et al., 1998).

Anticòs anti-α-Actina i Phalloidina-TRICT de Sigma-Aldrich

Streptavidin-PE (ficoeritrina) de BD Pharmingen.

Avidina conjugada a peroxidasa de Roche Diagnostics.

Tosyl activated beads i Dynabeads sheep-anti mouse IgG de Dynal. A. S.

Els anticossos purificats biotinitats són amb biotinamida-caproate *N*-hydroxysuccinimide éster de Sigma-Aldrich.

1.2.2 Reactius

PMA (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*) i Ionomicina de Calbiochem.

Biotina i IgE anti-DNP de Sigma-Aldrich.

DNP-HSA (*2,4-Dinitrophenyl-Human Serum Albumin*), de Sigma-Aldrich.

P-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucoopyranoside, de Calbiochem.

IgE biotinitilada, d'Abbotec.

Estreptavidina recombinant (de *Streptomyces avidinii*), de Sigma-Aldrich.

Manitol 20x (Osmofundina concentrada), de B.Braun.

Proteïna A Sepharosa CL-4B d'Amersham.

Kit d'electroporació AMAXA d'IZASA

Membranes de PVDF, de Millipore.

Supersignal Chemiluminiscense substrate de Pierce.

Pel·lícules Curix RP2 PLUS, de AGFA.

Fluo-3/AM, de Molecular Probes.

Paraformaldehyd al 16%, Electron Microscopy Sciences.

Medi de muntatge Fluoromount-G, de Southern Biotechnology.

Dual luciferase reporter kit , de Promega.

RNAeasy Mini Kit, de Qiagen.

GeneAmp® RNA PCR kit, de Applied Biosystems.

1.2.3 Reactius per DNA

Els oligonucleòtids utilitzats per generar les diferents construccions i els vectors on es van clonar aquestes construccions es troben resumits en la Taula 1. L'estratègia per la generació de les construccions es troba explicada en l'apartat 2.

El cDNA de SAP es troba clonat en el vector pCMV2-Flag (Sayos et al., 2001) i el de FYN en el vector pSRα (Del Valle et al., 2003).

Els cDNA de mLYN i mLYN K275 estan clonats dins el vector pcDNA IAmp i van ser cedits per la Dra. Hibbs, del Ludwig Institute for Cancer Research de Melbourne.

El cDNA de FPS/FES es troba clonat en el vector pCMV6-XL4 i és d'Origene.

El cDNA de TNF α -luciferasa es troba clonat dins el vector pGL3-Basic i va ser cedit per la Dra. Goldfeld, del CBR Institute for Biomedical Research Harvard Medical School, Boston.

Els vectors PCR 2.1 TOPO i PCR 3.1 TOPO són d'Invitrogen.

Kit de seqüenciació: ABI PRISM Big Dyes Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit i l'oligonucleòtid universal T7, de Applied Biosystems.

Oligonucleòtid		Seqüència de l'oligonucleòtid	Vector de clonatge
CD84	Forward	5'-CCCAAGCTTTTCCACAGAAGGTTAGAC-3'	pCINeo
CD84	Reverse	5'-AAAGGATCCGCCAGCAGCCTAG-3'	
CD244	Forward	5'-AAACTCGAGGAAATGCTGGGGCAAGTG-3'	
CD244-CD84	Forward	5'-CAGGAATTCATGGGCTTCCGTA CACCAC-3'	PCR 3.1 TOPO
CD244-CD84	Reverse	5'-GAAGCCCATGAATTCCTGATGGGCATTCTG-3'	
CD84-2	Reverse	5'-ACGGTCGACCTAGATCACAATTTTCATAG-3'	
Y262F	Forward	5'-GCCTCAAAGAAAACCATATTCACATATATC-3'	pCINeo
Y262F	Reverse	5'-TGTGAATATGGTTTTCTTTGAGGCAGC-3'	
Y279F	Forward	5'-GAGTCCAGAATCTTGATGAAATCCTG-3'	PCR 3.1 TOPO
Y279F	Reverse	5'-GGACTGCAGGATTCATCAAAGATTCTGGA-3'	
Y299F	Forward	5'-CACAGTTTTTCCGAAGTGCAG-3'	pCINeo
Y299F	Reverse	5'-CTGCACCTCGGAAAAACTGT-3'	
Δ cua citoplasmàtica	Reverse	5'-TGAGGCAGCTCATTGTCTTCTCTT-3'	pCINeo
Δ Y324	Reverse	5'CCCTCACTTATCAGCAAAGT-3'	PCR 3.1 TOPO

Taula 1. Oligonucleòtids i vectors de clonatge utilitzats per generar les construccions. Els llocs de mutació amb un canvi aminoacídic de tirosina a fenilalanina es troben remarcats en negreta. En el cas dels mutants de deleció, l'oligonucleòtid *forward* correspon al mateix que el CD84 *forward*. En la construcció de la quimera CD244-CD84 es van utilitzar quatre oligonucleòtids: CD244 *Forward*, CD244-CD84 *Forward* i *Reverse* i CD84-2 *Reverse*.

2. CONSTRUCCIÓ DE PLÀSMIDS

Per als diferents estudis realitzats s'han generat diverses construccions i mutants puntuals per tal de poder desenvolupar i abordar els experiments descrits en l'apartat de Resultats. La integritat de totes les construccions generades es va confirmar mitjançant un kit de seqüenciació: ABI PRISM Big Dyes Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit i l'oligonucleòtid universal T7 (Apartat 2.5).

2.1 Construcció de quimeres: CD244-CD84

Per a la construcció de la quimera CD244-CD84 es generen inicialment dues PCR (*Polymerase Chain Reaction*) independents: 1) Una primera PCR usant com a motlle

(*template*) el cDNA de CD244 humà clonat en pCINeo (Saborit-Villarroya et al., 2005), com a oligonucleòtid *forward* el CD244 *forward* i com a oligonucleòtid *reverse* el CD244-CD84 *reverse*. 2) Una segona PCR usant com a motlle el CD84 humà clonat en pCINeo, com a oligonucleòtid *forward* en CD244-CD84 *forward* i com a oligonucleòtid *reverse* el CD84-2 *reverse*. Es fa un anellatge (*annealing*) del producte de les dues PCR i el producte anellat resultant s'usa com a motlle per una tercera PCR amb els oligonucleòtids: CD244 *forward* i CD84-2 *reverse* (Fig 1.) (veure Taula 1. per a la seqüència dels oligonucleòtids usats). El producte obtingut en aquesta tercera PCR es clona dins el vector PCR 3.1 TOPO.

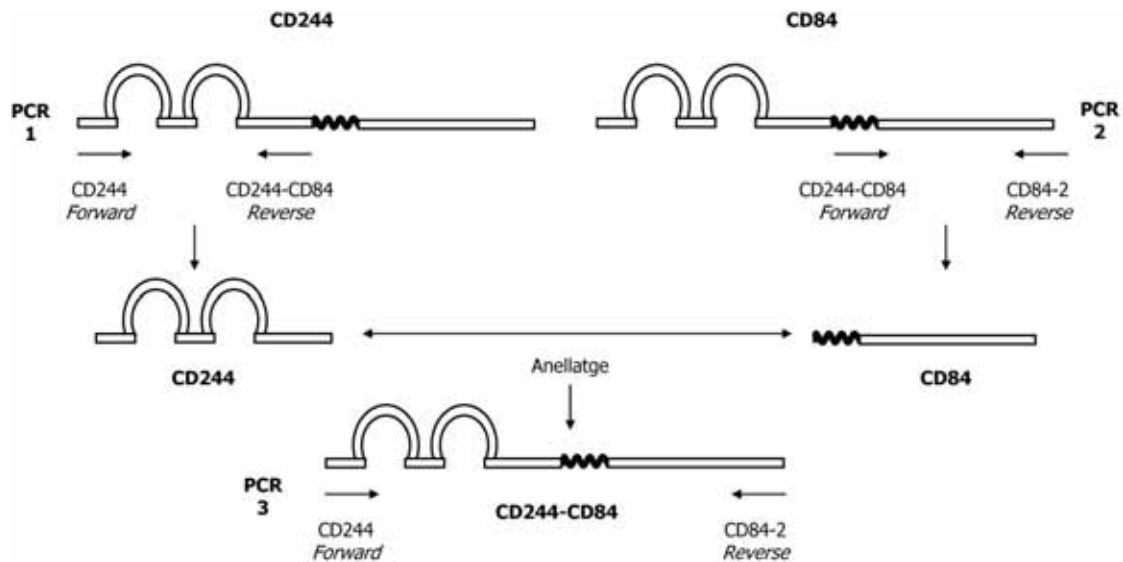


Fig 1. Esquema de la generació de la quimera CD244-CD84.

2.2 Construcció de mutants puntuals: CD84 Y262F, CD84 Y279F i CD84 Y299F

Per a l'anàlisi de la contribució de les tirosines de la cua citoplasmàtica del CD84 s'utilitza la tècnica de la mutagènesi dirigida per tal de canviar els residus tirosina a fenilalanina. S'usa com a motlle en tots els casos el CD84 humà clonat en pCINeo i per generar el mutant puntual, es fan servir oligonucleòtids on es canvia el codó que codifica per la tirosina que es vol mutar, per un codó que codifica per fenilalanina. Els oligonucleòtids usats per cada mutant es troben resumits a la Taula 1. Es fan dues PCR per separat amb els oligonucleòtids que presenten el canvi del residu tirosina a fenilalanina. Els productes de les dues PCR, s'aïllen a partir d'un gel d'agarosa, i es

purifiquen per tal d'usar-los com a motlle d'una tercera PCR on s'utilitzen aquest cop els oligonucleòtids de la molècula completa (Fig 2.). Finalment, el producte obtingut en aquesta tercera PCR, es clona dins els vectors pertinents (resumits en Taula 1.). En el cas del mutant CD84 Y279F, el producte de la tercera PCR es va clonar directament dins el vector PCR 3.1 TOPO. En el cas dels mutants CD84 Y262F i CD84 Y299F, el producte de la tercera PCR es va clonar dins el vector PCR 2.1 TOPO i posteriorment es va subclonar dins el vector pCINeo utilitzant un lloc de restricció per EcoRI.

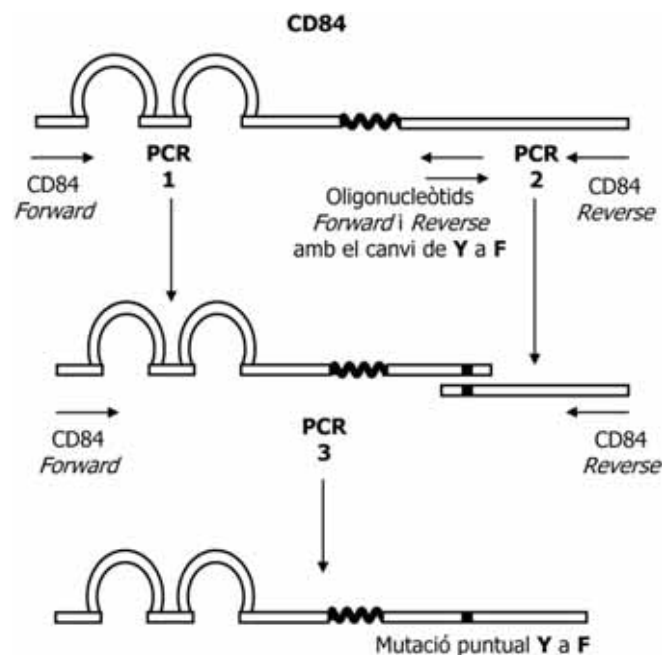


Fig 2. Esquema de la generació de construccions amb una mutació puntual.

2.3 Construcció de dobles mutants: CD84 Y262F/Y299F

En la generació de dobles mutants, l'estratègia és la mateixa que pels mutants simples i ambdues mutacions s'infereixen de manera seqüencial: primer s'obté un mutant puntual i un cop obtingut, s'utilitza com a motlle per generar l'altre mutant seguint la mateixa estratègia de mutagènesi dirigida. El producte final presenta les dues mutacions.

2.4 Construcció de mutants de deleció: CD84 Δ cua citoplasmàtica i CD84 Δ Y324

Per a la construcció dels mutants de deleció es fa servir com a motlle el CD84 humà clonat en pCINeo. Els oligonucleòtids que s'utilitzen amplifiquen part de la molècula que no conté el tros delecionat (oligonucleòtids resumits en Taula 1.).

2.5 Seqüenciació del DNA

Per garantir la integritat de les construccions generades es va realitzar una seqüenciació del DNA mitjançant ABI PRISM Big Dyes Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit i l'oligonucleòtid universal T7.

Material

- ABI PRISM Big Dyes Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit.
- Oligonucleòtid universal T7.
- Etanol Absolut i etanol al 70%.
- Oli mineral.

Protocol

1. Afegir 3 μ l de DNA (corresponents a 200-500ng), 3 μ l de l'oligonucleòtid universal T7 per seqüenciar i 4 μ l del Kit Big Dye Terminator 3.1 en un microtub de 500 μ l. Afegir un parell de gotes d'oli mineral a la superfície per evitar evaporacions als 10 μ l de producte final de seqüenciació.
2. Condicions del programa del Termociclador:
 - 96°C, 30 segons.
 - 50°C, 15 segons.
 - 60°C, 4 minuts.
3. Durant 25 cicles i acabar a 4°C
4. Recollir els 10 μ l de la seqüenciació.

5. Afegir 20µl d'aigua estèril i 70µl d'etanol absolut.
6. Deixar precipitant durant 15 minuts, a temperatura ambient.
7. Centrifugar 20 minuts, a 14000 rpm.
8. Eliminar el sobrenedant i rentar amb 200µl d'etanol al 70%.
9. Centrifugar 20 minuts, a 14000 rpm.
10. Deixar assecar el pèl·let i portar-lo, sec, al servei de seqüenciació.

3. SISTEMES DE TRANSFECCIÓ

Les diferents construccions es van usar per transfectar, ja sigui de manera estable, o bé de manera transitòria les diverses línies cel·lulars amb què s'ha treballat.

3.1 Transfeccions transitòries

L'objectiu de transfectar de manera transitòria una línia cel·lular és que pugui incorporar el plàsmid d'interès. Aquest plàsmid s'expressa al cap de 24-72 hores posteriors a la transfecció, moment en el què es poden realitzar els experiments desitjats amb les cèl·lules transfectades.

3.1.1 Electroporació de cèl·lules COS amb el sistema AMAXA

En els experiments amb cèl·lules COS, aquestes es transfecten de manera transitòria amb el Kit Nucleofector d'AMAXA d'electroporació.

Material

- Kit Nucleofector d'AMAXA d'electroporació
- Electroporador Amaxa

Protocol:

1. Temperar els medis de cultiu i la solució Nucleofector per minimitzar la mortalitat cel·lular.
2. Centrifugar (1500 rpm, 5 minuts, temperatura ambient) les cèl·lules en exponencial.
3. Rentar 1 cop amb medi RPMI 1640.
4. Barrejar els micrograms del DNA d'interès amb les cèl·lules resuspeses en 70µl de la solució Nucleofector. Generalment, se sol utilitzar 1µg de DNA per cada milió de cèl·lules, però aquesta proporció pot variar en funció de l'eficiència del plàsmid transfectat.
5. Electroporació amb el programa A-24 en l'electroporador AMAXA.
6. Recollir les cèl·lules i cultivar a 1×10^6 cèl·lules/ml. Mantenir fins la realització de l'experiment (almenys 24 hores perquè s'expressin els plàsmids).

3.2 Transfeccions estables

En les transfeccions de manera estable, l'objectiu és que les cèl·lules integrin el DNA plasmídic transfectat al seu DNA genòmic de manera estable. En aquest cas, cal utilitzar mecanismes de selecció de les cèl·lules transfectades: resistència a drogues i seleccions de poblacions positives mitjançant boles magnètiques conjugades a un anticòs anti-immunoglobulines de ratolí.

3.2.1 Electroporació de cèl·lules RBL-2H3

Cèl·lules RBL-2H3 es van transfectar de manera estable amb diferents construccions. El sistema de transfecció usat en aquest cas és l'electroporació mitjançant l'electroporador Bio-Rad.

Material

- Electroporador BioRad Pulse Controller II.
- Cubetes d'electroporació per cultius de mamífer de BioRad.

Protocol

1. Centrifugar 10×10^6 (1500 rpm, 5 minuts, temperatura ambient) cèl·lules RBL-2H3 en exponencial.
2. Rentar 1 cop amb medi RPMI 1640, sense FCS.
3. Barrejar les cèl·lules amb $20 \mu\text{g}$ DNA en $400 \mu\text{l}$ de RPMI 1640 sense FCS (el rang varia depenent de l'eficiència del DNA transfectat, tot i que generalment es troba entre $1\text{-}2 \mu\text{g}$ per cada milió de cèl·lules).
4. Mantenir en gel 10 minuts.
5. Electroporació (BioRad Pulse Controller II). Condicions: $950 \mu\text{F}$, 260V , 100Ω , capacítància màxima.
6. Mantenir en gel 10 minuts.
7. Resuspendre amb 20 ml de medi complet, 10 ml dels quals s'usen per plaquejar-ne $100 \mu\text{l}$ per pou en una placa de 96 pous, i els 10 ml restants es dilueix a la meitat per fer una dilució 1/2 i plaquejar-ne $100 \mu\text{l}$ per pou en una altra placa. La finalitat és obtenir plaques de diferent densitat cel·lular.
8. 24 hores després de la transfecció, cal afegir la droga per seleccionar les cèl·lules que s'han transfectat i expressen el gen de resistència aportat pel plàsmid. En aquest cas, les cèl·lules RBL es van seleccionar amb Geneticina (G418), ja que els plàsmids incorporats aportaven el gen de resistència a aquesta droga.

Cap a les 2 setmanes ja comencen a créixer clons. L'anàlisi d'expressió de la proteïna transfectada es pot fer mitjançant citometria de flux (Apartat 8) i/o mitjançant *Western Blot* (Apartat 7.6). Es treballa amb poblacions policlonals enriquides en funció del grau d'expressió de la proteïna mitjançant la selecció per boles magnètiques conjugades a un anticòs anti-immunoglobulines de ratolí (Apartat 3.2.2), i/o mitjançant citometria de *sorting* (Apartat 8.1).

3.2.2 Selecció de poblacions positives mitjançant boles magnètiques conjugades a un anticòs anti-immunoglobulines de ratolí

A part de la selecció i el manteniment de poblacions transfectades positivament amb el plàsmid introduït mitjançant la geneticina, també es va utilitzar amb aquesta finalitat

un sistema de selecció basat en l'ús de boles magnètiques conjugades a un anticòs anti-immunoglobulines de ratolí.

Material

- Dynabeads sheep-anti mouse IgG (boles magnètiques conjugades a un anticòs anti-immunoglobulines de ratolí).
- Tampó PBS-FCS 10%.

Protocol

1. Rentar amb PBS fred aproximadament 5×10^6 cèl·lules transfectades.
2. Barrejar les cèl·lules amb l'anticòs contra la proteïna transfectada que es vol seleccionar (en aquest cas, amb un anticòs anti-CD84), en 500µl de PBS-FCS al 10%. La proporció és aproximadament d'1µg d'anticòs per cada milió de cèl·lules, tot i que pot variar en funció de l'especificitat de l'anticòs.
3. Deixar 20 minuts en gel.
4. Rentar amb PBS fred.
5. Barrejar les cèl·lules incubades amb 15µl de les boles magnètiques conjugades a un anticòs anti-immunoglobulines de ratolí (*sheep anti-mouse IgG magnetic beads*), prèviament rentades amb PBS fred, en 500µl de PBS-FCS al 10%.
6. Incubar 20 minuts en rotació a 4°C.
7. Utilitzar un imant per seleccionar les boles unides a les cèl·lules positives i descartar la part no unida.
8. Rentar 3 cops amb PBS fred i seleccionar sempre les cèl·lules positives unides a les boles magnètiques amb l'imant.
9. Resuspendre les cèl·lules seleccionades en medi complet més geneticina.

4. ANÀLISI DE FLUX DE CALCI PER CITOMETRIA

En molts processos d'activació cel·lular es donen canvis en els nivells de calci intracel·lular. Per fer estudis sobre el flux de calci és molt freqüent l'ús d'indicadors de calci fluorescent. En els estudis presentats a la secció Resultats es va utilitzar el Fluo-3

A/M, que té capacitat per unir-se a calci i s'utilitza de manera sovint en la mesura de canvis en la concentració de calci intracel·lular en resposta a les funcions dels canals iònics.

Material

- Fluo-3/AM.

Protocol

1. Incubar 1×10^6 cèl·lules en suspensió (si són cèl·lules adherides, com les RBL-2H3, cal tripsinitzar prèviament) amb la concentració desitjada d'IgE anti-DNP i una dosi de $5 \mu\text{g/ml}$ de Fluo-3/AM, durant 1 hora, a 37°C , en un volum final $500 \mu\text{l}$ de RPMI 1640-1% FCS. És important mantenir en tot moment els reactius a temperatura ambient.
2. Rentar amb RPMI 1640, sense FCS.
3. Centrifugar a 1500rpm, durant 5 minuts, a temperatura ambient.
4. Resuspendre les cèl·lules en $500 \mu\text{l}$ RPMI 1640-1% FCS i mantenir sempre a 37°C fins addició de l'estímul.
5. Fer una lectura al citòmetre del flux de calci basal durant 1 minut.
6. Afegir la dosi desitjada de DNP-HSA per lligar la IgE i mesurar al citòmetre els canvis en el flux de calci durant 5 minuts. Intentar mantenir les cèl·lules a 37°C mitjançant alguna font de calor.
7. Afegir la dosi desitjada de Ionomicina i mesurar al citòmetre els canvis en el flux de calci durant 1 minut.

5. ASSAIG D'ALLIBERACIÓ DE β -HEXOSAMINIDASA

L'anàlisi de la secreció de β -hexosaminidasa, mediador contingut al lisosomes cel·lulars dels mastòcits, s'utilitza com una mesura de desgranulació mastocitària. En aquest cas, es va utilitzar per estudiar els efectes del receptor CD84 sobre la desgranulació, tant en cèl·lules RBL-2H3, com en cèl·lules LAD-2. El protocol presenta certes variacions segons els tipus cel·lular utilitzat.

5.1 Assaig d'alliberació de β -Hexosaminidasa en RBL-2H3

En els assajos d'alliberació de β -Hexosaminidasa en RBL s'estudia l'efecte del CD84 per interacció homotípica usant cèl·lules transfectades.

Material

- Substrat *P-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucoopyranoside*.
- Triton X-100
- Tampó de citrat de sodi 0.1M (pH 4.5)
- Tampó carbonat de sodi 0.2M (pH 10.7)

Protocol

1. Sembrar 2×10^5 cèl·lules per pou en una placa de 96 pous i cultivar durant tota la nit en presència o absència de diferents concentracions d'IgE anti-DNP, en un volum de 100 μ l de medi complet per pou, a 37°C.
2. L'endemà rentar les cèl·lules amb RPMI 1640 sense FCS.
3. Incubar les cèl·lules amb 100 μ l per pou de DNP-HSA (50ng/ml) o PMA (50ng/ml) més Ionomicina (2.5 μ M), en RPMI 1640 sense FCS.
4. Deixar activant durant 1 hora a 37°C.
5. Recollir 25 μ l de sobrenedants per a la mesura de β -Hexosaminidasa. Recollir també 25 μ l de llisats cel·lulars totals, que s'obtenen afegint Tritó a l'1% en el mateix medi.
6. Els sobrenedants recollits i els llisats cel·lulars totals obtinguts s'incuben en 50 μ l del substrat *P-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucoopyranoside*, a una concentració de 1.3mg/ml en un tampó de citrat de sodi 0.1M, durant 1 hora a 37°C.
7. Per aturar la reacció cal afegir 100 μ l per pou d'un tampó carbonat de sodi 0.2M.
8. L'absorbància de *4-P-nitrophenol* es monitoritza mitjançant l'absorbància a 405nm. L'activitat resultant de β -Hexosaminidasa s'expressa com el percentatge de la resposta màxima (mostres tractades amb Tritó X-100): Alliberació de β -Hexosaminidasa = (alliberació de la mostra menys alliberació espontània/alliberació màxima menys alliberació espontània) x 100.

5.2 Assaig d'alliberació de β -Hexosaminidasa en LAD-2

En els assajos d'alliberació de β -Hexosaminidasa en LAD-2 l'efecte del CD84 s'estudia mitjançant l'ús d'anticossos monoclonals que actuen sobre el CD84 endogen.

Material

- Tampó d'alliberació de β -Hexosaminidasa (10mM HEPES, 137mM NaCl, 2.70mM KCl, 0.4mM NaH₂PO₄, 5.6mM (D)-glucosa, 1.8mM CaCl₂, 1.3mM MgSO₄, 0.025% BSA, filtrat estèril).
- Substrat *P-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucoopyranoside*.
- Triton X-100.
- Tampó de citrat de sodi 0.1M (pH 4.5).
- Tampó carbonat de sodi 0.2M (pH 10.7).

Protocol

1. Incubar 10⁴ cèl·lules per pou en una placa de 96 pous en presència o absència d'IgE biotilada (0.1 μ g/ml) en 100 μ l de medi (StemPro-34) complet, durant tota la nit, a 37°C.
2. L'endemà incubar les cèl·lules en el mateix medi en presència o absència d'un anticòs monoclonal contra el CD84, o bé d'una IgG isotípica, a una concentració de 3.25 μ g/ml, durant 30 minuts, a 37°C.
3. Rentar 2 cops les cèl·lules amb un tampó d'alliberació de β -Hexosaminidasa.
4. Incubar les cèl·lules amb 50 μ l per pou d'estreptavidina (0.1 μ g/ml) o PMA (50ng/ml) més Ionomicina (2.5 μ M), en tampó d'alliberació de β -Hexosaminidasa, durant 30 minuts, a 37°C.
5. Centrifugar la placa de 96 pous i recollir els 50 μ l de sobrenedant a una placa nova. Recollir també 50 μ l de llisats cel·lulars totals, què s'obtenen afegint Tritó a l'1% en el mateix tampó d'alliberació de β -Hexosaminidasa.
6. Els sobrenedants recollits i els llisats cel·lulars totals obtinguts s'incuben en 100 μ l del substrat *P-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucoopyranoside*, a una concentració de 1.3mg/ml en un tampó de citrat de sodi 0.1M (pH 4.5), durant 1 hora a 37°C.

7. Per aturar la reacció cal afegir 200µl per pou d'un tampó carbonat de sodi 0.2M (pH 10.7).

8. L'absorbància de *4-P-nitrophenol* es monitoritza mitjançant l'absorbància a 405nm. L'activitat resultant de β-Hexosaminidasa s'expressa com el percentatge de la resposta màxima (mostres tractades amb Tritó X-100): Alliberació de β-Hexosaminidasa = (alliberació de la mostra menys alliberació espontània/alliberació màxima menys alliberació espontània) x 100.

6. ANÀLISI D'EXPRESSIÓ DE GENS

L'anàlisi de l'expressió de gens té com a finalitat estudiar l'absència o presència d'una proteïna determinada a nivell de la seva transcripció gènica. És un sistema força utilitzat, ja que representa una tècnica molt sensible que permet detectar l'expressió de proteïnes que es troben expressades a nivells molt baixos, o bé que no hi ha disponibilitat d'anticossos contra aquestes proteïnes.

6.1 Aïllament del RNA missatger d'una línia cel·lular

Per tal de determinar mitjançant transcripció gènica l'absència o presència d'una proteïna determinada, el primer pas consisteix en l'obtenció del RNA missatger (mRNA) d'una línia cel·lular, o bé d'un cultiu primari. En els estudis presentats en la secció Resultats, es va obtenir el mRNA de cèl·lules LAD-2.

Material

- Kit d'extracció de RNA: RNeasy Mini Kit (Qiagen).

Protocol

1. Agafar 1×10^6 cèl·lules.
2. Centrifugar a 1800rpm, durant 5 minuts, a temperatura ambient.
3. Obtenir el RNA seguint les instruccions del kit RNeasy Mini Kit.
4. El RNA es manté estable a -80°C un màxim de 6 mesos.

6.2 Retrotranscripció de RNA a cDNA

La retrotranscripció de mRNA a cDNA és necessària per tal de poder fer estudis posteriors d'amplificació per PCR dels gens que codifiquen per les diferents proteïnes d'interès.

Material

- GeneAmp® RNA PCR kit, de Applied Biosystems.

Protocol

1. Agafar 1µg de RNA i afegir-hi aigua estèril fins a tenir un volum final de 10µl.
2. Afegir 10µl de la Barreja preparada amb els reactius del GeneAmp® RNA PCR kit. El contingut és el següent:

Tampó de RT 10x	2µl
Barreja de dNTPs (100mM) 25x	0.8µl
Oligonucleòtids Random de RT 10x	2µl
Transcriptasa Reversa Multiscribe™	1µl
Inhibidor de RNasa	1µl
Aigua lliure de Nucleases	3.2µl

3. Fer un pols a 14000rpm, durant 11 segons, a temperatura ambient.
4. Afegir 40µl d'oli mineral
5. Condicions del programa de Retrotranscripció del Termociclador:
 - 25°C, 10 minuts.
 - 37°C, 2 hores.
 - 85°C, 5 segons.
 - Mantenir a 4°C.

6.3 Amplificació per PCR

Per tal de determinar l'absència o presència de l'expressió d'un gen que codifica per una proteïna determinada en una línia cel·lular concreta, s'utilitza l'amplificació per PCR del cDNA obtingut d'aquesta línia cel·lular, mitjançant l'ús d'oligonucleòtids específics. Els oligonucleòtids usats per amplificar els gens CD84 (s'amplifica solament la seva cua citoplasmàtica) i SAP (s'amplifica part del gen) es troben resumits a la Taula 2. Els cDNAs usats com a controls positius corresponen a les seqüències del receptor CD84 humà, clonat dins el vector pcINeo; i de l'adaptador SAP-Flag, clonat dins el vector pCMV2-Flag (Sayos et al., 1998). Les condicions del programa d'amplificació del Termociclador per l'amplificació d'aquests gens són les següents:

- 95°C, 1 minut.
- 55°C, 50 segons.
- 72°C, 1 minut.
- Repetir durant 36 cicles.
- 72°C, 10 minuts.
- Mantenir a 4°C.

Els productes obtinguts en la primera PCR es van tornar a re-amplificar de la mateixa manera i en les mateixes condicions que el primer cop, per tal d'assegurar la fiabilitat dels resultats, donat que la procedència del motlle (cDNA cel·lular) podria portar a un baix nombre de còpies no detectable en la primera PCR.

Gen a amplificar	Oligonucleòtid	Seqüència de l'oligonucleòtid
CD84	Forward	5'-CCCGAATTCGGTTTGTTCAGAG-3'
	Reverse	5'-AAAGGATCCGCCAGCAGCCTAG-3'
SAP	Forward	5'-AGTGGCTGTGTATCATGGCAA-3'
	Reverse	5'-CTTGATCTGGCTTCTGAAATG-3'

Taula 2. Oligonucleòtids utilitzats per amplificar els gens CD84 i SAP. Les amplificacions es van dur a terme usant com a motlle el cDNA de la línia cel·lular LAD-2.

7. ANÀLISI DE PROTEÏNES

L'anàlisi de proteïnes s'utilitza amb diferents finalitats: estudiar la presència o absència d'una proteïna determinada, analitzar l'estat de fosforilació/activació d'una proteïna, estudiar interaccions proteiques, etc. Previ a l'anàlisi de proteïnes, sovint cal primer procedir a l'activació cel·lular.

7.1 Activació cel·lular

El protocol d'activació cel·lular per a l'anàlisi de proteïnes varia una mica en funció de la línia cel·lular utilitzada.

7.1.1 Activació per a la línia RBL-2H3

Protocol

1. Incubar les cèl·lules RBL-2H3, que creixen en monocapes adherides a la superfície, durant tota la nit en presència o absència d'IgE anti-DNP (0.25µg/ml), en medi complet.
2. L'endemà, rentar les cèl·lules 2 cops amb RPMI 1640 sense FCS.
3. Activar les cèl·lules amb DNP-HSA (50ng/ml) en RPMI 1640 sense FCS, durant el temps desitjat.

7.1.2 Activació per a la línia LAD-2

Material

- Tampó d'alliberació de β -Hexosaminidasa (10mM HEPES, 137mM NaCl, 2.70mM KCl, 0.4mM NaH₂PO₄, 5.6mM (D)-glucosa, 1.8mM CaCl₂, 1.3mM MgSO₄, 0.025% BSA, filtrat estèril).

Protocol

1. Incubar les cèl·lules LAD-2, que creixen en suspensió, durant tota la nit en presència o absència d'IgE biotinilada (0.1µg/ml), en medi (StemPro-34) complet.

2. L'endemà, incubar en el mateix medi en presència o absència d'anticòs anti-CD84 o bé d'una IgG isotípica a una dosi de 3.25µg/ml, durant 30 minuts, a 37°C.
3. Rentar 2 cops amb tampó d'alliberació de β-Hexosaminidasa.
4. Activar les cèl·lules amb 0.1µg/ml d'estreptavidina, durant el temps desitjat, a 37°C, en un tampó d'alliberació de β-Hexosaminidasa.

7.2 Biotinilació

Hi ha certs casos en què prèviament a l'activació cel·lular amb l'equivalent a l'antigen que lliga la IgE (DNP-HSA en el cas de cèl·lules RBL-2H3, i Estreptavidina en el cas de cèl·lules LAD-2), es requereix un procés de biotinilació. La biotina s'uneix a les amines primàries de les proteïnes i la seva presència es pot detectar fàcilment amb una avidina conjugada a peroxidasa (l'avidina presenta una elevada afinitat per la biotina). Aquest pas és necessari quan no es tenen anticossos específics contra la proteïna de membrana (receptor) que s'immunoprecipita per detectar-la en condicions desnaturalitzades en la membrana de nitrocel·lulosa. Així doncs, el que es fa és immunoprecipitar contra la proteïna de membrana d'interès amb un anticòs que sí que reconeix la forma nativa de la proteïna i després, es determina la seva presència (en la membrana de nitrocel·lulosa) usant l'avidina, que presenta una elevada afinitat per la biotina. En els estudis presentats, la biotinilació es va realitzar en els casos en que es va immunoprecipitar posteriorment amb un anticòs anti-CD84, donat que no existeixen anticossos que reconeguin aquest receptor de forma desnaturalitzada en la membrana de nitrocel·lulosa.

7.2.1 Biotinilació en cèl·lules RBL-2H3

Material

- Biotina (0.25mg/ml) dissolta en PBS.

Protocol

1. Rentar la monocapa de cèl·lules 3 cops amb PBS.
2. Afegir el volum necessari de la solució de Biotina dissolta en PBS a 0.25mg/ml, de manera que cobreixi tota la monocapa cel·lular.

3. Mantenir 25 minuts en gel.
4. Descartar la biotina i afegir el volum necessari de RPMI 1640 sense FCS, de manera que cobreixi tota la monocapa cel·lular.
5. Mantenir 5 minuts en gel.
6. Rentar 2 cops amb PBS.

7.2.2 Biotinilació en cèl·lules LAD-2

Material

- Biotina (0.25mg/ml) dissolta en PBS.
- Tampó d'alliberació de β -Hexosaminidasa (10mM HEPES, 137mM NaCl, 2.70mM KCl, 0.4mM NaH_2PO_4 , 5.6mM (D)-glucosa, 1.8mM CaCl_2 , 1.3mM MgSO_4 , 0.025% BSA, filtrat estèril).

Protocol

1. Centrifugar les cèl·lules a 1500rpm, durant 5 minuts.
2. Rentar 3 cops amb PBS (centrifugar igual que el pas 1 cada cop).
3. Resuspendre les cèl·lules en 1ml de biotina dissolta en PBS a 0.25mg/ml.
4. Mantenir 20 minuts en rotació a 4°C.
5. Centrifugar les cèl·lules amb un pols (14000rpm, 11 segons) a 4°C.
6. Descartar la biotina i resuspendre les cèl·lules en 1ml de RPMI 1640 sense FCS.
7. Mantenir 10 minuts en gel.
8. Centrifugar les cèl·lules amb un pols (14000rpm, 11 segons) a 4°C.
9. Rentar 2 cops amb tampó d'alliberació de β -Hexosaminidasa (centrifugar igual que el pas 8 cada cop).

7.3 Immunoprecipitació

Aquesta tècnica permet identificar associacions entre proteïnes. Consisteix en precipitar una proteïna d'interès mitjançant l'ús d'anticossos específics (immunoprecipitació). La

proteïna d'interès s'immunoprecipita en condicions natives, juntament amb totes les seves proteïnes associades que poden determinar-se posteriorment en la membrana de nitrocel·lulosa mitjançant l'ús d'anticossos específics.

Durant tot el procés de la immunoprecipitació, cal mantenir els reactius i cèl·lules sempre a 4°C, o bé en gel.

Material

- Tampó de lisi: 1% Tritó X-100, 50mM Tris-Base (pH 7.4), 150mM NaCl, 100mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 1mM PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*), 1mM NaPirofosfat.
- Proteïna A Sepharosa.
- Tampó de càrrega (3X): 200mM Tris pH 8.6; 6% SDS, 0.06% Bromophenol, 5% 2-β-Mercaptoetanol, 30% Glicerol.

Protocol

1. Prèviament a la immunoprecipitació s'hauran donat, si s'escau, els processos de biotinilació i activació de les cèl·lules.
2. Rentar les cèl·lules amb PBS fred.
3. Llisar les cèl·lules amb 1 ml de tampó de lisi. En el cas de cèl·lules adherides (com les cèl·lules COS o les cèl·lules RBL-2H3) s'afegeix el tampó de lisi a la monocapa seca de cèl·lules, i es rasca amb una espàtula, recollint tota la mostra llisada en un microtub. En el cas de cèl·lules en suspensió (com les LAD-2) s'afegeix al pèl·let de cèl·lules sec i es resuspenen les cèl·lules amb el tampó de lisi.
4. Mantenir durant 20 minuts en gel.
5. Centrifugar a 14000 rpm, durant 20 minuts, a 4°C.
6. Recollir els sobrenedants en microtubs nous. Guardar entre 30-50µl d'aquests sobrenedants com a llisats totals (WCL: *Whole Cell Lysate*) i amb la resta procedir a la realització entre 1-4 *pre-clearings*, si s'escau, afegint 40µl de proteïna A Sepharosa, durant 30 minuts en rotació, a 4°C. Els *pre-clearings* es realitzen per reduir les unions inespecífiques amb l'anticòs contra la proteïna d'interès.
7. Centrifugar amb un pols (14000rpm, 11 segons) a 4°C.

8. Recollir els sobrenedants en microtubs nous i afegir entre 1-10µg d'anticòs específic contra la proteïna d'interès que es vol immunoprecipitar.
9. Incubar durant 1hora, en rotació, a 4°C.
10. Afegir als microtubs 50µl de proteïna A Sepharosa per immunoprecipitar l'anticòs afegit. La proteïna A Sepharosa s'uneix amb elevada afinitat al fragment Fc de les immunoglobulines.
11. Incubar durant 1hora, en rotació, a 4°C.
12. Rentar tres vegades la immunoprecipitació amb el tampó de lisi diluït a la meitat sense detergent (en cada rentat, centrifugar com el pas 7 i descartar el sobrenedant). La dilució del tampó de lisi és opcional segons l'astringència amb què es vulguin dur a terme els rentats (l'astringència és proporcional a la quantitat de detergent).
13. Afegir 50µl del tampó de càrrega 3x (en condicions reductores) a totes les mostres, incloses les mostres corresponents als llisats cel·lulars totals.
14. Bullir les mostres a 100°C durant 10 minuts per tal de desnaturalitzar-les i separar la proteïna A Sepharosa.
15. Les mostres ja estan preparades per córrer en un gel SDS-PAGE.

7.4 Assaigs d'activitat d'ERK, P38, JNK i AKT

Per estudiar l'activitat de MAPK com ERK, P38 i JNK i d'altres proteïnes, com AKT, s'analitza generalment el seu grau de fosforilació. En aquests estudis no es duu a terme cap immunoprecipitació, sinó que es treballa amb els llisats cel·lulars totals.

Material

- Tampó de Lisi: 1% Tritó X-100, 50mM Tris-Base (pH 7.4), 150mM NaCl, 100mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 1mM PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*), 1mM NaPirofosfat.
- Tampó de càrrega (3X): 200mM Tris pH 8.6; 6% SDS, 0.06% Bromophenol, 5% 2-β-Mercaptoetanol, 30% Glicerol.

Protocol

1. Activar les cèl·lules tal com s'explica a l'apartat 7.1.
2. Rentar les cèl·lules amb PBS.
3. Llisar les cèl·lules amb 50-100µl de tampó de lisi. En el cas de cèl·lules adherides s'afegeix el tampó de lisi a la monocapa seca de cèl·lules, i es rasca amb una espàtula, recollint tota la mostra llisada en un microtub. En el cas de cèl·lules en suspensió s'afegeix al pèl·let de cèl·lules sec i es resuspenen les cèl·lules amb el tampó de lisi.
4. Afegir entre 20-50µl (depenent del volum de lisi) de tampó de càrrega 3x.
5. Bullir les mostres a 100°C durant 10 minuts per tal de desnaturalitzar-les.
6. Les mostres ja estan preparades per córrer en un gel SDS-PAGE.

7.5 Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE)

Com el nom indica, la tècnica SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) consisteix en l'electroforesi de proteïnes en un gel d'acrilamida. Amb aquesta tècnica s'aconsegueix que les proteïnes migrin en funció de la seva mida, ja que gràcies a l'acció del detergent SDS, totes les proteïnes adquireixen càrrega negativa en proporció a la seva massa, aconseguint que la relació càrrega/massa sigui idèntica en tots casos, i que per tant la migració depengui únicament de la longitud de la cadena polipeptídica.

Aquesta tècnica requereix la preparació de dues fases del gel d'acrilamida: la fase corresponent al gel apilador, i la fase corresponent al gel separador. Ambdues fases varien en el percentatge d'acrilamida, el pH i la molaritat. La finalitat del gel apilador és aconseguir un empaquetament correcte de les mostres, previ a la seva entrada al gel separador. En el gel separador té lloc la fase resolutive, on les mostres se separen en funció del seu pes molecular. El percentatge d'acrilamida del gel separador pot variar segons el pes de les proteïnes a resoldre. Es treballa amb elevats percentatges d'acrilamida (15%) per proteïnes de baix pes molecular, i baixos percentatges d'acrilamida (8%) per proteïnes d'alt pes molecular.

Material

- Acrilamida 30%
- Tris-Base 1M pH 8.8 i pH 6.8
- SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10%
- APS (*Ammonium Persulfate*) 20%
- TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamida)
- Tampó d'electroforesi 10x, pH 8.4, 1L: 30gr Tris-Base, 144gr Glicina i 10gr SDS. Es treballa a l'1x.

Protocol

1. Preparar les dues fases del gel d'acrilamida. Les quantitats de cada reactiu per la preparació d'ambdues fases del gel d'acrilamida es troben resumides en la següent taula:

	Gel Apilador (10ml)	Gel Separador (30ml)
Acrilamida/Bis-Acrilamida 30%	1.5 ml	8%-15%
Tris-Base 1M, pH 8.8	-	11.20 ml
Tris-Base 1M, pH 6.8	1.25 ml	-
Aigua Mili Q	7 ml	Varia segons el percentatge d'acrilamida
SDS 10%	100µl	300µl
APS 20%	50µl	150µl
TEMED	10µl	20µl

2. Carregar les mostres als pous.
3. Córrer el gel aplicant un amperatge no superior als 60mA des del pol negatiu al positiu.

7.6 Western-Blot

La tècnica del Western Blot consisteix en la transferència del gel d'electroforesi a una membrana, que originalment era de nitrocel·lulosa, tot i que actualment també

s'utilitzen molt les membranes de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*). La membrana permet diverses incubacions amb els anticossos d'interès.

Material

- Tampó de transferència: 25mM Tris-Base, 129mM Glicina, 20% Metanol. Aquest tampó s'ha de mantenir a 4°C.
- Tampó TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween-20*) 10x, 1L: 24gr Tris-Base, 80gr NaCl, 20ml Tween 20%. Es treballa a l'1x i s'utilitza per fer els rentats i incubar els anticossos.
- Tampó de *stripping*, pH 2-3, 1L: 8.75gr NaCl; 1.57gr Trizma. El tractament de les membranes amb aquest tampó durant 10-15 minuts amb un moviment vigorós, permet dissociar l'anticòs unit a la membrana (degut a l'acidesa del pH del tampó de *stripping*). D'aquesta manera, la membrana es pot tornar a bloquejar i reutilitzar per més d'una incubació amb altres anticossos.

Protocol

1. Muntar la transferència amb el gel d'electroforesi: el gel en contacte amb la membrana de nitrocel·lulosa (PVDF) i aquesta en contacte amb el pol positiu (la transferència es fa del pol negatiu al pol positiu). Hi ha diversos sistemes per realitzar la transferència: humits, semi-sec i secs. En el sistema semi-sec, no excedir els 25 volts i 3mA per cm² en el cas de gels grans, o 5.5mA per cm² en el cas de minigels. Generalment s'utilitza un amperatge de 0.8mA per cm² per gels grans.
2. Un cop finalitzada la transferència, descartar el gel i incubar la membrana amb els anticossos desitjats, seguint els següents passos:
3. Bloqueig amb llet desnatada 2% o albúmina (BSA: *Bovine serum albumin*) 2% (en el cas d'utilitzar l'anticòs contra tirosines fosforilades), durant 1 hora en agitació, a temperatura ambient.
4. Rentar 2-3 cops amb TBS-T, durant 5 minuts en agitació, a temperatura ambient.
5. Incubar amb l'anticòs primari, durant 1 hora en agitació, a temperatura ambient; o bé durant tota la nit a 4°C en agitació.
6. Rentar 2-3 cops amb TBS-T, durant 5 minuts en agitació, a temperatura ambient.

7. Incubar amb l'anticòs secundari, durant 30-45 minuts en agitació, a temperatura ambient. En el cas que l'anticòs primari estigui directament conjugat a peroxidasa, aquest pas s'elimina.
8. Rentar 2-3 cops amb TBS-T, durant 5 minuts en agitació, a temperatura ambient.
9. Revelar amb el Supersignal Chemiluminiscense substrate, utilitzant pel·lícules Curix RP2 PLUS per al revel·lador CURIX AGFA 60.

8. CITOMETRIA DE FLUX

La citometria de flux és una tècnica que permet el comptatge, l'anàlisi i la separació de cèl·lules que es troben en suspensió en un líquid. Permet fer estudis multiparamètrics de característiques físiques o químiques de cèl·lules individuals que flueixen a través d'un aparell de detecció, que capta les característiques de dispersió de la llum i fluorescència que posseeixen aquestes cèl·lules conforme se les fa passar a través d'un feix de llum. La dispersió de la llum varia per cada població de cèl·lules analitzada: la mida de la cèl·lula donarà un paràmetre de dispersió, i la granularitat de la cèl·lula donarà un altre paràmetre de reflexió de la llum. A més de la dispersió, l'ús d'anticossos monoclonals marcats amb molècules fluorescents, permet estudiar la presència de diversos marcadors de manera simultània.

Material (Necessari en tots els protocols realitzats per citometria de flux)

- Tampó de rentat: PBS, 2% FCS, 0.01% Azida Sòdica. S'utilitza pels rentats i la resuspensió de les cèl·lules.
- Tampó de fenotipat: Sèrum conill inactivat, al percentatge desitjat, en el tampó de rentat. El percentatge de sèrum pot variar, generalment entre 1-20%. La majoria dels experiments mostrats en la secció de Resultats es van fer amb un percentatge de sèrum del 15%. Aquest tampó serveix per fer les dilucions i les incubacions amb els anticossos.

8.1 Anàlisi d'expressió de proteïnes de membrana

Quan s'estudia l'expressió de proteïnes de membrana, com els receptors (CD84, CD244, CD229, etc.), es duu a terme un marcatge de superfície. El marcatge

d'expressió es pot dur a terme per fer estudis comparatius dels nivells d'expressió de diferents proteïnes de membrana abans i després d'una activació cel·lular (que es realitza tal com s'explica a l'apartat 7.1). Aquest tipus de marcatge també permet fer enriquiments de les poblacions amb major grau de positivitat per la proteïna d'interès, mitjançant *citometria de sorting*. El protocol és el mateix, però el marcatge d'expressió es fa en condicions estèrils i la separació de les poblacions positives es realitza amb un aparell específic per aquesta funció.

Protocol

1. Agafar entre 0.2×10^6 - 1×10^6 cèl·lules i es passar a un tub de FACS (*Fluorescence Analyzer Cell Sorter*).
2. Rentar les cèl·lules amb tampó de rentat.
3. Centrifugar a 1500rpm, durant 5 minuts, a 4°C.
4. Incubar amb l'anticòs primari en un volum final de 100µl per tub, durant 1 hora, en gel. Generalment s'utilitza 1µg d'anticòs per tub, i en el cas que l'anticòs estigui biotinitat, s'acostuma a fer una dilució 1/200. De totes maneres, sempre és millor fer una titulació de l'anticòs per determinar la dilució a la què treballa millor.
5. Rentar les cèl·lules amb tampó de rentat.
6. Centrifugar a 1500rpm, durant 5 minuts, a 4°C.
7. Incubar amb l'anticòs secundari. En el cas que l'anticòs primari estigui biotinitat, s'afegeix Avidina conjugada a algun fluorocrom, com PE (*Phycoerythrin*) o Cy-Chrome (Dilució entre 1/200-1/800), durant 20 minuts, en gel. En el cas que l'anticòs primari no estigui biotinitat, es pot usar com a secundari, durant 30 minuts, en gel, un anticòs anti-IgG que estigui directament conjugat a un fluorocrom; o bé que estigui biotinitat. En aquest últim cas, es requereix un pas addicional en que es requereix la incubació amb Avidina-PE (o conjugada a qualsevol altre fluorocrom). També és possible que l'anticòs primari es trobi directament conjugat a algun fluorocrom, i que per tant no es requereixi incubació amb anticòs secundari.
8. Rentar les cèl·lules amb tampó de rentat.
9. Centrifugar a 1500rpm, durant 5 minuts, a 4°C.

10. Llegir les mostres al citòmetre. Els fluorocroms més usats són: FITC (Fluoresceïna), que es llegeix al canal FL-1; PE, que es llegeix al canal FL-2; i Cy-Chrome, que es llegeix al canal FL-3.

9. ESTUDIS DE REORGANITZACIÓ DEL CITOESQUELET PER INCORPORACIÓ DE PHALLOIDINA

Els canvis en el citoesquelet d'actina es poden determinar mitjançant l'ús de la Phalloïdina, tòxic derivat de l'*Amanita phalloides* que s'uneix amb una elevada afinitat a l'actina polimeritzada (actina F). Això converteix la Phalloïdina en un bon marcador de reorganització del citoesquelet en cèl·lules prèviament fixades i permeabilitzades.

9.1 Estudis de reorganització del citoesquelet en cèl·lules adherents per microscopia de fluorescència

Material

- Paraformaldehid al 3%.
- Triton X-100. Detergent que serveix per permeabilitzar les cèl·lules.
- Phalloïdina-TRITC.
- Medi de muntatge Fluoromount-G.

Protocol

1. Sembrar 2×10^5 cèl·lules per cada punt d'activació en cobreobjectes estèrils dins d'una placa de 24 pous.
2. Activar les cèl·lules amb els estímuls corresponents, tal com s'explica a l'apartat 7.1.
3. Rentar les cèl·lules amb PBS.
4. Fixació amb 200µl de Paraformaldehid al 3%, durant 30 minuts, a temperatura ambient.
5. Rentar les cèl·lules amb PBS.

6. Permeabilització amb 200µl de Tritó al 0.2%, durant 15 minuts, a temperatura ambient.
7. Rentar les cèl·lules amb PBS.
8. Bloqueig amb 200µl de PBS-BSA a l'1%, durant 30-40 minuts, a temperatura ambient.
9. Rentar les cèl·lules amb PBS.
10. Incubar amb 200µl de Phalloidina-TRITC, a una dilució entre 1/200-1/1000 en PBS-BSA al 0.1%, durant 20 minuts, a temperatura ambient.
11. Rentar 3 cops les cèl·lules amb PBS.
12. Muntar els cobreobjectes sobre els portaobjectes afegint una gota de medi de muntatge Fluoromount-G, de manera que la superfície del cobreobjectes amb les cèl·lules quedi enfrontada amb el portaobjectes. Evitar les bombolles.
13. Analitzar les mostres al microscopi confocal de fluorescència Leica TCS NT. El TRITC s'excita amb el làser verd (557nm) i emet en vermell (576nm).

9.2 Estudis de reorganització del citoesquelet per citometria de flux

Material

- Paraformaldehyd al 4%. Es prepara a partir d'un estoc comercial que està al 16%. Permet Fixar les cèl·lules.
- Saponina. Serveix per permeabilitzar les cèl·lules i s'utilitza a l'1% diluït en PBS.
- Phalloidina-TRITC.

Protocol

1. Agafar entre 0.1×10^6 - 0.5×10^6 cèl·lules per cada punt d'activació.
2. Activar les cèl·lules amb els estímuls corresponents, tal com s'explica a l'apartat 7.1.
3. Rentar les cèl·lules amb PBS i centrifugar amb un pols, a 14000rpm, durant 11 segons, a 4°C.

4. Fixació amb 500µl de Paraformaldehid al 4%, durant 10 minuts, en gel.
5. Rentar com en el pas 3.
6. Permeabilització amb 500µl de PBS-Saponina al 0.1%, durant 15 minuts, en gel.
7. Rentar com en el pas 3.
8. Bloqueig amb 1ml de PBS-BSA a l'1%, durant 40 minuts, en gel.
9. Rentar com en el pas 3.
10. Incubar amb 100µl de Phalloidina-TRITC, a una dilució entre 1/200-1/1000 en PBS-BSA al 0.1%, durant 20 minuts, en gel.
11. Rentar com en el pas 3.
12. Passar les mostres a tubs de FACS i rentar amb tampó de rentat (veure apartat 8, Material).
13. Centrifugar a 1500rpm, durant 5 minuts, a 4°C.
14. Resuspendre el pèl·let cel·lular en 0.2-0.5ml de tampó de rentat (veure apartat 8, Material).
15. Llegir les mostres al citòmetre. L'emissió del fluorocrom TRITC (*Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate*), al què es troba conjugada la Phalloidina, es llegeix al canal FL-2.

10. ANÀLISI DE L'ACTIVACIÓ DE GENS

L'estudi d'activació de gens ens permet estudiar l'activació de certes proteïnes a nivell de transcripció gènica.

10.1 Estudi de l'activació de gens reporters de luciferasa en cèl·lules RBL-2H3

Sovint, en l'anàlisi d'activació de gens s'utilitza de manera freqüent una estratègia que consisteix en transfectar les cèl·lules amb un vector on es troba clonat el gen d'interès en pauta de lectura amb l'enzim luciferasa. L'activació del gen d'interès, mitjançant la unió de factors de transcripció al seu promotor, implica l'activació alhora de l'enzim luciferasa, que catalitza una reacció de bioluminiscència, mesurable en un

luminòmetre. Una major activació del gen d'interès, comportarà una major emissió de luminescència. En els estudis presentats en la secció resultats, s'utilitza un vector que conté el gen de la citocina TNF α , en pauta de lectura amb l'enzim luciferasa.

Material

- Dual luciferase reporter kit (Promega), que conté tots els elements necessaris per la mesura d'activitat luciferasa.
- Vector que conté el gen TK-Renilla-Luciferasa, que s'utilitza com a control de transfecció per normalitzar els resultats obtingut amb el vector d'interès.

Protocol

1. Transfectar 10×10^6 cèl·lules en exponencial amb $5 \mu\text{g}$ del vector TNF α reporter de luciferasa ($0.5 \mu\text{g}/10^6$ cèl·lules), juntament amb $1 \mu\text{g}$ del vector TK-Renilla-Luciferasa ($0.1 \mu\text{g}/10^6$ cèl·lules). La transfecció es fa mitjançant el sistema d'electroporació (veure apartat 3.2.1), però en aquest cas, és una transfecció transitòria i no estable. Per aquest motiu, a les 24 hores no cal afegir droga, sinó que les cèl·lules es recullen per dur a terme l'experiment. Les condicions d'electroporació són: $950 \mu\text{F}$, 260V , 100Ω , capacítància màxima.
2. Plaquejar les cèl·lules transfectades en una placa de 24 pous. Sembrar 2×10^6 cèl·lules per cada punt d'activació en un volum final d'1ml de medi complet.
3. Incubar les cèl·lules RBL-2H3, durant 24 hores (temps necessari perquè s'expressin els plàsmids transfectats) en presència o absència d'IgE anti-DNP ($0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$), en medi complet.
4. Rentar les cèl·lules cops amb RPMI 1640 sense FCS.
5. Activar les cèl·lules en presència o absència de DNP-HSA ($50 \text{ng}/\text{ml}$) en medi complet, durant 6 hores (per tal de detectar transcripció gènica), a 37°C ; o bé amb PMA ($50 \text{ng}/\text{ml}$) més Ionomicina ($2.5 \mu\text{M}$), com a control positiu, durant 6 hores, a 37°C .
6. Rentar les cèl·lules amb PBS.
7. Resuspendre les cèl·lules en $50 \mu\text{l}$ de tampó de lisi 5x inclòs al kit (Dual luciferase reporter kit, de Promega). Rascar les cèl·lules amb un espàtula i recollir els llisats en microtubs nous. Mantenir 30 minuts, a temperatura ambient.

8. Centrifugar a 10000rpm, durant 5 minuts, a temperatura ambient.
9. Recollir els sobrenedants en tubs nous. Dels sobrenedants recollits, s'utilitzen 15µl per fer la lectura de l'activitat luciferasa al luminòmetre (Lumat LB 9507, EG&G Berthold), seguint les instruccions del kit Dual luciferase reporter kit. Els valors d'activitat luciferasa obtinguts amb el vector TK-Renilla-Luciferasa, s'utilitzen per normalitzar els valors d'activitat luciferasa obtinguts amb el vector TNFα reporter de luciferasa.

IV. RESULTATS

IV. RESULTATS

El receptor CD84 presenta una àmplia expressió en cèl·lules leucocitàries (de la Fuente et al., 1997; Martin et al., 2001; Nanda et al., 2005; Romero et al., 2004; Tangye et al., 2002; Zaiss et al., 2003). Per altra banda, el CD84 representa l'únic membre de la família SLAM que s'expressa en mastòcits en estat basal. Donat que els mastòcits són cèl·lules efectores en moltes funcions més enllà de reaccions al·lèrgiques, inclosos els desordres d'immunitat innata, autoimmunitat i inflamacions cròniques (veure Introducció, apartat 1), els estudis presentats en aquesta secció tenen com a finalitat l'estudi de la funció del receptor CD84 en mastòcits. Per aquest motiu es van abordar diferents estratègies amb diverses línies cel·lulars, per tal de caracteritzar la funció del receptor i discernir les seves possibles vies de senyalització en mastòcits.

A. RESULTATS OBTINGUTS AMB LA LÍNIA CEL·LULAR RBL-2H3

La línia cel·lular RBL-2H3 (*Rat Basophilic Leukemia 2H3*) és una línia de mastòcits de rata que va ser originalment obtinguda per Eccleston *et al.*, descrita com una línia de mastòcits amb capacitat per secretar histamina després d'una reacció mitjançada per la IgE (Eccleston et al., 1973). Aquest model cel·lular s'utilitza de manera freqüent com un model d'estudi mastocitari. Aquesta línia cel·lular possibilita a més la sobreexpressió de molècules humanes, permetent així l'estudi de la interacció homotípica del receptor d'interès. Amb aquesta estratègia s'evita l'ús d'anticossos contra aquest receptor, que podrien donar lloc a efectes agonistes o antagonistes indeterminats.

1. Transfecció de la línia cel·lular RBL-2H3 amb el receptor CD84 humà

1.1 Generació de la línia cel·lular transfectant CD84 RBL-2H3

Per estudiar la funció del receptor CD84 humà en mastòcits, es van realitzar transfectants estables de la línia cel·lular RBL-2H3 amb el cDNA del receptor CD84 humà i es van seleccionar les poblacions positives mitjançant boles magnètiques. Els nivells del CD84 transfectat es van mesurar mitjançant citometria de flux i *Western Blot*. Finalment, les cèl·lules transfectades també van ser biotinitades, lligades i immunoprecipitades amb un anticòs anti-CD84 (Fig 1A. i Fig 1B.). També es va

demostrar, mitjançant citometria de flux, que l'expressió del FcεRI és molt similar en RBL *wild type* i en RBL transfectades amb el receptor CD84 (Fig 1C.).

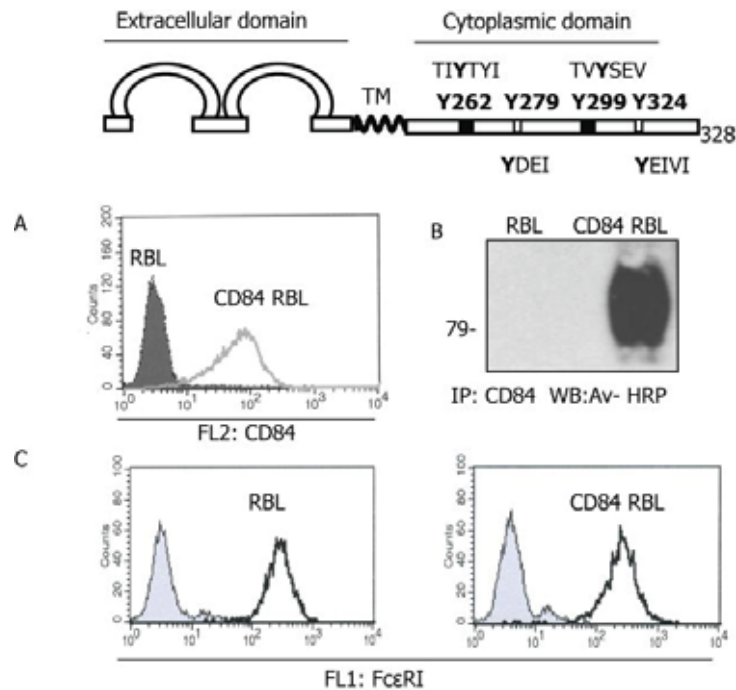


Fig 1. Transfecció de la línia RBL-2H3 amb el receptor humà CD84. El receptor CD84 presenta quatre tirosines dins la seva cua citoplasmàtica. Dues d'elles, la Y262 i la Y299, es troben dins de motius consens d'unió a l'adaptador SAP. La línia cel·lular RBL-2H3 es va transfectar amb el receptor CD84 humà i la seva expressió va ser analitzada mitjançant citometria de flux (A) i immunoprecipitació i Western Blot (B). També es va analitzar l'expressió del FcεRI mitjançant citometria de flux (C).

1.2 Modulació de l'expressió del receptor CD84 en cèl·lules CD84 RBL-2H3 després de l'activació

Per tal de determinar si l'expressió del receptor CD84 es modifica després de l'activació en cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3, aquestes es van activar amb una dosi de 50ng/ml de PMA més 2.5μM de inomicina, durant 30 minuts, a 37°C. Mitjançant l'ús d'anticossos específics per citometria de flux, es van estudiar els nivells d'expressió del receptor CD84 abans i després de l'activació. Els resultats indiquen que l'expressió del CD84 disminueix posteriorment a l'activació amb PMA més ionomicina (Fig 2.).

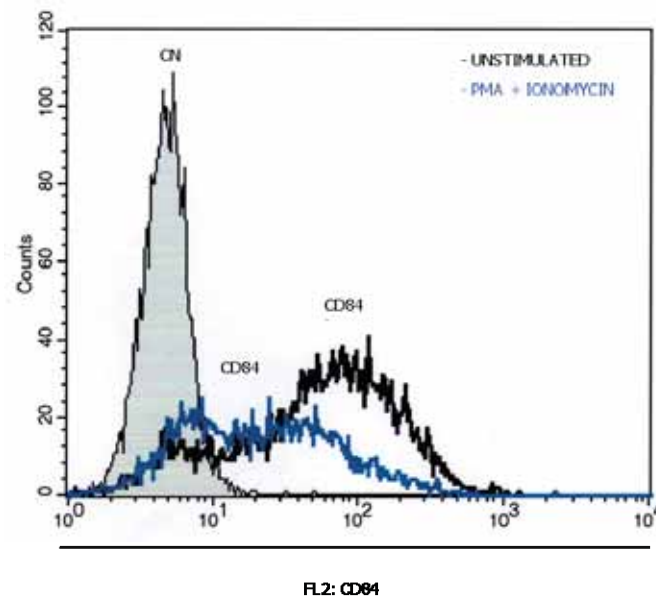


Fig 2. Disminució de l'expressió del receptor CD84 després de l'activació. 5×10^5 cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3 es van activar amb PMA (50ng/ml) més inomicina (2.5 μ M), durant 30 minuts, a 37°C. Posteriorment es van utilitzar anticossos específics per estudiar, mitjançant citometria de flux, l'expressió del receptor CD84.

2. El receptor CD84 altera el flux de calci dependent d'IgE

En molts processos d'activació cel·lular es donen canvis en els nivells de calci intracel·lular. Les vies d'activació mastocitàries a través del Fc ϵ RI estan molt relacionades amb el moviment de calci (veure Introducció, apartat 4). Per aquest motiu es va fer un estudi del flux de calci en cèl·lules CD84 RBL-2H3 respecte cèl·lules control RBL-2H3 després de l'activació a través del Fc ϵ RI. Es va utilitzar un indicador de calci fluorescent, el Fluo-3 A/M, que té capacitat per unir-se a calci i s'utilitza de manera freqüent en la mesura de canvis en la concentració de calci intracel·lular en resposta a les funcions dels canals iònics. Per dur a terme l'assaig es van utilitzar cèl·lules control RBL-2H3 i cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3. Ambdós tipus cel·lulars es van incubar en suspensió amb IgE anti-DNP més Fluo-3 A/M, durant 1 hora, a 37°C. Posteriorment es va mesurar el flux de calci basal, el flux de calci després d'activar-les durant 5 minuts amb DNP-HSA (que té la funció de lligar la IgE, mimetitzant així els efectes de l'antigen) i finalment el flux de calci després d'afegir Ionomicina durant 1 minut (la inomicina és un ionòfor que genera una obertura de canals de calci). Els resultats mostren com el flux de calci es troba disminuït en cèl·lules CD84 RBL-2H3, respecte cèl·lules RBL-2H3 control. La mobilització de calci és alhora més sostinguda en el cas de cèl·lules control. Ambdós tipus cel·lulars responen

correctament a l'addició de ionomicina, que mostra un augment significatiu i similar del flux de calci, tant en cèl·lules RBL-2H3 control, com cèl·lules CD84 RBL-2H3 (Fig 3.).

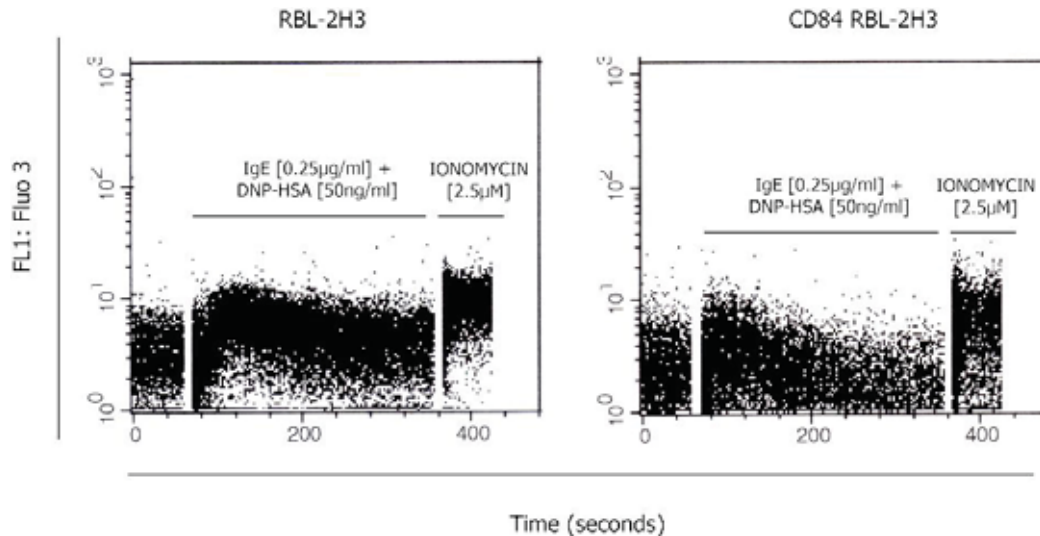


Fig 3. Disminució del flux de calci dependent d'IgE en cèl·lules CD84 RBL-2H3 respecte cèl·lules RBL-2H3 control. 1×10^6 cèl·lules de cada tipus cel·lular s'incuben en suspensió amb 0.25µg/ml d'IgE anti-DNP i 5µg/ml Fluo-3/AM, durant 1 hora, a 37°C. Posteriorment es mesura per citometria de flux, mitjançant l'emissió del Fluo-3 pel canal FL1, el flux de calci basal, durant 1 minut. Tot seguit s'addiciona DNP-HSA a una concentració de 50ng/ml i es mesura novament el flux de calci durant 5 minuts. Finalment, s'afegeix una dosi de Ionomicina de 2.5µM i es mesura el nou flux de calci durant 1 minut.

3. El receptor CD84 altera el procés de *ruffling* de la membrana cel·lular induït per l'activació a través del FcεRI

El procés de *ruffling* de la membrana cel·lular és un dels canvis estructurals més primerencs observats en resposta a diversos factors extracel·lulars. Aquest procés consisteix en la formació de protusions de filaments d'actina a la superfície cel·lular, degut a la reorganització del citoesquelet d'actina, procés habitual i primerenc en la majoria de vies de transducció de senyals. Els canvis en el citoesquelet d'actina es poden determinar mitjançant l'ús de la Phalloïdina, tòxic derivat de l'*Amanita phalloides* que s'uneix amb una elevada afinitat a l'actina polimeritzada (actina F). Així doncs, el marcatge amb Phalloïdina en cèl·lules prèviament fixades i permeabilitzades permet identificar processos de reorganització del citoesquelet. Aquesta tècnica es va utilitzar per tal de determinar si l'activació a través del FcεRI comporta variacions en el procés de *ruffling* de la membrana cel·lular en cèl·lules RBL-2H3, i si la presència del receptor CD84 altera aquest procés. Per aquest motiu, cèl·lules control RBL-2H3 i CD84 RBL-

2H3 es van sensibilitzar durant tota la nit amb IgE anti-DNP i l'endemà es va procedir a la lligació de la IgE amb DNP-HSA durant 10 minuts o 20 minuts, a 37°C. Les cèl·lules llavors es van fixar, permeabilitzar i marcar amb Phalloidin-TRITC. Posteriorment, el marcatge amb Phalloidina es va analitzar en un microscopi de fluorescència. Els resultats mostrats a la Fig 4. indiquen que les cèl·lules RBL-2H3 augmenten el procés de *ruffling* de la membrana cel·lular en resposta a l'activació a través del FcεRI, i que la presència del receptor CD84 comporta una disminució d'aquest procés de *ruffling* (Fig 4.).

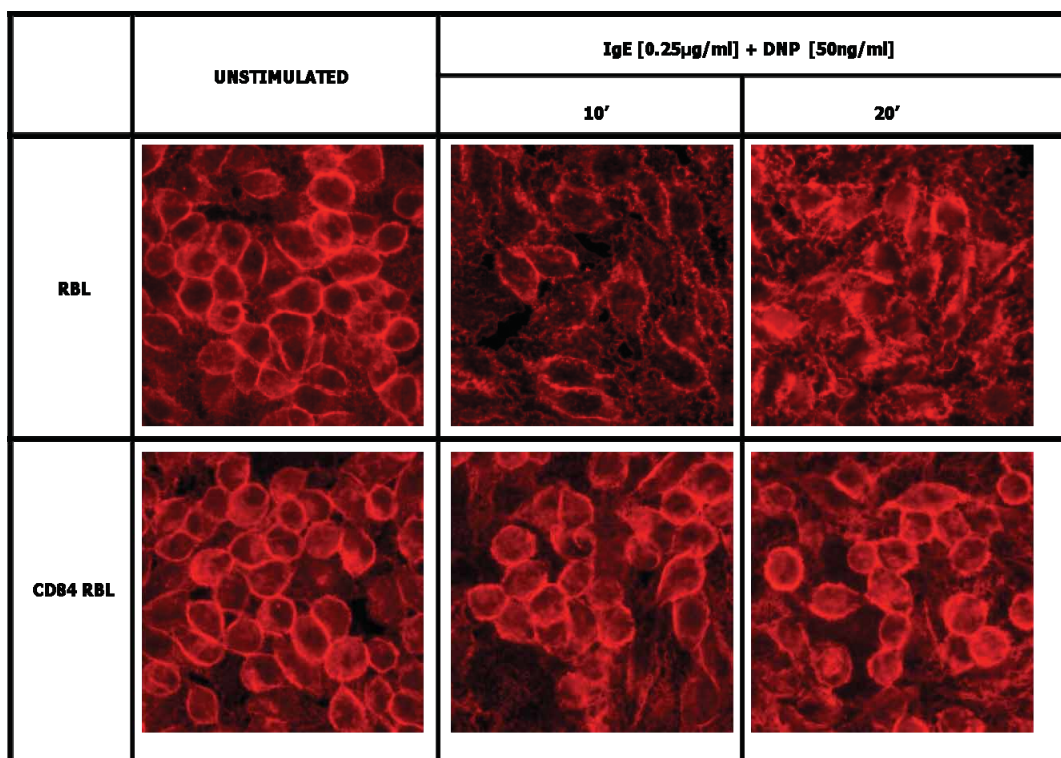


Fig 4. Disminució del procés de *ruffling* dependent d'IgE en cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3 respecte cèl·lules RBL-2H3 control. 2×10^6 cèl·lules de cada tipus cel·lular es van sembrar en cobreobjectes i es van incubar durant tota la nit amb una dosi de 0.25µg/ml d'IgE anti-DNP. L'endemà es van rentar i es van activar amb 50ng/ml de DNP-HSA. Posteriorment, les cèl·lules es van fixar amb paraformaldehid al 3%, permeabilitzar amb Tritó al 0.2%, bloquejar amb BSA a l'1% i marcar amb Phalloidina conjugada a TRITC. Posteriorment es va realitzar el muntatge en portaobjectes i es van analitzar les mostres per microscopia de fluorescència.

4. El receptor CD84 inhibeix la desgranulació dependent d'IgE en cèl·lules RBL-2H3

Tal com s'ha citat anteriorment, la lligació de la IgE unida al FcεRI, comporta l'inici d'una cascada de senyalització mitjançada pel receptor que condueix, entre moltes

altres funcions, a l'alliberació de mediadors preformats. Entre els mediadors preformats es troba l'enzim β -Hexosaminidasa, present dins els lisosomes cel·lulars i que serveix com a mesura de desgranulació dels mastòcits.

4.1 Perfil d'alliberació de β -Hexosaminidasa a diferents dosis d'IgE anti-DNP en cèl·lules RBL-2H3 control i cèl·lules CD84 RBL-2H3

Mitjançant assajos d'alliberació de β -Hexosaminidasa es va determinar que el receptor CD84 inhibeix la desgranulació dependent d'IgE en cèl·lules RBL-2H3 mitjançant interacció homotípica. Per dur a terme l'assaig es van utilitzar cèl·lules RBL-2H3 *wild type* com a control i cèl·lules RBL transfectades amb el CD84. Ambdós tipus cel·lulars es van incubar tota la nit amb diferents concentracions d'IgE anti-DNP i posteriorment, es va procedir a la lligació de la IgE unida al Fc ϵ RI mitjançant una concentració fixa de DNP-HSA durant una hora a 37°C. Tot seguit es va procedir a la mesura de la β -Hexosaminidasa alliberada. L'alliberació d'aquest enzim mostra una corba en forma de campana, tant en cèl·lules control, com en cèl·lules transfectades. A baixes concentracions d'IgE, les cèl·lules control i les cèl·lules transfectades amb el CD84 mostren una alliberació similar de β -Hexosaminidasa. A mesura que s'augmenta la concentració d'IgE, s'observa un efecte inhibitor en l'alliberació de β -Hexosaminidasa dels transfectants amb el CD84, respecte les cèl·lules control. Per altra banda, també es va determinar els efectes en l'alliberació de β -Hexosaminidasa mitjançant per un estímul independent de la IgE, en aquest cas representats pel PMA més ionomicina. El PMA és un potent activador de la proteïna cinasa K (PKC) i comporta un ampli espectre d'efectes en la cèl·lula (Castagna et al., 1982). Per altra banda, la ionomicina és un potent ionòfor de calci utilitzat freqüentment per augmentar les concentracions de calci intracel·lular. La combinació d'ambdós elements comporta un fort estímul d'activació cel·lular. En aquest cas, l'alliberació de β -Hexosaminidasa independent d'IgE no es troba alterada en les cèl·lules transfectades amb el receptor CD84 en comparació amb les cèl·lules control (Fig 5.).

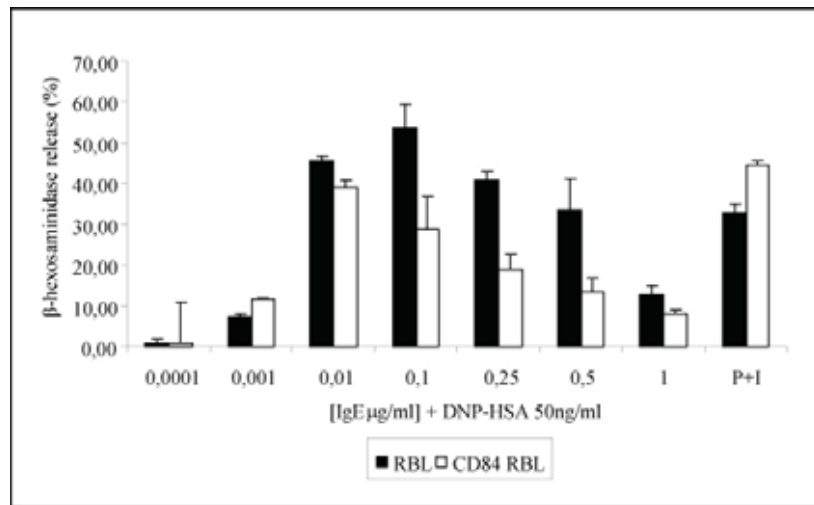


Fig 5. Les cèl·lules CD84 RBL-2H3 mostren inhibició en la desgranulació mitjançada pel FcεRI dosis òptimes d'IgE. Es va dur a terme un assaig d'alliberació de β-Hexosaminidasa amb diferents dosis d'IgE anti-DNP i una dosi fixa de 50ng/ml de DNP amb cèl·lules control i cèl·lules transfectades amb el CD84. Ambdós tipus cel·lulars mostren una corba dosi-resposta en forma de campana. A dosis altes, s'observa un efecte inhibitori de la desgranulació de les cèl·lules CD84 RBL-2H3, respecte les cèl·lules control. L'alliberació de β-Hexosaminidasa s'expressa com el percentatge de l'alliberació màxima (tractament amb tritó) menys l'alliberació espontània. Les mesures es van fer per triplicat i les dades representades són representatives de tres experiments independents.

4.2 Perfil d'alliberació de β-Hexosaminidasa a diferents dosis de DNP-HSA en cèl·lules RBL-2H3 control i cèl·lules CD84 RBL-2H3

Donat que la concentració d'IgE anti-DNP on s'observa l'alliberació màxima de β-Hexosaminidasa es va determinar en un rang entre 0.125 i 0.25µg/ml, es va escollir aquesta última concentració, en la que es valora que tots els receptors d'IgE es troben ocupats, per fer un assaig amb una dosi fixa d'IgE anti-DNP i diferents dosis de DNP-HSA, per tal de titular la seva concentració òptima en l'assaig de desgranulació. La funció del DNP-HSA és la lligació de la IgE anti-DNP, unint-se a aquesta IgE i mimetitzant d'aquesta manera l'al·lergen. L'efecte inhibitori del CD84 incrementa a dosis majors de DNP-HSA. Tant les cèl·lules control RBL-2H3 *wild type*, com les cèl·lules CD84 RBL-2H3 mostren una corba d'alliberació de β-Hexosaminidasa dosi-resposta en forma de campana (Fig 6.).

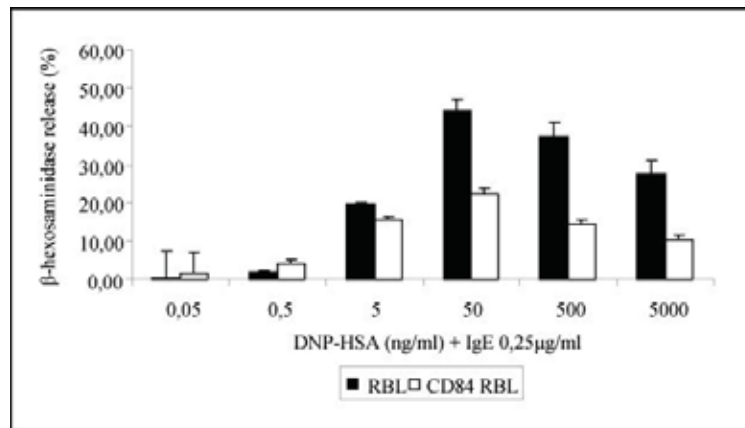


Fig 6. Les cèl·lules CD84 RBL-2H3 mostren inhibició en la desgranulació mitjançada pel FcεRI a dosis òptimes de DNP-HSA. Es va dur a terme un assaig d'alliberació de β-Hexosaminidasa amb cèl·lules control i cèl·lules transfectades amb el CD84, incubant les cèl·lules tota una nit amb una dosi fixa de 0.25µg/ml d'IgE anti-DNP. L'endemà es va procedir a la lligació de la IgE amb diferents dosis de DNP-HSA. Ambdós tipus cel·lulars mostren una corba dosi-resposta en forma de campana. A dosis altes, s'observa un efecte inhibitori de la desgranulació de les cèl·lules CD84 RBL-2H3, respecte les cèl·lules control. L'alliberació de β-Hexosaminidasa s'expressa com el percentatge de l'alliberació màxima (tractament amb tritó) menys l'alliberació espontània. Les mesures es van fer per triplicat i les dades representades són representatives de tres experiments independents.

5. La inhibició de la desgranulació està mitjançada per la interacció homotípica CD84-CD84

Donat el fet que la sobre-expressió del receptor CD84 comporta la inhibició de la senyalització depenent d'IgE i que el CD84 presenta interacció homotípica, això suggereix que el receptor CD84 és el mitjancer de l'efecte inhibitori observat a través de la interacció homotípica amb ell mateix. Per tal de demostrar formalment aquesta afirmació, es va procedir a la realització de diferents aproximacions (apartats 5.1, 5.2).

5.1 Efecte de la interacció homotípica CD84-CD84 en la desgranulació

Per tal de determinar si l'efecte inhibitori observat en la desgranulació per part de les cèl·lules CD84 RBL-2H3 venia donat per la interacció homotípica CD84-CD84, es van barrejar a diferents proporcions cèl·lules CD84 RBL-2H3 transfectades i cèl·lules RBL *wild type* control. Posteriorment es va procedir a la realització d'un assaig d'alliberació de β-Hexosaminidasa amb les barreges d'ambdós tipus cel·lulars. A mesura que va disminuint la proporció de cèl·lules CD84 RBL-2H3, que proveeixen el lligand homotípic, va disminuint alhora en paral·lel la inhibició observada en la desgranulació (Fig 7.)

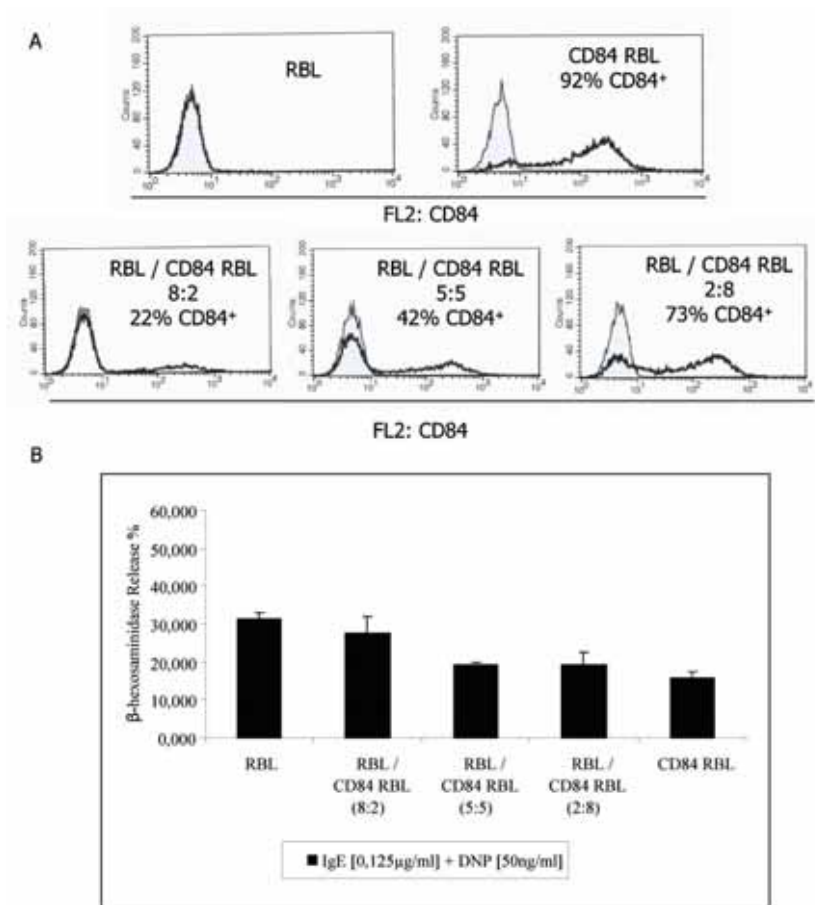


Fig 7. Nivells menor d'expressió del receptor CD84 mostren nivells menor d'inhibició de la senyalització a través del FcεRI. Cèl·lules RBL *wild type* control, que no expressen el receptor CD84, es van barrejar amb cèl·lules CD84 RBL-2H3 transfectades a diferents proporcions, 8:2, 5:5, 2:8, respectivament. Es va realitzar un marcatge de les cèl·lules positives pel receptor CD84 mitjançant un anticòs específic anti-CD84, i es va analitzar la seva expressió mitjançant citometria de flux (A). Amb les diferents barreges d'ambdós tipus cel·lulars es va realitzar un assaig d'alliberació de β-Hexosaminidasa (B).

5.2 La substitució del domini extracel·lular del CD84 reverteix la inhibició de la desgranulació dependent d'IgE

Per tal de confirmar que el mecanisme inhibitori del receptor CD84 ve mitjançat per la interacció homotípica CD84-CD84, es va generar una construcció formada pel domini extracel·lular del receptor CD244 humà i la regió transmembrana i domini citoplasmàtic del receptor CD84 humà. El CD244 no presenta interacció homotípica i és l'únic membre de la família de receptors del CD150 que s'uneix de manera heterofílica. El lligand del CD244 humà és el CD48 humà, el qual no és present en aquest tipus cel·lulars, donat que són cèl·lules de rata. Es van obtenir transfectants estables de la línia cel·lular RBL-2H3 amb la construcció generada i es van mesurar els seus nivells

d'expressió mitjançant citometria de flux (Fig 8A.). També es van analitzar que els nivells d'expressió del FcεRI en les cèl·lules transfectades, fos similar al de les cèl·lules RBL-2H3 *wild type* control (Fig 8A). Es van utilitzar les cèl·lules transfectades amb la construcció CD244-CD84 RBL-2H3 per fer un assaig d'alliberació de β-Hexosaminidasa conjuntament amb cèl·lules CD84 RBL-2H3 transfectades i les cèl·lules control RBL-2H3 *wild type*. La desgranulació no es troba inhibida en les cèl·lules CD244-CD84 RBL-2H3, indicant que el reemplaçament del domini extracel·lular del CD84 reverteix la inhibició de l'alliberació de β-hexosaminidasa (Fig 8B.).

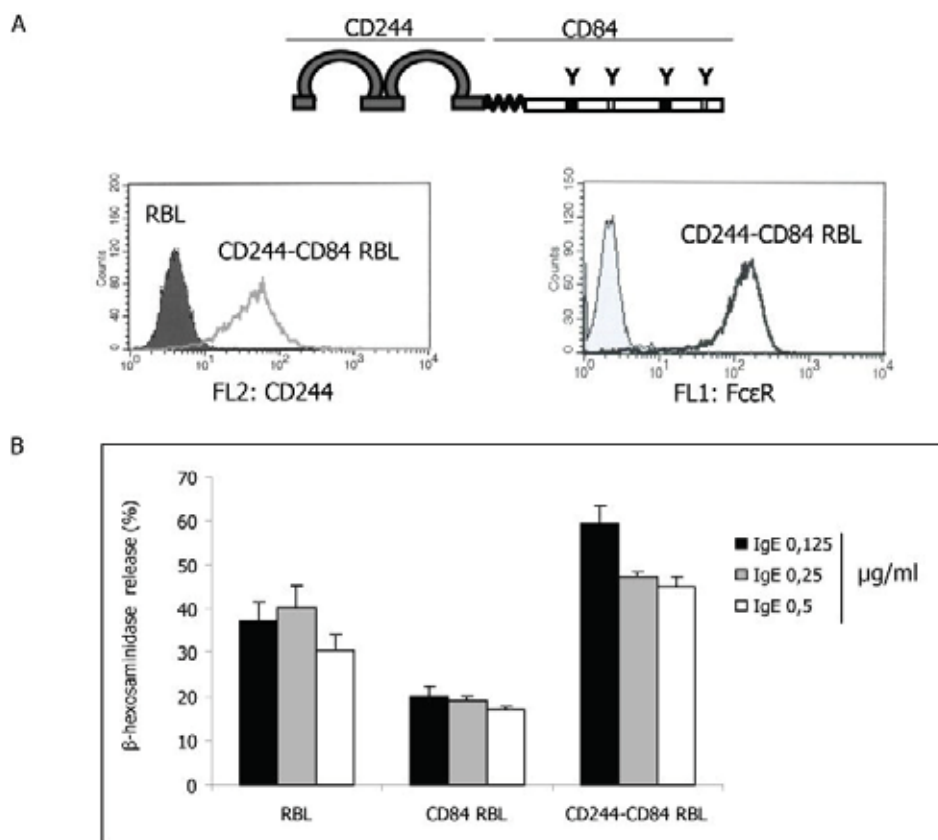


Fig 8. La substitució del domini extracel·lular del CD84 reverteix la inhibició de la desgranulació a través del FcεRI. La quimera CD244-CD84 conté el domini extracel·lular del receptor CD244 i la regió transmembrana i domini citoplasmàtic del receptor CD84. Es va generar una línia transfectant estable de RBL-2H3 que expressa el CD244-CD84. L'expressió de la quimera es va mesurar mitjançant anticossos específics contra el CD244 per citometria de flux. També es van utilitzar anticossos específics contra el FcεRI per mirar el seu nivell d'expressió (A). Cèl·lules control i transfectades amb el CD84 i la quimera CD244-CD84 es van sensibilitzar tota la nit amb diferents dosis d'IgE anti-DNP, que l'endemà es van lligar amb una dosi de 50ng/ml de DNP-HSA durant 1 hora per fer un estudi de desgranulació (B).

6. La senyalització a través del receptor CD84 mitjança la inhibició de la desgranulació

Després de demostrar que la interacció homotípica CD84-CD84 és la responsable de l'efecte inhibitori del CD84, es va procedir a determinar que el mecanisme d'aquest efecte inhibitori ve mitjançat per la senyalització a través de la cua citoplasmàtica del CD84. En els apartats 6.1 i 6.2 es mostren les estratègies realitzades amb aquesta finalitat.

6.1 L'eliminació de la cua citoplasmàtica del CD84 reverteix la inhibició de la desgranulació

Paral·lelament als estudis amb la quimera CD244-CD84, es va dur a terme un assaig de desgranulació per demostrar que l'efecte inhibitori observat del receptor CD84 es dona a través de la senyalització del CD84. Per aquest estudi es va utilitzar una construcció en la que es va mutar el gen del CD84, delectant tota la part corresponent a la seva cua citoplasmàtica (CD84 Δ Cyto), impedit així la seva senyalització, però no la seva interacció homotípica. Posteriorment es van obtenir transfectants estables de la línia cel·lular RBL-2H3 amb la construcció generada i es van mesurar els seus nivells d'expressió mitjançant citometria de flux (Fig 9A.). També es van analitzar els nivells d'expressió del Fc ϵ RI en les cèl·lules transfectades amb el CD84 Δ domini citoplasmàtic (Fig 9A). Amb aquest nou transfectant obtingut es va realitzar un assaig de desgranulació, conjuntament amb cèl·lules control, incubant les cèl·lules tota la nit amb diferents dosis d'IgE anti-DNP i una dosi fixa de DNP-HSA de 50ng/ml per lligar la IgE l'endemà. Les cèl·lules transfectades amb el mutant del CD84 que manca tota la seva cua citoplasmàtica mostren una abolició de la inhibició observada prèviament amb el receptor CD84, indicant d'aquesta manera que la interacció homotípica del CD84 comporta una senyalització negativa que condueix a la inhibició de la desgranulació (Fig 9B).

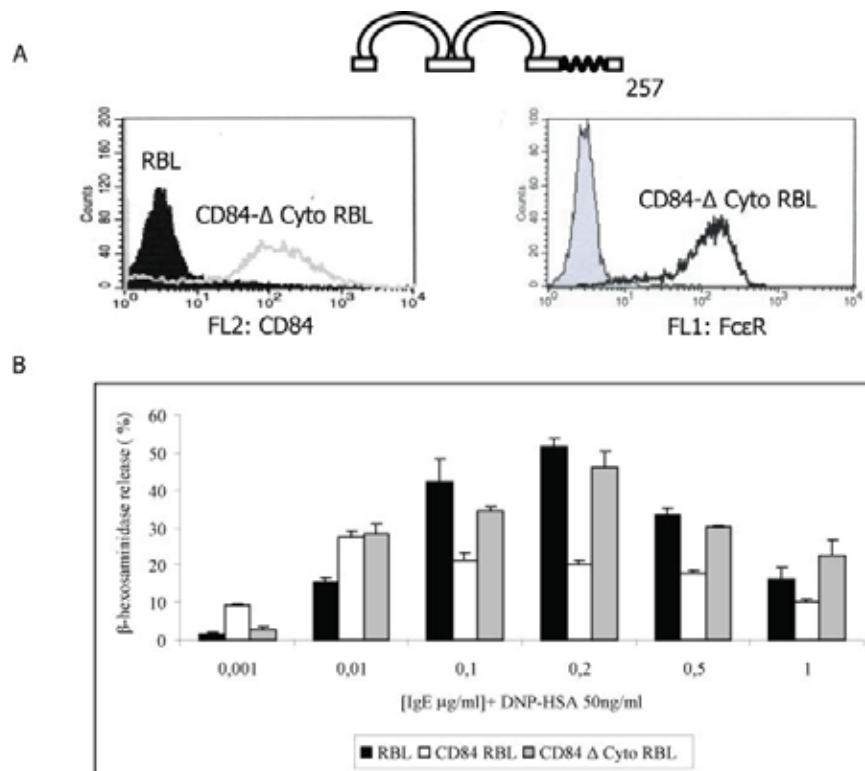


Fig 9. La senyalització generada a través de la interacció homotípica CD84-CD84 comporta la inhibició de la desgranulació. Es va utilitzar una construcció generada a la qual li manca la cua citoplasmàtica al receptor CD84 per obtenir transfectants estables de la línia cel·lular RBL-2H3. Mitjançant l'ús d'anticossos específics (anti-CD84 i anti-FcεRI) i citometria de flux es va analitzar els nivells d'expressió de la construcció transfectada (CD84 Δ Cyto) i del FcεRI (A). Es va realitzar un assaig de desgranulació amb cèl·lules control i cèl·lules CD84 RBL-2H3 transfectades i cèl·lules CD84 Δ Cyto RBL-2H3 transfectades, sensibilitzant durant tota la nit tots els tipus cel·lulars amb diferents dosis d'IgE anti-DNP. L'endemà es va usar una concentració de 50ng/ml de DNP-HSA per a la lligació de la IgE i es va procedir a l'assaig d'alliberació de β-Hexosaminidasa (B).

6.2 La generació de nous mutants del receptor CD84, confirmen l'efecte inhibitori d'aquest receptor

Tots els transfectants estables usats en els diferents experiments es van seleccionar mitjançant una selecció policlonal. Tot i això, sempre existeix una certa probabilitat que algun clon simple amb diferent capacitat de desgranulació sobrecreixi per damunt dels altres. Per aquest motiu, i per tal de determinar l'efecte inhibitori del CD84, es van generar noves línies de transfectants estables en RBL-2H3, tant amb el receptor CD84 *wild type*, com amb el receptor CD84 al qual se li va deletar la cua citoplasmàtica. Mitjançant anticossos específics es van analitzar els nivells del receptor CD84 (*wild type* i Δ domini citoplasmàtic) transfectat i els nivells d'expressió del FcεRI (Fig 10A.). Posteriorment es va realitzar un assaig de desgranulació i es va observar que en tots

els casos l'alliberació de β -Hexosaminidasa es troba disminuïda en aquelles cèl·lules transfectades amb el receptor CD84 *wild type*, respecte les cèl·lules transfectades amb el receptor CD84 al qual se li ha deletionat la cua citoplasmàtica (Fig 10B.).

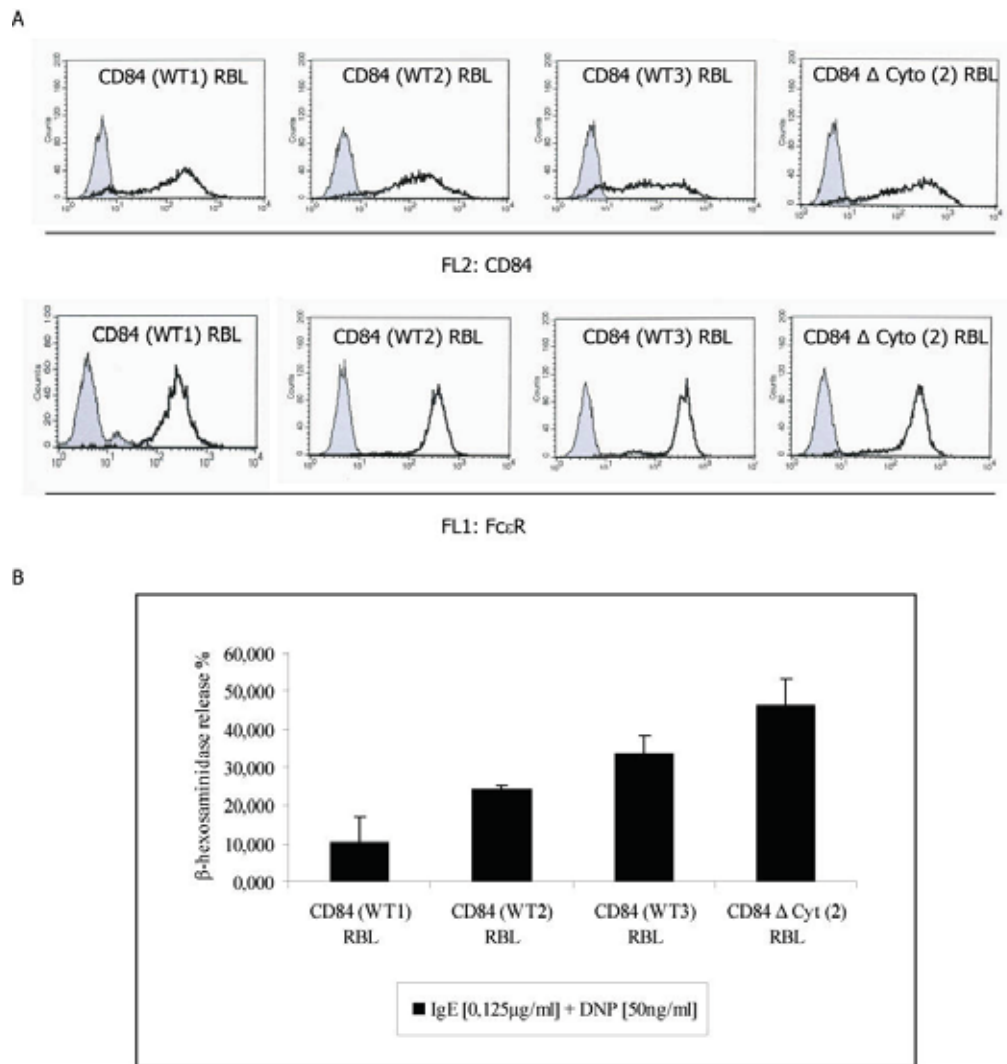


Fig 10. Diferents transfectants CD84 RBL-2H3 disminueixen l'alliberació de β -Hexosaminidasa en comparació amb un transfectant del receptor CD84 al què li manca la cua citoplasmàtica. Es van generar diverses línies estables de RBL-2H3 transfectades amb el CD84 *wild type* i un mutant del CD84 que té deletionada tota la cua citoplasmàtica. Mitjançant l'ús d'anticossos específics (anti-CD84 i anti-Fc ϵ RI) i citometria de flux es va analitzar els nivells d'expressió de les dues formes del receptor CD84 transfectades (CD84 *wild type* i CD84 Δ Cyto) i del Fc ϵ RI (A). Es va realitzar un assaig de desgranulació amb els diferents tipus cel·lulars generats, incubant-los durant tota la nit amb una dosi d'IgE anti-DNP de 0.25 μ g/ml i. L'endemà es va usar una concentració de 50ng/ml de DNP-HSA per a la lligació de la IgE i es va procedir a l'assaig d'alliberació de β -Hexosaminidasa (B).

7. La proteïna adaptadora SAP és independent del mecanisme d'inhibició del CD84 en cèl·lules CD84 RBL-2H3

7.1 Determinació de la unió de la molècula adaptadora SAP i la fosfatasa SHP-2 al receptor CD84

El receptor CD84 presenta a la seva cua citoplasmàtica quatre tirosines, dues d'elles dins de motius d'unió ITSM (Y262 i Y299) (de la Fuente et al., 1997). S'ha descrit que la proteïna adaptadora SAP, responsable de la síndrome limfoproliferativa associada al cromosoma X (XLP) s'uneix a la cua citoplasmàtica del CD84 (Sayos et al., 2001). Aquesta interacció és dependent de fosforilació i en el cas de cèl·lules T, s'ha reportat que la funció del receptor CD84 és independent de la seva unió amb SAP (Tangye et al., 2003). També s'ha descrit un altre lligand intracel·lular del CD84, la fosfatasa SHP-2, tot i que el paper d'aquesta interacció encara no ha estat aclarit (Sayos et al., 2001). Per tal de dissecionar el mecanisme inhibitori del receptor CD84, es van generar mutants puntuals per totes les tirosines que el CD84 presenta a la seva cua citoplasmàtica (veure apartat Material i Mètodes, Taula 1.). Dues d'aquestes tirosines Y262 i Y299 són motius consens d'unió a l'adaptador SAP i a la fosfatasa SHP-2, respectivament. Es van generar mutants simples i dobles mutants per aquests dos residus tirosina i es va determinar la seva capacitat d'unió a les molècules SAP i SHP-2 en cèl·lules COS mitjançant tècniques d'immunoprecipitació. Amb aquesta finalitat es van transfectar aquestes cèl·lules de manera transitòria amb diversos cDNAs: CD84 *wild type* o bé CD84 Y262F o bé CD84 Y299F o bé el doble mutant Y262F/Y299F més el cDNA de la cinasa FYN i de l'adaptador SAP. La fosfatasa SHP-2 s'expressa de manera constitutiva en cèl·lules COS (Fig 11.). Els resultats mostren com la Y262 es troba dins un motiu crucial per al reclutament de l'adaptador SAP, mentre que la tirosina Y299 es troba involucrada amb la unió amb la fosfatasa SHP-2. La presència de la mutació Y299F canvia la mobilitat del receptor CD84 fosforilat (Fig 11.).

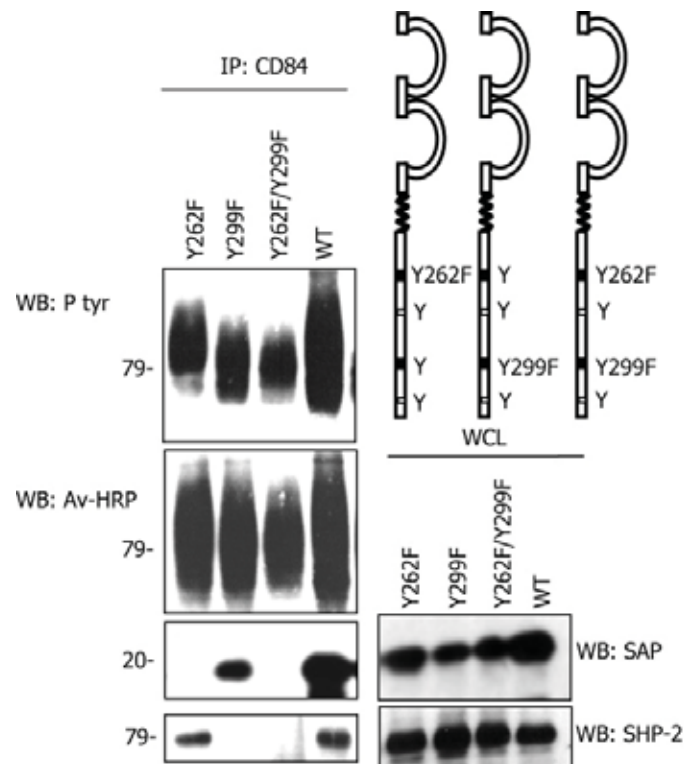


Fig 11. La tirosina Y262 és crucial per al reclutament de SAP i la Y299 participa en la unió amb SHP-2. Es van generar les següents construccions amb mutants simples i dobles per als motius d'unió a SAP (Thr-Val/Ile-Tyr-X-X-Val/Ile) que presenta el receptor CD84 a la seva cua citoplasmàtica: CD84 Y262F, CD84 Y299F i CD84 Y262F/Y299F. Es van transfectar cèl·lules COS amb el cDNA del CD84 *wild type*, o bé amb un dels mutants generats (simples o doble) més els vectors corresponents a l'adaptador SAP i la cinasa FYN. A les 48 hores posteriors a la transfecció, les cèl·lules es van biotinillar, es van immunoprecipitar amb 1µg d'un anticòs específic anti-CD84 i es van córrer en un gel SDS-PAGE al 12%. Després del *western blot*, les membranes es van incubar amb els anticossos específics indicats a la figura.

7.2 Efecte dels mutants dels dominis d'unió a SAP del receptor CD84 en la desgranulació de cèl·lules RBL-2H3

Amb les construccions obtingudes dels mutants simples i doble del CD84 pels motius d'unió a SAP es van generar línies transfectants estables de RBL-2H3. L'expressió de cadascun dels mutants transfectat, així com l'expressió del FcεRI es van analitzar mitjançant l'ús d'anticossos específics (anti-CD84 i anti-FcεRI) per citometria de flux (Fig 12A.). Els transfectants generats es van utilitzar per assajos de desgranulació, on cap d'aquestes línies cel·lulars que expressen cadascuna diferents mutants del CD84 (CD84 Y262F, CD84 Y299F i CD84 Y262F/Y299F), té capacitat per revertir la inhibició mitjançada pel CD84. Això indica que els motius on es troben les tirosines Y262F i Y299F no participen en el mecanisme inhibitori del CD84 (Fig 12B.).

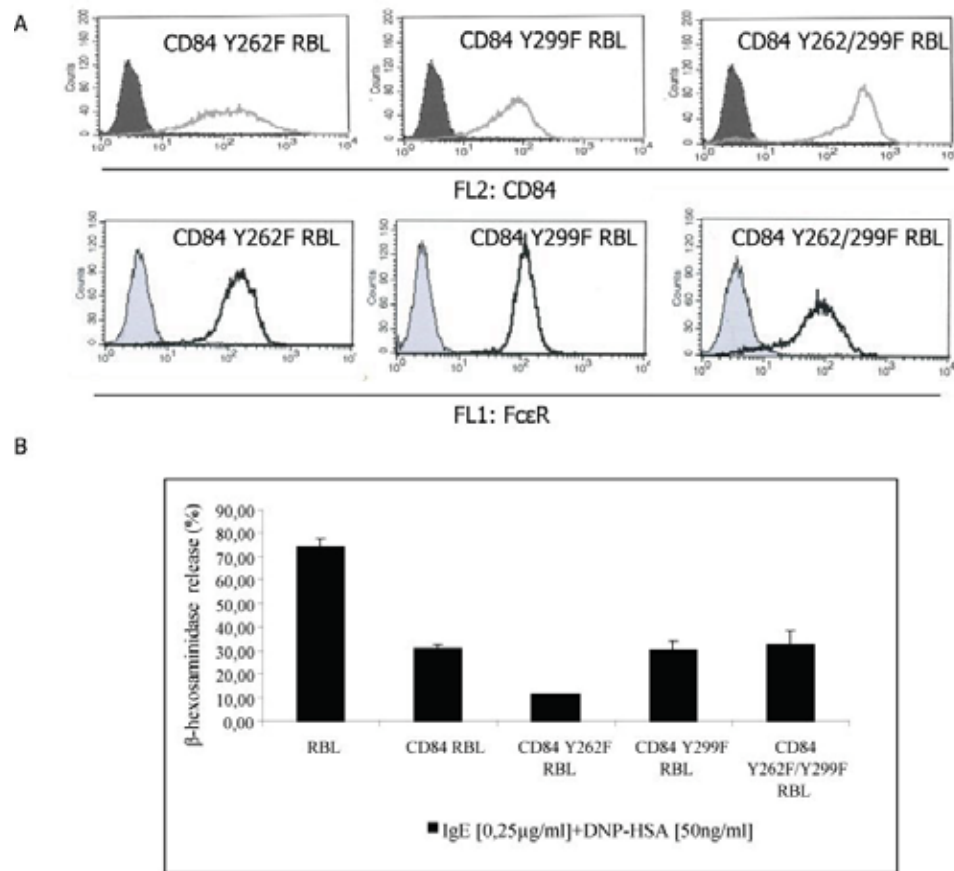


Fig 12. La proteïna SAP no està involucrada en la inhibició mitjançada pel CD84. Amb la línia cel·lular RBL-2H3, es van generar transfectats estables per cadascuna de les construccions dels mutants simples i dobles dels motius d'unió a SAP que presenta el receptor CD84 en la seva cua citoplasmàtica: CD84 Y262F RBL-2H3, CD84 Y299F RBL-2H3 i CD84 Y262F/Y299F RBL-2H3. L'expressió dels mutants del CD84 transfectats i del FcεRI es va analitzar per cadascun dels tipus cel·lulars mitjançant l'ús d'anticossos específics (anti-CD84 i anti-FcεRI) per citometria de flux (A). Amb les línies cel·lulars dels transfectants estables obtingudes es va procedir a la realització d'un assaig de desgranulació, incloent també cèl·lules RBL-2H3 *wild type* control i cèl·lules CD84 *wild type* RBL-2H3, en el què es va utilitzar una dosi fixa d'IgE anti-DNP (0.25µg/ml) durant tota la nit, i una dosi fixa de DNP-HSA (50ng/ml) durant 1 hora (B). L'alliberació de β-Hexosaminidasa s'expressa com el percentatge de l'alliberació màxima (tractament amb tritó) menys l'alliberació espontània. Les mesures es van fer per triplicat i les dades representades són representatives de tres experiments independents.

8. Els mutants per les tirosines 279 i 324 reverteixen l'efecte inhibitori del CD84 observat en la desgranulació

Dins de la cua citoplasmàtica del CD84 es troben altres dues tirosines sensibles a ser fosforilades, i per tant dos motius d'interacció amb dominis SH2: Y279 i Y324. El paper d'aquestes dues tirosines mai ha estat explorat. Per tal d'estudiar si aquests motius estan implicats en la senyalització negativa que duu a terme el CD84 en cèl·lules RBL-2H3, es van generar dues construccions més: una amb la tirosina 279 mutada a

fenilalanina, i una altra on es va delecionar un petit tros de la part final de la cua citoplasmàtica del CD84 per tal d'eliminar la tirosina 324. La tirosina 324 es troba a tan sols quatre aminoàcids de l'extrem carboxi-terminal del CD84. Per aquest motiu, és més senzill simplement delecionar a partir d'aquesta tirosina, que intentar fer un mutant puntual.

Amb les noves construccions obtingudes es van generar línies de RBL-2H3 de transfectants estables: CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3. Mitjançant anticossos específics (anti-CD84 i anti-Fc ϵ RI) per citometria de flux es van determinar els nivells d'expressió dels mutants del CD84 i del Fc ϵ RI (Fig 13A.). Posteriorment, es va realitzar un assaig d'alliberació de β -Hexosaminidasa, utilitzant la dosi d'IgE en què experimentalment s'havia observat que la inhibició del CD84 era més sostinguda. De manera interessant, ambdues línies transfectades amb les mutacions del CD84 (CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3) tenien capacitat per revertir la inhibició de la desgranulació observada en les cèl·lules transfectades amb el CD84 *wild type*, indicant que els dos motius tirosina (Y279 i Y324) són necessaris de la mateixa manera per al mecanisme d'inhibició del CD84. (Fig 13B.).

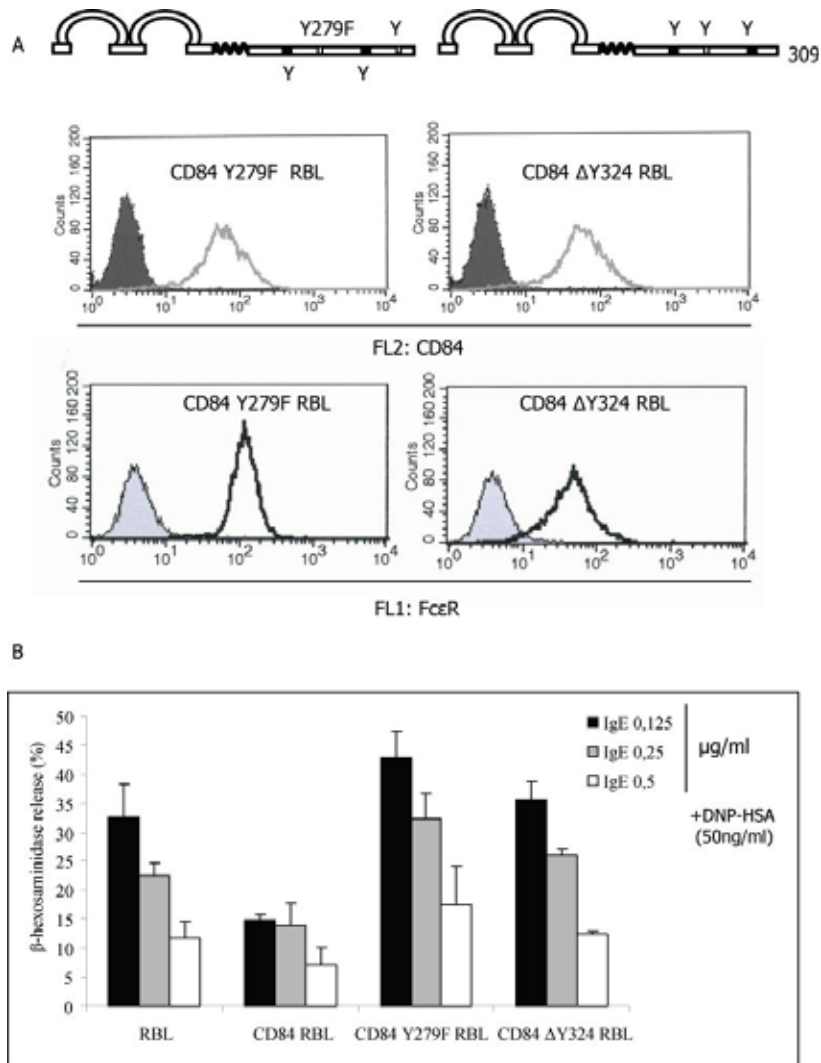


Fig 13. Els mutants CD84 Y279F i CD84 ΔY324 reverteixen la inhibició de la desgranulació mitjançada pel CD84. Es van obtenir construccions pel mutant simple Y279F i el mutant de deleció ΔY324 del CD84, i es van utilitzar aquestes construccions per tal de generar transfectants estables de la línia cel·lular RBL-2H3: CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 ΔY324 RBL-2H3. Es va mesurar l'expressió dels mutants del CD84 transfectats (CD84 Y279F i CD84 ΔY324) i l'expressió del FcεRI per citometria de flux, mitjançant l'ús d'anticossos específics (A). Es van realitzar assajos d'alliberació de β-Hexosaminidasa amb aquests nous tipus cel·lulars transfectats obtinguts en comparació amb cèl·lules RBL-2H3 *wild type* control i cèl·lules CD84 *wild type* RBL-2H3. Per l'assai es va utilitzar diferents dosis d'IgE anti-DNP durant tota la nit, i una dosi fixa de DNP-HSA (50ng/ml) durant 1hora (B). L'alliberació de β-Hexosaminidasa s'expressa com el percentatge de l'alliberació màxima (tractament amb tritó) menys l'alliberació espontània. Les mesures es van fer per triplicat i les dades representades són representatives de tres experiments independents.

9. El CD84 es fosforila després de la lligació de la IgE: fosforilació diferencial de proteïnes en cèl·lules RBL 2H3 control i cèl·lules CD84 RBL-2H3

9.1 La lligació de la IgE potencia la fosforilació del receptor CD84 en cèl·lules CD84 RBL-2H3

Per tal de caracteritzar les vies de senyalització que determinen el paper inhibitor del receptor CD84 en la desgranulació mitjançada per la IgE, es va passar a estudiar l'estat de fosforilació del CD84 en cèl·lules no activades i cèl·lules estimulades amb IgE anti-DNP més DNP-HSA. Les cèl·lules transfectants CD84 RBL-2H3 es van deixar sense tractar, o bé es van sensibilitzar amb IgE anti-DNP durant tota la nit. L'endemà es van biotinyllar, per tal de detectar els nivells totals de CD84 en un posterior *western blot*, donat que no existeixen bons anticossos que permetin detectar en CD84 per aquesta tècnica. Posteriorment a la biotinyllació, les cèl·lules s'activen amb una dosi de DNP-HSA, que permet lligar la IgE anti-DNP unida al FcεRI, durant 2 i 15 minuts a 37°C. Després es llisten les cèl·lules i s'immunoprecipiten amb una IgG isotípica control, no expressada en aquest tipus cel·lular, o bé amb un anticòs específic contra el CD84. Els resultats mostren com la lligació de la IgE mostra un augment en la fosforilació del receptor CD84. També es pot observar que hi ha una fosforilació basal, possiblement deguda a la interacció homotípica CD84-CD84 (Fig 14.).

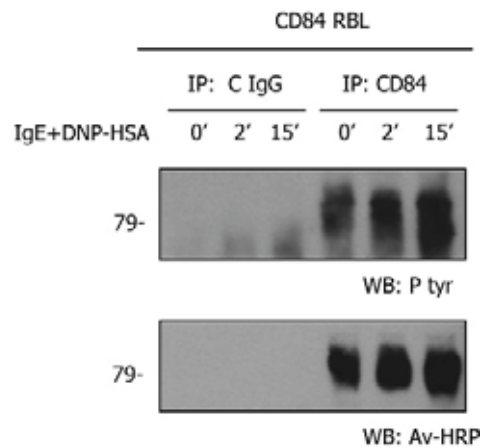


Fig 14. La lligació de la IgE potencia la fosforilació del receptor CD84. En aquest estudi es van utilitzar 10×10^6 cèl·lules per cada punt. Part de les cèl·lules es van deixar sense tractar i part es van incubar tota la nit amb una dosi d'IgE anti-DNP de $0.25 \mu\text{g/ml}$. L'endemà es va realitzar un rentat de les cèl·lules, es van biotinilar i es van activar amb 50ng/ml de DNP-HSA, que comporta la lligació de la IgE, durant 2 i 15 minuts a 37°C . Posteriorment les cèl·lules es van lliurar i es van immunoprecipitar amb $2 \mu\text{g}$ d'una IgG isotípica control, o bé d'un anticòs específic anti-CD84. Es van córrer les mostres en un gel SDS-PAGE al 8%, i el *Western Blot* posterior es va incubar amb un anticòs anti-tirosines fosforilades (anti-pTYR) i amb avidina-HRP.

9.2 L'activació a través del FcεRI potencia la fosforilació de les proteïnes c-CBL i DOK-1 en cèl·lules CD84 RBL-2H3 respecte cèl·lules control

Per tal de dilucidar les molècules mitjanceres del mecanisme inhibitori del receptor CD84, es va estudiar quines molècules de senyalització s'activaven de manera diferencial en cèl·lules RBL-2H3 control i quines en cèl·lules CD84 RBL-2H3 transfectades després de la lligació de la IgE. Part de cadascun d'ambdós tipus cel·lular es va incubar durant tota la nit amb una dosi d'IgE ($0.25 \mu\text{g/ml}$). L'endemà es va procedir a la lligació de la IgE amb una dosi de DNP-HSA (50ng/ml), durant 10 minuts a 37°C . Posteriorment, les cèl·lules es van lliurar, immunoprecipitar amb un anticòs anti-tirosines fosforilades, córrer en un gel d'acrilamida i transferir a una membrana. De manera interessant, la incubació de la membrana amb un anticòs anti-tirosines fosforilades no mostra un patró general de disminució de la fosforilació global en cèl·lules CD84 RBL-2H3. És més, en aquest tipus cel·lular s'observen dues bandes de 60 i 120 kDa, respectivament, més fosforilades en comparació amb les cèl·lules RBL-2H3 control (Fig 15.). Segons el pes molecular, dues molècules podien ser bones candidates a correspondre a les bandes fosforilades: DOK-1 i c-CBL, respectivament. Ambdues molècules han estat descrites com a molècules inhibidores en l'activació dels mastòcits (Ott et al., 2002; Qu et al., 2004). Donat aquest paper com a molècules

reguladores negatives, i la possible correspondència de pesos, es va procedir a incubar la membrana amb anticossos específics anti-DOK-1 i anti-c-CBL. Els resultats mostren que les bandes detectades corresponen a aquestes molècules (Fig 15.).

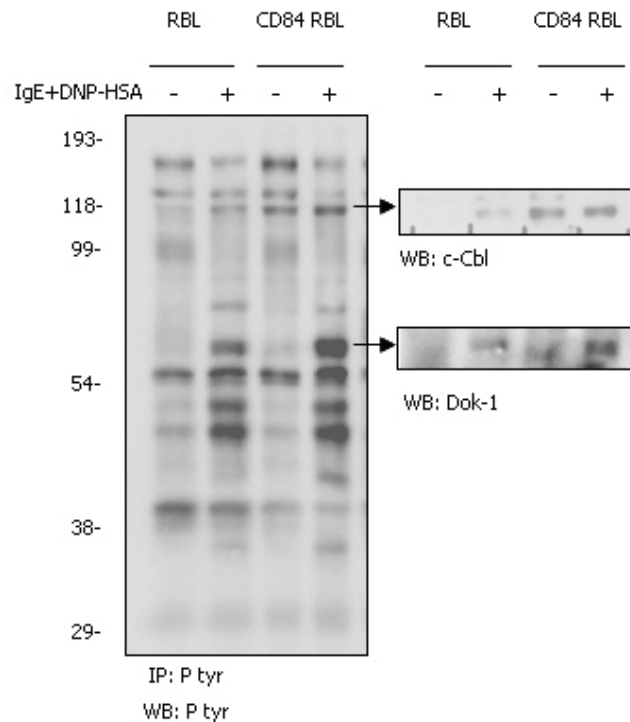


Fig 15. Fosforilació diferencial de proteïnes en cèl·lules RBL-2H3 control i cèl·lules CD84 RBL-2H3 després de la lligació de la IgE. En aquest estudi es van utilitzar cèl·lules RBL-2H3 *wild type* com a control, i cèl·lules CD84 RBL-2H3 transfectades. Es van fer servir 12×10^6 cèl·lules de cada tipus cel·lular per cada punt d'activació, per tal d'assegurar que la càrrega proteica fos la mateixa en cada cas. Part de les cèl·lules de cadascun d'ambdós tipus es van deixar sense tractar i part es van incubar tota la nit amb una dosi d'IgE anti-DNP de $0.25 \mu\text{g/ml}$. Per tal d'activar les cèl·lules, l'endemà es va procedir a la lligació de la IgE amb 50 ng/ml de DNP-HSA durant 10 minuts a 37°C . Posteriorment les cèl·lules es van lliurar i es van immunoprecipitar amb $2.5 \mu\text{g}$ d'un anticòs anti-tirosines fosforilades. Es van córrer les mostres en un gel SDS-PAGE al 10%, i posteriorment es van transferir a una membrana de PVDF (*Western Blot*). La membrana obtinguda es va incubar amb diferents anticossos: anti-tirosines fosforilades (anti-pTYR), anti-c-CBL i anti-DOK-1.

9.3 La fosforilació de les proteïnes c-CBL i DOK-1 és proporcional a l'efecte inhibitori del CD84

Donat que la inhibició observada en l'alliberació de β -hexosaminidasa depenent d'IgE per part del receptor CD84 es dona a dosis òptimes (Fig 5.), es va realitzar una activació similar en cèl·lules RBL-2H3 control i cèl·lules CD84 RBL-2H3 amb diferents concentracions d'IgE (incubació durant tota la nit) i una dosi fixa de DNP-HSA (50 ng/ml) durant 5 minuts l'endemà. Posteriorment a l'activació, les cèl·lules es van

llisar, córrer en un gel d'acrilamida i transferir a una membrana. Aquesta es va incubar amb un anticòs anti-tirosines fosforilades, per tal d'estudiar diferències en el patró de fosforilació d'ambdós tipus cel·lulars. De manera interessant, els resultats mostren com la fosforilació de les molècules DOK-1 i c-CBL es troba augmentada a les concentracions d'IgE en les què el receptor CD84 indueix els graus d'inhibició de la desgranulació dependent d'IgE més elevats (Fig 16.).

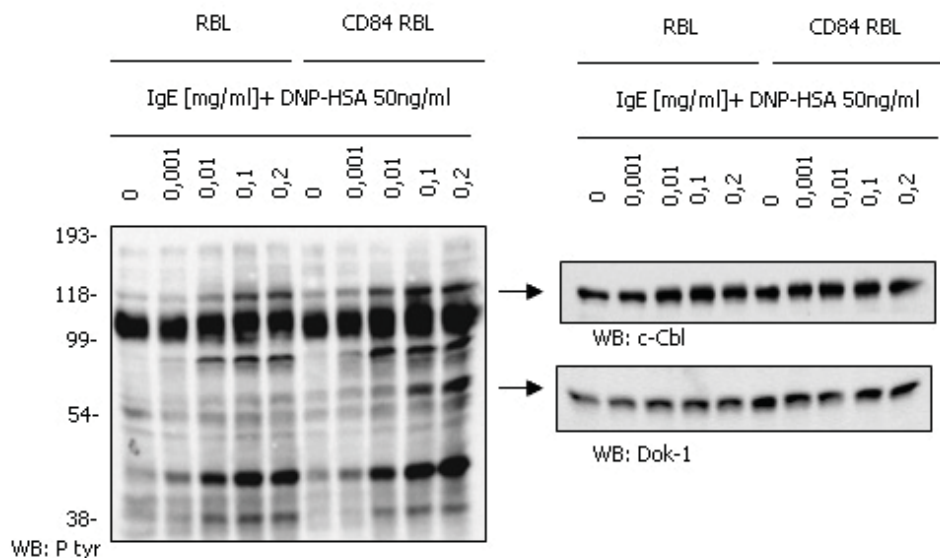


Fig 16. La fosforilació de les molècules DOK-1 i c-CBL es troba augmentada a les concentracions on s'observen els majors efectes inhibitoris del receptor CD84 en cèl·lules CD84 RBL-2H3. Es va realitzar un estudi d'activació amb cèl·lules RBL-2H3 control i cèl·lules CD84 RBL-2H3 transfectades. Es van utilitzar 1×10^6 cèl·lules per cada tipus cel·lular i per cada grup d'activació, per tal d'assegurar que la càrrega proteica fos similar en tots els casos, i es va incubar una part de les cèl·lules amb diferents dosi d'IgE anti-DNP durant tota la nit. L'endemà es va procedir a la lligació de la IgE amb 50ng/ml de DNP-HSA durant 5 minuts. Posteriorment les cèl·lules es van lliar, córrer en un gel SDS-PAGE al 10% i transferir a un membrana, que va ser incubada amb diferents anticossos: anti-tirosines fosforilades, anti-c-CBL i anti-DOK-1. Els nivells de les proteïnes c-CBL i DOK-1 demostren que la càrrega proteica és similar en tots els punts d'activació.

9.4 La fosforilació de les proteïnes c-CBL i DOK-1 es troba disminuïda en els mutants del CD84 que reverteixen la seva funció inhibitoria (Y279F i Δ Y324)

Donats els últims resultats obtinguts, es va procedir a determinar com es trobava l'estat de fosforilació de les molècules DOK-1 i c-CBL en les línies cel·lulars CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3, que expressen els mutants del receptor CD84 que reverteixen el seu efecte inhibitori. Per aquest motiu, una part de cèl·lules RBL-2H3 control, CD84 RBL-2H3, CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3 es van deixar

sense tractar, i una altra part es van incubar durant tota la nit amb una dosi d'IgE (0.25µg/ml) per ser activades l'endemà amb una dosi de DNP-HSA (50ng/ml), durant 5 minuts a 37°C. Posteriorment, es va dur a terme la tècnica d'immunoprecipitació amb un anticòs anti-tirosines fosforilades. Els resultats obtinguts indiquen que en els carrils de cèl·lules activades a través del FcεRI dels mutants CD84 Y279F i CD84 ΔY324, la fosforilació de les molècules c-CBL i DOK-1 es troba disminuïda en comparació amb les cèl·lules que expressen el receptor CD84 *wild type*, i que és molt similar a l'estat de fosforilació de les cèl·lules RBL-2H3 control (Fig 17.).

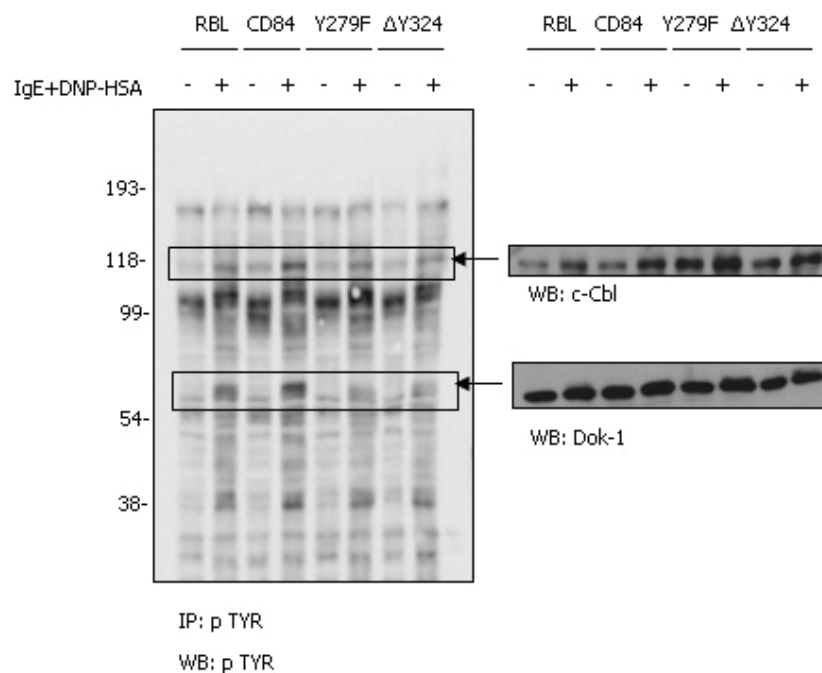


Fig 17. La fosforilació de les molècules DOK-1 i c-CBL es troba disminuïda en cèl·lules CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 ΔY324 RBL-2H3 en comparació amb cèl·lules CD84 *wild type* RBL-2H3. Es mostren els resultats d'una immunoprecipitació amb un anticòs anti-tirosines fosforilades comparant les següents línies cel·lulars: RBL-2H3 control, CD84 RBL-2H3, CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 ΔY324 RBL-2H3. Es van utilitzar 12×10^6 cèl·lules per cada tipus cel·lular i per cada grup d'activació, per tal d'assegurar que la càrrega proteica fos la mateixa en cada cas. Part de les cèl·lules de cada grup es van deixar sense tractar i part es van incubar tota la nit amb diferents dosis d'IgE anti-DNP més 50ng/ml de DNP-HSA durant 5 minuts en l'activació de l'endemà. Les cèl·lules llavors es van llisar, córrer en un gel SDS-PAGE al 10% i transferir a una membrana, que es va incubar amb diferents anticòsos: anti-tirosines fosforilades, anti-c-CBL i anti DOK-1.

10. La fosforilació de les MAPK ERK1/2, P38 i JNK es troba afectada en cèl·lules CD84 RBL-2H3

10.1 Les cèl·lules CD84 RBL-2H3 presenten alteracions en l'activació de la cascada de MAPK

DOK-1 és una molècula adaptadora de 62 kDa que originalment es va associar amb la proteïna Ras-GAP, un regulador negatiu de Ras i per tant de la cascada de MAPK (ERK, P38, JNK) dependent de Raf (veure Introducció, apartat 5.2.5). Donat que DOK-1 es troba més fosforilat en cèl·lules CD84 RBL-2H3, es va fer un estudi per determinar si el mecanisme inhibidor del receptor CD84 afecta alhora la cascada de MAPK. Per aquest motiu, es va estudiar l'estat de fosforilació d'ERK1/2, P38 i JNK. Cèl·lules RBL-2H3 i cèl·lules CD84 RBL-2H3 es van incubar tota la nit amb una dosi de 0.25µg/ml d'IgE anti-DNP i l'endemà es van activar amb 50ng/ml de DNP-HSA durant 5, 10 i 20 minuts, per tal de determinar la cinètica de fosforilació de les MAPK en aquests tipus cel·lulars. Els resultats demostren que la fosforilació de JNK i P38 es troba molt reduïda, mentre que la fosforilació d'ERK1/2 es troba parcialment afectada, en cèl·lules CD84 RBL-2H3, en comparació amb cèl·lules RBL-2H3 control (Fig 18.).

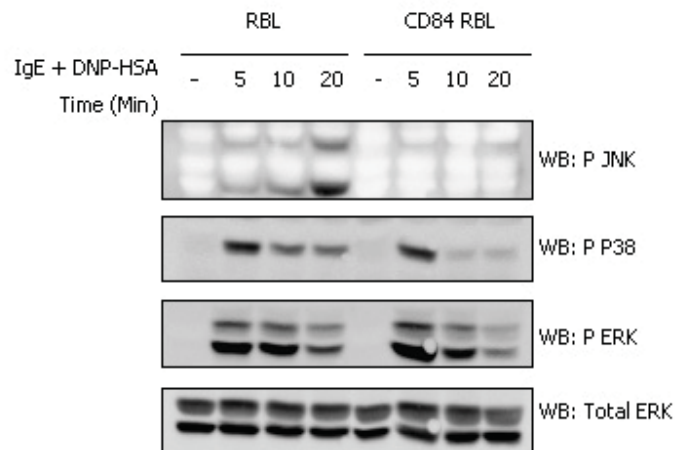


Fig 18. La fosforilació de JNK, P38 i ERK es troba afectada en cèl·lules CD84 RBL-2H3 en comparació amb cèl·lules RBL-2H3 control. Cèl·lules RBL-2H3 control i cèl·lules CD84 RBL-2H3 es van incubar durant tota la nit amb 0.25µg/ml d'IgE anti-DNP. L'endemà es va procedir a la lligació de la IgE amb una dosi de 50ng/ml de DNP-HSA durant 10 minuts, a 37°C. Tot seguit es van lliurar les cèl·lules, es van córrer en un gel SDS-PAGE al 10% i va transferir a una membrana de PVDF. El *Western Blot* es va incubar posteriorment amb anticossos específics contra les MAPK en estat de fosforilació (anti-pJNK, anti-pP38, anti-pERK) i amb un anticòs anti-ERK Total, per tal de comprovar que la càrrega de MAPK en tots els punts era similar.

10.2 Els mutants que reverteixen l'efecte inhibitori del receptor CD84 presenten una fosforilació de MAPK normal en comparació amb cèl·lules RBL-2H3 control

Per tal de determinar l'estat de fosforilació de les MAPK ERK, P38 i JNK en els mutants CD84 Y279F i CD84 Δ Y324 que reverteixen l'efecte inhibitori del receptor CD84, es va realitzar un estudi similar a l'anterior (Fig 18.), en el què cèl·lules RBL-2H3, CD84 RBL-2H3, CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3 van ser incubades tota la nit amb una dosi d'IgE anti-DNP i l'endemà activades amb una dosi de DNP-HSA durant 10 minuts. Els resultats mostren que la fosforilació de JNK, P38 i ERK és més elevada en cèl·lules transfectades amb els mutants CD84 Y279F i CD84 Δ Y324 en comparació amb cèl·lules transfectades amb el receptor CD84 *wild type*. El fet que els dos mutants del receptor CD84 utilitzats en aquest estudi restaurin l'estat de fosforilació de JNK, P38 i ERK al nivell de les cèl·lules control indica novament la implicació dels residus Y279 i Y324 en la via de senyalització negativa que duu a terme el CD84 (Fig 19.).

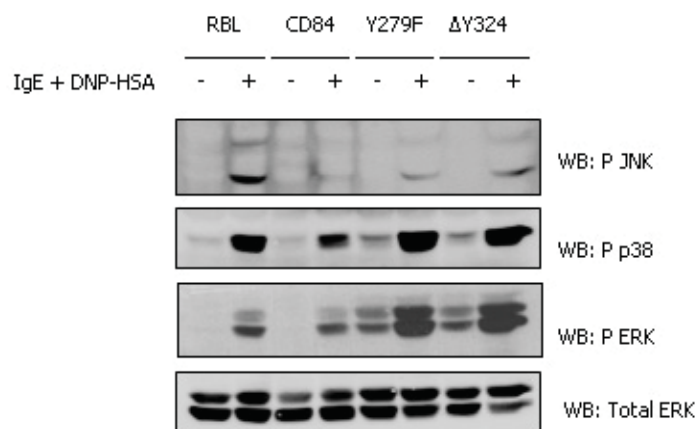


Fig 19. La fosforilació de JNK, P38 i ERK es troba restaurada en cèl·lules CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3 respecte a la disminució observada en cèl·lules CD84 RBL-2H3. Cèl·lules RBL-2H3 control, CD84 RBL-2H3, CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3 es van incubar durant tota la nit amb 0.25 μ g/ml d'IgE anti-DNP. L'endemà es van activar amb una dosi de 50ng/ml de DNP-HSA durant 10 minuts, a 37°C. Posteriorment, les cèl·lules es van lliurar, córrer en un gel SDS-PAGE al 10% i transferir a una membrana de PVDF, que posteriorment es va incubar amb anticossos específics contra les MAPK en estat de fosforilació (anti-pJNK, anti-pP38, anti-pERK) i amb un anticòs anti-ERK Total, per tal de comprovar que la càrrega de MAPK en tots els punts era similar.

11. La fosforilació d'AKT es troba afectada en cèl·lules CD84 RBL-2H3

AKT és una serina/treonina cinasa que gràcies al seu domini PH s'uneix als PIP₃ generats per acció de la PI3K. Aquesta unió als PIP₃, permet que s'exposin els motius

fosforilables d'AKT, sobre els què actua la cinasa PDK1 (veure Introducció, apartat 4.2.4). AKT actua sobre diferents molècules efectores i factors de transcripció, intervenint en processos de reorganització del citoesquelet, diferenciació, cicle cel·lular, apoptosi, metabolisme, etc. (Kharas and Fruman, 2005). La fosforilació i activació d'AKT es considera un marcador indirecte de l'activació de la PI3K.

11.1 Les cèl·lules CD84 RBL-2H3 presenten alteracions en l'activació d'AKT

Per mirar si la interacció homotípica del receptor CD84 afecta a la via de la PI3K, es va fer un estudi de fosforilació d'AKT dependent d'IgE, comparant cèl·lules RBL-2H3 control amb cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3. Els resultats mostren com la fosforilació d'AKT es troba parcialment disminuïda en cèl·lules CD84 RBL-2H3 (Fig 20.), indicant que el receptor CD84 es troba involucrat en la via de la PI3K.

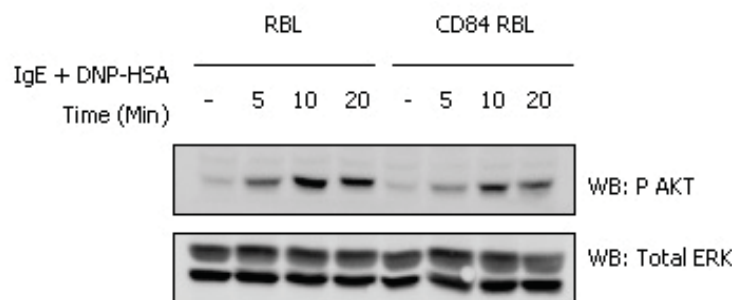


Fig 20. La fosforilació d'AKT es troba afectada en cèl·lules CD84 RBL-2H3 en comparació amb cèl·lules RBL-2H3 control. Cèl·lules RBL-2H3 control i cèl·lules CD84 RBL-2H3 es van incubar durant tota la nit amb 0.25µg/ml d'IgE anti-DNP. L'endemà es van activar amb una dosi de 50ng/ml de DNP-HSA, per la lligació de la IgE, durant 10 minuts, a 37°C. Tot seguit les cèl·lules es van lliurar, córrer en un gel SDS-PAGE al 10% i transferir a una membrana de PVDF. El *Western Blot* es va incubar posteriorment amb anticossos específics contra AKT fosforilat (anti-pAKT) i amb un anticòs anti-ERK Total, per tal de comprovar que la càrrega proteica en tots els punts era similar.

11.2 Els mutants que reverteixen l'efecte inhibitori del receptor CD84 presenten una fosforilació d'AKT normal en comparació amb cèl·lules RBL-2H3 control

Per tal d'estudiar l'estat de fosforilació d'AKT en els mutants CD84 Y279F i CD84 ΔY324 que reverteixen l'efecte inhibitori del receptor CD84, es va dur a terme un estudi similar a l'anterior (Fig 20.), en el què cèl·lules RBL-2H3, CD84 RBL-2H3, CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 ΔY324 RBL-2H3 van ser incubades tota la nit amb una dosi d'IgE anti-DNP i l'endemà activades amb una dosi de DNP-HSA durant 10 minuts. En la Fig 21.,

els resultats indiquen que la fosforilació d'AKT és més elevada en cèl·lules transfectades amb els mutants CD84 Y279F i CD84 Δ Y324 en comparació amb cèl·lules transfectades amb el receptor CD84 *wild type*, restaurant d'aquesta manera la inhibició de la fosforilació d'AKT dependent d'IgE que provoca el receptor CD84 *wild type* (Fig 21.).

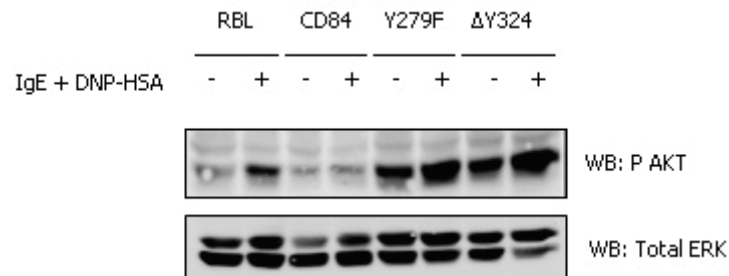


Fig 21. La fosforilació d'AKT es troba restaurada en cèl·lules CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3 respecte a la disminució observada en cèl·lules CD84 RBL-2H3. Cèl·lules RBL-2H3 control, CD84 RBL-2H3, CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3 es van incubar durant tota la nit amb 0.25 μ g/ml d'IgE anti-DNP i l'endemà es va procedir a la lligació de la IgE amb 50ng/ml de DNP-HSA durant 10 minuts, a 37°C. Posteriorment, les cèl·lules es van llisar, córrer en un gel SDS-PAGE al 10% i transferir a una membrana de PVDF, que es va incubar amb anticossos específics contra AKT fosforilat (anti-pAKT) i amb un anticòs anti-ERK Total, per tal de comprovar que la càrrega proteica en tots els punts era similar.

12. La secreció de citocines es troba alterada en cèl·lules CD84 RBL-2H3

Donat que la fosforilació de les MAPK P38 i JNK es troba molt reduïda en cèl·lules transfectades que expressen el receptor CD84, el següent pas va ser investigar si la interacció homofílica del CD84 inhibia de la mateixa manera la síntesi de citocines, ja que el resultat final de la via de les MAPK és l'activació de factors de transcripció, entre els quals es troben molts que condueixen a la síntesi de citocines (veure Introducció, apartat 4.1.3). Per aquest estudi es van transfectar cèl·lules RBL-2H3, CD84 RBL-2H3, CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3 amb un gen de TNF α reporter de luciferasa més un plàsmid de TK-Renilla. Les cèl·lules transfectades es van incubar durant tota la nit amb una dosi d'IgE anti-DNP i l'endemà es van activar amb una dosi de DNP-HSA durant 6 hores. Posteriorment es van llisar les cèl·lules i es va mesurar l'activitat luciferasa amb un luminòmetre. Els resultats mostren que el receptor CD84 *wild type* inhibeix la inducció de TNF α en cèl·lules RBL-2H3 transfectades amb el CD84. A més a més, aquesta inhibició es troba restaurada en cèl·lules RBL-2H3 transfectades

amb els mutants CD84 Y279F i CD84 Δ Y324, concomitant amb la seva capacitat de revertir l'efecte inhibitori del CD84 en la desgranulació i l'activació de MAPK (Fig 22A.). Els esdeveniments observats en aquest estudi són dependents d'IgE, ja que l'activació amb PMA més ionomicina de cèl·lules RBL-2H3 control i cèl·lules CD84 RBL-2H3 dona una inducció de TNF α similar (Fig 22B.).

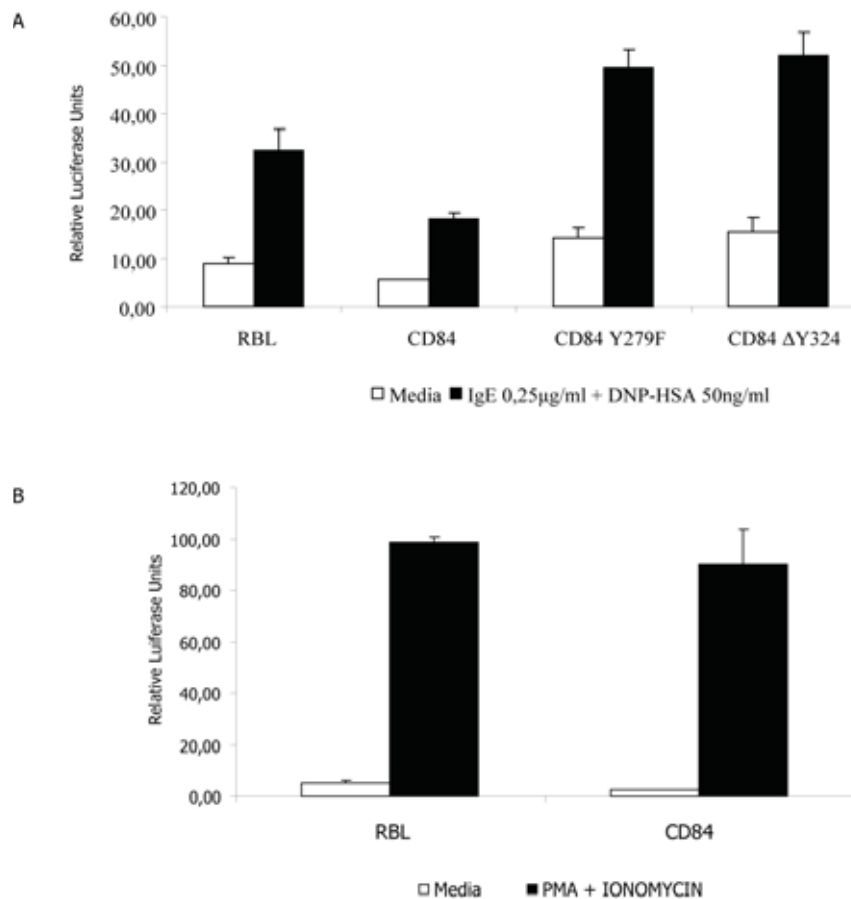


Fig 22. La síntesi de citocines es troba alterada en cèl·lules CD84 RBL-2H3. Es van transfectar cèl·lules RBL-2H3, CD84 RBL-2H3, CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3 (10×10^6 cèl·lules per grup) amb 5µg d'un gen de TNF α reporter de luciferasa més 1µg d'un plàsmid de TK-Renilla. Les cèl·lules transfectades en van incubar durant tota la nit amb una dosi de 0.25µg/ml d'IgE anti-DNP. L'endemà es va procedir a la lligació de la IgE amb 50ng/ml de DNP-HSA durant 6 hores a 37°C. Posteriorment es van lliar les cèl·lules i es va mesurar l'activitat luciferasa amb un luminòmetre (A). Per altra banda, cèl·lules RBL-2H3 i cèl·lules CD84 RBL-2H3 (10×10^6 cèl·lules per grup) es van transfectar amb 5µg d'un gen de TNF α reporter de luciferasa més 1µg d'un plàsmid de TK-Renilla. L'endemà les cèl·lules transfectades es van activar amb PMA (50ng/ml) més ionomicina (2.5µM), durant 6 hores a 37°C. Posteriorment es van lliar les cèl·lules i es va mesurar l'activitat luciferasa amb un luminòmetre (B). Les mesures es van fer per duplicat i les dades són representatives de tres experiments independents.

Els estudis amb la línia cel·lular RBL-2H3 han permès identificar el receptor CD84 com una molècula amb caràcter inhibitori en l'activació dels mastòcits i determinar quines

són les tirosines claus que mitjancen aquesta inhibició (Y279 i Y324). Per tal d'analitzar amb més detall el possible mecanisme d'activació d'aquest receptor, i els efectes de la fosforilació sobre aquestes dues tirosines claus, s'ha utilitzat la línia cel·lular COS. Aquesta línia permet sobre-expressar molècules humanes i fer estudis d'interacció entre elles. És per tant, un bon model per a l'estudi i la dissecció de la fosforilació del receptor CD84 i l'efecte en les tirosines 279 i 324.

B. RESULTATS OBTINGUTS AMB LA LÍNIA CEL·LULAR COS

La línia cel·lular COS són fibroblasts obtinguts del ronyó del mico verd africà que es troben infectades amb una versió del genoma del virus SV40, que permet a la cèl·lula hoste produir múltiples cicles de replicació del DNA viral (Gluzman, 1981). Per aquest motiu, aquesta línia cel·lular s'utilitza molt freqüentment com a sistema de transfecció transitori per produir proteïnes recombinants per realitzar estudis de biologia molecular, cel·lular i bioquímics (Edwards and Aruffo, 1993).

En l'estudi del receptor CD84, es va fer servir el sistema de transfecció transitori amb cèl·lules COS per determinar les cinases amb capacitat per fosforilar el CD84. També es va fer un estudi de dissecció de l'acció d'aquestes cinases sobre les diferents tirosines presents en la cua citoplasmàtica del receptor CD84, per tal de determinar si presenten una activitat diferencial respecte els quatre residus tirosina del CD84.

1. La cinasa LYN participa en la fosforilació del receptor CD84

LYN és una proteïna tirosina cinasa, de la família de les src-cinases, que es fosforila ràpidament després de l'agregació del FcεRI en mastòcits. Participa activament en la via primària d'activació dels mastòcits, tot i que també ha estat identificada com una de les possibles molècules reguladores mastocitàries negatives. És a dir, presenta dues possibles funcions: iniciar l'activació dels mastòcits, i participar en la seva regulació negativa (veure Introducció, apartats 4.1 i 5.2.2). Donat que és una cinasa clau en la senyalització mastocitària, i que ha estat involucrada en processos de senyalització negatius, es va fer un estudi per tal d'analitzar si la cinasa LYN té capacitat per fosforilar el CD84. Cèl·lules COS es van transfectar amb el cDNA del receptor CD84, juntament amb el de la cinasa LYN de ratolí (mLYN), en la seva forma *wild type*, o bé amb una forma mutada, K275M, on la lisina 275 s'ha canviat per una metionina, convertint-la en una cinasa catalíticament inactiva. 24 hores després de la transfecció, les cèl·lules van ser biotinitades, lliades i immunoprecipitades amb un anticòs específic contra el CD84. Els resultats mostren com la cinasa LYN fosforila perfectament el receptor CD84, mentre que la forma mutada de la cinasa (K275M) no té capacitat per fosforilar-lo (Fig 23.).

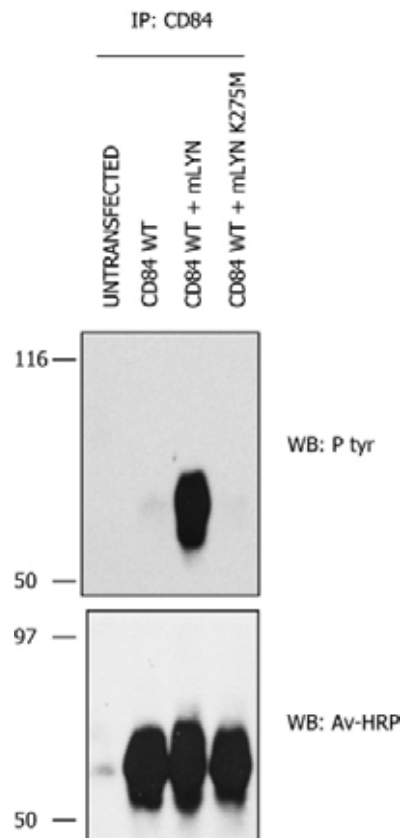


Fig 23. La cinasa mLYN fosforila el CD84. Cèl·lules COS es van transfectar amb 4µg del receptor CD84 i 2µg de la cinasa mLYN *wild type* o bé 2µg de la cinasa catalíticament inactiva mLYN K275M. 24 hores després de la transfecció (temps necessari perquè es puguin expressar els plàsmids transfectats), les cèl·lules van ser biotinitades, llisades i immunoprecipitades amb 2µg d'un anticòs anti-CD84. Posteriorment, les mostres es van córrer en un gel SDS-PAGE al 8% i transferir a una membrana de PVDF, que es va incubar amb diferents anticossos: anti-tirosines fosforilades i Avidina-HRP, per determinar els nivells del CD84 transfectat.

2. Fosforilació diferencial de les tirosines de la cua citoplasmàtica del receptor CD84 per la cinasa LYN

2.1 La mutació puntual de la tirosina 279 i la deleció de la tirosina 324 redueixen la fosforilació del CD84 per la cinasa mLYN

Donada la capacitat de la cinasa LYN de fosforilar el receptor CD84, el següent pas de l'estudi va ser determinar si la fosforilació del CD84 per la cinasa LYN resulta afectada quan el receptor presenta una mutació en alguna de les dues tirosines que tenen capacitat per revertir el seu efecte inhibitori (Y279 i Y324). Per aquest motiu es van transfectar cèl·lules COS amb els mutants Y279F i Δ Y324 del receptor del CD84, juntament amb la cinasa mLYN i es va estudiar el seu estat de fosforilació. També es

va incloure en aquest estudi la transfecció de cèl·lules COS amb el cDNA del mutant del CD84 al què li manca tota la cua citoplasmàtica (CD84 Δ Cyto), juntament amb la cinasa mLYN, per tal d'assegurar que la fosforilació observada es deu realment a la fosforilació de les tirosines de la cua citoplasmàtica del CD84. Segons els resultats mostrats en la Fig 24., la cinasa mLYN fosforila àmpliament al receptor CD84 *wild type*, mentre que les mutacions Y279F i Δ Y324 redueixen aquest estat de fosforilació. En el cas de la mutació Y279F, la disminució de la fosforilació del CD84 és major que en el cas de la mutació Δ Y324. El mutant Δ Cyto CD84 no presenta cap tipus de fosforilació, donat que té tota la cua citoplasmàtica delecionada (Fig 24.).

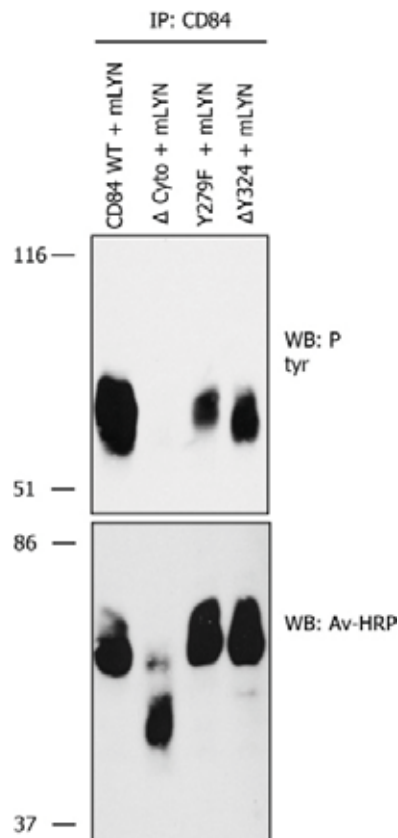


Fig 24. Les mutacions Y279F i Δ Y324 disminueixen la fosforilació del receptor CD84 per la cinasa mLYN. Cèl·lules COS es van transfectar amb 4 μ g de les diferents formes del receptor CD84 (*Wild Type*, Δ Cyto CD84, Y279F i Δ Y324) juntament amb 2 μ g de la cinasa mLYN. 24 hores després de la transfecció, les cèl·lules van ser biotinitades, llistades i immunoprecipitades amb 1 μ g d'un anticòs anti-CD84. Posteriorment, les mostres es van córrer en un gel SDS-PAGE al 8% i transferir a una membrana de PVDF, que es va incubar amb diferents anticossos: anti-tirosines fosforilades i Avidina-HRP.

2.2 La combinació de les mutacions Y279F i Δ Y324 inhibeix completament la fosforilació del CD84 per la cinasa mLYN

Tal com s'ha demostrat abans, les tirosines 279 i 324 són importants per al mecanisme inhibitori del CD84, ja que les seves mutacions puntuals reverteixen la inhibició de la desgranulació mitjançada pel CD84 (Fig 13.), i la reducció en la fosforilació de MAPK com ERK1/2, P38 i JNK (Fig 19.). També s'ha demostrat que la presència d'aquestes mutacions redueix els nivells de fosforilació del receptor CD84 per la cinasa mLYN (Fig 24.). Donat aquest últim resultat, es va decidir fer un estudi de transfecció de cèl·lules COS amb el cDNA de la cinasa mLYN i d'un mutant del receptor CD84 que presenta alhora una mutació en la tirosina 279 i una deleció de les tirosines 299 (no implicada en el mecanisme inhibitori del CD84) i 324. Després de biotinyllar, llsar i immunoprecipitar les cèl·lules, les mostres es van córrer en un gel i transferir a una membrana, que es va incubar amb un anticòs anti-tirosines fosforilades, per fer un estudi de fosforilació; i amb Avidina-HRP, per determinar els nivells de transfecció del CD84. En els resultats obtinguts s'observa com la fosforilació del receptor CD84 s'aboleix completament quan les dues tirosines que reverteixen la seva activitat inhibidora (Y279 i Y324) es troben mutades, indicant que ambdues tirosines són els principals substrats de la cinasa LYN (Fig 25.).

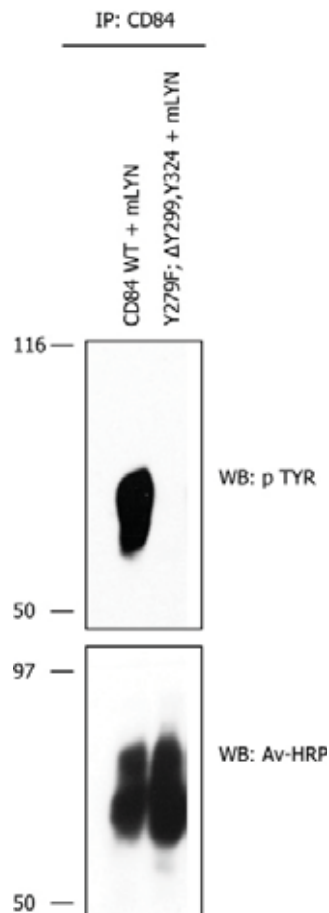


Fig 25. La combinació de les mutacions Y279F i ΔY324 aboleixen la fosforilació del receptor CD84 per la cinasa mLYN. Cèl·lules COS es van transfectar amb 2μg de la cinasa mLYN, juntament amb 4μg de dues formes del receptor CD84: *Wild Type* o bé Y279F;ΔY299,Y324. 24 hores després de la transfecció, les cèl·lules es van biotinilar, lliurar i immunoprecipitar amb 1μg d'un anticòs anti-CD84. Posteriorment, es van córrer en un gel SDS-PAGE al 8% i transferir a una membrana de PVDF, que es va incubar amb diferents anticossos: anti-tirosines fosforilades i Avidina-HRP.

3. La cinasa FES participa en la fosforilació del receptor CD84

La cinasa FPS/FES participa en molts processos de senyalització dels mastòcits, com per exemple en la reorganització del citoesquelet, gràcies al seu domini FCH (veure Introducció, apartat 5.2.2). Per altra banda, el receptor CD84, presenta una funció inhibidora en mastòcits i s'ha vist involucrat en processos de reorganització del citoesquelet d'actina (Fig 4.). Tenint en compte aquestes dades i el fet que la cinasa FPS/FES es troba implicada en senyalitzacions negatives en els mastòcits, es va considerar interessant realitzar un estudi per determinar la capacitat de la cinasa FPS/FES en la fosforilació del CD84. Per aquest motiu es van transfectar cèl·lules COS amb el cDNA del receptor CD84 en presència o absència del cDNA de la cinasa

FPS/FES, i es va fer un estudi d'immunoprecipitació amb un anticòs anti-CD84. L'estudi de fosforilació demostra com la cinasa FES té capacitat per fosforilar perfectament el CD84 (Fig 26.).

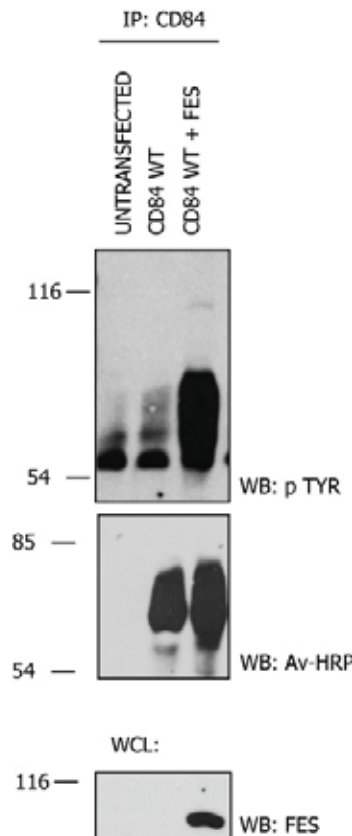


Fig 26. La cinasa FPS/FES fosforila el CD84. Cèl·lules COS es van transfectar amb 4µg del receptor CD84 en presència o absència de 4µg de la cinasa FPS/FES. 24 hores després de la transfecció, les cèl·lules van ser biotinitilades, llistades i immunoprecipitades amb 2µg d'un anticòs anti-CD84. Posteriorment, les mostres es van córrer en un gel SDS-PAGE al 8% i transferir a una membrana de PVDF, que es va incubar amb diferents anticossos: anti-tirosines fosforilades, anti-FPS/FES i Avidina-HRP.

4. Fosforilació diferencial de les tirosines de la cua citoplasmàtica del receptor CD84 per la cinasa FES

4.1 La mutació puntual de la tirosina 279 i la deleció de la tirosina 324 redueixen la fosforilació del CD84 per la cinasa FPS/FES.

Tal com es va fer per la cinasa LYN, en el cas de la cinasa FPS/FES, es va ampliar l'estudi de fosforilació del receptor CD84 als mutants que reverteixen el seu efecte inhibitori (Y279F i ΔY324), per tal de determinar si la fosforilació del CD84 per part de FPS/FES és diferencial per les tirosines que presenta a la seva cua citoplasmàtica. En

aquest cas l'estudi és interessant tenint en compte que la tirosina Y324 es troba dins un possible motiu d'unió a la cinasa FPS/FES. Amb aquesta finalitat, cèl·lules COS es van transfectar amb el cDNA dels mutants Y279F i Δ Y324 del CD84, juntament amb el cDNA de la cinasa FPS/FES. En aquest estudi es va incloure a més a més un nou grup de transfecció: el cDNA de FPS/FES, juntament al d'un doble mutant del receptor CD84 que presenta canvis alhora en els dos residus tirosina no implicats en el mecanisme inhibitori del CD84 (Y262F/Y299F). La finalitat en aquest cas és ampliar una mica més l'anàlisi del mecanisme de fosforilació que exerceix la cinasa FPS/FES sobre les tirosines de la cua citoplasmàtica del receptor CD84. Les cèl·lules transfectades es van tractar de la següent manera: biotinitiació, lisi i immunoprecipitació amb el CD84. Després de córrer les mostres en un gel SDS-PAGE, i de transferir-les a una membrana, es van fer els pertinents estudis de fosforilació. A la Fig 27., els resultats mostren que la cinasa FPS/FES fosforila àmpliament el receptor CD84 *wild type*, mentre que les mutacions Y279F i Δ Y324 redueixen aquest estat de fosforilació. En aquest cas, al contrari del que succeeix amb la cinasa LYN, la mutació Y279F disminueix significativament la fosforilació del CD84, mentre que amb la mutació Δ Y324 aquesta fosforilació està pràcticament abolida. Pel que fa al mutant Y262F/Y299F, la fosforilació del CD84 és molt similar a la del CD84 *wild type*, però la seva mobilitat electroforètica es veu modificada (la banda corresponent al CD84 es troba indicada amb fletxes a la Fig 27.). Aquest fenomen apareix en presència de la mutació Y299F, tal com es pot apreciar també a la Fig 11.

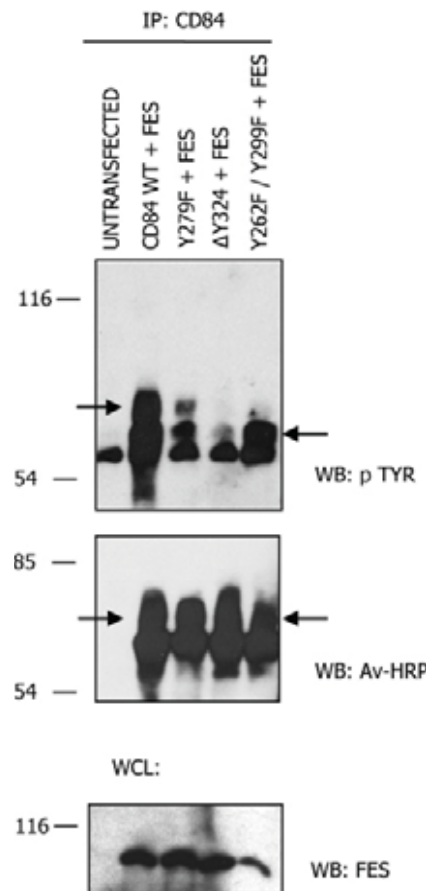


Fig 27. Les mutacions Y279F i Δ Y324 disminueixen la fosforilació del receptor CD84 per la cinasa FPS/FES. Cèl·lules COS es van transfectar amb 4 μ g de les diferents formes del receptor CD84 (*Wild Type*, Y279F, Δ Y324 i Y262F/Y299F) juntament amb 4 μ g de la cinasa FPS/FES. 24 hores després de la transfecció, les cèl·lules van ser biotinitades, llistades i immunoprecipitades amb 2 μ g d'un anticòs anti-CD84. Posteriorment, les mostres es van córrer en un gel SDS-PAGE al 8% i transferir a una membrana de PVDF, que es va incubar amb diferents anticossos: anti-tirosines fosforilades, anti-FPS/FES i Avidina-HRP.

4.2 La combinació de les mutacions Y279F i Δ Y324 inhibeix completament la fosforilació del CD84 per la cinasa FPS/FES

Seguint els mateixos passos que es van fer per l'estudi de la cinasa LYN en la fosforilació del receptor CD84, es va voler determinar quin efecte té la combinació de les dues mutacions que reverteixen l'efecte inhibitori del CD84 sobre la fosforilació d'aquest receptor per la cinasa FPS/FES. Per aquest motiu, cèl·lules COS es van transfectar amb el cDNA de la cinasa FPS/FES i del mutant del receptor CD84 que presenta alhora una mutació en la tirosina 279 i una deleció de les tirosines 299 i 324, i es van immunoprecipitar amb un anticòs anti-CD84. Els resultats indiquen que, tal com succeeix en el cas de LYN (Fig 25.), en els resultats obtinguts s'observa com la fosforilació del receptor CD84 per la cinasa FPS/FES també s'aboleix completament

quan les dues tirosines que reverteixen la seva activitat inhibidora (Y279 i Y324) es troben mutades (Fig 28.)

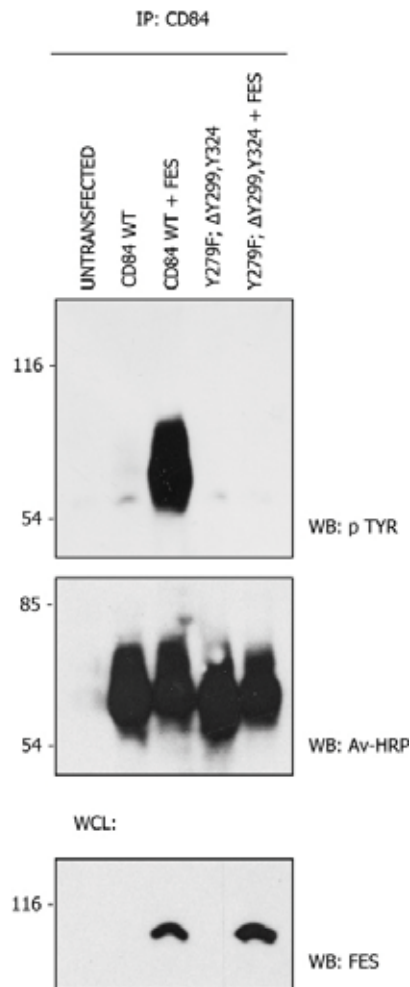


Fig 28. La combinació de les mutacions Y279F i ΔY324 aboleixen la fosforilació del receptor CD84 per la cinasa FPS/FES. Cèl·lules COS es van transfectar amb 4μg de dues formes del receptor CD84: *Wild Type* o bé Y279F;ΔY299,Y324, en presència o absència de 4μg de la cinasa FPS/FES. 24 hores després de la transfecció, les cèl·lules es van biotinilar, lliurar i immunoprecipitar amb 2μg d'un anticòs anti-CD84. Posteriorment, es van córrer en un gel SDS-PAGE al 8% i transferir a una membrana de PVDF, que es va incubar amb diferents anticossos: anti-tirosines fosforilades, anti-FES i Avidina-HRP.

5. La cinasa FYN fosforila totes les tirosines del receptor CD84

FYN és una cinasa de la família de les Src-cinases amb capacitat per fosforilar el receptor CD84, tal com es demostra a la Fig 11. La cinasa FYN es troba implicada en processos de senyalització positius en mastòcits (la seva mutació dóna lloc a fenotips d'hipodesgranulació) (veure Introducció, Taula 1), i per aquest motiu és una candidata poc probable a fosforilar diferencialment les tirosines implicades en el mecanisme

inhibitori del CD84 (Y279F i Δ Y324). Tot i això, es va realitzar un estudi de fosforilació del mutant del CD84 que presenta una mutació en la tirosina 279 i una deleció de les tirosines 299 i 324. Amb aquesta finalitat es van transfectar cèl·lules COS amb aquest mutant, juntament amb la cinasa FYN, o bé amb la cinasa FPS/FES, per poder d'aquesta manera fer un anàlisi comparatiu del mecanisme de fosforilació d'aquestes dues cinases. En els resultats de la Fig 29. s'observa, tal com ja s'havia vist en la Fig 28., que la cinasa FES no té capacitat per fosforilar la forma del receptor CD84 que presenta mutacions en les dues tirosines que reverteixen el seu fenotip inhibitori; mentre que la cinasa FYN encara conserva aquesta capacitat, indicant una menor predisposició de fosforilació diferencial segons les tirosines (Fig 29.)

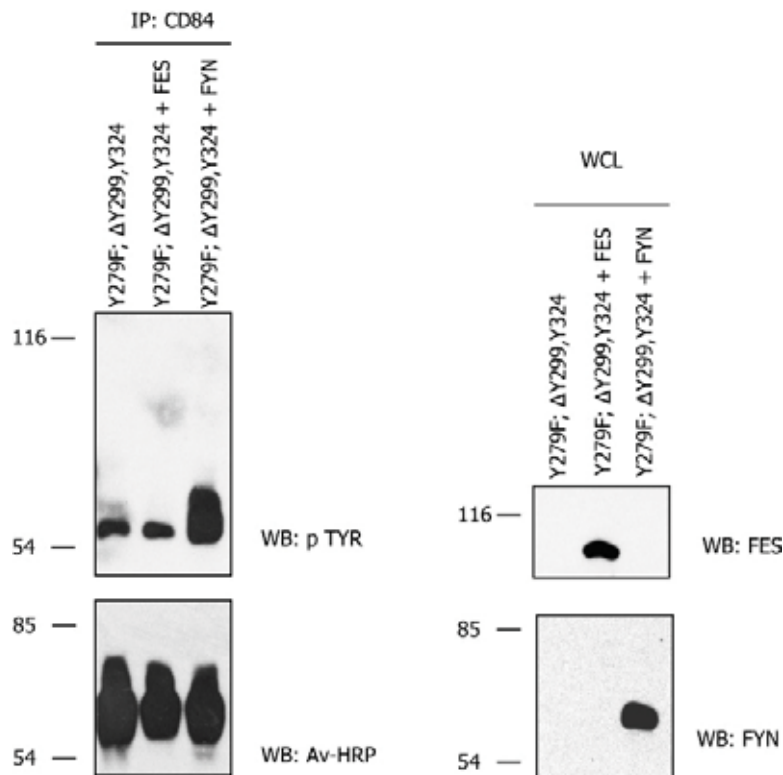


Fig 29. La cinasa FYN conserva la capacitat de fosforilar la forma del receptor CD84 que presenta la combinació de les mutacions Y279F i Δ Y324. Cèl·lules COS es van transfectar amb 4 μ g de la forma del receptor CD84 Y279F; Δ Y299,Y324, conjuntament amb 4 μ g de la cinasa FPS/FES, o bé amb 2 μ g de la cinasa FYN. 24 hores després de la transfecció, les cèl·lules es van biotinilar, lligar i immunoprecipitar amb 2 μ g d'un anticòs anti-CD84. Posteriorment, es van córrer en un gel SDS-PAGE al 8% i transferir a una membrana de PVDF, que es va incubar amb diferents anticossos: anti-tirosines fosforilades, anti-FES, anti-FYN i Avidina-HRP.

Després dels estudis en cèl·lules RBL-2H3 sobre el paper del receptor CD84 en l'activació mastocitària, i del seu mecanisme d'activació/fosforilació en cèl·lules COS, és

important corroborar les dades obtingudes en un model fisiològicament més proper als mastòcits humans obtinguts en cultius primaris. El fet que la línia cel·lular RBL-2H3 provingui d'una línia cel·lular de rata, fa necessari l'estudi del paper del CD84 en un model humà, i les implicacions d'aquest receptor en la modulació de les funcions dependents d'IgE en mastòcits humans.

C. RESULTATS OBTINGUTS AMB LA LÍNIA CEL·LULAR LAD2

La línia cel·lular LAD-2 (*Laboratory of allergic diseases 2*) és una línia de mastòcits humans derivada d'una leucèmia/sarcoma mastocitari. Es va establir recentment a partir dels aspirats de la medul·la òssia de pacients amb aquesta patologia. La línia cel·lular LAD-2 presenta totes les característiques ultra-estructurals dels mastòcits humans (expressen el FcεRI i tots els marcadors mastocitaris, histamina intracitoplasmàtica, triptasa i cimasa), no tenen cap mutació en el receptor c-KIT i requereixen SCF (*Stem cell factor*) per sobreviure. També s'ha descrit que alliberen β-hexosaminidasa després de l'agregació del FcεRI (Kirshenbaum et al., 2003). La disponibilitat d'aquesta línia cel·lular i la seva similitud als cultius primaris de mastòcits humans, converteixen les LAD-2 en un bon model fisiològic per a l'estudi de la funció i la biologia dels mastòcits humans (Bischoff, 2007). Per altra banda, també serveix en aquest estudi, per tal de confirmar en una línia humana fisiològicament més propera als efectes dels mastòcits de cultius primaris, els efectes observats en la línia cel·lular RBL-2H3.

1. Estudi d'expressió dels receptors de família del CD150 en la línia cel·lular LAD-2: Elevada expressió del receptor CD84 i expressió induïble del receptor CD150

1.1 La línia cel·lular LAD-2 presenta una elevada expressió del receptor CD84

Per tal de poder confirmar en un model mastocitari fisiològic més proper als humans, com és la línia cel·lular LAD2, els efectes inhibitoris del receptor CD84 observats en la línia cel·lular RBL-2H3, el primer pas va ser caracteritzar quina és l'expressió del receptor CD84 en les cèl·lules LAD2. Per aquest motiu, es van fer estudis per citometria de flux i estudis d'amplificació per PCR (*Polymerase Chain Reaction*) mitjançant l'ús d'oligonucleòtids específics (veure Materials i Mètodes, Taula 2.). També es va dur a terme una immunoprecipitació amb un anticòs específic anti-CD84 (prèvia biotinitalació i lisi cel·lulars) i posteriorment es va estudiar l'expressió del CD84 per *Western Blot* (Fig 30A., 30B. i 30C.).

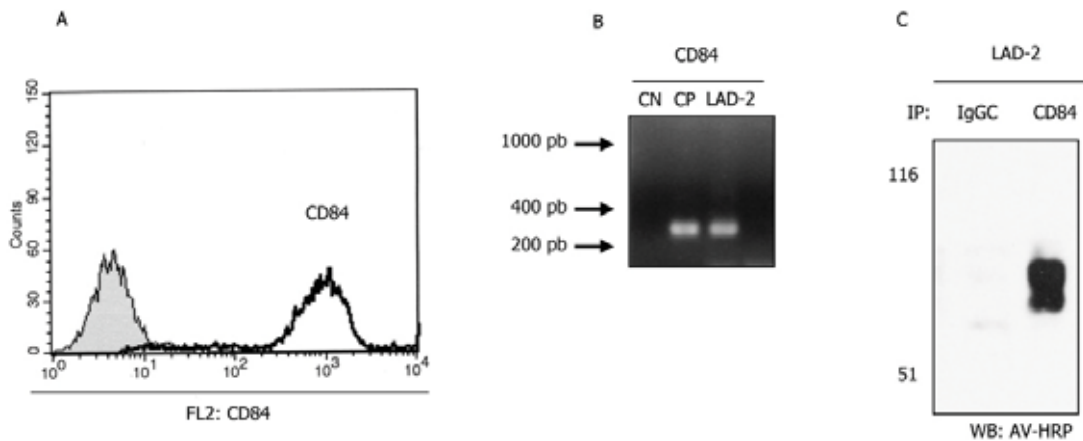


Fig 30. Alta expressió del receptor CD84 en la línia LAD-2. Es va fer un estudi de l'expressió del receptor CD84 en la línia cel·lular mastocitària LAD-2. Es va caracteritzar la seva expressió amb anticossos específics anti-CD84 per citometria de flux (A). També es va amplificar la part corresponent a la cua citoplasmàtica del gen que codifica pel receptor CD84, a partir de cDNA obtingut de les LAD-2. Com a control positiu (CP) es utilitzar la seqüència del cDNA corresponent al CD84 humà, clonat dins el vector pCINeo; i com a control negatiu (CN) es va fer servir aigua estèril (B). Per últim, 4×10^6 cèl·lules LAD-2 per grup van ser biotinitades, llistades i immunoprecipitades amb $2 \mu\text{g}$ d'una IgG isotípica o $2 \mu\text{g}$ d'un anticòs anti-CD84. Posteriorment, les mostres es van córrer en un gel SDS-PAGE al 10% i es van transferir a una membrana de PVDF, que es va incubar amb Avidina-HRP per determinar els nivells del receptor CD84 immunoprecipitat.

1.2 Expressió d'altres receptors de la família SLAM: CD244 i CD229

L'estudi d'expressió de receptors leucocitaris en les LAD-2 es va ampliar a altres membres de la família SLAM. Es va determinar mitjançant citometria de flux l'expressió dels receptors CD244 i CD229. Els resultats mostren com la línia cel·lular LAD-2 no expressa el CD244 ni el CD229 (Fig 31).

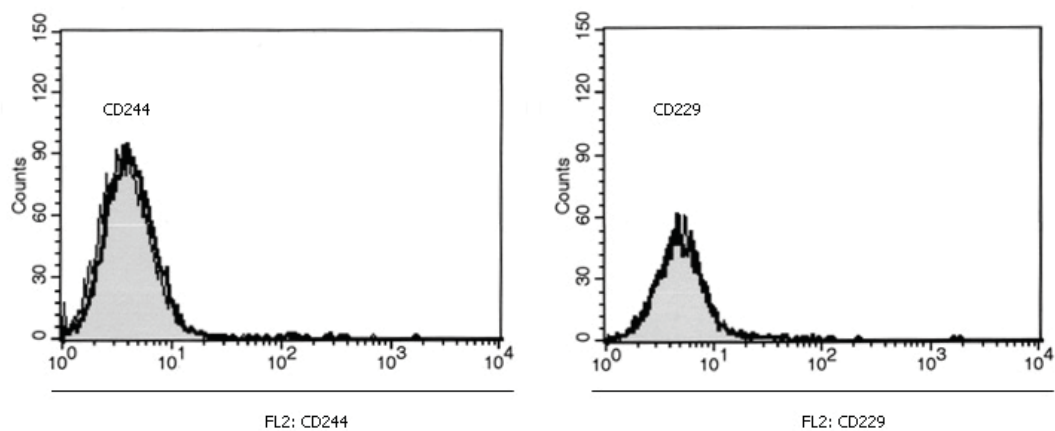


Fig 31. La línia cel·lular LAD-2 no expressa els receptors CD244 i CD229. Mitjançant l'ús d'anticossos específics per citometria de flux es va estudiar l'expressió dels receptors CD244 i CD229 en cèl·lules LAD-2.

1.3 Modulació de l'expressió dels receptors CD84 i CD150 després de l'activació

Per tal de determinar si l'activació de les cèl·lules LAD-2 comporta canvis en l'expressió d'alguns receptors membres de la família SLAM, cèl·lules LAD-2 es van activar amb una dosi de 50ng/ml de PMA més 2.5µM de ionomicina, durant 30 minuts (pel receptor CD84) o 24 hores (pels receptors CD150, CD244 i CD229), a 37°C. Mitjançant l'ús d'anticossos específics per citometria de flux, es van estudiar els nivells d'expressió dels receptors CD84, CD150, CD244 i CD229 abans i després de l'activació. L'expressió dels receptors CD244 i CD229 no varia i es manté negativa després de l'activació. Els resultats mostrats a la Fig 32. indiquen que l'expressió del receptor CD84 disminueix posteriorment a l'activació amb PMA més ionomicina, mentre que l'expressió del receptor CD150, negativa en estat basal, s'indueix després de l'activació (Fig 32.).

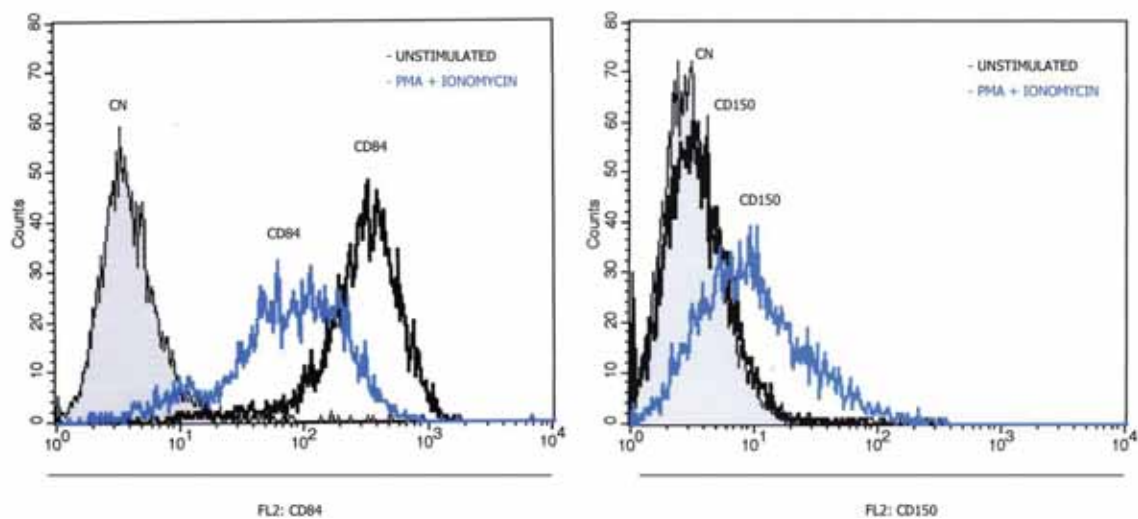


Fig 32. Disminució de l'expressió del receptor CD84 i expressió induïble del receptor CD150 després de l'activació. 3×10^5 cèl·lules LAD2 es van activar amb PMA (50ng/ml) més ionomicina (2.5µM), durant 30 minuts (en l'estudi del CD84) o 24 hores (en l'estudi del CD150), a 37°C. Posteriorment es van utilitzar anticossos específics per estudiar, mitjançant citometria de flux, l'expressió dels receptors CD84 i CD150.

2. Estudi d'expressió de molècules de senyalització intracel·lular en cèl·lules LAD-2

2.1 La molècula adaptadora SAP no es troba expressada en cèl·lules LAD-2

L'adaptador SAP és una molècula important en la senyalització dels receptors de la família del CD150, ja que la seva unió als motius ITSM d'aquests receptors juga un paper important en la regulació de l'activació i les funcions efectores de diversos tipus de cèl·lules del sistema immunitari (Ma et al., 2007). Per altra banda, el receptor CD84 presenta a la seva cua citoplasmàtica dos motius ITSM per a la seva unió amb la família d'adaptadors SAP i EAT-2 i s'ha demostrat que el residu Y262 és crucial per al reclutament de SAP (veure Resultats, Fig 11.). El receptor CD150, l'expressió del qual augmenta en cèl·lules LAD-2 després de l'activació amb PMA més ionomicina (Fig 32.), també presenta a la seva cua citoplasmàtica 2 motius ITSM d'unió a SAP: el primer motiu és susceptible d'unir-se a SAP independentment de fosforilació; mentre que el segon motiu requereix ser fosforilat per tal d'interaccionar amb SAP (Cocks et al., 1995; Latour et al., 2001; Sayos et al., 1998). Per aquest motiu es va analitzar, tant per amplificació per PCR, mitjançant l'ús d'oligonucleòtids específics (veure Materials i Mètodes, Taula 2.); com en estudis amb llisats cel·lulars, la presència de l'adaptador SAP en cèl·lules LAD-2. Els resultats mostren que aquest tipus cel·lular no expressa la molècula adaptadora SAP en condicions basals (Fig 33A. i 33B.).

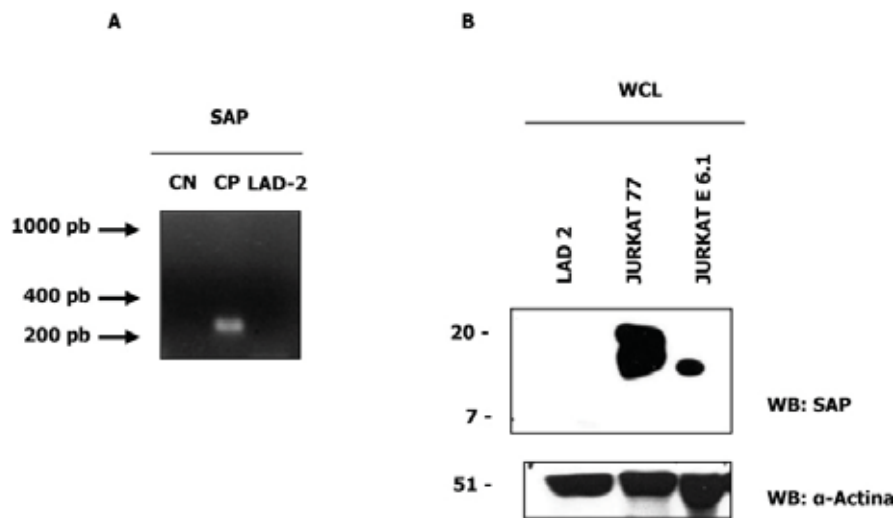


Fig 33. L'adaptador SAP no s'expressa en cèl·lules LAD-2. Mitjançant oligonucleòtids específics es va amplificar per PCR part del gen corresponent a la molècula adaptadora SAP, a partir de cDNA obtingut de les LAD-2. Com a control positiu (CP) es va utilitzar la seqüència de cDNA de SAP-Flag, clonada dins el vector pCMV2-Flag (Sayos et al., 1998); i com a control negatiu (CN) es va fer servir aigua estèril (A). També es van obtenir els llisats de 1×10^6 cèl·lules LAD-2, es van córrer en un gel SDS-PAGE al 12% i es van transferir a una membrana de PVDF, que es va incubar amb un anticòs anti-SAP per determinar els nivells d'aquesta molècula adaptadora. Com a control positiu de la presència de SAP, es van utilitzar els llisats de 1×10^6 cèl·lules Jurkat de dos tipus diferents (Jurkat 77 i Jurkat E6.1), models de limfòcits T (B).

2.2 La línia cel·lular LAD-2 expressa la cinasa FPS/FES

La cinasa FPS/FES s'activa després de la lligació del FcεRI i s'ha descrit que participa en la reorganització del citoesquelet, afectant d'aquesta manera els complexos de senyalització creats pel receptor. Es pensa que aquesta cinasa podria tenir un paper en la regulació de la inflamació (veure Introducció, apartat 5.2.2). Donat que aquesta cinasa es troba implicada en senyalitzacions negatives en els mastòcits, i que el receptor CD84 presenta una funció inhibidora de certs processos com la desgranulació i la síntesi de citocines, i a més es troba implicat en processos de reorganització del citoesquelet, es va realitzar un estudi per determinar la presència o absència de la cinasa FPS/FES en la línia cel·lular LAD-2, per tal de poder analitzar posteriorment, si aquesta cinasa estaria implicada en el mecanisme inhibitori del CD84. En aquest estudi es van obtenir llisats de cèl·lules LAD-2, que posteriorment es van córrer en un gel SDS-PAGE i es van transferir a una membrana, que es va incubar amb un anticòs específic anti-FPS/FES. Els resultats mostren com les cèl·lules LAD-2 sí expressen aquesta cinasa (Fig 34.).

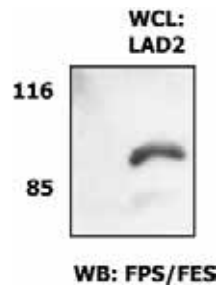


Fig 34. La cinasa FPS/FES es troba expressada en la línia cel·lular LAD-2. 5×10^5 cèl·lules LAD2 es van lliurar i les mostres lliurades es van córrer en un gel SDS-PAGE al 8%. Posteriorment, mitjançant la tècnica del *Western Blot*, es va realitzar la transferència a una membrana de PVDF, que es va incubar amb un anticòs específic anti-FPS/FES.

3. La lligació de la IgE comporta una disminució de la polimerització del citoesquelet d'actina en cèl·lules LAD-2

3.1 Determinació de l'expressió del FcεRI en cèl·lules LAD-2

Per tal de determinar la capacitat d'activació i de senyalització citoplasmàtica de la línia cel·lular LAD-2 a través del FcεRI, el primer va ser determinar, mitjançant l'ús d'anticòs específics per citometria de flux, l'expressió del FcεRI en les LAD-2, que ja havia estat caracteritzada prèviament (Kirshenbaum et al., 2003). En la Fig 35. es confirma que aquesta línia cel·lular mostra bons nivells del receptor (Fig 35.).

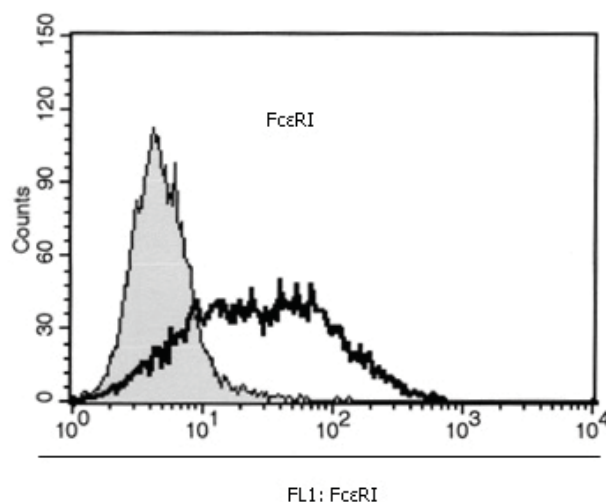
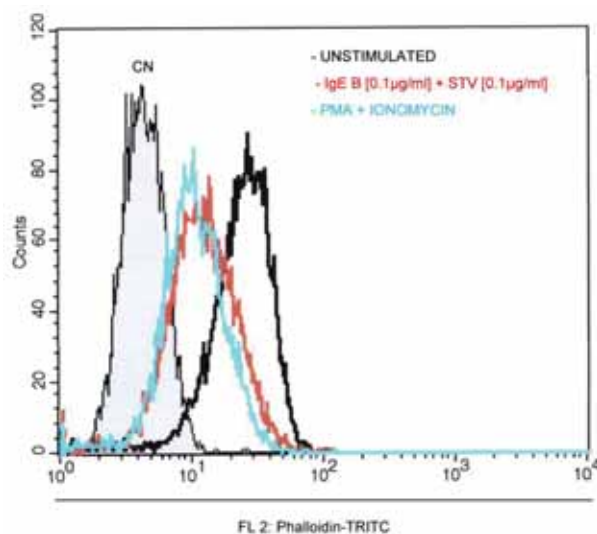


Fig 35. Les cèl·lules LAD-2 mostren bons nivells de FcεRI. Es va determinar mitjançant l'ús d'un anticòs específic anti-FcεRI i citometria de flux, els nivells d'expressió del receptor d'alta afinitat per la IgE en la línia cel·lular LAD-2.

3.2. Alteració de la polimerització del citoesquelet d'actina en cèl·lules LAD-2 després de l'activació a través del FcεRI

Durant els processos de senyalització, es generen complexos moleculars que requereixen una adequada reorganització del citoesquelet. L'estudi amb cèl·lules RBL-2H3, va mostrar que l'activació a través del FcεRI comporta un augment del procés de *ruffling* de la membrana cel·lular (Fig 4.). En el cas de les LAD-2 es va utilitzar aquesta eina per tal de determinar el grau de polimerització d'actina en cèl·lules activades a través del FcεRI. Es va afegir un grup de LAD-2 activades mitjançant PMA+Ionomicina per tal de comparar diferències en la polimerització d'actina en ambdós casos. En el resultat s'observa com l'activació de cèl·lules LAD-2, tant a través del FcεRI, com a través d'estímuls potents (PMA+Ionomicina), comporta una disminució de la polimerització d'actina, ja que la unió de la Phalloïdina amb la forma F-actina és menor (Fig 36.).



	%	MFI
UNSTIMULATED	97.36	26.13
IgE B [0.1µg/ml] + STV [0.1µg/ml]	78.27	15.67
P+I	72.57	13.50

Fig 36. L'activació a través del FcεRI promou la despolimerització d'actina en cèl·lules LAD-2.

En aquest estudi es van usar 3×10^5 cèl·lules LAD-2 per punt d'activació. Les cèl·lules es van incubar durant tota la nit amb una dosi de 0.1µg/ml d'IgE biotilada. L'endemà es van rentar i es van activar amb 0.1µg/ml d'estreptavidina, o bé amb una dosi de PMA (50ng/ml) més ionomicina (2.5µM). Posteriorment, les cèl·lules es van fixar amb paraformaldehid al 4%, permeabilitzar amb Saponina al 0.1%, bloquejar amb BSA a l'1% i marcar per citometria de flux amb Phalloïdina conjugada a TRITC. Els marcatges mostrats són representatius de 3 experiments independents.

4. El tractament amb un anticòs monoclonal contra el CD84 altera la despolimerització del citoesquelet d'actina en cèl·lules LAD-2, després de la lligació de la IgE

Els estudis de citoesquelet amb cèl·lules RBL-2H3 mostren que la presència del receptor CD84 disminueix el procés de *ruffling* de la membrana cel·lular induït per la senyalització del FcεRI (Fig 4.). La línia RBL-2H3, no obstant, representa un model de mastòcit de rata que en aquest cas sobre-expressa el CD84. Per tal de determinar l'efecte d'aquest receptor sobre la reorganització del citoesquelet d'una línia mastocitària humana més similar al model fisiològic humà, com és la línia cel·lular LAD-2, es van fer estudis potenciant la funció del CD84 mitjançant l'ús d'un anticòs monoclonal anti-CD84. Es va utilitzar un anticòs anti-CD84 biotinilat, per tal que la posterior addició d'estreptavidina tingui efecte de co-ligació tant de la IgE biotinilada, com de l'anticòs biotinilat, permetent d'aquesta manera veure efectes de co-modulació del receptor CD84 en l'activació depenent d'IgE. Un cop determinat que l'activació de les cèl·lules LAD-2 a través del FcεRI comporta una despolimerització del citoesquelet d'actina, el proper pas va ser analitzar si el receptor CD84 altera aquest efecte de despolimerització observat en l'activació de les LAD-2. Per aquest motiu, es va fer un estudi comparatiu de l'estat de polimerització de l'actina en cèl·lules LAD-2 tractades amb un anticòs contra el CD84 o bé amb una IgG isotípica. Segons els resultats, la despolimerització observada en activar les cèl·lules a través del FcεRI no és tan pronunciada en el cas de cèl·lules LAD-2 en les que s'ha potenciat l'acció del CD84 mitjançant l'ús d'un anticòs anti-CD84 (Fig 37.).

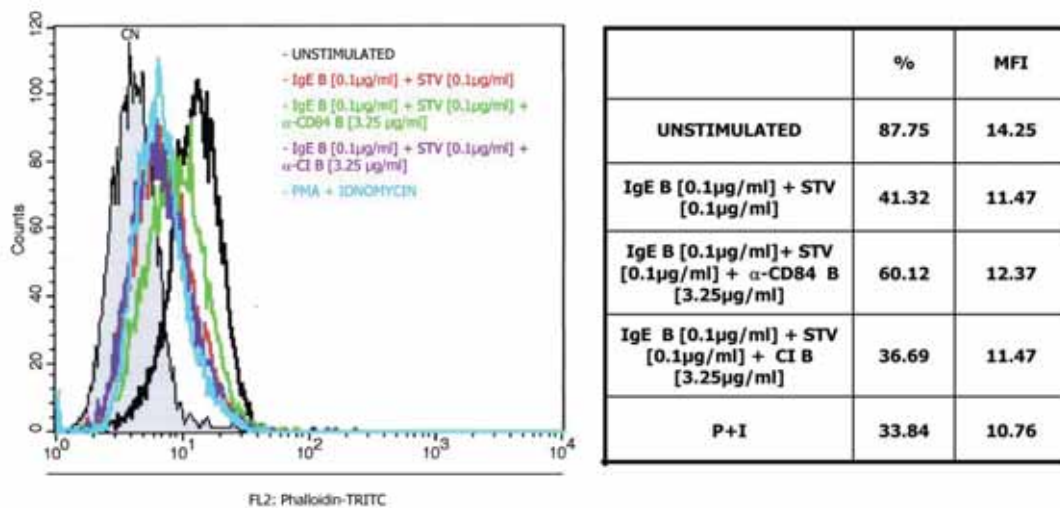


Fig 37. El tractament amb un anticòs monoclonal contra el CD84 altera la despolimerització d'actina dependent d'IgE en cèl·lules LAD-2. En aquest estudi es van usar 3×10^5 cèl·lules LAD-2 per punt d'activació. Les cèl·lules es van sensibilitzar durant tota la nit amb una dosi de $0.1 \mu\text{g/ml}$ d'IgE biotinitada i l'endemà es van incubar amb una dosi de $3.25 \mu\text{g/ml}$ d'un anticòs biotinitat anti-CD84, o bé d'una IgG isotípica biotinitada. Posteriorment, les cèl·lules es van rentar i activar amb $0.1 \mu\text{g/ml}$ d'estreptavidina, o bé amb una dosi de PMA (50ng/ml) més ionomicina ($2.5 \mu\text{M}$). Tot seguit, es van fixar amb paraformaldehid al 4%, permeabilitzar amb Saponina al 0.1%, bloquejar amb BSA a l'1% i marcar per citometria de flux amb Phalloidina conjugada a TRITC. Els marcatges mostrats són representatius de 3 experiments independents.

5. Corba dosi-resposta en la desgranulació dependent d'IgE en cèl·lules LAD-2

Per estudiar la capacitat de desgranulació mitjançada per la IgE en cèl·lules LAD-2, es va a dur a terme un estudi amb una dosi fixa d'IgE biotinitada i diferents dosis d'estreptavidina (que té la funció de lligar la IgE, mimetitzant d'aquesta manera l'efecte de l'antigen), per tal de definir la concentració òptima de l'estímul que s'utilitza per lligar la IgE. D'aquesta manera es va determinar la capacitat de resposta que presenta aquesta línia cel·lular enfront d'activacions per via del FcεRI. En aquest estudi també es va incloure una comparació de resposta de les cèl·lules LAD-2 que s'han incubat tota la nit amb IgE biotinitada i SCF; i cèl·lules LAD-2 que han estat tota la nit incubant-se amb IgE biotinitada, però sense SCF. Segons dades reportades, l'addició de SCF conjuntament amb l'antigen que provoca la lligació de la IgE, condueix a un augment en el procés de desgranulació (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). És per aquest motiu que es va voler comparar la diferència entre els nivells de desgranulació en presència o absència de factor de creixement més rellevant en mastòcits, el SCF. Els resultats mostren com les LAD-2 presenten una resposta de desgranulació òptima a

una dosi de 0.1µg/ml. A dosis molt inferiors, els nivells de desgranulació disminueixen molt, però encara són detectables. En experiments futurs es va escollir la dosi de 0.1µg/ml com a concentració òptima per la lligació de la IgE. La presència de SCF augmenta la desgranulació en un percentatge de l'ordre del 20% (Fig 38.).

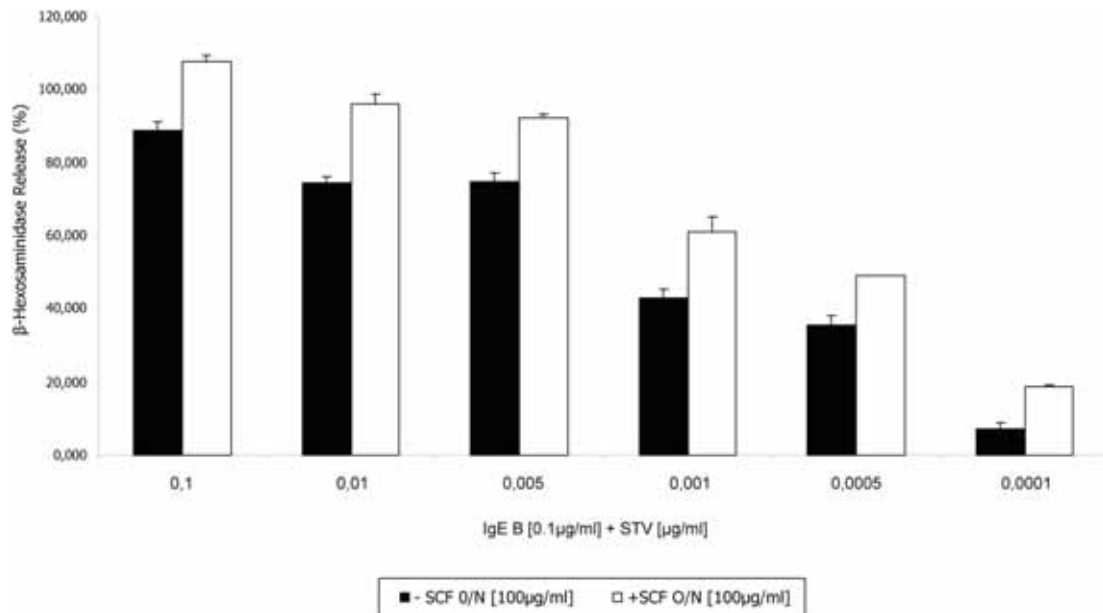


Fig 38. Les cèl·lules LAD2 presenten una corba dosi-resposta en la desgranulació dependent d'IgE. Cèl·lules LAD-2 es van incubar amb una dosi fixa de 0.1µg/ml d'IgE biotinitada durant tota la nit, en presència o absència de SCF (a una concentració de 100µg/ml). Posteriorment les cèl·lules es van activar amb diferents dosis d'estreptavidina per tal de determinar la seva dosi òptima per a la lligació de la IgE. Finalment, es va determinar l'alliberació de β-Hexosaminidasa com a mesura de desgranulació. L'alliberació de β-Hexosaminidasa s'expressa com el percentatge de l'alliberació màxima (tractament amb tritó) menys l'alliberació espontània. Les mesures es van fer per triplicat i les dades representades són representatives de tres experiments independents.

6. El tractament amb un anticòs monoclonal contra el CD84 afecta la desgranulació dependent d'IgE, però no la desgranulació dependent d'estímuls osmòtics, en cèl·lules LAD-2

6.1 Alteració de la desgranulació dependent d'IgE en cèl·lules LAD-2 tractades amb un anticòs monoclonal anti-CD84

Els estudis amb cèl·lules RBL-2H3 han permès determinar la funció inhibidora del receptor CD84 en la desgranulació dependent d'IgE dels mastòcits. La línia RBL-2H3, no obstant, representa un model de mastòcit de rata que en aquest cas sobre-expressa el CD84. Amb la finalitat de determinar l'efecte d'aquest receptor en la desgranulació

de les LAD-2, línia mastocitària humana més similar al model fisiològic humà, es va potenciar la funció del CD84 mitjançant l'ús d'un anticòs monoclonal anti-CD84. Es va determinar l'efecte de l'estimulació del receptor CD84 sobre la desgranulació a través del FcεRI, mitjançant la mesura d'alliberació de β-Hexosaminidasa. En els resultats s'observa com les cèl·lules LAD-2 tractades amb un anticòs anti-CD84 a diferents dosis, mostren una inhibició de la desgranulació, respecte cèl·lules tractades amb una IgG isotípica (Fig 39.).

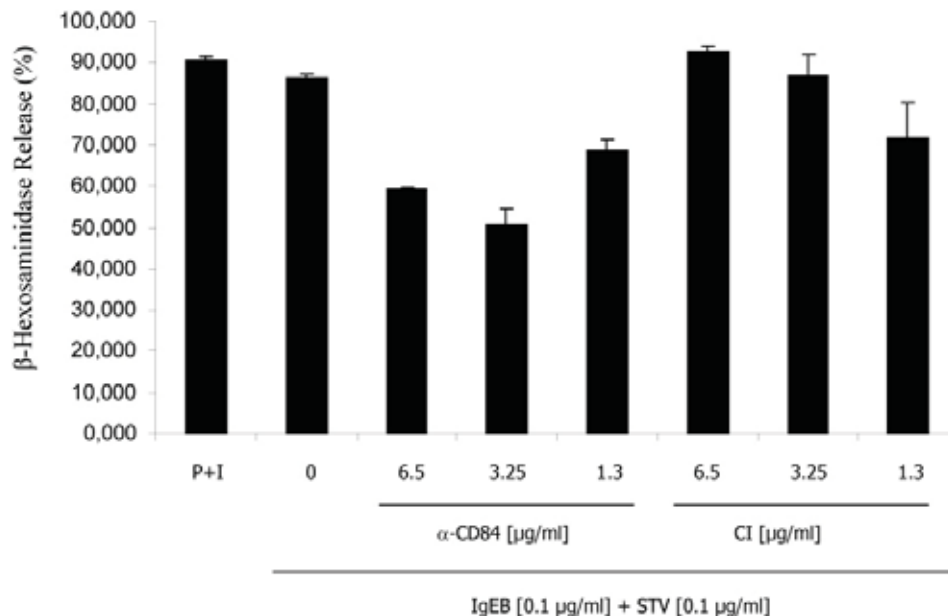


Fig 39. El tractament amb un anticòs monoclonal anti-CD84 afecta la desgranulació dependent d'IgE en cèl·lules LAD-2. En aquest estudi es van utilitzar 10^4 cèl·lules LAD-2 per condició. Les cèl·lules es van incubar durant tota la nit amb $0.1\mu\text{g/ml}$ d'IgE biotinitada. L'endemà, prèviament a la seva activació, es van incubar durant 30 minuts, a 37°C , amb un anticòs específic anti-CD84 biotinitat, o bé amb una IgG isotípica biotinitada (en aquest cas, corresponent a un anticòs anti-Ly9). Posteriorment, les cèl·lules es van rentar, i es van activar amb una dosi de $0.1\mu\text{g/ml}$ d'estreptavidina, durant 30 minuts, a 37°C , permetent la lligació alhora tant de la IgE biotinitada, com dels anticòs biotinitats, per tal d'assegurar una activació simultània d'ambdós estímuls. Finalment, es recullen els sobrenedants per fer una mesura dels nivells de β-Hexosaminidasa alliberats en cada cas. L'alliberació de β-Hexosaminidasa s'expressa com el percentatge de l'alliberació màxima (tractament amb tritó) menys l'alliberació espontània. Les mesures es van fer per triplicat i les dades són representatives de tres experiments independents.

6.2 El tractament amb un anticòs monoclonal anti-CD84 no afecta la desgranulació dependent d'estímuls osmòtics (Manitol) en cèl·lules LAD-2

El CD84 exerceix el seu mecanisme inhibitori quan es lliga de manera simultània a la IgE. És a dir, està duent a terme el seu efecte de molècula com-moduladora enfront un estímulo immunològic. Donat que els mastòcits també poden activar-se per altres

estímuls no immunològics, com és el cas d'estímuls hiperosmòtics (Gulliksson et al., 2006), es va dur a terme un estudi per tal d'analitzar si l'efecte inhibitor del CD84 es manté en el cas d'estimulacions no immunològiques. Per aquest motiu, es va fer un assaig d'alliberació de β -Hexosaminidasa amb cèl·lules LAD-2 activades amb Manitol (solució hiperosmòtica) prèviament tractades amb un anticòs específic contra el CD84, o bé amb una IgG isotípica. Segons els resultats obtinguts, l'efecte inhibitor del CD84 no es manté en el cas de l'activació amb estímuls osmòtics (Manitol), ja que la desgranulació provocada per Manitol en cèl·lules LAD-2 tractades amb un anticòs anti-CD84 és molt similar a la de cèl·lules LAD-2 tractades amb una IgG isotípica (Fig 40.)

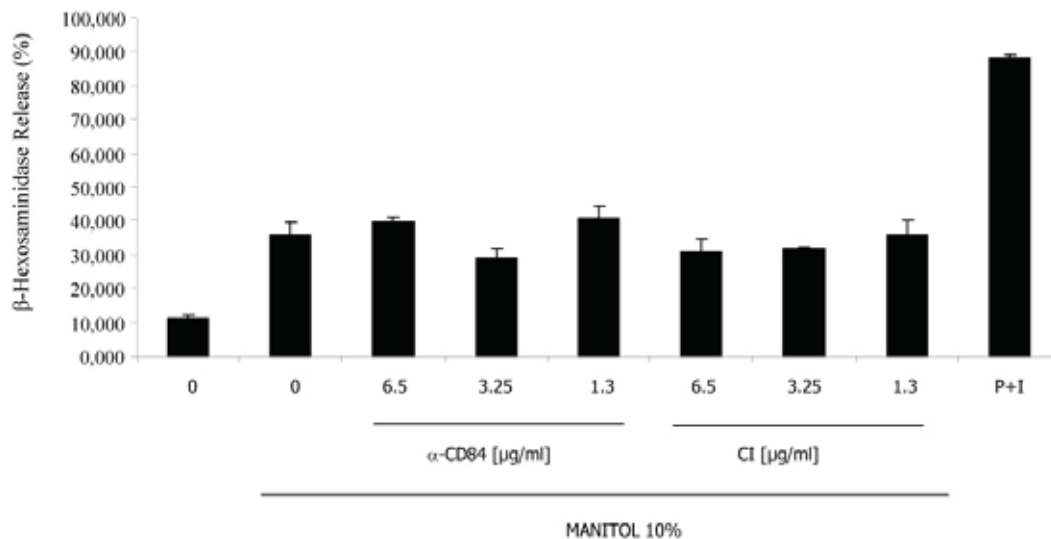


Fig 40. El tractament amb un anticòs monoclonal anti-CD84 no afecta la desgranulació dependent d'estímuls osmòtics (Manitol) en cèl·lules LAD-2. En aquest estudi es van utilitzar 10^4 cèl·lules LAD-2 per condició. Les cèl·lules es van incubar durant 30 minuts, a 37°C , amb un anticòs específic anti-CD84, o bé amb una IgG isotípica (corresponent a un anticòs anti-Ly9). Posteriorment, les cèl·lules es van rentar, i es van activar amb una dosi de Manitol al 10%, durant 30 minuts, a 37°C , després de la qual es van recollir els sobrenedants per fer una mesura dels nivells de β -Hexosaminidasa alliberats en cada cas. L'alliberació de β -Hexosaminidasa s'expressa com el percentatge de l'alliberació màxima (tractament amb tritó) menys l'alliberació espontània.

7. El tractament amb un anticòs monoclonal contra el CD84 potencia la fosforilació de la proteïna DOK-1 en l'activació dependent de la IgE

Els resultats amb cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3 van permetre identificar algunes de les molècules que participen en el mecanisme inhibitor del receptor CD84, com és la molècula adaptadora DOK-1 (veure Fig 15.). Per tal de corroborar si aquests resultats també s'observen en la línia mastocitària humana LAD-2, fisiològicament més

propera al que succeeix en els mastòcits provinents de cultius primaris, es va fer un estudi de fosforilació de la molècula DOK-1 després de l'activació a través del FcεRI. Amb aquesta finalitat, cèl·lules LAD-2 es van sensibilitzar durant tota la nit amb IgE biotinilada i l'endemà es van tractar amb un anticòs monoclonal contra el CD84 o bé amb una IgG isotípica. Posteriorment, es van lligar els anticossos biotinilats la IgE biotinilada mitjançant l'ús d'estreptavidina i es va dur a terme una immunoprecipitació amb un anticòs anti-tirosines fosforilades. En els resultats s'observa com la incubació del *western blot* amb un anticòs anti-DOK-1 mostra que hi ha un major reclutament d'aquesta proteïna en estat fosforilat en el cas de cèl·lules LAD-2 tractades amb l'anticòs monoclonal contra el CD84 (Fig 41.), corroborant així la participació de DOK-1 en el mecanisme inhibitori del receptor CD84 en una línia mastocitària humana.

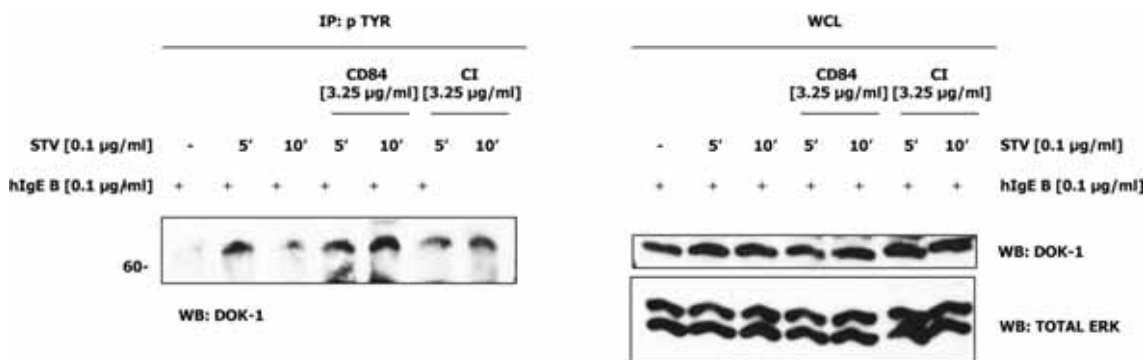


Fig 41. Major fosforilació de DOK-1 en cèl·lules LAD-2 tractades amb un anticòs monoclonal contra el CD84 en l'activació a través del FcεRI. En aquest estudi es van utilitzar 21×10^6 cèl·lules LAD-2 per cada condició. Les cèl·lules es van sensibilitzar durant tota la nit amb $0.1 \mu\text{g/ml}$ d'IgE biotinilada. L'endemà, part de les cèl·lules es van incubar amb $3.25 \mu\text{g/ml}$ d'un anticòs monoclonal biotinilat contra el CD84 o bé d'una IgG isotípica biotinilada, durant 30 minuts a 37°C . Després de rentar les cèl·lules, la IgE i els anticossos es van lligar simultàniament amb una dosi de $0.1 \mu\text{g/ml}$ d'estreptavidina a diferents temps (5 minuts i 10 minuts). Posteriorment, les cèl·lules es van llisar i immunoprecipitar amb $1 \mu\text{g}$ d'anticòs anti-tirosines fosforilades. Les mostres llavors es van córrer en un gel SDS-PAGE al 10%, que es va transferir a una membrana de PVDF. La membrana va ser incubada amb diferents anticossos: anticòs anti-DOK-1 i un anticòs anti-ERK TOTAL per tal de determinar que la càrrega proteica era similar en tots els punts.

8. El tractament amb un anticòs monoclonal contra el CD84 afecta la fosforilació de la MAPK ERK en cèl·lules LAD-2, després de la lligació de la IgE

Donats el efectes inhibidors observats que exerceix el receptor CD84 sobre la desgranulació depenent d'IgE, i la participació de DOK-1 en el seu mecanisme, tal com succeeix en la línia cel·lular RBL-2H3, el proper pas en l'estudi de les funcions del

receptor CD84 en cèl·lules LAD-2 va ser analitzar els seus efectes en l'activació de la cascada de MAPK. En experiments previs amb cèl·lules RBL-2H3 es va demostrar que el receptor CD84 afecta la fosforilació de diverses MAPK (Fig 18.). Per aquest motiu es va dur a terme un estudi comparatiu amb cèl·lules LAD-2, per comprovar si aquest efecte inhibitori del receptor CD84 sobre la via de les MAPK, es manté també amb una línia de mastòcits humana fisiològicament més propera al que succeeix amb mastòcits obtinguts de cultius primaris. Es va mirar el grau d'activació de la MAPK ERK (determinat pel seu estat de fosforilació), ja que aquesta MAPK participa en l'activació de diversos factors de transcripció que condueixen a la producció de citocines. Els resultats mostren com les cèl·lules LAD-2 a les quals se'ls ha potenciat l'activitat del CD84, mitjançant l'ús d'un anticòs monoclonal anti-CD84, mostren una clara inhibició de l'activitat de la MAPK ERK 1/2 (Fig 42.).

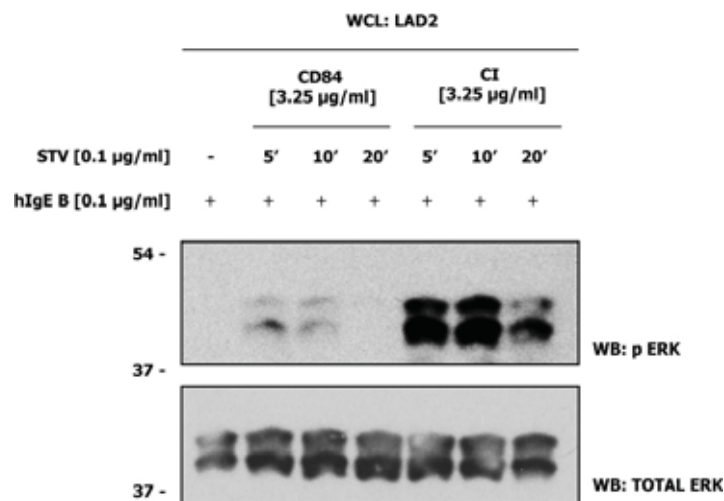


Fig 42. El tractament amb un anticòs monoclonal contra el CD84 disminueix la fosforilació de la MAPK ERK 1/2. 0.5×10^6 cèl·lules LAD-2 per cada punt d'activació es van incubar durant tota la nit amb 0.1µg/ml d'IgE biotinitada. L'endemà, les cèl·lules es van incubar amb 3.25µg/ml d'un anticòs monoclonal biotinitat contra el CD84 o bé d'una IgG isotípica biotinitada, durant 30 minuts a 37°C. Posteriorment les cèl·lules es van rentar i la IgE i els anticossos es van lligar simultàniament amb una dosi de 0.1µg/ml d'estreptavidina a diferents temps per tal d'establir una cinètica d'activació. Les cèl·lules llavors es van llisar, córrer en un gel SDS-PAGE al 10% i transferir a una membrana de PVDF, que va ser incubada amb un anticòs anti ERK-fosforilat i un anticòs anti-ERK TOTAL com a control de càrrega.

9. El tractament amb un anticòs monoclonal contra el CD84 afecta la fosforilació d'AKT en cèl·lules LAD-2 després de la lligació de la IgE

Tal com s'ha citat abans (secció A –Resultats en RBL-2H3-, apartat 11), AKT és una serina/treonina cinasa que actua sobre diferents molècules efectores i factors de

transcripció, intervenint en processos de reorganització del citoesquelet, diferenciació, cicle cel·lular, apoptosi, metabolisme, etc. (Kharas and Fruman, 2005). La fosforilació i activació d'AKT es considera un marcador indirecte de l'activació de la PI3K. Per mirar si l'acció del receptor CD84 afecta a la via de la PI3K, es va fer un estudi de fosforilació d'AKT depenent d'IgE, comparant cèl·lules LAD-2 tractades amb un anticòs monoclonal contra el CD84 o bé amb una IgG isotípica. Els resultats mostren com la fosforilació d'AKT es troba molt disminuïda en les LAD-2 on s'ha potenciat l'acció del CD84 mitjançant un anticòs monoclonal (Fig 43.), confirmant novament la implicació del receptor CD84 en la via de la PI3K.

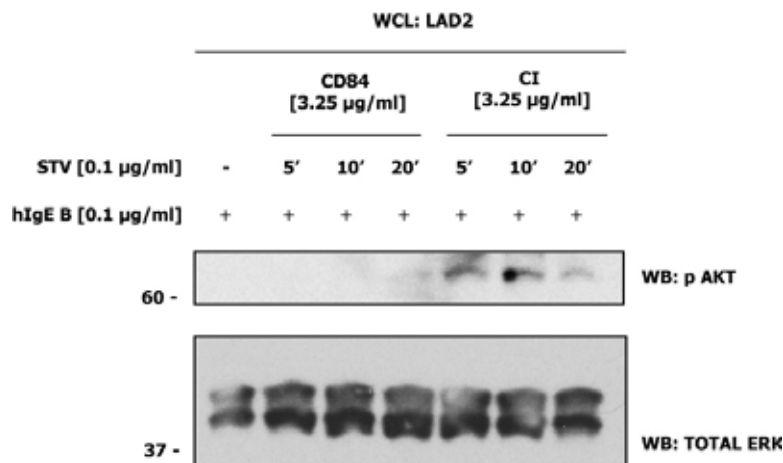


Fig 43. El tractament amb un anticòs monoclonal contra el CD84 disminueix la fosforilació d'AKT. 0.5×10^6 cèl·lules LAD-2 per cada punt d'activació es van incubar durant tota la nit amb $0.1 \mu\text{g/ml}$ d'IgE biotinilada. L'endemà, les cèl·lules es van incubar amb $3.25 \mu\text{g/ml}$ d'un anticòs monoclonal biotinilat contra el CD84 o bé d'una IgG isotípica biotinilada, durant 30 minuts a 37°C . Posteriorment les cèl·lules es van rentar i la IgE i els anticossos es van lligar simultàniament amb una dosi de $0.1 \mu\text{g/ml}$ d'estreptavidina a diferents temps. Les cèl·lules llavors es van llisar i les mostres llisades es van córrer en un gel SDS-PAGE al 10%. Després es van transferir a una membrana de PVDF, que va ser incubada amb un anticòs anti-AKT fosforilat i un anticòs anti-ERK TOTAL per tal de determinar que la càrrega era similar en tots els punts.

V. DISCUSSIÓ

V. DISCUSSIÓ

Els mastòcits són les principals cèl·lules efectores en les reaccions inflamàtores relacionades amb hipersensibilitat i al·lèrgia. Però més enllà d'aquestes funcions, també es coneix que els mastòcits participen en el mecanisme de defensa del sistema immunitari innat i que també poden actuar com a cèl·lules reguladores de la resposta immunitària adaptativa (Galli et al., 2005a; Marshall and Jawdat, 2004; Mekori, 2004; Rivera et al., 2008). La via d'activació clàssica i més estudiada d'aquestes cèl·lules requereix de la coordinació d'una sèrie d'esdeveniments que comencen amb la unió de la IgE al seu receptor d'alta afinitat (FcεRI) i la posterior lligació d'aquesta IgE mitjançant l'al·lergen. Això comporta l'agregació del FcεRI, iniciant-se la propagació a l'interior de la cèl·lula d'una cascada de senyalització, amb la finalitat d'ensamblar una sofisticada xarxa de molècules que controlen la resposta de la cèl·lula en front de certs estímuls o exposicions a al·lèrgens determinades (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). L'activació mastocitària condueix a totes les funcions conegudes dels mastòcits (veure Introducció, apartat 1.2). La xarxa de senyalització iniciada pel FcεRI ha d'estar finament regulada per tal d'evitar les respostes inflamàtores al·lèrgiques. Aquesta regulació és molt complexa ja que es pot donar a molts nivells i sovint utilitza proteïnes i lípids que poden tenir rols positius, negatius o duals en la coordinació de les seves respostes. La regulació de la senyalització iniciada pel FcεRI està mitjançada per un ampli ventall de mecanismes inhibidors, entre els què s'inclouen el propi FcεRI, cinases, fosfatases, molècules adaptadores i diferents tipus de molècules co-estimuladores que poden modular l'activació generada pel FcεRI, entre les què es troben els receptors inhibidors (Gilfillan and Tkaczyk, 2006; Kraft and Kinet, 2007; Rivera and Gilfillan, 2006). L'activació d'aquests receptors inhibidors generalment condueix al reclutament de fosfatases i altres mediadors intracel·lulars per tal de donar lloc a la inhibició selectiva de diferents processos, com la desgranulació i la síntesi de citocines (Galli et al., 2005a; Katz, 2002; Nadler et al., 2000).

1. Identificació del receptor CD84 com una nova molècula inhibidora de la senyalització mitjançada pel FcεRI en mastòcits

En els estudis presentats en aquesta tesi, s'ha identificat el receptor CD84, membre de la família de receptors SLAM (o família del CD150) com una nova molècula inhibidora de la senyalització a través del FcεRI en mastòcits.

1.1 El receptor CD84 inhibeix la desgranulació mastocitària

En els estudis de desgranulació dependent d'IgE (mesurada mitjançant l'alliberació de β-Hexosaminidasa) realitzats en cèl·lules RBL-2H3, es va determinar que a concentracions òptimes, tant d'IgE, com d'al·lergen (en aquests estudis mimetitzat per DNP-HSA) les cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3 inhibeixen aquesta desgranulació (veure Resultats, Fig 5. i 6.). Posteriorment, mitjançant l'ús de la quimera CD244-CD84 (domini extracel·lular del CD244 i domini transmembrana i cua citoplasmàtica del CD84) i l'ús del mutant del CD84 que manca de tota la seva cua citoplasmàtica (CD84 Δ Cyto), es va confirmar que la inhibició de la desgranulació observada es deu a la interacció homofílica del receptor CD84, i a la senyalització a través de la seva cua citoplasmàtica (Fig 8. i 9.). La línia RBL-2H3 s'utilitza de manera freqüent com un model d'estudi mastocitari. Aquesta línia cel·lular possibilita la sobre-expressió de molècules humanes, permetent així l'estudi de la interacció homotípica del receptor d'interès. Amb aquesta estratègia s'evita l'ús d'anticossos contra aquest receptor, que podrien donar lloc en un principi a efectes agonistes o antagonistes indeterminats.

Un dels problemes particulars en la recerca de les funcions dels mastòcits humans, és la manca de bon models d'estudi, i la dificultat per obtenir material cel·lular humà per a la realització dels estudis *in vitro*. Per aquest motiu, sovint s'acaben utilitzant línies cel·lulars amb una significança funcional limitada, o bé mastòcits obtinguts de cultius primaris de ratolí, que presenten certes diferències amb el model humà. Per tal d'evitar totes aquestes limitacions, es va intentar abordar el treball amb mastòcits aïllats de pòlips obtinguts per un altre laboratori. Aquest hagués estat un model prou satisfactori per poder corroborar els efectes del CD84 observats en la línia mastocitària de rata RBL-2H3, en un model de cultiu primari de mastòcits humans; però la dificultat en l'aïllament i la purificació i el baix nombre de cèl·lules obtingudes va decantar els estudis cap a la línia cel·lular LAD-2, que en requerir la presència de SCF per a la seva

supervivència, es converteix en una de les línies més similars als cultius primaris de mastòcits. En els estudis realitzats en aquesta tesi, l'ús de la línia cel·lular LAD-2 permet observar efectes fisiològicament més propers als que es donarien en els mastòcits dins el seu microambient del cos humà, en comparació en els observats en la línia cel·lular de mastòcits de rata RBL-2H3.

La inhibició de la desgranulació dependent d'IgE observada en cèl·lules RBL-2H3 a través del receptor CD84, es corrobora en la línia mastocitària humana, les LAD-2, confirmant els efectes negatius de la senyalització del CD84 en la desgranulació dependent d'IgE, en una línia mastocitària fisiològicament més propera als cultius primaris de mastòcits humans (veure Resultats, Fig 39.). Per altra banda, els estudis de desgranulació en LAD-2 també han permès determinar que l'efecte inhibitori del receptor CD84 només actua en l'activació mastocitària dependent d'IgE (estimulació immunològica); ja que l'activació amb un estímul osmòtic com el manitol (estimulació física), genera un perfil de degranulació similar en cèl·lules tractades amb un anticòs monoclonal contra el CD84 o bé tractades amb una IgG isotípica (veure Resultats, Fig 40.). En aquest cas, no es pot aplicar l'estratègia de la interacció homotípica que s'utilitza en les cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3, donat que les cèl·lules LAD-2 presenten nivells endògens de CD84 humà. En el cas de cèl·lules LAD-2, l'acció del CD84 es potencia mitjançant l'ús d'anticòsos monoclonals agonistes. Cèl·lules LAD-2 tractades amb un anticòs monoclonal anti-CD84 presenten un percentatge de desgranulació dependent d'IgE de l'ordre del 30% inferior al de cèl·lules tractades amb una IgG isotípica. Sovint els percentatges d'inhibició a través del CD84 observats en cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3 són superiors als observats en cèl·lules LAD-2. El fet que les inhibicions del CD84 en cèl·lules LAD-2 no siguin tan marcades com en RBL-2H3 es pot explicar per dos motius principals: a) El sistema de les RBL-2H3 és un sistema de sobre-expressió, mentre que l'efecte observat en les cèl·lules LAD-2 es deu a l'expressió del CD84 endogen. La sobre-expressió d'una molècula generalment condueix a la potenciació de la seva activitat; i b) Les activacions a través de l'ús d'anticòsos monoclonals en el cas de les LAD-2 podrien ser menys efectives que la interacció homotípica CD84-CD84 que té lloc en cèl·lules CD84 RBL-2H3, ja que en aquest últim cas, s'està treballant amb el lligand natural del receptor. Generalment els anticòsos solen tenir afinitats molt elevades per als seus antígens, amb constants de dissociació (Kd) de l'ordre de 10^{-7} a 10^{-11} M, tot i que poden variar en funció de

l'afinitat específica que presenta cada anticòs. Per altra banda, la interacció homofílica del receptor CD84 és una de les interaccions més fortes observades entre els membres de la família de receptors SLAM o família del CD150, i presenta una K_d que es troba dins un rang submicromolar (Yan et al., 2007). Altres membres de la família, com el CD150 i el NTB-A presenten K_d de $200\mu\text{M}$ i $2\mu\text{M}$, respectivament (Cao et al., 2006; Mavaddat et al., 2000), demostrant que existeix un rang de tres ordres de magnitud en les afinitats de les interaccions homofíliques dels receptors de la família SLAM (CD150). Aquest rang d'afinitats podria ser una explicació a les funcions biològiques solapades, però diferents dels membres de la família (Yan et al., 2007).

El perfil de desgranulació dependent d'IgE en la línia cel·lular LAD-2 mostra que la incubació amb SCF, el lligand del receptor KIT i el factor de creixement més important en mastòcits, augmenta la desgranulació induïda pel Fc ϵ RI aproximadament en un 20% (veure Resultats, Fig 38.), confirmant les dades reportades a la literatura que indiquen que l'addició de SCF conjuntament amb l'antigen que provoca la lligació de la IgE, condueix a un augment en el procés de desgranulació (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

1.2 Les tirosines 262 i 299, que es troben dins de motius d'unió a la família d'adaptadors SAP, no participen en el mecanisme inhibitori del CD84; mentre que les tirosines 279 i 324 es troben involucrades en la inhibició mitjançada pel receptor CD84

La cua citoplasmàtica del receptor CD84 presenta quatre motius basats en tirosina: Y262, Y279, Y299 i Y324. Les tirosines 262 i 299 es troben dins de motius consens d'unió a la molècula adaptadora SAP i a la fosfatasa SHP-2 (Sayos et al., 2001). SAP és una proteïna adaptadora involucrada en la senyalització dels membres de la família SLAM, i actua reclutant src-cinases a la cua citoplasmàtica dels receptors (Chan et al., 2003; Chen et al., 2006). Per altra banda, la fosfatasa SHP-2 competeix amb SAP per la seva unió al receptor CD150, modulant d'aquesta manera la funció de la proteïna adaptadora (Sayos et al., 1998).

La utilització dels models de cèl·lules transfectants CD84 Y262F RBL-2H3, CD84 Y299F RBL-2H3 i CD84 Y262F/Y299F RBL-2H3, han demostrat que, en la cua citoplasmàtica del CD84, SAP s'uneix preferencialment a la Y262, mentre que SHP-2 ho fa a la Y299, i

que no hi ha competència per la unió al receptor CD84 entre ambdues molècules (veure Resultats, Fig 11.). Tant les mutacions simples Y262F i Y299F, com el doble mutant Y262F/Y299F, no reverteixen l'efecte inhibitori del receptor CD84, suggerint d'aquesta manera que aquestes tirosines no són crítiques en la mediació de la senyalització negativa que promou el receptor CD84 en els transfectants de RBL-2H3 (veure Resultats, Fig 12.). El fet que la Y262 uneixi la molècula adaptadora SAP i que la seva mutació no afecti el mecanisme inhibitori del receptor CD84 en cèl·lules RBL-2H3, suggereix que els efectes negatius del CD84 són independents de SAP. És possible que la implicació de SAP no sigui important degut a la baixa o nul·la expressió d'aquesta proteïna en cèl·lules RBL-2H3. En el cas de cèl·lules LAD-2 per exemple, s'ha vist una elevada expressió del receptor CD84, però no s'ha pogut detectar l'expressió de SAP, ni en els seus llisats totals, ni mitjançant l'amplificació per PCR (veure Resultats, Fig 33.). Resultats similars es van obtenir prèviament al laboratori amb dues altres línies cel·lulars: cèl·lules HMC-1, línia immadura de mastòcits humans; i cèl·lules KU812, línia provinent d'una leucèmia basofílica. Ambdues línies cel·lulars expressen bons nivells de CD84, però no s'ha pogut detectar expressió de SAP ni en els seus llisats totals, ni mitjançant tècniques d'immunoprecipitació. Cal dir, però que l'estudi de l'expressió de SAP s'ha fet en tots els casos en mastòcits en condicions basals. L'expressió de SAP en condicions d'activació no es coneix. Certes molècules augmenten la seva expressió de manera tardana després de l'activació i és llavors quan tenen algun paper en la regulació de l'activació. En aquest cas, però, els estudis amb cèl·lules CD84 Y262F RBL-2H3, CD84 Y299F RBL-2H3 i CD84 Y262F/Y299F RBL-2H3, han demostrat, que en cas que SAP augmentés la seva expressió de manera posterior a l'activació cel·lular, el més probable és que no participés en el mecanisme de senyalització negativa del CD84, ja que la mutació dels motius d'unió a SAP que el CD84 presenta a la seva cua citoplasmàtica, no tenen capacitat per revertir l'efecte inhibitori del CD84. Una altra dada que reforça la hipòtesi que SAP no participa en el mecanisme inhibitori del CD84, és que la seva sobre-expressió en cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3 (cèl·lules RBL-2H3 transfectades que sobre-expressen alhora el receptor CD84 i l'adaptador SAP), no fa variar el patró inhibitori del receptor, segons es va observar en estudis previs al laboratori. Respecte a la participació de SAP en el mecanisme de senyalització del CD84, hi ha evidències en altres tipus cel·lulars. S'ha descrit que la fosforilació del CD84 no requereix l'expressió de SAP, ja que també

es dona en línies cel·lulars deficientes per SAP i en cèl·lules T de pacients amb XLP (Tangye et al., 2003; Tangye et al., 2002).

Per altra banda, també s'ha descrit que les tirosines 262 i 299 uneixen EAT-2 (Tangye et al., 2003). EAT-2 és una molècula adaptadora que pertany a la família d'adaptadors SAP i es troba implicada en processos de senyalització negativa mitjançats pel receptor CD244 en cèl·lules NK (Roncagalli et al., 2005). En el cas del receptor CD84 en mastòcits, i basant-se en el fet que la mutació de les tirosines 262 i 299 no reverteix l'efecte inhibitori del CD84, es podria concloure que EAT-2 tampoc és una molècula efectora clau en la inhibició mitjançada pel CD84 en cèl·lules CD84 RBL-2H3.

Els estudis de desgranulació amb els transfectants CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3, han permès identificar els residus 279 i 324 com les tirosines implicades en el mecanisme inhibitori del CD84, ja que la seva mutació permet revertir els efectes en la inhibició de la desgranulació dependent d'IgE mitjançada pel CD84 (veure Resultats, Fig 13.).

2. Les proteïnes DOK-1 i c-CBL es troben implicades en el mecanisme de senyalització del receptor CD84

En la cerca de possibles molècules implicades en el mecanisme de senyalització del CD84, es va determinar que les molècules adaptadores DOK-1 i c-CBL podrien participar en el mecanisme inhibitori del CD84, donat que la seva fosforilació es troba augmentada en cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3 després de l'activació a través del Fc ϵ RI, respecte cèl·lules RBL-2H3 control, i que l'augment de fosforilació de DOK-1 i c-CBL en cèl·lules CD84 RBL-2H3 és concomitant amb la inhibició de la desgranulació observada en aquest tipus cel·lular (veure Resultats, Fig 15. i 16.). En el cas de cèl·lules LAD-2, no s'ha pogut determinar la participació de l'adaptador c-CBL en el mecanisme de senyalització promogut pel receptor CD84. És probable que els nivells d'expressió d'aquesta molècula adaptadora no siguin prou elevats en aquest tipus cel·lular i dificultin la seva detecció com una de les proteïnes fosforilades que formen part del complex de senyalització del receptor CD84. S'ha descrit que la forma predominant de les proteïnes CBL expressada en mastòcits és CBL-b, i que regula negativament l'activació dels mastòcits a través del Fc ϵ RI (Gustin et al., 2006). És

temptador especular que aquesta forma de CBL sigui una candidata a participar en el mecanisme d'inhibició del receptor CD84 en cèl·lules LAD-2.

Es creu que la proteïna CBL participa en l'atenuació de les funcions mastocitàries, induint la ubiquïtinització ràpida de cinases, proteïnes de senyalització citoplasmàtiques i receptors de membrana involucrats en la senyalització a través del FcεRI. S'ha descrit que c-CBL es troba implicada en la ubiquïtinització de les subunitats del FcεRI i de la cinasa SYK en cèl·lules RBL-2H3 (Lafont and Simons, 2001; Paolini et al., 2002), i que CBL també pot ubiquïtinitzar les cinases LYN i FYN posteriorment a l'agregació del FcεRI en cèl·lules RBL-2H3 (Kyo et al., 2003). El fet que en cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3 es trobi augmentada la fosforilació de CBL després de l'activació a través del FcεRI, suggereix que el receptor CD84 potencia l'acció d'aquesta proteïna i afavoreix la ubiquïtinització de diferents molècules implicades en la senyalització a través del FcεRI. Per tal de determinar la importància del proteosoma en el mecanisme d'inhibició del receptor CD84, s'han fet estudis preliminars amb l'inhibidor del proteosoma ALLN (*N-Acetyl-Leucinyl-Leucinyl-Norleucina*), en els què la seva addició no fa variar l'efecte inhibitori del CD84, en cèl·lules RBL-2H3. Aquestes dades suggereixen que potser el mecanisme d'ubiquïtinització i posterior degradació en el proteosoma promogut per les proteïnes CBL no sembla suficient per si sol per explicar el mecanisme inhibitori del receptor CD84.

Pel que fa a l'adaptador DOK, s'ha descrit que s'associa de manera constitutiva amb el FcεRI en cèl·lules RBL-2H3 i que es fosforila després de la lligació del FcεRI. Un cop fosforilat, adquireix capacitat per unir-se i reclutar molècules inhibidores com la fosfatasa SHIP i la cinasa CSK (Brauweiler et al., 2000; Zhao et al., 2006). També pot unir-se a Ras-GAP, que correspon a la proteïna activadora de la GTPasa encarregada d'inactivar la proteïna Ras. D'aquesta manera, es regula negativament la senyalització induïda pel FcεRI de la via dependent de Raf, conduint a la inhibició de les MAPK ERK, JNK i p38, i a la producció de TNFα (Abramson et al., 2003). L'augment de fosforilació de la proteïna DOK-1 en cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3 després de l'activació a través del FcεRI, suggereix que el receptor CD84 potencia l'acció de DOK-1 i afavoreix els processos inhibitoris en què aquest adaptador es troba implicat. Els estudis amb cèl·lules LAD-2 també corroboren la implicació de l'adaptador DOK-1 en el mecanisme de senyalització del CD84, ja que cèl·lules LAD-2 tractades amb un anticòs monoclonal

anti-CD84 mostren un major reclutament de la proteïna DOK-1 fosforilada, en comparació amb cèl·lules LAD-2 tractades amb una IgG isotípica (veure Resultats, Fig 41.). Aquestes dades confirmen que en els mastòcits humans també es dona la participació de l'adaptador DOK en el mecanisme inhibitori promogut pel receptor CD84.

Els estudis amb els transfectants CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3, confirmen la participació de les proteïnes DOK-1 i c-CBL en el mecanisme inhibitori del CD84, ja que la seva mutació, que té capacitat per revertir l'efecte inhibitori mitjançat pel CD84 de la desgranulació depenent d'IgE, és concomitant amb una menor fosforilació de les proteïnes DOK-1 i c-CBL, després de l'activació a través del Fc ϵ RI. En els cas de les cèl·lules transfectades CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3, els nivells de fosforilació de DOK-1 i c-CBL posteriors a l'agregació del Fc ϵ RI són inferiors al de cèl·lules CD84 RBL-2H3 i comparables als de cèl·lules RBL-2H3 control (veure Resultats, Fig 17.).

3. El receptor CD84 disminueix l'activació de les MAPK ERK, JNK i P38 i la secreció de citocines induïdes per l'activació a través del Fc ϵ RI

Mitjançant els estudis en cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3 s'ha determinat que la interacció homofílica CD84-CD84 comporta la disminució de la fosforilació de les MAPK ERK, JNK i P38 després de l'agregació del Fc ϵ RI (veure Resultats, Fig 18.). Aquestes dades concorden amb la disminució en la secreció de citocines depenent d'IgE observada en cèl·lules CD84 RBL-2H3 (veure Resultats, Fig 22.), donat que aquest procés es troba principalment mitjançat per l'activació de la via de les MAPK, que al seu torn s'encarrega d'activar molts factors de transcripció, entre els què es troben els responsables de la generació de citocines. Entre les possibles molècules inhibidores responsables d'aquesta inhibició, es troba l'adaptador DOK-1, ja que aquesta molècula atenua la senyalització induïda pel Fc ϵ RI de la via depenent de Raf, conduint a la inhibició de les MAPK ERK, JNK i P38 i a la conseqüent disminució en la secreció de citocines (Ott et al., 2002); i per altra banda s'ha demostrat que la seva fosforilació es troba augmentada en cèl·lules CD84 RBL-2H3.

En els transfectants CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3, la fosforilació de les MAPK ERK, JNK i P38 es troba restaurada (veure Resultats, Fig 19.), així com

l'alliberació de TNF α (veure Resultats, Fig 22.), confirmant que el mecanisme inhibitori del CD84 observat en aquests esdeveniments també es troba mitjançat per les tirosines 279 i 324. En la Fig 19. de la secció Resultats s'observa que la restauració de la fosforilació de JNK en els transfectants CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3 no és completa. Probablement això es deu al fet que l'anticòs anti-JNK fosforilat utilitzat a l'estudi no detectava eficientment les formes fosforilades, fins i tot en controls positius. Per aquest motiu, és molt probable que la no completa restauració de la fosforilació de JNK en el cas de cèl·lules transfectades amb els mutants Y279F i Δ Y324 del receptor CD84 vingui donada per un problema tècnic afegit.

En el cas de cèl·lules LAD-2, s'observa una disminució molt clara de la MAPK ERK1/2 en cèl·lules tractades amb un anticòs monoclonal anti-CD84 i estimulades a través del Fc ϵ RI, en comparació amb cèl·lules LAD-2 tractades amb una IgG isotípica (veure Resultats, Fig 42.). Aquestes dades coincideixen amb les obtingudes en cèl·lules RBL-2H3, on la interacció homofílica del CD84 disminueix l'activació de la via de les MAPK. Per altra banda, el fet que amb cèl·lules LAD-2 tractades amb un anticòs monoclonal anti-CD84 també es reclutin majors nivells de l'adaptador DOK-1 fosforilat, reforça la hipòtesi que és aquesta molècula la que podria estar mitjançant principalment la disminució de l'activació de la MAPK ERK.

Els estudis en cèl·lules LAD-2, no han pogut determinar quin és l'efecte del receptor CD84 sobre la producció de citocines, degut a la dificultat de detecció de diferents citocines en aquest tipus cel·lular. S'han intentat diverses aproximacions, des d'estudis d'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) per detectar la secreció de TNF α , fins a tècniques de CBA (*Cytometric Bead Array*), que permeten estudiar els nivells de secreció de diverses citocines pro-inflamatòries (TNF α , IL8, IL6, IL10, IL1 β , IL12), però malauradament cap de les tècniques aplicades ha rendit efecte en cèl·lules activades a través del Fc ϵ RI. L'alternativa d'estudi en aquest cas podria ser la detecció dels nivells transcripcionals de diferents citocines mitjançant RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaction*), un estudi que actualment s'està posant a punt al grup.

El model representat a la Fig 1. intenta integrar els esdeveniments claus que es donen després de la lligació conjunta del Fc ϵ RI i el receptor CD84 i que actuen sobre la via d'activació primària dels mastòcits, dependent de LYN. La lligació del receptor d'alta

afinitat per la IgE comporta la fosforilació ràpida de cinases com LYN i SYK. La lligació del receptor CD84, permet alhora la fosforilació dels residus tirosina 279 i 324 de la cua citoplasmàtica, per tal de poder dur a terme el seu mecanisme inhibitori en mastòcits. En aquest model s'especula amb la possibilitat que la cinasa LYN pugui ser una bona candidata a la fosforilació del receptor CD84, donat que és una cinasa que s'ha vist implicada en processos de senyalització negativa en mastòcits. En el mecanisme d'inhibició del CD84 que comporta la disminució de la desgranulació i de l'activació de les MAPKs ERK, P38 i JNK, s'ha vist que es troben majorment fosforilades les molècules adaptadores DOK-1 i c-CBL. DOK-1 condueix a la inhibició de la via de MAPKs (Abramson et al., 2003) i c-CBL podria estar ubiquitinitzant i enviant a degradació al proteosoma, tant les subunitats del FcεRI (Lafont and Simons, 2001), com les cinases LYN (Kyo et al., 2003) i SYK (Paolini et al., 2002), generant així una inhibició de tots els processos engegats per la senyalització a través del FcεRI, com és la desgranulació.

Model de senyalització negativa del receptor CD84 sobre la via del FcεRI

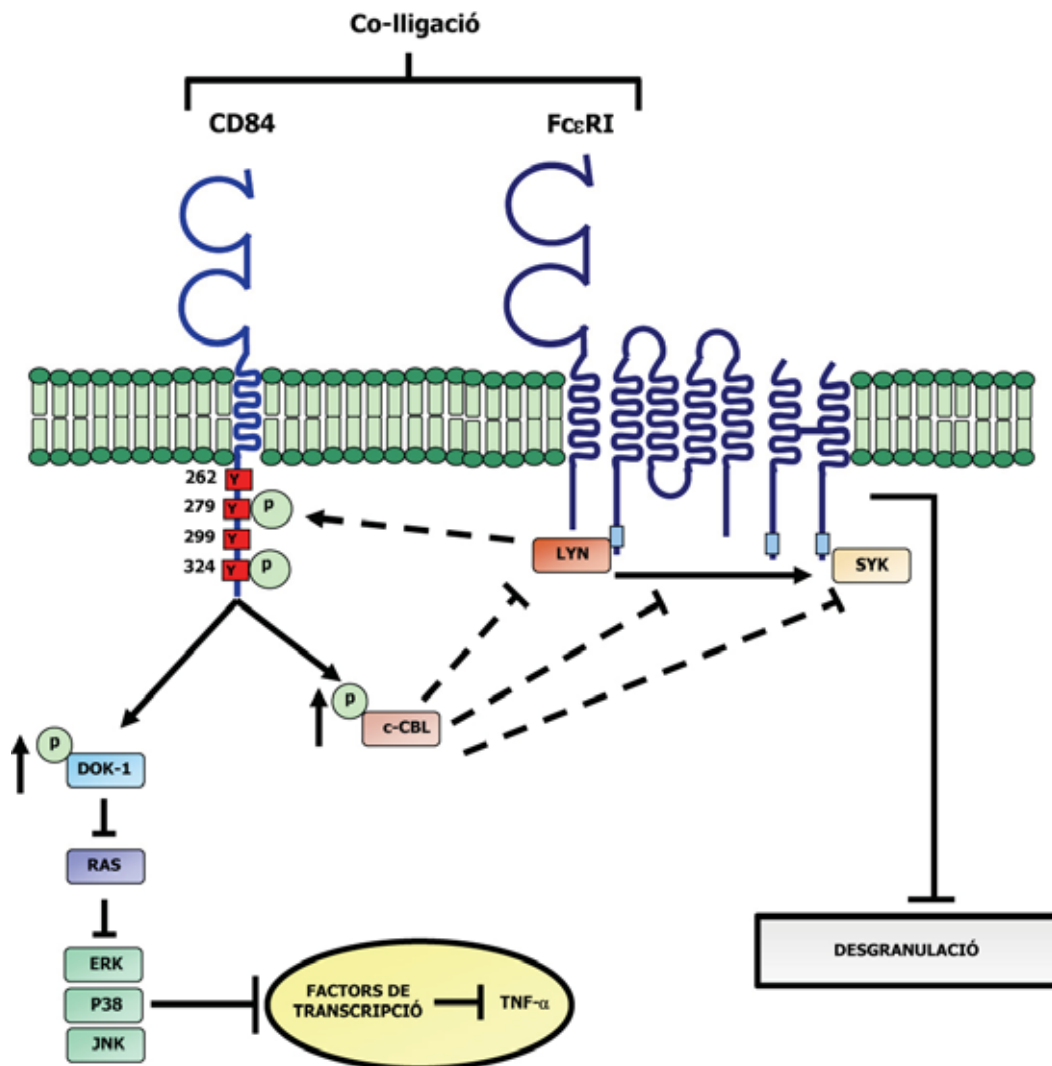


Fig 1. Model de senyalització negativa del receptor CD84 sobre la via del FcεRI, després de la co-lligació d'ambdós receptors. La lligació simultània del FcεRI i del receptor CD84, permet que aquest últim actuï modulant la senyalització mitjançada pel FcεRI. La lligació del CD84 comporta la fosforilació dels adaptador DOK-1 i c-CBL que actuen inhibint la via de les MAPKs i ubiquitinitzant proteïnes implicades en la senyalització del FcεRI, respectivament.

4. El receptor CD84 altera la fosforilació d'AKT induïda pel FcεRI

Una altra de les vies que resulta atenuada per l'acció del CD84 sobre la senyalització del FcεRI és la via de la PI3K, ja que en els estudis amb cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3 s'observa una disminució de la fosforilació d'AKT, considerada un marcador directe de l'activació de la PI3K (veure Resultats, Fig 20.). La PI3K participa en moltes

funcions cel·lulars, com el creixement, la proliferació, la diferenciació, la motilitat, la supervivència i el tràfic intracel·lular. Per altra banda, la PI3K també participa en la producció de citocines, ja que la cinasa AKT (que s'activa per acció de la PDK1 quan aquesta és reclutada a membrana gràcies a la formació de PIP₃ per acció de la PI3K) regula de manera positiva la funció del factor de transcripció NF- κ B (Kraft and Kinet, 2007; Stephens et al., 1998).

En els transfectants CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 Δ Y324 RBL-2H3, la fosforilació d'AKT es troba restaurada, suggerint la participació de les tirosines 279 i 324 en el mecanisme inhibitori del CD84 que afecta la via de la PI3K (veure Resultats, Fig 21.).

Els estudis sobre la via de la PI3K en cèl·lules LAD-2, corroboren els resultats obtinguts en el cas del transfectant CD84 RBL-2H3, ja que cèl·lules LAD-2 tractades amb un anticòs monoclonal anti-CD84 mostren una clara disminució de la fosforilació d'AKT després de l'agregació del Fc ϵ RI, en comparació amb cèl·lules LAD-2 tractades amb una IgG isotípica (veure Resultats, Fig 43.).

5. El receptor CD84 altera el flux de calci en cèl·lules CD84 RBL-2H3

Els moviments de calci es troben molt relacionats amb els esdeveniments de desgranulació en mastòcits. De fet, estudis realitzats en cèl·lules RBL-2H3 demostren que existeix una correlació entre majors percentatges de desgranulació i un augment en la concentració de calci intracel·lular. Així doncs, l'estudi del flux de calci i la monitorització de les variacions de concentració de calci intracel·lular constitueixen un marcador sensible de desgranulació en cèl·lules RBL-2H3 (Aketani et al., 2001). En els estudis sobre flux de calci que es van realitzar en cèl·lules transfectades CD84 RBL-2H3 en comparació amb cèl·lules RBL-2H3 control, es va observar que la interacció homotípica CD84-CD84 comporta una disminució del flux de calci depenent d'IgE. El manteniment de la mobilització de calci en el cas de les cèl·lules CD84 RBL-2H3 és a més molt menys sostinguda en el temps, quan es compara amb el flux de calci de cèl·lules control després de l'activació a través del Fc ϵ RI (veure Resultats, Fig 3.). Aquestes dades concorden a l'hora amb la inhibició observada en la via de la PI3K per part del CD84, ja que la PI3K es considera la responsable del manteniment, però no de l'inici del senyal de calci per a una desgranulació òptima (Gilfillan and Tkaczyk, 2006). La inhibició del flux de calci és alhora lògica amb el fenotip inhibitori del CD84, ja que

en molts processos d'activació cel·lular es donen canvis en els nivells de calci intracel·lular, així que la menor mobilització de calci observada en cèl·lules CD84 RBL-2H3 estaria indicant un estat menor d'activació posterior a l'agregació del FcεRI quan té lloc la interacció homotípica CD84-CD84. Dades preliminars obtingudes pel grup indiquen que la disminució del flux de calci en cèl·lules CD84 RBL-2H3 es restaura en el cas dels transfectants CD84 Y279F RBL-2H3 i CD84 ΔY324 RBL-2H3, indicant novament la implicació de les tirosines 279 i 324 en el mecanisme inhibitori del CD84.

6. El receptor CD84 afecta la reorganització del citoesquelet

Els estudis de reorganització del citoesquelet en el cas de cèl·lules RBL-2H3 s'han dut a terme mitjançant l'anàlisi del procés de *ruffling* de la membrana cel·lular. Aquest procés és un dels canvis estructurals més habituals i primerencs en la majoria de vies de transducció de senyals en resposta a diversos factors extracel·lulars, i consisteix en la formació de protusions de nous filaments d'actina polimeritzada a la superfície cel·lular, degut a la reorganització del citoesquelet d'actina. En el cas de cèl·lules adherides, com les RBL-2H3, és freqüent l'estudi del procés de *ruffling* de la membrana cel·lular, ja que això permet observar canvis en la reorganització del citoesquelet d'actina, sense alterar l'estat d'adhesió de les cèl·lules. A més s'ha reportat que l'estimulació del FcεRI en cèl·lules RBL-2H3, comporta un ràpid augment de la F-actina (*Filamentous actin*) i una elevada reorganització del seu citoesquelet, que té com a característica prominent la formació de les protusions de membrana observades en el procés de *ruffling* de la membrana (Frigeri and Apgar, 1999; Pfeiffer et al., 1985). Hi ha moltes molècules de senyalització que interaccionen amb el citoesquelet d'actina i que poden regular el procés de *ruffling*, com la proteïna GTPasa Rac, la proteïna Ras, l'adaptador GRB2 i la PI3K, entre d'altres. Canvis en el metabolisme dels fosfoinositols i en els nivells de calci intracel·lular també poden jugar un paper en el procés de *ruffling* de la membrana cel·lular. Hi ha diverses molècules que uneixen actina i que es localitzen en les protusions de membrana, convertint-se d'aquesta manera en dianes potencials per les molècules senyalitzadores que controlen el procés de *ruffling*. Corroborant les dades reportades a la literatura, ens els estudis realitzats en aquesta tesi, l'activació de cèl·lules RBL-2H3 a través del FcεRI comporta l'inici del procés de *ruffling* de membrana, mentre que en cèl·lules CD84 RBL-2H3, aquest procés es troba atenuat, indicant una menor reorganització del citoesquelet, promoguda per la

senyalització negativa que duu a terme el receptor CD84 sobre la via del FcεRI (veure Resultats, Fig 4.).

Pel que fa als estudis de reorganització del citoesquelet en cèl·lules LAD-2, s'ha observat que l'activació a través del FcεRI comporta una disminució en els nivells d'actina polimeritzada, és a dir, que l'estimulació del FcεRI comporta un procés de despolimerització (veure Resultats, Fig 36.). Això concorda amb dades publicades sobre aquest tema fins el moment, en què s'ha descrit que l'estimulació del FcεRI en mastòcits derivats de la medul·la òssia (BMMCs), desencadena una desestructuració i desunió de la F-actina d'una manera dependent de calci (Nishida et al., 2005). Aquesta despolimerització estaria involucrada en un pas d'exocitosi dels mastòcits, ja que el desplaçament de la F-actina cortical permetria als grànuls un major accés a la membrana (Nishida et al., 2005). Tornant als estudis realitzats en aquesta tesi, el tractament de cèl·lules LAD-2 amb un anticòs monoclonal anti-CD84 comporta una inhibició en la despolimerització d'actina observada després de l'activació a través del FcεRI, en comparació amb cèl·lules LAD-2 tractades amb una IgG isotípica (veure Resultats, Fig 37.). Novament aquestes dades indiquen que l'acció del CD84 indueix una disminució de la reorganització del citoesquelet després de l'estimulació del FcεRI.

El model representat a la Fig 2. especula amb els esdeveniments que ocorren en el mecanisme inhibitor del receptor CD84 quan aquest es co-lliga juntament amb el FcεRI, i que es troben més relacionats amb la via de la PI3K i la senyalització de calci. En aquest cas, la lligació del receptor d'alta afinitat per la IgE comporta la fosforilació ràpida de les cinases FYN i SYK, que formen part d'un complex de senyalització en el que participa l'enzim PI3K (veure Introducció, Apartat 4.2). La lligació del receptor CD84 comporta la fosforilació dels residus tirosina 279 i 324 de la seva cua citoplasmàtica, i una disminució de l'activació de la via de la PI3K, que es detecta a través d'una disminució en la fosforilació d'AKT. La disminució d'aquesta via comporta una sèrie d'efectes inhibidors en diversos processos, com la desgranulació, la reorganització del citoesquelet i la producció de factors de transcripció.

Model d'actuació del mecanisme inhibitor del receptor CD84

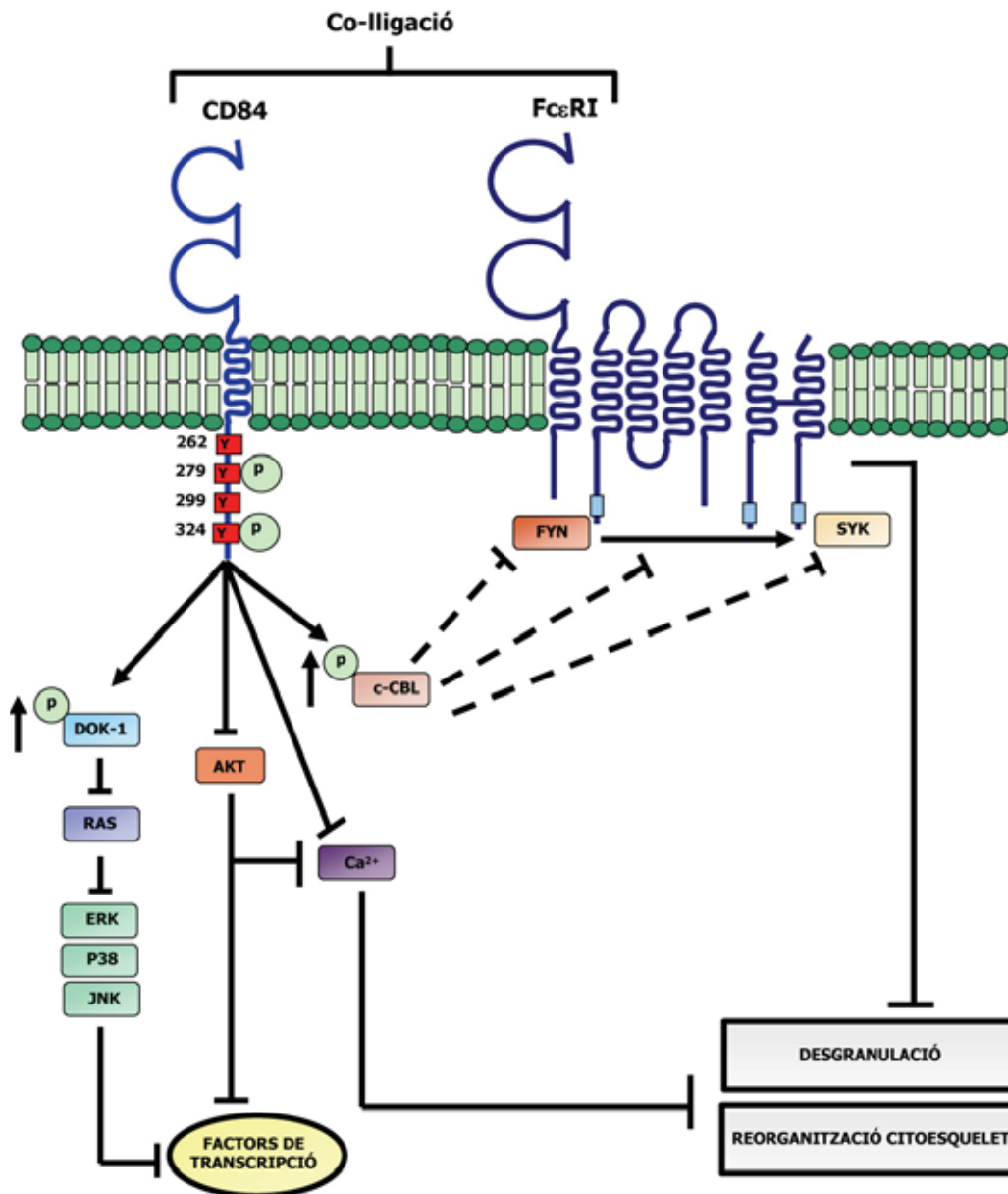


Fig 2. Model d'actuació del mecanisme inhibitor del receptor CD84 en la seva co-lligació amb el FcεRI. La co-lligació simultània del receptor CD84 i el FcεRI, comporta una sèrie d'esdeveniments mitjançant els quals el receptor CD84 actua inhibint alguns dels processos iniciats per la senyalització del FcεRI. La lligació del CD84 comporta una inhibició de la via de la PI3K i en conseqüència del senyal de calci, afectant així molts processos iniciats per la senyalització a través del FcεRI, com la desgranulació i la reorganització del citoesquelet.

7. Les cinases LYN i FPS/FES fosforilen de manera diferencial les tirosines presents a la cua citoplasmàtica del receptor CD84. La cinasa FYN fosforila totes les tirosines del CD84

Els estudis amb cèl·lules COS han permès determinar dues de les cinases principals en la fosforilació dels motius inhibitoris del receptor CD84: la cinasa LYN i la cinasa FPS/FES. La cinasa FYN també fosforila el receptor CD84, però actua sobre totes les tirosines de la cua citoplasmàtica del receptor; mentre que les cinases LYN i FPS/FES presenten una fosforilació diferencial dels motius tirosina on resideix la capacitat inhibidora del receptor CD84.

El fet que la cinasa FYN es trobi més implicada en processos de senyalització positius en mastòcits (la seva deficiència dóna lloc a fenotips d'hipodesgranulació) (veure Introducció, Taula 1) no la converteix en una candidata interessant a participar en el mecanisme inhibitori del CD84. Per altra banda, FYN encara conserva la capacitat de fosforilar el receptor CD84 en presència de les mutacions implicades en el mecanisme inhibitori d'aquest receptor (Y279F i Δ Y324) (veure Resultats, Fig 29.). Això suggereix que FYN no sembla una cinasa clau en el mecanisme inhibitori del receptor CD84.

LYN fosforila àmpliament el receptor CD84 *wild type*, però aquesta fosforilació es troba molt disminuïda quan es tracta dels mutants CD84 Y279F i CD84 Δ Y324. Concretament, la fosforilació de la tirosina més afectada en aquest cas, és la fosforilació de residu Y279 (veure Resultats, Fig 23. i 24.). En el cas de la cinasa FPS/FES, també fosforila àmpliament el receptor CD84 *wild type* i també presenta una reducció de la seva fosforilació quan són presents les mutacions Y279F i Δ Y324. En aquests cas, però, la fosforilació de la tirosina més afectada és la del residu Y324 (veure Resultats, Fig 26. i 27.). A més a més, la tirosina 324 es troba dins un motiu d'unió a la cinasa FPS/FES (seqüència **Tyr**-Glu-X-Val/Ile, on la X representa un aminoàcid qualsevol), tot i que en experiments realitzats al grup amb cèl·lules COS no s'observa una associació directa entre el receptor CD84 i la cinasa FES. Quan es combinen les dues tirosines claus en el mecanisme inhibitori del CD84 (Y279F i Δ Y324), les cinases LYN i FPS/FES són incapaces de fosforilar el receptor CD84, mentre que la cinasa FYN encara conserva aquesta capacitat (veure Resultats, Fig 25., 28. i 29.). Tant la cinasa LYN, com la cinasa FPS/FES s'han vist implicades en processos de

senyalització negatiu. S'ha descrit que BMMCs provinents de ratolins deficients per la cinasa LYN mostren un augment de la desgranulació, un augment de l'expressió de gens de citocines, una major activitat de la cinasa FYN, una menor activitat de la fosfatasa SHIP, i una activació perllongada de les MAPK ERK i P38 (Hernandez-Hansen et al., 2004; Kawakami et al., 2000; Odom et al., 2004; Parravicini et al., 2002). Per altra banda, mastòcits deficients per la cinasa FPS/FES mostren un fenotip d'hiperdesgranulació dependent d'IgE a baixes dosis d'antigen. A dosis més altes d'antigen que comporten una major intensitat d'estimulació, la funció de limitar la desgranulació en mastòcits que presenta la cinasa FPS/FES seria compensada per altres cinases (Udell et al., 2006). En el cas de macròfags i neutròfils, s'ha descrit que ratolins deficients per la proteïna FPS/FES mostren un augment a la sensibilitat al *shock* induït per lipopolisacàrid (LPS) (Zirngibl et al., 2002). Aquestes dades semblen assignar a la proteïna FPS/FES un paper regulador de la inflamació, potser mitjançant la inhibició de vies de senyalització pro-inflamatòries, o promovent vies de senyalització antiinflamatòries (Greer, 2002; Kuhn et al., 1993; O'Farrell et al., 2000). Tenint en compte que el CD84 presenta un paper inhibidor de l'activació mitjançada pel FcεRI, i que les cinases LYN i FPS/FES participen selectivament en la fosforilació de les tirosines clau en l'efecte inhibitori del CD84, es podrien proposar ambdues com a cinases claus en el mecanisme inhibidor del CD84. Per altra banda, la fosforilació de la cinasa FPS/FES és dependent de LYN (Udell et al., 2006). Això suggereix que potser ambdues cinases podrien participar de manera conjunta en la senyalització negativa del CD84.

En la Fig 3. es presenta el principal mecanisme de fosforilació del receptor CD84. La cinasa LYN actuaria fosforilant la tirosina 279 de la cua citoplasmàtica del receptor CD84. Per altra banda, la cinasa FPS/FES fosforilaria la tirosina 324, donat que aquesta tirosina es troba dins un motiu d'unió a la cinasa FES.

Model del mecanisme de fosforilació del receptor CD84

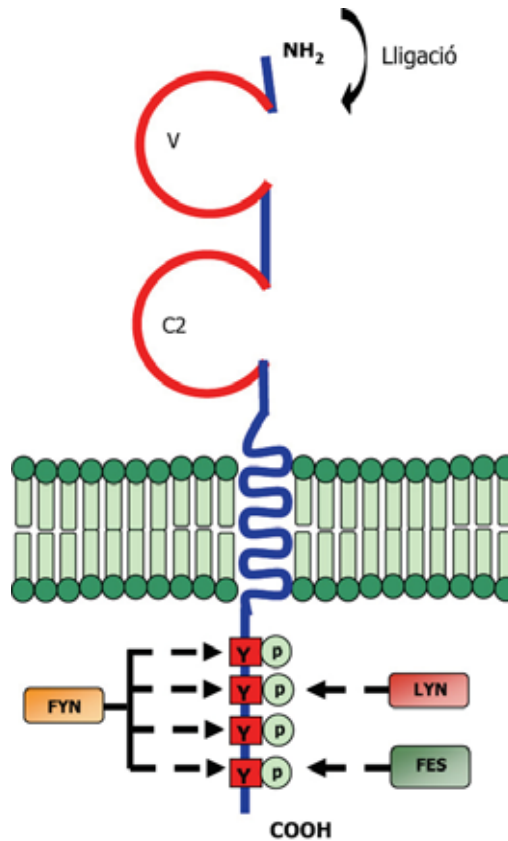


Fig 3. Mecanisme de fosforilació del receptor CD84. En aquest model es representa el principal mecanisme de fosforilació de les tirosines implicades en el mecanisme inhibitori del receptor CD84. Es representa LYN com la cinasa responsable de fosforilar la tirosina 279 de la cua citoplasmàtica del receptor CD84, i la cinasa FES com la responsable de fosforilar la tirosina 324.

8. Possibles molècules directament implicades en el mecanisme inhibitori del CD84

Per a l'estudi de les molècules que poden formar part del complex de senyalització del receptor CD84 per interacció directa amb el receptor, es van dur a terme dos assajos amb la tècnica del triple híbrid en llevats (Sayos et al., 2001), que permet detectar interaccions proteiques en condicions de fosforilació. Es va utilitzar el CD84 per caçar interaccions, FYN com a cinasa responsable de la fosforilació (donat que fosforila sense problemes tots els motius tirosina del receptor) i dues llibreries diferents: una provinent de cèl·lules B, i una altra provinent de medul·la òssia. Malauradament, en cap dels dos casos es van obtenir cap resultat satisfactori.

La majoria de receptors inhibidors de les cèl·lules immunes contenen en la seva cua citoplasmàtica un o més ITIMs (Ravetch and Lanier, 2000), basats en la següent seqüència aminoacídica: Ile/Val/Leu/Ser-X-**Tyr**-X-X-Leu/Val, on la X denota un aminoàcid qualsevol. La tirosina 324 de la cua citoplasmàtica del receptor CD84 es troba dins d'un d'aquests motius ITIMs (Ser-Ser-**Tyr**-Glu-Ile-Val-Ile), mentre que la tirosina 279 no segueix aquest motiu consens (Arg-Ile-**Tyr**-Asp-Glu-Ile). L'agregació induïda pels lligands dels receptors que contenen ITIMs, comporta la seva fosforilació en tirosina, sovint deguda a una src-cinasa. Això proveeix un lloc d'unió per al reclutament de fosfatases com SHP-1, SHP-2 o SHIP.

Estudis previs realitzats al nostre laboratori mitjançant la tècnica del triple híbrid en llevats, van demostrar que no existeix una interacció directa entre el CD84 i la fosfatasa SHP-1, el que descarta aquesta fosfatasa com a molècula mitjancera en la senyalització negativa del CD84. El fet que no s'observi un patró de defosforilació general, típic de l'acció de la fosfatasa SHP-1, en cèl·lules CD84 RBL-2H3 reforça aquesta hipòtesi.

Pel que fa a la fosfatasa SHP-2, relacionada amb mecanismes inhibitoris, s'ha demostrat que s'uneix a la tirosina 299 de la cua citoplasmàtica del receptor CD84, ja que la mutació Y299F aboleix la unió de SHP-2 al CD84 (veure Resultats, Fig 11.). La tirosina Y299 no participa en el mecanisme inhibitori del receptor (veure Resultats, Fig 12.). El fet que la tirosina 299 uneix SHP-2, juntament amb el fet que la mutació Y299F no afecta la inhibició que el CD84 realitza sobre la desgranulació depenent d'IgE, fa que aquesta fosfatasa no es consideri clau en el mecanisme inhibitori del receptor CD84.

La fosfatasa SHIP podria ser una bona candidata a participar en la inhibició mitjançada pel receptor CD84, ja que per una banda, els seus efectes de senyalització negativa no afecten l'estat de fosforilació general; i per una altra banda, SHIP pot ser reclutada per l'adaptador DOK (Brauweiler et al., 2000; Ono et al., 1997), del que s'han trobat evidències que participa en el mecanisme d'inhibició del receptor CD84. A més, s'han descrit evidències en BMMCs de ratolí que SHIP participa en la limitació de l'activació mastocitària a través del FcεRI (Huber et al., 1998; Kalesnikoff et al., 2002). L'ITIM on es troba la tirosina 324 no constitueix un motiu d'unió a SHIP (**Tyr**-X-X-Leu), el que

dificultaria la interacció directa entre la fosfatasa i el receptor CD84. Caldrien estudis per determinar exactament les molècules que s'uneixen a les tirosines 279 i 324 de la cua citoplasmàtica del CD84 per tal de determinar si poden formar part d'un complex en el que pogués participar la fosfatasa SHIP.

El model representat a la Fig 4. integra els possibles mecanismes que tenen lloc després de la lligació conjunta del receptor CD84 i el FcεRI. La lligació dependent d'antigen de la IgE unida al FcεRI, comporta l'inici de la cascada de senyalització d'aquest receptor per tal de donar lloc als processos característics de l'activació mastocitària, com la desgranulació, la reorganització del citoesquelet i la producció de citocines, entre d'altres. L'inici d'aquests processos ve marcat per la fosforilació de tres cinases principals: LYN, FYN i SYK. LYN participa en la via principal d'activació mastocitària, mentre que FYN ho fa a la via complementària (veure Introducció, Apartat 4). Els resultats mostrats en aquesta tesi, demostren que el receptor CD84 té capacitat per modular ambdues vies d'activació dels mastòcits, i que les tirosines 279 i 324 presents a la seva cua citoplasmàtica són claus per dur a terme l'efecte inhibitori del CD84 sobre la via de senyalització del FcεRI. DOK-1 i c-CBL participen en aquest mecanisme inhibitori i s'especula amb la possibilitat que la fosfatasa SHIP també hi formi part, mitjançant la seva unió a l'adaptador DOK-1. Per altra banda, la cinasa FES, implicada en processos de senyalització negatius (Zirngibl et al., 2002), també podria estar mitjançant alguns dels efectes del mecanisme inhibitori del receptor CD84, a través de la seva unió a la tirosina 324 de la cua citoplasmàtica del receptor.

Model d'integració del mecanisme inhibitor del receptor CD84 sobre la senyalització del FcεRI

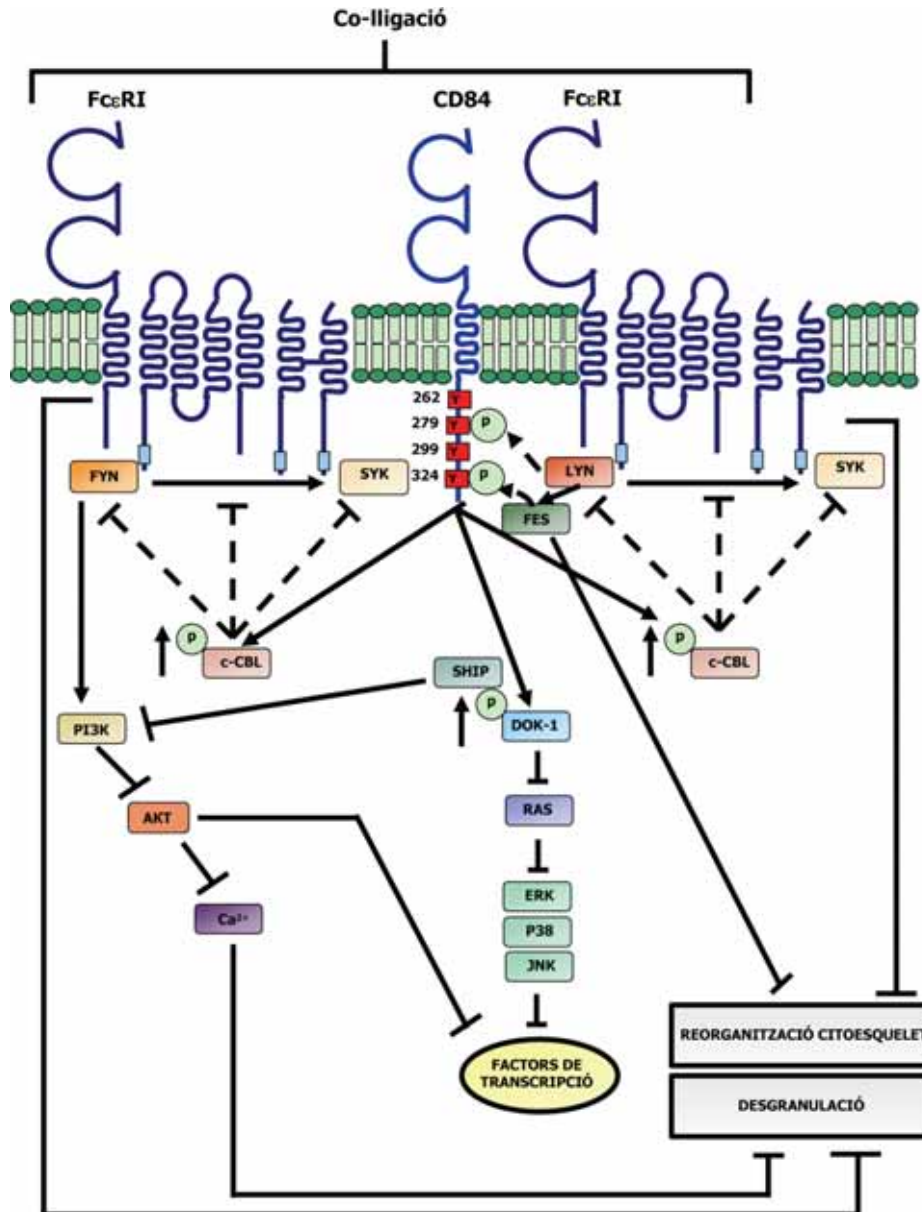


Fig 4. Model d'integració del mecanisme inhibitor del receptor CD84 sobre la senyalització del FcεRI després de la co-ligació simultània d'ambdós receptors. La lligació simultània del FcεRI i del receptor CD84, permet que aquest últim actuï modulador, de manera negativa, la senyalització mitjançada pel FcεRI. Per una banda, la lligació del CD84 comporta la fosforilació dels adaptador DOK-1 i c-CBL que actuen inhibint la via de les MAPKs i ubiquïtinitzant proteïnes implicades en la senyalització del FcεRI, respectivament. Per una altra banda, també comporta una inhibició de la via de la PI3K i en conseqüència del senyal de calci, afectant d'aquesta manera als processos iniciats per la senyalització a través del FcεRI. La co-ligació del receptor CD84 i el FcεRI també comporta la fosforilació de les tirosines 279 i 324, presents a la cua citoplasmàtica del CD84 i claus en la seva senyalització negativa. En el mecanisme de fosforilació d'aquestes tirosines, es representa la cinasa LYN com la responsable de fosforilar la tirosina 279, i la cinasa FPS/FES com la responsable de la fosforilació de la tirosina 324.

9. L'activació mastocitària comporta una disminució de l'expressió del receptor CD84

En cèl·lules CD84 RBL-2H3 s'ha observat que l'activació amb PMA més ionomicina comporta una disminució de l'expressió del receptor CD84 respecte els seus nivells d'expressió basals (veure Resultats, Fig 2.). Aquestes dades també s'observen en els experiments amb cèl·lules LAD-2. En cèl·lules LAD-2, a més, també s'ha vist que l'activació amb PMA més ionomicina comporta un augment de l'expressió del receptor CD150 (membre de la família SLAM), el qual no es detecta en mastòcits en condicions basals (veure Resultats, Fig 32.). Per altra banda, s'ha mirat l'estat d'expressió d'altres receptors membres de la família SLAM (CD229 i CD244) i s'ha observat que no s'expressen ni en condicions basals, ni en condicions d'activació, el que indicaria que aquests receptors no tenen cap paper en les funcions dels mastòcits (veure Resultats, Fig 31.). La disminució de l'expressió del receptor CD84 podria correspondre a un mecanisme d'atenuació dels receptors amb caràcter inhibitori, com el CD84, en el procés d'activació cel·lular. La modulació dels nivells d'expressió de proteïnes que controlen positiva o negativament la secreció mastocitària podria correspondre a un mecanisme per regular la funció del mastòcit. De fet en basòfils s'ha descrit que la manca de molècules d'acció positiva, com la cinasa SYK, condueix a un fenotip no secretor després de l'activació a través del FcεRI (Kepley et al., 1999); mentre que la deficiència de molècules d'acció negativa com la fosfatasa SHIP incrementen l'activitat secretora dependent d'IgE (Vonakis et al., 2001). En el cas del CD150, es desconeix la seva funció en mastòcits, donat que la seva expressió no havia estat detectada en condicions basals. El fet que augmenti la seva expressió després de l'activació, podria estar indicant que tindria algun efecte en l'activació mastocitària, o que podria ser algun marcador important en desordres com la mastocitosi, on es pot trobar un augment patològic del nombre de mastòcits i dels seus mediadors. En aquest cas, caldria estudiar també, si l'augment d'expressió del receptor CD150 va acompanyat de l'augment d'expressió de l'adaptador SAP (tampoc detectable en condicions basals) i si podrien exercir algun tipus d'efecte sobre la senyalització a través del FcεRI.

10. Implicacions funcionals del receptor CD84

En els estudis amb cèl·lules CD84 RBL-2H3 s'ha vist que el receptor CD84 actua com a receptor inhibitor a aquelles concentracions òptimes d'IgE on la resposta de desgranulació és superior, però no a baixes concentracions. El fet que no actuï a baixes concentracions es podria deure a que potser és necessari un cert grau d'activació per tal que tingui lloc la fosforilació i la senyalització del receptor CD84. També és concebible que seria desavantatjós suprimir completament les funcions del mastòcit, ja que aquest tipus cel·lular, juntament amb els basòfils, proveeixen una resposta protectora innata essencial a les infeccions bacterianes i parasitàries (Marshall, 2004). En el cas de cèl·lules LAD-2, la desgranulació dependent d'IgE mostra una corba dosi-resposta, però no es tenen evidències de la seva forma de campana (veure Resultats, Fig 38.). Probablement, aquest fet es deu a la manca de dosis elevades d'IgE usades a l'experiment. Es va partir com a dosi inicial d'IgE, aquella que s'havia considerat òptima segons dades reportades a la literatura, però, possiblement, l'addició de dosis més altes d'IgE comportaria una disminució de la desgranulació.

Contràriament als efectes observats del receptor CD84 en mastòcits, on presenta un paper inhibitor, s'ha descrit que aquest receptor juga un paper com a molècula co-estimuladora en cèl·lules T, on augmenta la proliferació i la secreció d'IFN γ (Martin et al., 2001; Tangye et al., 2003). Aquest efecte de co-estimulació també s'observa en cèl·lules T deficientes per la proteïna SAP obtingudes de pacients amb XLP, suggerint que el receptor CD84 participa en l'activació de cèl·lules T a través del TCR, d'una manera independent de SAP (Martin et al., 2001; Tangye et al., 2003). Una possible explicació a l'efecte contradictori que presenta el receptor CD84 en mastòcits (inhibitori) en comparació amb cèl·lules T (activador), podria ser que segons el tipus cel·lular es desencadenessin mecanismes de senyalització i/o molècules involucrades diferents en mastòcits respecte cèl·lules T després de la lligació del CD84. Aquesta hipòtesi es troba reforçada amb altres membres de la família SLAM, com el receptor CD244, on se li ha descrit un paper positiu o negatiu en funció de l'expressió dels adaptadors SAP o EAT-2 en diferents tipus cel·lulars o diferents estats de maduració (Parolini et al., 2000; Veillette et al., 2006).

Fins el moment encara no s'han generat ratolins deficientes pel CD84, tot i que el seu estudi aportaria dades interessants respecte la funció d'aquest receptor, i aportaria nova informació sobre les implicacions funcionals del receptor CD84 en diferents tipus cel·lulars. En aquest aspecte, però, és important remarcar que el receptor CD84 de ratolí no presenta la tirosina 324, identificada en el cas de la molècula humana com un dels motius que participen en el mecanisme inhibitori del CD84. Per altra banda, els models de ratolí sovint no reflecteixen acuradament la funció en humans. Aquests dos fets comporten que en l'estudi de la funció mastocitària del receptor CD84, el model de ratolí potser no sigui el més adequat. Una aproximació interessant a dur a terme en aquest estudi seria el *knockdown* selectiu del gen que codifica pel receptor CD84 o per altres molècules implicades en la seva via de senyalització, mitjançant tècniques de silenciament de RNA en models de cultius primaris de mastòcits.

Totes aquestes dades suggereixen que el CD84 no solament contribueix a variacions en el fenotip de secreció dels mastòcits, sinó que també mostren el receptor CD84 com una nova molècula que pot regular negativament la senyalització dependent del FcεRI. Així doncs, caldria considerar el possible paper del CD84 en al·lèrgies inflamatòries i altres desordres associats als mastòcits.

VI. CONCLUSIONS

VI. CONCLUSIONS

- Els resultats obtinguts en aquesta tesi, han permès caracteritzar el receptor CD84 com un nou receptor inhibidor de la cascada de senyalització iniciada pel FcεRI, després de la lligació de la IgE, en mastòcits. El mecanisme inhibitori del CD84 no afecta a la senyalització iniciada per estímuls osmòtics, com el Manitol.
- La interacció homofílica CD84-CD84 inhibeix tant esdeveniments primerencs (desgranulació, flux de calci, reorganització del citoesquelet, activació de MAPKs, activació d'AKT), com esdeveniments tardans (producció de citocines) en cèl·lules RBL-2H3 (mastòcits de rata).
- L'efecte inhibitori del receptor CD84 també es manté en cèl·lules LAD-2 (mastòcits humans) en els esdeveniments de desgranulació, reorganització del citoesquelet, activació de MAPKs i activació d'AKT, després del tractament amb un anticòs monoclonal agonista contra el CD84.
- Els adaptadors DOK-1 i c-CBL participen en la via de senyalització del receptor CD84 responsable de l'efecte inhibitori sobre la via del FcεRI.
- Les tirosines 279 i 324 de la cua citoplasmàtica del CD84 són les responsables d'exercir el mecanisme inhibitori del receptor. Les tirosines 262 i 299, englobades dins de motius consens d'unió a l'adaptador SAP, no participen en la inhibició mitjançada pel receptor CD84.
- La cinasa FYN té capacitat per fosforilar el receptor CD84, però no actua de manera diferencial sobre les tirosines de la seva cua citoplasmàtica.
- Les cinases LYN i FPS/FES fosforilen diferencialment les tirosines 279 i 324, responsables de la inhibició duta a terme pel receptor CD84 sobre la via de senyalització del FcεRI en mastòcits.
- L'efecte negatiu del CD84 sobre la via de senyalització del FcεRI, fa que el receptor CD84 es perfilii com una molècula amb un paper rellevant en la funció dels mastòcits, constituint així una possible diana per l'ús terapèutic en al·lèrgies inflamatòries i altres desordres associats als mastòcits.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Abramson J., Rozenblum G. and Pecht I. (2003) Dok protein family members are involved in signaling mediated by the type 1 Fcepsilon receptor. *Eur J Immunol* **33**, 85-91.
2. Agis H., Fureder W., Bankl H. C., Kundi M., Sperr W. R., Willheim M., Boltz-Nitulescu G., Butterfield J. H., Kishi K., Lechner K. and Valent P. (1996) Comparative immunophenotypic analysis of human mast cells, blood basophils and monocytes. *Immunology* **87**, 535-43.
3. Aketani S., Teshima R., Umezawa Y. and Sawada J. (2001) Correlation between cytosolic calcium concentration and degranulation in RBL-2H3 cells in the presence of various concentrations of antigen-specific IgEs. *Immunol Lett* **75**, 185-9.
4. Al-Alem U., Li C., Forey N., Relouzat F., Fondaneche M. C., Tavitigian S. V., Wang Z. Q., Latour S. and Yin L. (2005) Impaired Ig class switch in mice deficient for the X-linked lymphoproliferative disease gene Sap. *Blood* **106**, 2069-75.
5. Al-Muhsen S. Z., Shablovsky G., Olivenstein R., Mazer B. and Hamid Q. (2004) The expression of stem cell factor and c-kit receptor in human asthmatic airways. *Clin Exp Allergy* **34**, 911-6.
6. Alcalay M., Antolini F., Van de Ven W. J., Lanfrancione L., Grignani F. and Pelicci P. G. (1990) Characterization of human and mouse c-fes cDNA clones and identification of the 5' end of the gene. *Oncogene* **5**, 267-75.
7. Amin K., Janson C., Boman G. and Venge P. (2005) The extracellular deposition of mast cell products is increased in hypertrophic airways smooth muscles in allergic asthma but not in nonallergic asthma. *Allergy* **60**, 1241-7.
8. Ansel J. C., Kaynard A. H., Armstrong C. A., Olerud J., Bunnett N. and Payan D. (1996) Skin-nervous system interactions. *J Invest Dermatol* **106**, 198-204.
9. Argov S., Johnson D. R., Collins M., Koren H. S., Lipscomb H. and Purtilo D. T. (1986) Defective natural killing activity but retention of lymphocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Cell Immunol* **100**, 1-9.
10. Asai K., Kitaura J., Kawakami Y., Yamagata N., Tsai M., Carbone D. P., Liu F. T., Galli S. J. and Kawakami T. (2001) Regulation of mast cell survival by IgE. *Immunity* **14**, 791-800.
11. Aspenstrom P. (1997) A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton. *Curr Biol* **7**, 479-87.
12. Assarsson E., Kambayashi T., Persson C. M., Chambers B. J. and Ljunggren H. G. (2005) 2B4/CD48-mediated regulation of lymphocyte activation and function. *J Immunol* **175**, 2045-9.
13. Assarsson E., Kambayashi T., Schatzle J. D., Cramer S. O., von Bonin A., Jensen P. E., Ljunggren H. G. and Chambers B. J. (2004) NK cells stimulate proliferation of T and NK cells through 2B4/CD48 interactions. *J Immunol* **173**, 174-80.
14. Badertscher K., Bronnimann M., Karlen S., Braathen L. R. and Yawalkar N. (2005) Mast cell chymase is increased in chronic atopic dermatitis but not in psoriasis. *Arch Dermatol Res* **296**, 503-6.
15. Baraniuk J. N. (1997) Pathogenesis of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* **99**, S763-72.

16. Baumruker T. and Prieschl E. E. (2000) The role of sphingosine kinase in the signaling initiated at the high-affinity receptor for IgE (FcepsilonRI) in mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* **122**, 85-90.
17. Begueret H., Berger P., Vernejoux J. M., Dubuisson L., Marthan R. and Tunon-de-Lara J. M. (2007) Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax* **62**, 8-15.
18. Benhamou M., Ryba N. J., Kihara H., Nishikata H. and Siraganian R. P. (1993) Protein-tyrosine kinase p72syk in high affinity IgE receptor signaling. Identification as a component of pp72 and association with the receptor gamma chain after receptor aggregation. *J Biol Chem* **268**, 23318-24.
19. Benoit L., Wang X., Pabst H. F., Dutz J. and Tan R. (2000) Defective NK cell activation in X-linked lymphoproliferative disease. *J Immunol* **165**, 3549-53.
20. Berger P., Compton S. J., Molimard M., Walls A. F., N'Guyen C., Marthan R. and Tunon-De-Lara J. M. (1999) Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi. *Clin Exp Allergy* **29**, 804-12.
21. Berger P., Girodet P. O., Begueret H., Ousova O., Perng D. W., Marthan R., Walls A. F. and Tunon de Lara J. M. (2003) Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *Faseb J* **17**, 2139-41.
22. Berger P., N'Guyen C., Buckley M., Scotto-Gomez E., Marthan R. and Tunon-de-Lara J. M. (2002) Passive sensitization of human airways induces mast cell degranulation and release of tryptase. *Allergy* **57**, 592-9.
23. Bialy L. and Waldmann H. (2005) Inhibitors of protein tyrosine phosphatases: next-generation drugs? *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 3814-39.
24. Bischoff S. and Crowe S. E. (2005) Gastrointestinal food allergy: new insights into pathophysiology and clinical perspectives. *Gastroenterology* **128**, 1089-113.
25. Bischoff S. C. (2007) Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol* **7**, 93-104.
26. Bischoff S. C., Lorentz A., Schwengberg S., Weier G., Raab R. and Manns M. P. (1999a) Mast cells are an important cellular source of tumour necrosis factor alpha in human intestinal tissue. *Gut* **44**, 643-52.
27. Bischoff S. C., Sellge G., Schwengberg S., Lorentz A. and Manns M. P. (1999b) Stem cell factor-dependent survival, proliferation and enhanced releasability of purified mature mast cells isolated from human intestinal tissue. *Int Arch Allergy Immunol* **118**, 104-7.
28. Blank U. and Rivera J. (2004) The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol* **25**, 266-73.
29. Boles K. S. and Mathew P. A. (2001) Molecular cloning of CS1, a novel human natural killer cell receptor belonging to the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily. *Immunogenetics* **52**, 302-7.
30. Boles K. S., Stepp S. E., Bennett M., Kumar V. and Mathew P. A. (2001) 2B4 (CD244) and CS1: novel members of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily molecules expressed on natural killer cells and other leukocytes. *Immunol Rev* **181**, 234-49.
31. Borowski C. and Bendelac A. (2005) Signaling for NKT cell development: the SAP-FynT connection. *J Exp Med* **201**, 833-6.
32. Bottino C., Falco M., Parolini S., Marcenaro E., Augugliaro R., Sivori S., Landi E., Biassoni R., Notarangelo L. D., Moretta L. and Moretta A. (2001) NTB-A

- [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Exp Med* **194**, 235-46.
33. Boucheix C. and Rubinstein E. (2001) Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1189-205.
 34. Bouchon A., Cella M., Grierson H. L., Cohen J. I. and Colonna M. (2001) Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J Immunol* **167**, 5517-21.
 35. Bradding P. (2003) The role of the mast cell in asthma: a reassessment. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **3**, 45-50.
 36. Bradding P., Roberts J. A., Britten K. M., Montefort S., Djukanovic R., Mueller R., Heusser C. H., Howarth P. H. and Holgate S. T. (1994) Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**, 471-80.
 37. Bradding P., Walls A. F. and Holgate S. T. (2006) The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* **117**, 1277-84.
 38. Brauweiler A. M., Tamir I. and Cambier J. C. (2000) Bilevel control of B-cell activation by the inositol 5-phosphatase SHIP. *Immunol Rev* **176**, 69-74.
 39. Brdicka T., Imrich M., Angelisova P., Brdickova N., Horvath O., Spicka J., Hilgert I., Luskova P., Draber P., Novak P., Engels N., Wienands J., Simeoni L., Osterreicher J., Aguado E., Malissen M., Schraven B. and Horejsi V. (2002) Non-T cell activation linker (NTAL): a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling. *J Exp Med* **196**, 1617-26.
 40. Brightling C. E., Ammit A. J., Kaur D., Black J. L., Wardlaw A. J., Hughes J. M. and Bradding P. (2005a) The CXCL10/CXCR3 axis mediates human lung mast cell migration to asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 1103-8.
 41. Brightling C. E. and Bradding P. (2005) The re-emergence of the mast cell as a pivotal cell in asthma pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep* **5**, 130-5.
 42. Brightling C. E., Bradding P., Symon F. A., Holgate S. T., Wardlaw A. J. and Pavord I. D. (2002) Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* **346**, 1699-705.
 43. Brightling C. E., Kaur D., Berger P., Morgan A. J., Wardlaw A. J. and Bradding P. (2005b) Differential expression of CCR3 and CXCR3 by human lung and bone marrow-derived mast cells: implications for tissue mast cell migration. *J Leukoc Biol* **77**, 759-66.
 44. Brightling C. E., Symon F. A., Holgate S. T., Wardlaw A. J., Pavord I. D. and Bradding P. (2003) Interleukin-4 and -13 expression is co-localized to mast cells within the airway smooth muscle in asthma. *Clin Exp Allergy* **33**, 1711-6.
 45. Brown J. M., Wilson T. M. and Metcalfe D. D. (2008) The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. *Clin Exp Allergy* **38**, 4-18.
 46. Brown M. H., Boles K., van der Merwe P. A., Kumar V., Mathew P. A. and Barclay A. N. (1998) 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med* **188**, 2083-90.
 47. Bruhns P., Fremont S. and Deraon M. (2005) Regulation of allergy by Fc receptors. *Curr Opin Immunol* **17**, 662-9.

48. Burrows B., Martinez F. D., Halonen M., Barbee R. A. and Cline M. G. (1989) Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* **320**, 271-7.
49. Busse W., Corren J., Lanier B. Q., McAlary M., Fowler-Taylor A., Cioppa G. D., van As A. and Gupta N. (2001) Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* **108**, 184-90.
50. Calpe S., Erdos E., Liao G., Wang N., Rietdijk S., Simarro M., Scholtz B., Mooney J., Lee C. H., Shin M. S., Rajnavolgyi E., Schatzle J., Morse H. C., 3rd, Terhorst C. and Lanyi A. (2006) Identification and characterization of two related murine genes, Eat2a and Eat2b, encoding single SH2-domain adapters. *Immunogenetics* **58**, 15-25.
51. Calpe S., Wang N., Romero X., Berger S. B., Lanyi A., Engel P. and Terhorst C. (2008) The SLAM and SAP gene families control innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* **97**, 177-250.
52. Cannons J. L., Yu L. J., Jankovic D., Crotty S., Horai R., Kirby M., Anderson S., Cheever A. W., Sher A. and Schwartzberg P. L. (2006) SAP regulates T cell-mediated help for humoral immunity by a mechanism distinct from cytokine regulation. *J Exp Med* **203**, 1551-65.
53. Cantley L. C. and Neel B. G. (1999) New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4240-5.
54. Cao E., Ramagopal U. A., Fedorov A., Fedorov E., Yan Q., Lary J. W., Cole J. L., Nathenson S. G. and Almo S. C. (2006) NTB-A receptor crystal structure: insights into homophilic interactions in the signaling lymphocytic activation molecule receptor family. *Immunity* **25**, 559-70.
55. Care A., Mattia G., Montesoro E., Parolini I., Russo G., Colombo M. P. and Peschle C. (1994) c-fes expression in ontogenetic development and hematopoietic differentiation. *Oncogene* **9**, 739-47.
56. Carroll N. G., Mutavdzic S. and James A. L. (2002a) Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* **19**, 879-85.
57. Carroll N. G., Mutavdzic S. and James A. L. (2002b) Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. *Thorax* **57**, 677-82.
58. Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U. and Nishizuka Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* **257**, 7847-51.
59. Chan B., Lanyi A., Song H. K., Griesbach J., Simarro-Grande M., Poy F., Howie D., Sumegi J., Terhorst C. and Eck M. J. (2003) SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol* **5**, 155-60.
60. Chen G., Tai A. K., Lin M., Chang F., Terhorst C. and Huber B. T. (2005) Signaling lymphocyte activation molecule-associated protein is a negative regulator of the CD8 T cell response in mice. *J Immunol* **175**, 2212-8.
61. Chen R., Latour S., Shi X. and Veillette A. (2006) Association between SAP and FynT: Inducible SH3 domain-mediated interaction controlled by engagement of the SLAM receptor. *Mol Cell Biol* **26**, 5559-68.
62. Cherwinski H. M., Murphy C. A., Joyce B. L., Bigler M. E., Song Y. S., Zurawski S. M., Moshrefi M. M., Gorman D. M., Miller K. L., Zhang S., Sedgwick J. D. and

- Phillips J. H. (2005) The CD200 receptor is a novel and potent regulator of murine and human mast cell function. *J Immunol* **174**, 1348-56.
63. Choi O. H., Kim J. H. and Kinet J. P. (1996) Calcium mobilization via sphingosine kinase in signalling by the Fc epsilon RI antigen receptor. *Nature* **380**, 634-6.
64. Chong Z. Z. and Maiese K. (2007) The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histol Histopathol* **22**, 1251-67.
65. Chung B., Aoukaty A., Dutz J., Terhorst C. and Tan R. (2005) Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein controls NKT cell functions. *J Immunol* **174**, 3153-7.
66. Cocks B. G., Chang C. C., Carballido J. M., Yssel H., de Vries J. E. and Aversa G. (1995) A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* **376**, 260-3.
67. Coffey A. J., Brooksbank R. A., Brandau O., Oohashi T., Howell G. R., Bye J. M., Cahn A. P., Durham J., Heath P., Wray P., Pavitt R., Wilkinson J., Leversha M., Huckle E., Shaw-Smith C. J., Dunham A., Rhodes S., Schuster V., Porta G., Yin L., Serafini P., Sylla B., Zollo M., Franco B., Bolino A., Seri M., Lanyi A., Davis J. R., Webster D., Harris A., Lenoir G., de St Basile G., Jones A., Behlradsky B. H., Achatz H., Murken J., Fassler R., Sumegi J., Romeo G., Vaudin M., Ross M. T., Meindl A. and Bentley D. R. (1998) Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet* **20**, 129-35.
68. Cole Z. A., Clough G. F. and Church M. K. (2001) Inhibition by glucocorticoids of the mast cell-dependent weal and flare response in human skin in vivo. *Br J Pharmacol* **132**, 286-92.
69. Conrad B. and Antonarakis S. E. (2007) Gene duplication: a drive for phenotypic diversity and cause of human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **8**, 17-35.
70. Craig A. W. and Greer P. A. (2002) Fer kinase is required for sustained p38 kinase activation and maximal chemotaxis of activated mast cells. *Mol Cell Biol* **22**, 6363-74.
71. Craig A. W., Zirngibl R. and Greer P. (1999) Disruption of coiled-coil domains in Fer protein-tyrosine kinase abolishes trimerization but not kinase activation. *J Biol Chem* **274**, 19934-42.
72. Creticos P. S., Peters S. P., Adkinson N. F., Jr., Naclerio R. M., Hayes E. C., Norman P. S. and Lichtenstein L. M. (1984) Peptide leukotriene release after antigen challenge in patients sensitive to ragweed. *N Engl J Med* **310**, 1626-30.
73. Crotty S., Kersh E. N., Cannons J., Schwartzberg P. L. and Ahmed R. (2003) SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* **421**, 282-7.
74. Crotty S., McCausland M. M., Aubert R. D., Wherry E. J. and Ahmed R. (2006) Hypogammaglobulinemia and exacerbated CD8 T-cell-mediated immunopathology in SAP-deficient mice with chronic LCMV infection mimics human XLP disease. *Blood* **108**, 3085-93.
75. Cruse G., Kaur D., Yang W., Duffy S. M., Brightling C. E. and Bradding P. (2005) Activation of human lung mast cells by monomeric immunoglobulin E. *Eur Respir J* **25**, 858-63.
76. Czar M. J., Kersh E. N., Mijares L. A., Lanier G., Lewis J., Yap G., Chen A., Sher A., Duckett C. S., Ahmed R. and Schwartzberg P. L. (2001) Altered lymphocyte responses and cytokine production in mice deficient in the X-linked

- lymphoproliferative disease gene SH2D1A/DSHP/SAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7449-54.
77. Daeron M., Jaeger S., Du Pasquier L. and Vivier E. (2008) Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol Rev* **224**, 11-43.
 78. Dahlen S. E. and Kumlin M. (2004) Monitoring mast cell activation by prostaglandin D2 in vivo. *Thorax* **59**, 453-5.
 79. Damsgaard T. E., Olesen A. B., Sorensen F. B., Thestrup-Pedersen K. and Schiotz P. O. (1997) Mast cells and atopic dermatitis. Stereological quantification of mast cells in atopic dermatitis and normal human skin. *Arch Dermatol Res* **289**, 256-60.
 80. Davidson D., Shi X., Zhang S., Wang H., Nemer M., Ono N., Ohno S., Yanagi Y. and Veillette A. (2004) Genetic evidence linking SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product, to Src-related kinase FynT in T(H)2 cytokine regulation. *Immunity* **21**, 707-17.
 81. Davis S. J. and van der Merwe P. A. (1996) The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function. *Immunol Today* **17**, 177-87.
 82. de la Fuente M. A., Pizcueta P., Nadal M., Bosch J. and Engel P. (1997) CD84 leukocyte antigen is a new member of the Ig superfamily. *Blood* **90**, 2398-405.
 83. de la Fuente M. A., Tovar V., Pizcueta P., Nadal M., Bosch J. and Engel P. (1999) Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of the mouse homologue of CD84, a member of the CD2 family of cell surface molecules. *Immunogenetics* **49**, 249-55.
 84. de la Fuente M. A., Tovar V., Villamor N., Zapater N., Pizcueta P., Campo E., Bosch J. and Engel P. (2001) Molecular characterization and expression of a novel human leukocyte cell-surface marker homologous to mouse Ly-9. *Blood* **97**, 3513-20.
 85. Deane J. A. and Fruman D. A. (2004) Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* **22**, 563-98.
 86. Del Valle J. M., Engel P. and Martin M. (2003) The cell surface expression of SAP-binding receptor CD229 is regulated via its interaction with clathrin-associated adaptor complex 2 (AP-2). *J Biol Chem* **278**, 17430-7.
 87. Denburg J. A. (1992) Basophil and mast cell lineages in vitro and in vivo. *Blood* **79**, 846-60.
 88. Dikic I. (2002) CIN85/CMS family of adaptor molecules. *FEBS Lett* **529**, 110-5.
 89. Djukanovic R., Wilson S. J., Kraft M., Jarjour N. N., Steel M., Chung K. F., Bao W., Fowler-Taylor A., Matthews J., Busse W. W., Holgate S. T. and Fahy J. V. (2004) Effects of treatment with anti-immunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 583-93.
 90. Dong C., Temann U. A. and Flavell R. A. (2001) Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions. *J Immunol* **166**, 3659-62.
 91. Duan L., Reddi A. L., Ghosh A., Dimri M. and Band H. (2004) The Cbl family and other ubiquitin ligases: destructive forces in control of antigen receptor signaling. *Immunity* **21**, 7-17.
 92. Dupre L., Andolfi G., Tangye S. G., Clementi R., Locatelli F., Arico M., Aiuti A. and Roncarolo M. G. (2005) SAP controls the cytolytic activity of CD8+ T cells against EBV-infected cells. *Blood* **105**, 4383-9.

93. Eberl G., Lowin-Kropf B. and MacDonald H. R. (1999) Cutting edge: NKT cell development is selectively impaired in Fyn- deficient mice. *J Immunol* **163**, 4091-4.
94. Eccleston E., Leonard B. J., Lowe J. S. and Welford H. J. (1973) Basophilic leukaemia in the albino rat and a demonstration of the basopoietin. *Nat New Biol* **244**, 73-6.
95. Echtenacher B., Mannel D. N. and Hultner L. (1996) Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* **381**, 75-7.
96. Edwards C. P. and Aruffo A. (1993) Current applications of COS cell based transient expression systems. *Curr Opin Biotechnol* **4**, 558-63.
97. El-Hillal O., Kurosaki T., Yamamura H., Kinet J. P. and Scharenberg A. M. (1997) syk kinase activation by a src kinase-initiated activation loop phosphorylation chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1919-24.
98. el-Lati S. G., Dahinden C. A. and Church M. K. (1994) Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *J Invest Dermatol* **102**, 803-6.
99. El-Shazly A., Berger P., Girodet P. O., Ousova O., Fayon M., Vernejoux J. M., Marthan R. and Tunon-de-Lara J. M. (2006) Fraktalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol* **176**, 1860-8.
100. Engel P., Eck M. J. and Terhorst C. (2003) The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat Rev Immunol* **3**, 813-21.
101. Falco M., Marcenaro E., Romeo E., Bellora F., Marras D., Vely F., Ferracci G., Moretta L., Moretta A. and Bottino C. (2004) Homophilic interaction of NTBA, a member of the CD2 molecular family: induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells. *Eur J Immunol* **34**, 1663-72.
102. Feldman R. A., Gabilove J. L., Tam J. P., Moore M. A. and Hanafusa H. (1985) Specific expression of the human cellular fps/fes-encoded protein NCP92 in normal and leukemic myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 2379-83.
103. Feng G. S., Shen R., Heng H. H., Tsui L. C., Kazlauskas A. and Pawson T. (1994) Receptor-binding, tyrosine phosphorylation and chromosome localization of the mouse SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *Oncogene* **9**, 1545-50.
104. Fennelly J. A., Tiwari B., Davis S. J. and Evans E. J. (2001) CD2F-10: a new member of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily. *Immunogenetics* **53**, 599-602.
105. Field K. A., Holowka D. and Baird B. (1999) Structural aspects of the association of FcepsilonRI with detergent-resistant membranes. *J Biol Chem* **274**, 1753-8.
106. Finkelman F. D., Shea-Donohue T., Morris S. C., Gildea L., Strait R., Madden K. B., Schopf L. and Urban J. F., Jr. (2004) Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol Rev* **201**, 139-55.
107. Fischer M., Harvima I. T., Carvalho R. F., Moller C., Naukkarinen A., Enblad G. and Nilsson G. (2006) Mast cell CD30 ligand is upregulated in cutaneous inflammation and mediates degranulation-independent chemokine secretion. *J Clin Invest* **116**, 2748-56.
108. Flaig R. M., Stark S. and Watzl C. (2004) Cutting edge: NTB-A activates NK cells via homophilic interaction. *J Immunol* **172**, 6524-7.

109. Foster B., Schwartz L. B., Devouassoux G., Metcalfe D. D. and Prussin C. (2002) Characterization of mast-cell tryptase-expressing peripheral blood cells as basophils. *J Allergy Clin Immunol* **109**, 287-93.
110. Fraser C. C., Howie D., Morra M., Qiu Y., Murphy C., Shen Q., Gutierrez-Ramos J. C., Coyle A., Kingsbury G. A. and Terhorst C. (2002) Identification and characterization of SF2000 and SF2001, two new members of the immune receptor SLAM/CD2 family. *Immunogenetics* **53**, 843-50.
111. Freeland H. S., Pipkorn U., Schleimer R. P., Bascom R., Lichtenstein L. M., Naclerio R. M. and Peters S. P. (1989) Leukotriene B4 as a mediator of early and late reactions to antigen in humans: the effect of systemic glucocorticoid treatment in vivo. *J Allergy Clin Immunol* **83**, 634-42.
112. Frigeri L. and Apgar J. R. (1999) The role of actin microfilaments in the down-regulation of the degranulation response in RBL-2H3 mast cells. *J Immunol* **162**, 2243-50.
113. Furumoto Y., Brooks S., Olivera A., Takagi Y., Miyagishi M., Taira K., Casellas R., Beaven M. A., Gilfillan A. M. and Rivera J. (2006) Cutting Edge: Lentiviral short hairpin RNA silencing of PTEN in human mast cells reveals constitutive signals that promote cytokine secretion and cell survival. *J Immunol* **176**, 5167-71.
114. Furumoto Y., Nunomura S., Terada T., Rivera J. and Ra C. (2004) The FcepsilonRIbeta immunoreceptor tyrosine-based activation motif exerts inhibitory control on MAPK and IkappaB kinase phosphorylation and mast cell cytokine production. *J Biol Chem* **279**, 49177-87.
115. Gadue P., Morton N. and Stein P. L. (1999) The Src family tyrosine kinase Fyn regulates natural killer T cell development. *J Exp Med* **190**, 1189-96.
116. Galli G., Nuti S., Tavarini S., Galli-Stampino L., De Lalla C., Casorati G., Dellabona P. and Abrignani S. (2003) CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *J Exp Med* **197**, 1051-7.
117. Galli S. J., Grimbaldston M. and Tsai M. (2008) Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 478-86.
118. Galli S. J., Kalesnikoff J., Grimbaldston M. A., Piliponsky A. M., Williams C. M. and Tsai M. (2005a) Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* **23**, 749-86.
119. Galli S. J., Nakae S. and Tsai M. (2005b) Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* **6**, 135-42.
120. Gao N., Dang T., Dunnick W. A., Collins J. T., Blazar B. R. and Yuan D. (2005) Receptors and counterreceptors involved in NK-B cell interactions. *J Immunol* **174**, 4113-9.
121. Garni-Wagner B. A., Purohit A., Mathew P. A., Bennett M. and Kumar V. (1993) A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* **151**, 60-70.
122. Gauchat J. F., Henchoz S., Mazzei G., Aubry J. P., Brunner T., Blasey H., Life P., Talabot D., Flores-Romo L., Thompson J. and et al. (1993) Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* **365**, 340-3.
123. Gebhardt T., Lorentz A., Detmer F., Trautwein C., Bektas H., Manns M. P. and Bischoff S. C. (2005) Growth, phenotype, and function of human intestinal mast cells are tightly regulated by transforming growth factor beta1. *Gut* **54**, 928-34.
124. Gelfand E. W. (2004) Inflammatory mediators in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* **114**, S135-8.

125. Genovese A., Stellato C., Patella V., Lamparter-Schummert B., de Crescenzo G., Adt M. and Marone G. (1996) Contrast media are incomplete secretagogues acting on human basophils and mast cells isolated from heart and lung, but not skin tissue. *Int J Clin Lab Res* **26**, 192-8.
126. Gibbs B. F., Rathling A., Zillikens D., Huber M. and Haas H. (2006) Initial Fc epsilon RI-mediated signal strength plays a key role in regulating basophil signaling and deactivation. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 1060-7.
127. Gilfillan A. M. and Rivera J. (2009) The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol Rev* **228**, 149-69.
128. Gilfillan A. M. and Tkaczyk C. (2006) Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* **6**, 218-30.
129. Gilmour K. C. and Gaspar H. B. (2003) Pathogenesis and diagnosis of X-linked lymphoproliferative disease. *Expert Rev Mol Diagn* **3**, 549-61.
130. Gimborn K., Lessmann E., Kuppig S., Krystal G. and Huber M. (2005) SHIP down-regulates FcepsilonR1-induced degranulation at supraoptimal IgE or antigen levels. *J Immunol* **174**, 507-16.
131. Gluzman Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-82.
132. Gonzalez-Cabrero J., Wise C. J., Latchman Y., Freeman G. J., Sharpe A. H. and Reiser H. (1999) CD48-deficient mice have a pronounced defect in CD4(+) T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1019-23.
133. Gonzalez-Espinosa C., Odom S., Olivera A., Hobson J. P., Martinez M. E., Oliveira-Dos-Santos A., Barra L., Spiegel S., Penninger J. M. and 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**, 1453-65.
134. Greer P. (2002) Closing in on the biological functions of Fps/Fes and Fer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 278-89.
135. Greer P., Haigh J., Mbamalu G., Khoo W., Bernstein A. and Pawson T. (1994) The Fps/Fes protein-tyrosine kinase promotes angiogenesis in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **14**, 6755-63.
136. Grimbacher B., Hutloff A., Schlesier M., Glocker E., Warnatz K., Drager R., Eibel H., Fischer B., Schaffer A. A., Mages H. W., Kroczeck R. A. and Peter H. H. (2003) Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* **4**, 261-8.
137. Groneberg D. A., Bester C., Grutzkau A., Serowka F., Fischer A., Henz B. M. and Welker P. (2005a) Mast cells and vasculature in atopic dermatitis--potential stimulus of neoangiogenesis. *Allergy* **60**, 90-7.
138. Groneberg D. A., Serowka F., Peckenschneider N., Artuc M., Grutzkau A., Fischer A., Henz B. M. and Welker P. (2005b) Gene expression and regulation of nerve growth factor in atopic dermatitis mast cells and the human mast cell line-1. *J Neuroimmunol* **161**, 87-92.
139. Groneberg D. A., Welker P., Fischer T. C., Dinh Q. T., Grutzkau A., Peiser C., Wahn U., Henz B. M. and Fischer A. (2003) Down-regulation of vasoactive intestinal polypeptide receptor expression in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* **111**, 1099-105.
140. Guhl S., Lee H. H., Babina M., Henz B. M. and Zuberbier T. (2005) Evidence for a restricted rather than generalized stimulatory response of skin-derived human mast cells to substance P. *J Neuroimmunol* **163**, 92-101.

141. Gulliksson M., Palmberg L., Nilsson G., Ahlstedt S. and Kumlin M. (2006) Release of prostaglandin D2 and leukotriene C4 in response to hyperosmolar stimulation of mast cells. *Allergy* **61**, 1473-9.
142. Gurish M. F. and Austen K. F. (2001) The diverse roles of mast cells. *J Exp Med* **194**, F1-5.
143. Gustin S. E., Thien C. B. and Langdon W. Y. (2006) Cbl-b is a negative regulator of inflammatory cytokines produced by IgE-activated mast cells. *J Immunol* **177**, 5980-9.
144. Guyer B. J., Shimamoto S. R., Bradhurst A. L., Grossbard E. B., Dreskin S. C. and Nelson H. S. (2006) Mast cell inhibitor R112 is well tolerated and affects prostaglandin D2 but not other mediators, symptoms, or nasal volumes in a nasal challenge model of allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc* **27**, 208-13.
145. Haigh J., McVeigh J. and Greer P. (1996) The fps/fes tyrosine kinase is expressed in myeloid, vascular endothelial, epithelial, and neuronal cells and is localized in the trans-golgi network. *Cell Growth Differ* **7**, 931-44.
146. Hao Q. L., Heisterkamp N. and Groffen J. (1989) Isolation and sequence analysis of a novel human tyrosine kinase gene. *Mol Cell Biol* **9**, 1587-93.
147. Hao S., Kurosaki T. and August A. (2003) Differential regulation of NFAT and SRF by the B cell receptor via a PLCgamma-Ca(2+)-dependent pathway. *EMBO J* **22**, 4166-77.
148. Harada S., Bechtold T., Seeley J. K. and Purtilo D. T. (1982a) Cell-mediated immunity to Epstein-Barr virus (EBV) and natural killer (NK)-cell activity in the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Int J Cancer* **30**, 739-44.
149. Harada S., Sakamoto K., Seeley J. K., Lindsten T., Bechtold T., Yetz J., Rogers G., Pearson G. and Purtilo D. T. (1982b) Immune deficiency in the X-linked lymphoproliferative syndrome. I. Epstein-Barr virus-specific defects. *J Immunol* **129**, 2532-5.
150. Hart P. H., Grimbaldston M. A., Swift G. J., Jaksic A., Noonan F. P. and Finlay-Jones J. J. (1998) Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice. *J Exp Med* **187**, 2045-53.
151. Hasegawa S., Pawankar R., Suzuki K., Nakahata T., Furukawa S., Okumura K. and Ra C. (1999) Functional expression of the high affinity receptor for IgE (FcepsilonRI) in human platelets and its' intracellular expression in human megakaryocytes. *Blood* **93**, 2543-51.
152. Hata T., Aikoh T., Hirokawa M. and Hosoda M. (1998) Mycosis fungoides with involvement of the oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* **27**, 127-8.
153. Hemler M. E. (2001) Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* **155**, 1103-7.
154. Henning G., Kraft M. S., Derfuss T., Pirzer R., de Saint-Basile G., Aversa G., Fleckenstein B. and Meinel E. (2001) Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) regulates T cellular cytotoxicity. *Eur J Immunol* **31**, 2741-50.
155. Hernandez-Hansen V., Smith A. J., Surviladze Z., Chigaeiev A., Mazel T., Kalesnikoff J., Lowell C. A., Krystal G., Sklar L. A., Wilson B. S. and Oliver J. M. (2004) Dysregulated FcepsilonRI signaling and altered Fyn and SHIP activities in Lyn-deficient mast cells. *J Immunol* **173**, 100-12.
156. Hislop A. D., Taylor G. S., Sauce D. and Rickinson A. B. (2007) Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* **25**, 587-617.
157. Hjermstad S. J., Peters K. L., Briggs S. D., Glazer R. I. and Smithgall T. E. (1993) Regulation of the human c-fes protein tyrosine kinase (p93c-fes) by its

- src homology 2 domain and major autophosphorylation site (Tyr-713). *Oncogene* **8**, 2283-92.
158. Holgate S. T., Djukanovic R., Casale T. and Bousquet J. (2005) Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. *Clin Exp Allergy* **35**, 408-16.
159. Horvat A., Schwaiger F., Hager G., Brocker F., Streif R., Knyazev P., Ullrich A. and Kreutzberg G. W. (2001) A novel role for protein tyrosine phosphatase shp1 in controlling glial activation in the normal and injured nervous system. *J Neurosci* **21**, 865-74.
160. Howie D., Simarro M., Sayos J., Guirado M., Sancho J. and Terhorst C. (2002) Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Blood* **99**, 957-65.
161. Hron J. D., Caplan L., Gerth A. J., Schwartzberg P. L. and Peng S. L. (2004) SH2D1A regulates T-dependent humoral autoimmunity. *J Exp Med* **200**, 261-6.
162. Huang R., Abrink M., Gobl A. E., Nilsson G., Aveskogh M., Larsson L. G., Nilsson K. and Hellman L. (1993) Expression of a mast cell tryptase in the human monocytic cell lines U-937 and Mono Mac 6. *Scand J Immunol* **38**, 359-67.
163. Huber M., Helgason C. D., Damen J. E., Liu L., Humphries R. K. and Krystal G. (1998) The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11330-5.
164. Huels C., Germann T., Goedert S., Hoehn P., Koelsch S., Hultner L., Palm N., Rude E. and Schmitt E. (1995) Co-activation of naive CD4+ T cells and bone marrow-derived mast cells results in the development of Th2 cells. *Int Immunol* **7**, 525-32.
165. Isnardi I., Lesourne R., Bruhns P., Fridman W. H., Cambier J. C. and Daron M. (2004) Two distinct tyrosine-based motifs enable the inhibitory receptor FcγRIIB to cooperatively recruit the inositol phosphatases SHIP1/2 and the adapters Grb2/Grap. *J Biol Chem* **279**, 51931-8.
166. Iwaki S., Tkaczyk C., Metcalfe D. D. and Gilfillan A. M. (2005) Roles of adaptor molecules in mast cell activation. *Chem Immunol Allergy* **87**, 43-58.
167. Janssen E. and Zhang W. (2003) Adaptor proteins in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* **15**, 269-76.
168. Janssen E., Zhu M., Zhang W. and Koonpaew S. (2003) LAB: a new membrane-associated adaptor molecule in B cell activation. *Nat Immunol* **4**, 117-23.
169. Jarvikallio A., Harvima I. T. and Naukkarinen A. (2003) Mast cells, nerves and neuropeptides in atopic dermatitis and nummular eczema. *Arch Dermatol Res* **295**, 2-7.
170. Jascur T., Gilman J. and Mustelin T. (1997) Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in NFAT activation in T cells. *J Biol Chem* **272**, 14483-8.
171. Jolly P. S., Bektas M., Olivera A., Gonzalez-Espinosa C., Proia R. L., Rivera J., Milstien S. and Spiegel S. (2004) Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcεRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J Exp Med* **199**, 959-70.
172. Joseph M., Gounni A. S., Kusnierz J. P., Vorng H., Sarfati M., Kinet J. P., Tonnel A. B., Capron A. and Capron M. (1997) Expression and functions of the high-affinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors. *Eur J Immunol* **27**, 2212-8.
173. Kalesnikoff J., Baur N., Leitges M., Hughes M. R., Damen J. E., Huber M. and Krystal G. (2002) SHIP negatively regulates IgE + antigen-induced IL-6

- production in mast cells by inhibiting NF-kappa B activity. *J Immunol* **168**, 4737-46.
174. Kalesnikoff J. and Galli S. J. (2008) New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* **9**, 1215-23.
175. Kalesnikoff J., Huber M., Lam V., Damen J. E., Zhang J., Siraganian R. P. and Krystal G. (2001) Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival. *Immunity* **14**, 801-11.
176. Kalesnikoff J., Rios E. J., Chen C. C., Alejandro Barbieri M., Tsai M., Tam S. Y. and Galli S. J. (2007) Roles of RabGEF1/Rabex-5 domains in regulating Fc epsilon RI surface expression and Fc epsilon RI-dependent responses in mast cells. *Blood* **109**, 5308-17.
177. Kambayashi T., Assarsson E., Chambers B. J. and Ljunggren H. G. (2001) Cutting edge: Regulation of CD8(+) T cell proliferation by 2B4/CD48 interactions. *J Immunol* **167**, 6706-10.
178. Kamperschroer C., Dibble J. P., Meents D. L., Schwartzberg P. L. and Swain S. L. (2006) SAP is required for Th cell function and for immunity to influenza. *J Immunol* **177**, 5317-27.
179. Katz H. R. (2002) Inhibitory receptors and allergy. *Curr Opin Immunol* **14**, 698-704.
180. Kawabori S., Kanai N. and Tosho T. (1995) Proliferative activity of mast cells in allergic nasal mucosa. *Clin Exp Allergy* **25**, 173-8.
181. Kawakami T. and Galli S. J. (2002) Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol* **2**, 773-86.
182. Kawakami Y., Kitaura J., Satterthwaite A. B., Kato R. M., Asai K., Hartman S. E., Maeda-Yamamoto M., Lowell C. A., Rawlings D. J., Witte O. N. and Kawakami T. (2000) Redundant and opposing functions of two tyrosine kinases, Btk and Lyn, in mast cell activation. *J Immunol* **165**, 1210-9.
183. Kepley C. L., Taghavi S., Mackay G., Zhu D., Morel P. A., Zhang K., Ryan J. J., Satin L. S., Zhang M., Pandolfi P. P. and Saxon A. (2004) Co-aggregation of Fc gamma RII with Fc epsilon RI on human mast cells inhibits antigen-induced secretion and involves SHIP-Grb2-Dok complexes. *J Biol Chem* **279**, 35139-49.
184. Kepley C. L., Youssef L., Andrews R. P., Wilson B. S. and Oliver J. M. (1999) Syk deficiency in nonreleaser basophils. *J Allergy Clin Immunol* **104**, 279-84.
185. Kharas M. G. and Fruman D. A. (2005) ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res* **65**, 2047-53.
186. Kiel M. J., Yilmaz O. H., Iwashita T., Yilmaz O. H., Terhorst C. and Morrison S. J. (2005) SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**, 1109-21.
187. Kihara H. and Siraganian R. P. (1994) Src homology 2 domains of Syk and Lyn bind to tyrosine-phosphorylated subunits of the high affinity IgE receptor. *J Biol Chem* **269**, 22427-32.
188. Kim C. H., Qu C. K., Hangoc G., Cooper S., Anzai N., Feng G. S. and Broxmeyer H. E. (1999) Abnormal chemokine-induced responses of immature and mature hematopoietic cells from motheaten mice implicate the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in chemokine responses. *J Exp Med* **190**, 681-90.
189. Kim L. and Wong T. W. (1998) Growth factor-dependent phosphorylation of the actin-binding protein cortactin is mediated by the cytoplasmic tyrosine kinase FER. *J Biol Chem* **273**, 23542-8.

190. Kim Y. S., Ko H. M., Kang N. I., Song C. H., Zhang X., Chung W. C., Kim J. H., Choi I. H., Park Y. M., Kim G. Y., Im S. Y. and Lee H. K. (2007) Mast cells play a key role in the development of late airway hyperresponsiveness through TNF-alpha in a murine model of asthma. *Eur J Immunol* **37**, 1107-15.
191. Kimura T., Sakamoto H., Appella E. and Siraganian R. P. (1997a) The negative signaling molecule SH2 domain-containing inositol-polyphosphate 5-phosphatase (SHIP) binds to the tyrosine-phosphorylated beta subunit of the high affinity IgE receptor. *J Biol Chem* **272**, 13991-6.
192. Kimura T., Zhang J., Sagawa K., Sakaguchi K., Appella E. and Siraganian R. P. (1997b) Syk-independent tyrosine phosphorylation and association of the protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 with the high affinity IgE receptor. *J Immunol* **159**, 4426-34.
193. Kinet J. P. (1999) The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* **17**, 931-72.
194. Kingsbury G. A., Feeney L. A., Nong Y., Calandra S. A., Murphy C. J., Corcoran J. M., Wang Y., Prabhu Das M. R., Busfield S. J., Fraser C. C. and Villeval J. L. (2001) Cloning, expression, and function of BLAME, a novel member of the CD2 family. *J Immunol* **166**, 5675-80.
195. Kirshenbaum A. S., Akin C., Wu Y., Rottem M., Goff J. P., Beaven M. A., Rao V. K. and Metcalfe D. D. (2003) Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcepsilonRI or FcgammaRI. *Leuk Res* **27**, 677-82.
196. Kirshenbaum A. S., Kessler S. W., Goff J. P. and Metcalfe D. D. (1991) Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol* **146**, 1410-5.
197. Kitamura Y. (1989) Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol* **7**, 59-76.
198. Kitani S., Berenstein E., Mergenhagen S., Tempst P. and Siraganian R. P. (1991) A cell surface glycoprotein of rat basophilic leukemia cells close to the high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI). Similarity to human melanoma differentiation antigen ME491. *J Biol Chem* **266**, 1903-9.
199. Kitaura J., Asai K., Maeda-Yamamoto M., Kawakami Y., Kikkawa U. and Kawakami T. (2000) Akt-dependent cytokine production in mast cells. *J Exp Med* **192**, 729-40.
200. Koch C. A., Moran M., Sadowski I. and Pawson T. (1989) The common src homology region 2 domain of cytoplasmic signaling proteins is a positive effector of v-fps tyrosine kinase function. *Mol Cell Biol* **9**, 4131-40.
201. Kojima S., Yamamoto N., Kanazawa T. and Ovary Z. (1985) Monoclonal IgE-dependent eosinophil cytotoxicity to haptenated schistosomula of *Schistosoma japonicum*: enhancement of the cytotoxicity and expression of Fc receptors for IgE by *Nippostrongylus brasiliensis* infection. *J Immunol* **134**, 2719-22.
202. Koretzky G. A. and Myung P. S. (2001) Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol* **1**, 95-107.
203. Kraft S., Fleming T., Billingsley J. M., Lin S. Y., Jouvin M. H., Storz P. and Kinet J. P. (2005) Anti-CD63 antibodies suppress IgE-dependent allergic reactions in vitro and in vivo. *J Exp Med* **201**, 385-96.
204. Kraft S. and Kinet J. P. (2007) New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* **7**, 365-78.

205. Krishna M. T., Chauhan A., Little L., Sampson K., Hawksworth R., Mant T., Djukanovic R., Lee T. and Holgate S. (2001) Inhibition of mast cell tryptase by inhaled APC 366 attenuates allergen-induced late-phase airway obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* **107**, 1039-45.
206. Kronenberg M. and Gapin L. (2002) The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 557-68.
207. Kruse M., Meinl E., Henning G., Kuhnt C., Berchtold S., Berger T., Schuler G. and Steinkasserer A. (2001) Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J Immunol* **167**, 1989-95.
208. Kubin M. Z., Parshley D. L., Din W., Waugh J. Y., Davis-Smith T., Smith C. A., Macduff B. M., Armitage R. J., Chin W., Cassiano L., Borges L., Petersen M., Trinchieri G. and Goodwin R. G. (1999) Molecular cloning and biological characterization of NK cell activation-inducing ligand, a counterstructure for CD48. *Eur J Immunol* **29**, 3466-77.
209. Kubota K. (2002) A structurally variant form of the 2B4 antigen is expressed on the cell surface of mouse mast cells. *Microbiol Immunol* **46**, 589-92.
210. Kubota K., Katoh H., Muguruma K. and Koyama K. (1999) Characterization of a surface membrane molecule expressed by natural killer cells in most inbred mouse strains: monoclonal antibody C9.1 identifies an allelic form of the 2B4 antigen. *Immunology* **96**, 491-7.
211. Kuhn R., Lohler J., Rennick D., Rajewsky K. and Muller W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263-74.
212. Kulka M., Alexopoulou L., Flavell R. A. and Metcalfe D. D. (2004) Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 174-82.
213. Kumaresan P. R., Lai W. C., Chuang S. S., Bennett M. and Mathew P. A. (2002) CS1, a novel member of the CD2 family, is homophilic and regulates NK cell function. *Mol Immunol* **39**, 1-8.
214. Kyo S., Sada K., Qu X., Maeno K., Miah S. M., Kawauchi-Kamata K. and Yamamura H. (2003) Negative regulation of Lyn protein-tyrosine kinase by c-Cbl ubiquitin-protein ligase in Fc epsilon RI-mediated mast cell activation. *Genes Cells* **8**, 825-36.
215. Laffargue M., Calvez R., Finan P., Trifilieff A., Barbier M., Altruda F., Hirsch E. and Wymann M. P. (2002) Phosphoinositide 3-kinase gamma is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity* **16**, 441-51.
216. Lafont F. and Simons K. (2001) Raft-partitioning of the ubiquitin ligases Cbl and Nedd4 upon IgE-triggered cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3180-4.
217. Lahortiga I., Akin C., Cools J., Wilson T. M., Mentens N., Arthur D. C., Maric I., Noel P., Kocabas C., Marynen P., Lessin L. S., Wlodarska I., Robyn J. and Metcalfe D. D. (2008) Activity of imatinib in systemic mastocytosis with chronic basophilic leukemia and a PRKG2-PDGFRB fusion. *Haematologica* **93**, 49-56.
218. Laitinen L. A., Laitinen A. and Haahtela T. (1993) Airway mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. *Am Rev Respir Dis* **147**, 697-704.
219. Latchman Y., McKay P. F. and Reiser H. (1998) Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48. *J Immunol* **161**, 5809-12.
220. Latour S. (2007) Natural killer T cells and X-linked lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **7**, 510-4.

221. Latour S., Gish G., Helgason C. D., Humphries R. K., Pawson T. and Veillette A. (2001) Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat Immunol* **2**, 681-90.
222. Latour S., Roncagalli R., Chen R., Bakinowski M., Shi X., Schwartzberg P. L., Davidson D. and Veillette A. (2003) Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat Cell Biol* **5**, 149-54.
223. Latour S. and Veillette A. (2004) The SAP family of adaptors in immune regulation. *Semin Immunol* **16**, 409-19.
224. Lee K. M., McNerney M. E., Stepp S. E., Mathew P. A., Schatzle J. D., Bennett M. and Kumar V. (2004) 2B4 acts as a non-major histocompatibility complex binding inhibitory receptor on mouse natural killer cells. *J Exp Med* **199**, 1245-54.
225. Lee S. H., Miyagi T. and Biron C. A. (2007) Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends Immunol* **28**, 252-9.
226. Letwin K., Yee S. P. and Pawson T. (1988) Novel protein-tyrosine kinase cDNAs related to fps/fes and eph cloned using anti-phosphotyrosine antibody. *Oncogene* **3**, 621-7.
227. Leung D. Y., Boguniewicz M., Howell M. D., Nomura I. and Hamid Q. A. (2004) New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* **113**, 651-7.
228. Li C., Iosef C., Jia C. Y., Han V. K. and Li S. S. (2003) Dual functional roles for the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP/SH2D1A in signaling through the signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) family of immune receptors. *J Biol Chem* **278**, 3852-9.
229. Lindstedt K. A. and Kovanen P. T. (2004) Mast cells in vulnerable coronary plaques: potential mechanisms linking mast cell activation to plaque erosion and rupture. *Curr Opin Lipidol* **15**, 567-73.
230. Lindsten T., Seeley J. K., Ballow M., Sakamoto K., St Onge S., Yetz J., Aman P. and Purtilo D. T. (1982) Immune deficiency in the X-linked lymphoproliferative syndrome. II. Immunoregulatory T cell defects. *J Immunol* **129**, 2536-40.
231. Linnekin D. (1999) Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 1053-74.
232. Lorentz A., Schuppan D., Gebert A., Manns M. P. and Bischoff S. C. (2002) Regulatory effects of stem cell factor and interleukin-4 on adhesion of human mast cells to extracellular matrix proteins. *Blood* **99**, 966-72.
233. Lorentz A., Schwengberg S., Mierke C., Manns M. P. and Bischoff S. C. (1999) Human intestinal mast cells produce IL-5 in vitro upon IgE receptor cross-linking and in vivo in the course of intestinal inflammatory disease. *Eur J Immunol* **29**, 1496-503.
234. Lorentz A., Schwengberg S., Sellge G., Manns M. P. and Bischoff S. C. (2000) Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: role of IgE receptor cross-linking and IL-4. *J Immunol* **164**, 43-8.
235. Lu L. F., Lind E. F., Gondek D. C., Bennett K. A., Gleeson M. W., Pino-Lagos K., Scott Z. A., Coyle A. J., Reed J. L., Van Snick J., Strom T. B., Zheng X. X. and Noelle R. J. (2006) Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* **442**, 997-1002.
236. Ma C. S., Hare N. J., Nichols K. E., Dupre L., Andolfi G., Roncarolo M. G., Adelstein S., Hodgkin P. D. and Tangye S. G. (2005) Impaired humoral immunity in X-linked lymphoproliferative disease is associated with defective IL-10 production by CD4+ T cells. *J Clin Invest* **115**, 1049-59.

237. Ma C. S., Nichols K. E. and Tangye S. G. (2007) Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu Rev Immunol* **25**, 337-79.
238. Ma C. S., Pittaluga S., Avery D. T., Hare N. J., Maric I., Klion A. D., Nichols K. E. and Tangye S. G. (2006) Selective generation of functional somatically mutated IgM+CD27+, but not Ig isotype-switched, memory B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* **116**, 322-33.
239. MacDonald I., Levy J. and Pawson T. (1985) Expression of the mammalian c-fes protein in hematopoietic cells and identification of a distinct fes-related protein. *Mol Cell Biol* **5**, 2543-51.
240. Macleod J. D., Anderson D. F., Baddeley S. M., Holgate S. T., McGill J. I. and Roche W. R. (1997) Immunolocalization of cytokines to mast cells in normal and allergic conjunctiva. *Clin Exp Allergy* **27**, 1328-34.
241. Magro A. M. and Alexander A. (1974) Histamine release: in vitro studies of the inhibitory region of the dose-response curve. *J Immunol* **112**, 1762-5.
242. Malaviya R. and Georges A. (2002) Regulation of mast cell-mediated innate immunity during early response to bacterial infection. *Clin Rev Allergy Immunol* **22**, 189-204.
243. 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.
244. Malbec O., Malissen M., Isnardi I., Lesourne R., Mura A. M., Fridman W. H., Malissen B. and Daeron M. (2004) Linker for activation of T cells integrates positive and negative signaling in mast cells. *J Immunol* **173**, 5086-94.
245. Malbran A., Belmonte L., Ruibal-Ares B., Bare P., Massud I., Parodi C., Felippo M., Hodinka R., Haines K., Nichols K. E. and de Bracco M. M. (2004) Loss of circulating CD27+ memory B cells and CCR4+ T cells occurring in association with elevated EBV loads in XLP patients surviving primary EBV infection. *Blood* **103**, 1625-31.
246. Marodi L. and Notarangelo L. D. (2007) Immunological and genetic bases of new primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol* **7**, 851-61.
247. Marone G., Bova M., Detoraki A., Onorati A. M., Rossi F. W. and Spadaro G. (2004) The human heart as a shock organ in anaphylaxis. *Novartis Found Symp* **257**, 133-49; discussion 149-60, 276-85.
248. Marone G., Triggiani M., Genovese A. and Paulis A. D. (2005) Role of human mast cells and basophils in bronchial asthma. *Adv Immunol* **88**, 97-160.
249. Marshall J. S. (2004) Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* **4**, 787-99.
250. Marshall J. S. and Jawdat D. M. (2004) Mast cells in innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 21-7.
251. Martin M., Del Valle J. M., Saborit I. and Engel P. (2005) Identification of Grb2 as a novel binding partner of the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein binding receptor CD229. *J Immunol* **174**, 5977-86.
252. Martin M., Romero X., de la Fuente M. A., Tovar V., Zapater N., Esplugues E., Pizcueta P., Bosch J. and Engel P. (2001) CD84 functions as a homophilic adhesion molecule and enhances IFN-gamma secretion: adhesion is mediated by Ig-like domain 1. *J Immunol* **167**, 3668-76.
253. Matsuda H., Watanabe N., Kiso Y., Hirota S., Ushio H., Kannan Y., Azuma M., Koyama H. and Kitamura Y. (1990) Necessity of IgE antibodies and mast cells

- for manifestation of resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* ticks in mice. *J Immunol* **144**, 259-62.
254. Matsuda K., Piliponsky A. M., Iikura M., Nakae S., Wang E. W., Dutta S. M., Kawakami T., Tsai M. and Galli S. J. (2005) Monomeric IgE enhances human mast cell chemokine production: IL-4 augments and dexamethasone suppresses the response. *J Allergy Clin Immunol* **116**, 1357-63.
255. Maurer M., Echtenacher B., Hultner L., Kollias G., Mannel D. N., Langley K. E. and Galli S. J. (1998) The c-kit ligand, stem cell factor, can enhance innate immunity through effects on mast cells. *J Exp Med* **188**, 2343-8.
256. Maurer M., Lopez Kostka S., Siebenhaar F., Moelle K., Metz M., Knop J. and von Stebut E. (2006) Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *Faseb J* **20**, 2460-7.
257. Maurer M., Wedemeyer J., Metz M., Piliponsky A. M., Weller K., Chatterjea D., Clouthier D. E., Yanagisawa M. M., Tsai M. and Galli S. J. (2004) Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature* **432**, 512-6.
258. Mavaddat N., Mason D. W., Atkinson P. D., Evans E. J., Gilbert R. J., Stuart D. I., Fennelly J. A., Barclay A. N., Davis S. J. and Brown M. H. (2000) Signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) is homophilic but self-associates with very low affinity. *J Biol Chem* **275**, 28100-9.
259. McAdam A. J., Greenwald R. J., Levin M. A., Chernova T., Malenkovich N., Ling V., Freeman G. J. and Sharpe A. H. (2001) ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* **409**, 102-5.
260. Mekori Y. A. (2004) The mastocyte: the "other" inflammatory cell in immunopathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 52-7.
261. Mekori Y. A. and Metcalfe D. D. (2000) Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev* **173**, 131-40.
262. Melendez A. J. and Khaw A. K. (2002) Dichotomy of Ca²⁺ signals triggered by different phospholipid pathways in antigen stimulation of human mast cells. *J Biol Chem* **277**, 17255-62.
263. Meltzer E. O., Berkowitz R. B. and Grossbard E. B. (2005) An intranasal Syk-kinase inhibitor (R112) improves the symptoms of seasonal allergic rhinitis in a park environment. *J Allergy Clin Immunol* **115**, 791-6.
264. Messmer B., Eissmann P., Stark S. and Watzl C. (2006) CD48 stimulation by 2B4 (CD244)-expressing targets activates human NK cells. *J Immunol* **176**, 4646-50.
265. Metcalfe D. D. (2008) Mast cells and mastocytosis. *Blood* **112**, 946-56.
266. Metcalfe D. D., Baram D. and Mekori Y. A. (1997) Mast cells. *Physiol Rev* **77**, 1033-79.
267. Metz M., Piliponsky A. M., Chen C. C., Lammel V., Abrink M., Pejler G., Tsai M. and Galli S. J. (2006) Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science* **313**, 526-30.
268. Mierke C. T., Ballmaier M., Werner U., Manns M. P., Welte K. and Bischoff S. C. (2000) Human endothelial cells regulate survival and proliferation of human mast cells. *J Exp Med* **192**, 801-11.
269. Mikhalap S. V., Shlapatska L. M., Berdova A. G., Law C. L., Clark E. A. and Sidorenko S. P. (1999) CDw150 associates with src-homology 2-containing inositol phosphatase and modulates CD95-mediated apoptosis. *J Immunol* **162**, 5719-27.

270. Miller H. R., Wright S. H., Knight P. A. and Thornton E. M. (1999) A novel function for transforming growth factor-beta1: upregulation of the expression and the IgE-independent extracellular release of a mucosal mast cell granule-specific beta-chymase, mouse mast cell protease-1. *Blood* **93**, 3473-86.
271. Mitsui H., Furitsu T., Dvorak A. M., Irani A. M., Schwartz L. B., Inagaki N., Takei M., Ishizaka K., Zsebo K. M., Gillis S. and et al. (1993) Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 735-9.
272. Modregger J., Ritter B., Witter B., Paulsson M. and Plomann M. (2000) All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *J Cell Sci* **113 Pt 24**, 4511-21.
273. Molfetta R., Belleudi F., Peruzzi G., Morrone S., Leone L., Dikic I., Piccoli M., Frati L., Torrisi M. R., Santoni A. and Paolini R. (2005) CIN85 regulates the ligand-dependent endocytosis of the IgE receptor: a new molecular mechanism to dampen mast cell function. *J Immunol* **175**, 4208-16.
274. Molfetta R., Peruzzi G., Santoni A. and Paolini R. (2007) Negative signals from FcepsilonRI engagement attenuate mast cell functions. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **55**, 219-29.
275. Montrucchio G., Alloatti G. and Camussi G. (2000) Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* **80**, 1669-99.
276. Moretta A., Bottino C., Parolini S., Moretta L., Biassoni R. and Notarangelo L. D. (2001) Cellular and molecular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **1**, 513-7.
277. Morra M., Barrington R. A., Abadia-Molina A. C., Okamoto S., Julien A., Gullo C., Kalsy A., Edwards M. J., Chen G., Spolski R., Leonard W. J., Huber B. T., Borrow P., Biron C. A., Satoskar A. R., Carroll M. C. and Terhorst C. (2005) Defective B cell responses in the absence of SH2D1A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4819-23.
278. Morra M., Howie D., Grande M. S., Sayos J., Wang N., Wu C., Engel P. and Terhorst C. (2001a) X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu Rev Immunol* **19**, 657-82.
279. Morra M., Lu J., Poy F., Martin M., Sayos J., Calpe S., Gullo C., Howie D., Rietdijk S., Thompson A., Coyle A. J., Denny C., Yaffe M. B., Engel P., Eck M. J. and Terhorst C. (2001b) Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *Embo J* **20**, 5840-52.
280. Morra M., Simarro-Grande M., Martin M., Chen A. S., Lanyi A., Silander O., Calpe S., Davis J., Pawson T., Eck M. J., Sumegi J., Engel P., Li S. C. and Terhorst C. (2001c) Characterization of SH2D1A missense mutations identified in X-linked lymphoproliferative disease patients. *J Biol Chem* **276**, 36809-16.
281. Mullen M. M., Haan K. M., Longnecker R. and Jardetzky T. S. (2002) Structure of the Epstein-Barr virus gp42 protein bound to the MHC class II receptor HLA-DR1. *Mol Cell* **9**, 375-85.
282. Munitz A., Bachelet I., Fraenkel S., Katz G., Mandelboim O., Simon H. U., Moretta L., Colonna M. and Levi-Schaffer F. (2005) 2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils. *J Immunol* **174**, 110-8.
283. Nadler M. J., Matthews S. A., Turner H. and Kinet J. P. (2000) Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function. *Adv Immunol* **76**, 325-55.
284. Nagata H., Worobec A. S., Oh C. K., Chowdhury B. A., Tannenbaum S., Suzuki Y. and Metcalfe D. D. (1995) Identification of a point mutation in the catalytic

- domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10560-4.
285. Nakae S., Ho L. H., Yu M., Monteforte R., Iikura M., Suto H. and Galli S. J. (2007) Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice. *J Allergy Clin Immunol* **120**, 48-55.
286. Nakajima H., Cella M., Langen H., Friedlein A. and Colonna M. (1999) Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *Eur J Immunol* **29**, 1676-83.
287. Nakajima T., Matsumoto K., Suto H., Tanaka K., Ebisawa M., Tomita H., Yuki K., Katsunuma T., Akasawa A., Hashida R., Sugita Y., Ogawa H., Ra C. and Saito H. (2001) Gene expression screening of human mast cells and eosinophils using high-density oligonucleotide probe arrays: abundant expression of major basic protein in mast cells. *Blood* **98**, 1127-34.
288. Nakata K., Yoshimaru T., Suzuki Y., Inoue T., Ra C., Yakura H. and Mizuno K. (2008) Positive and negative regulation of high affinity IgE receptor signaling by Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1. *J Immunol* **181**, 5414-24.
289. Nanda N., Andre P., Bao M., Clauser K., Deguzman F., Howie D., Conley P. B., Terhorst C. and Phillips D. R. (2005) Platelet aggregation induces platelet aggregate stability via SLAM family receptor signaling. *Blood* **106**, 3028-34.
290. Nichols K. E., Harkin D. P., Levitz S., Krainer M., Kolquist K. A., Genovese C., Bernard A., Ferguson M., Zuo L., Snyder E., Buckler A. J., Wise C., Ashley J., Lovett M., Valentine M. B., Look A. T., Gerald W., Housman D. E. and Haber D. A. (1998) Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13765-70.
291. Nichols K. E., Hom J., Gong S. Y., Ganguly A., Ma C. S., Cannons J. L., Tangye S. G., Schwartzberg P. L., Koretzky G. A. and Stein P. L. (2005a) Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat Med* **11**, 340-5.
292. Nichols K. E., Ma C. S., Cannons J. L., Schwartzberg P. L. and Tangye S. G. (2005b) Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev* **203**, 180-99.
293. Nishida K., Yamasaki S., Ito Y., Kabu K., Hattori K., Tezuka T., Nishizumi H., Kitamura D., Goitsuka R., Geha R. S., Yamamoto T., Yagi T. and Hirano T. (2005) Fc{epsilon}RI-mediated mast cell degranulation requires calcium-independent microtubule-dependent translocation of granules to the plasma membrane. *J Cell Biol* **170**, 115-26.
294. Nishikata H., Oliver C., Mergenhagen S. E. and Siraganian R. P. (1992) The rat mast cell antigen AD1 (homologue to human CD63 or melanoma antigen ME491) is expressed in other cells in culture. *J Immunol* **149**, 862-70.
295. Nishizumi H. and Yamamoto T. (1997) Impaired tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ mobilization, but not degranulation, in lyn-deficient bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* **158**, 2350-5.
296. O'Farrell A. M., Parry D. A., Zindy F., Roussel M. F., Lees E., Moore K. W. and Mui A. L. (2000) Stat3-dependent induction of p19INK4D by IL-10 contributes to inhibition of macrophage proliferation. *J Immunol* **164**, 4607-15.
297. Odom S., Gomez G., Kovarova M., Furumoto Y., Ryan J. J., Wright H. V., Gonzalez-Espinosa C., Hibbs M. L., Harder K. W. and Rivera J. (2004) Negative

- regulation of immunoglobulin E-dependent allergic responses by Lyn kinase. *J Exp Med* **199**, 1491-502.
298. Okayama Y., Hagaman D. D. and Metcalfe D. D. (2001) A comparison of mediators released or generated by IFN-gamma-treated human mast cells following aggregation of Fc gamma RI or Fc epsilon RI. *J Immunol* **166**, 4705-12.
299. Olivera A. and Rivera J. (2005) Sphingolipids and the balancing of immune cell function: lessons from the mast cell. *J Immunol* **174**, 1153-8.
300. Olivera A., Urtz N., Mizugishi K., Yamashita Y., Gilfillan A. M., Furumoto Y., Gu H., Proia R. L., Baumruker T. and Rivera J. (2006) IgE-dependent activation of sphingosine kinases 1 and 2 and secretion of sphingosine 1-phosphate requires Fyn kinase and contributes to mast cell responses. *J Biol Chem* **281**, 2515-25.
301. Ono M., Okada H., Bolland S., Yanagi S., Kurosaki T. and Ravetch J. V. (1997) Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell* **90**, 293-301.
302. Ono S. J. and Abelson M. B. (2005) Allergic conjunctivitis: update on pathophysiology and prospects for future treatment. *J Allergy Clin Immunol* **115**, 118-22.
303. Ota Y., Beitz L. O., Scharenberg A. M., Donovan J. A., Kinet J. P. and Samelson L. E. (1996) Characterization of Cbl tyrosine phosphorylation and a Cbl-Syk complex in RBL-2H3 cells. *J Exp Med* **184**, 1713-23.
304. Ota Y. and Samelson L. E. (1997) The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science* **276**, 418-20.
305. Ott V. L., Tamir I., Niki M., Pandolfi P. P. and Cambier J. C. (2002) Downstream of kinase, p62(dok), is a mediator of Fc gamma IIB inhibition of Fc epsilon RI signaling. *J Immunol* **168**, 4430-9.
306. Palou E., Piroto F., Sole J., Freed J. H., Peral B., Vilardell C., Vilella R., Vives J. and Gaya A. (2000) Genomic characterization of CD84 reveals the existence of five isoforms differing in their cytoplasmic domains. *Tissue Antigens* **55**, 118-27.
307. Pani G., Kozlowski M., Cambier J. C., Mills G. B. and Siminovitch K. A. (1995) Identification of the tyrosine phosphatase PTP1C as a B cell antigen receptor-associated protein involved in the regulation of B cell signaling. *J Exp Med* **181**, 2077-84.
308. Paolini R. and Kinet J. P. (1993) Cell surface control of the multiubiquitination and deubiquitination of high-affinity immunoglobulin E receptors. *Embo J* **12**, 779-86.
309. Paolini R., Molfetta R., Beitz L. O., Zhang J., Scharenberg A. M., Piccoli M., Frati L., Siraganian R. and Santoni A. (2002) Activation of Syk tyrosine kinase is required for c-Cbl-mediated ubiquitination of Fc epsilon RI and Syk in RBL cells. *J Biol Chem* **277**, 36940-7.
310. Parekh A. B. and Penner R. (1997) Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* **77**, 901-30.
311. Parolini S., Bottino C., Falco M., Augugliaro R., Giliani S., Franceschini R., Ochs H. D., Wolf H., Bonnefoy J. Y., Biassoni R., Moretta L., Notarangelo L. D. and Moretta A. (2000) X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J Exp Med* **192**, 337-46.

312. Parravicini V., Gadina M., Kovarova M., Odom S., Gonzalez-Espinosa C., Furumoto Y., Saitoh S., Samelson L. E., O'Shea J. J. and Rivera J. (2002) Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol* **3**, 741-8.
313. Pasquier B., Launay P., Kanamaru Y., Moura I. C., Pfirsch S., Ruffie C., Henin D., Benhamou M., Pretolani M., Blank U. and Monteiro R. C. (2005a) Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcR γ ITAM. *Immunity* **22**, 31-42.
314. Pasquier B., Yin L., Fondaneche M. C., Relouzat F., Bloch-Queyrat C., Lambert N., Fischer A., de Saint-Basile G. and Latour S. (2005b) Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med* **201**, 695-701.
315. Pawankar R., Okuda M., Yssel H., Okumura K. and Ra C. (1997) Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc ϵ RI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest* **99**, 1492-9.
316. Peck S. R. and Ruley H. E. (2000) Ly108: a new member of the mouse CD2 family of cell surface proteins. *Immunogenetics* **52**, 63-72.
317. Peinelt C., Vig M., Koomoa D. L., Beck A., Nadler M. J., Koblan-Huberson M., Lis A., Fleig A., Penner R. and Kinet J. P. (2006) Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* **8**, 771-3.
318. Penhallow R. C., Class K., Sonoda H., Bolen J. B. and Rowley R. B. (1995) Temporal activation of nontransmembrane protein-tyrosine kinases following mast cell Fc ϵ RI engagement. *J Biol Chem* **270**, 23362-5.
319. Pesci A., Foresi A., Bertorelli G., Chetta A. and Olivieri D. (1993) Histochemical characteristics and degranulation of mast cells in epithelium and lamina propria of bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis* **147**, 684-9.
320. Petrelli A., Gilestro G. F., Lanzardo S., Comoglio P. M., Migone N. and Giordano S. (2002) The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* **416**, 187-90.
321. Pfeiffer J. R., Seagrave J. C., Davis B. H., Deanin G. G. and Oliver J. M. (1985) Membrane and cytoskeletal changes associated with IgE-mediated serotonin release from rat basophilic leukemia cells. *J Cell Biol* **101**, 2145-55.
322. Piliponsky A. M., Chen C. C., Nishimura T., Metz M., Rios E. J., Dobner P. R., Wada E., Wada K., Zacharias S., Mohanasundaram U. M., Faix J. D., Abrink M., Pejler G., Pearl R. G., Tsai M. and Galli S. J. (2008) Neurotensin increases mortality and mast cells reduce neurotensin levels in a mouse model of sepsis. *Nat Med* **14**, 392-8.
323. Pivniouk V. I., Martin T. R., Lu-Kuo J. M., Katz H. R., Oettgen H. C. and Geha R. S. (1999) SLP-76 deficiency impairs signaling via the high-affinity IgE receptor in mast cells. *J Clin Invest* **103**, 1737-43.
324. Poy F., Yaffe M. B., Sayos J., Saxena K., Morra M., Sumegi J., Cantley L. C., Terhorst C. and Eck M. J. (1999) Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine-independent sequence recognition. *Mol Cell* **4**, 555-61.
325. Prakriya M., Feske S., Gwack Y., Srikanth S., Rao A. and Hogan P. G. (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* **443**, 230-3.

326. Pribluda V. S., Pribluda C. and Metzger H. (1994) Transphosphorylation as the mechanism by which the high-affinity receptor for IgE is phosphorylated upon aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11246-50.
327. Proud D., Bailey G. S., Naclerio R. M., Reynolds C. J., Cruz A. A., Eggleston P. A., Lichtenstein L. M. and Togias A. G. (1992) Tryptase and histamine as markers to evaluate mast cell activation during the responses to nasal challenge with allergen, cold, dry air, and hyperosmolar solutions. *J Allergy Clin Immunol* **89**, 1098-110.
328. Prussin C., Griffith D. T., Boesel K. M., Lin H., Foster B. and Casale T. B. (2003) Omalizumab treatment downregulates dendritic cell FcepsilonRI expression. *J Allergy Clin Immunol* **112**, 1147-54.
329. Punnonen J., Cocks B. G., Carballido J. M., Bennett B., Peterson D., Aversa G. and de Vries J. E. (1997) Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J Exp Med* **185**, 993-1004.
330. Purtilo D. T., Cassel C. K., Yang J. P. and Harper R. (1975) X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* **1**, 935-40.
331. Purtilo D. T., Sakamoto K., Barnabei V., Seeley J., Bechtold T., Rogers G., Yetz J. and Harada S. (1982) Epstein-Barr virus-induced diseases in boys with the X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP): update on studies of the registry. *Am J Med* **73**, 49-56.
332. Qu X., Sada K., Kyo S., Maeno K., Miah S. M. and Yamamura H. (2004) Negative regulation of FcepsilonRI-mediated mast cell activation by a ubiquitin-protein ligase Cbl-b. *Blood* **103**, 1779-86.
333. Qualmann B. and Kelly R. B. (2000) Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *J Cell Biol* **148**, 1047-62.
334. Ra C., Jouvin M. H. and Kinet J. P. (1989) Complete structure of the mouse mast cell receptor for IgE (Fc epsilon RI) and surface expression of chimeric receptors (rat-mouse-human) on transfected cells. *J Biol Chem* **264**, 15323-7.
335. Ravetch J. V. and Lanier L. L. (2000) Immune inhibitory receptors. *Science* **290**, 84-9.
336. Razin E., Szallasi Z., Kazanietz M. G., Blumberg P. M. and Rivera J. (1994) Protein kinases C-beta and C-epsilon link the mast cell high-affinity receptor for IgE to the expression of c-fos and c-jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7722-6.
337. Read R. D., Lionberger J. M. and Smithgall T. E. (1997) Oligomerization of the Fes tyrosine kinase. Evidence for a coiled-coil domain in the unique N-terminal region. *J Biol Chem* **272**, 18498-503.
338. Repetto B., Bandara G., Kado-Fong H., Larigan J. D., Wiggan G. A., Pocius D., Basu M., Gilfillan A. M. and Kochan J. P. (1996) Functional contributions of the FcepsilonRIalpha and FcepsilonRIgamma subunit domains in FcepsilonRI-mediated signaling in mast cells. *J Immunol* **156**, 4876-83.
339. Reuter S., Heinz A., Sieren M., Wiewrodt R., Gelfand E. W., Stassen M., Buhl R. and Taube C. (2008) Mast cell-derived tumour necrosis factor is essential for allergic airway disease. *Eur Respir J* **31**, 773-82.
340. Rigaud S., Fondaneche M. C., Lambert N., Pasquier B., Mateo V., Soulas P., Galicier L., Le Deist F., Rieux-Laucat F., Revy P., Fischer A., de Saint Basile G. and Latour S. (2006) XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* **444**, 110-4.

341. Rivera J. (2002) Molecular adapters in Fc(epsilon)RI signaling and the allergic response. *Curr Opin Immunol* **14**, 688-93.
342. Rivera J. (2005) NTAL/LAB and LAT: a balancing act in mast-cell activation and function. *Trends Immunol* **26**, 119-22.
343. Rivera J., Cordero J. R., Furumoto Y., Luciano-Montalvo C., Gonzalez-Espinosa C., Kovarova M., Odom S. and Parravicini V. (2002) Macromolecular protein signaling complexes and mast cell responses: a view of the organization of IgE-dependent mast cell signaling. *Mol Immunol* **38**, 1253-8.
344. Rivera J., Fierro N. A., Olivera A. and Suzuki R. (2008) New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE. *Adv Immunol* **98**, 85-120.
345. Rivera J. and Gilfillan A. M. (2006) Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* **117**, 1214-25; quiz 1226.
346. Rivera J. and Olivera A. (2007) Src family kinases and lipid mediators in control of allergic inflammation. *Immunol Rev* **217**, 255-68.
347. Robertson D., Holowka D. and Baird B. (1986) Cross-linking of immunoglobulin E-receptor complexes induces their interaction with the cytoskeleton of rat basophilic leukemia cells. *J Immunol* **136**, 4565-72.
348. Roebroek A. J., Schalken J. A., Verbeek J. S., Van den Ouweland A. M., Onnekink C., Bloemers H. P. and Van de Ven W. J. (1985) The structure of the human c-fes/fps proto-oncogene. *Embo J* **4**, 2897-903.
349. Romero X., Benitez D., March S., Vilella R., Miralpeix M. and Engel P. (2004) Differential expression of SAP and EAT-2-binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4). *Tissue Antigens* **64**, 132-44.
350. Romero X., Zapater N., Calvo M., Kalko S. G., de la Fuente M. A., Tovar V., Ockeloen C., Pizcueta P. and Engel P. (2005) CD229 (Ly9) lymphocyte cell surface receptor interacts homophilically through its N-terminal domain and relocalizes to the immunological synapse. *J Immunol* **174**, 7033-42.
351. Roncagalli R., Taylor J. E., Zhang S., Shi X., Chen R., Cruz-Munoz M. E., Yin L., Latour S. and Veillette A. (2005) Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nat Immunol* **6**, 1002-10.
352. Rossman K. L., Der C. J. and Sondek J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 167-80.
353. Royer B., Varadaradjalou S., Saas P., Guillosson J. J., Kantelip J. P. and Arock M. (2001) Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy* **31**, 694-704.
354. Ryan J. J., Kashyap M., Bailey D., Kennedy S., Speiran K., Brenzovich J., Barnstein B., Oskeritzian C. and Gomez G. (2007) Mast cell homeostasis: a fundamental aspect of allergic disease. *Crit Rev Immunol* **27**, 15-32.
355. Ryan P. E., Davies G. C., Nau M. M. and Lipkowitz S. (2006) Regulating the regulator: negative regulation of Cbl ubiquitin ligases. *Trends Biochem Sci* **31**, 79-88.
356. Saborit-Villarroya I., Del Valle J. M., Romero X., Esplugues E., Lauzurica P., Engel P. and Martin M. (2005) The adaptor protein 3BP2 binds human CD244 and links this receptor to Vav signaling, ERK activation, and NK cell killing. *J Immunol* **175**, 4226-35.
357. Saborit-Villarroya I., Martinez-Barriocanal A., Oliver-Vila I., Engel P., Sayos J. and Martin M. (2008) The adaptor 3BP2 activates CD244-mediated cytotoxicity in PKC- and SAP-dependent mechanisms. *Mol Immunol* **45**, 3446-53.

358. Saitoh S., Arudchandran R., Manetz T. S., Zhang W., Sommers C. L., Love P. E., Rivera J. and Samelson L. E. (2000) LAT is essential for Fc(epsilon)RI-mediated mast cell activation. *Immunity* **12**, 525-35.
359. Saitoh S., Odom S., Gomez G., Sommers C. L., Young H. A., Rivera J. and Samelson L. E. (2003) The four distal tyrosines are required for LAT-dependent signaling in FcepsilonRI-mediated mast cell activation. *J Exp Med* **198**, 831-43.
360. Samelson L. E. (2002) Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol* **20**, 371-94.
361. Sandrin M. S., Gumley T. P., Henning M. M., Vaughan H. A., Gonez L. J., Trapani J. A. and McKenzie I. F. (1992) Isolation and characterization of cDNA clones for mouse Ly-9. *J Immunol* **149**, 1636-41.
362. Sanico A. M., Koliatsos V. E., Stanisiz A. M., Bienenstock J. and Togias A. (1999) Neural hyperresponsiveness and nerve growth factor in allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* **118**, 154-8.
363. Sanico A. M., Stanisiz A. M., Gleeson T. D., Bora S., Proud D., Bienenstock J., Koliatsos V. E. and Togias A. (2000) Nerve growth factor expression and release in allergic inflammatory disease of the upper airways. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 1631-5.
364. Sayed B. A., Christy A., Quirion M. R. and Brown M. A. (2008) The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu Rev Immunol* **26**, 705-39.
365. Sayos J., Martin M., Chen A., Simarro M., Howie D., Morra M., Engel P. and Terhorst C. (2001) Cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP. *Blood* **97**, 3867-74.
366. Sayos J., Nguyen K. B., Wu C., Stepp S. E., Howie D., Schatzle J. D., Kumar V., Biron C. A. and Terhorst C. (2000) Potential pathways for regulation of NK and T cell responses: differential X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP interactions with SLAM and 2B4. *Int Immunol* **12**, 1749-57.
367. Sayos J., Wu C., Morra M., Wang N., Zhang X., Allen D., van Schaik S., Notarangelo L., Geha R., Roncarolo M. G., Oettgen H., De Vries J. E., Aversa G. and Terhorst C. (1998) The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* **395**, 462-9.
368. Schneider L. A., Schlenner S. M., Feyerabend T. B., Wunderlin M. and Rodewald H. R. (2007) Molecular mechanism of mast cell mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin. *J Exp Med* **204**, 2629-39.
369. Schwartz L. B. (2004) Effector cells of anaphylaxis: mast cells and basophils. *Novartis Found Symp* **257**, 65-74; discussion 74-9, 98-100, 276-85.
370. Schwartz L. B., Yunginger J. W., Miller J., Bokhari R. and Dull D. (1989) Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *J Clin Invest* **83**, 1551-5.
371. Sears M. R., Burrows B., Flannery E. M., Herbison G. P., Hewitt C. J. and Holdaway M. D. (1991) Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N Engl J Med* **325**, 1067-71.
372. Sekizawa K., Caughey G. H., Lazarus S. C., Gold W. M. and Nadel J. A. (1989) Mast cell tryptase causes airway smooth muscle hyperresponsiveness in dogs. *J Clin Invest* **83**, 175-9.

373. Senis Y. A., Craig A. W. and Greer P. A. (2003) Fps/Fes and Fer protein-tyrosinekinases play redundant roles in regulating hematopoiesis. *Exp Hematol* **31**, 673-81.
374. Sharifi R., Sinclair J. C., Gilmour K. C., Arkwright P. D., Kinnon C., Thrasher A. J. and Gaspar H. B. (2004) SAP mediates specific cytotoxic T-cell functions in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* **103**, 3821-7.
375. Shaw R. J., Fitzharris P., Cromwell O., Wardlaw A. J. and Kay A. B. (1985) Allergen-induced release of sulphidopeptide leukotrienes (SRS-A) and LTB4 in allergic rhinitis. *Allergy* **40**, 1-6.
376. Sidorenko S. P. and Clark E. A. (2003) The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat Immunol* **4**, 19-24.
377. Silver R. B., Reid A. C., Mackins C. J., Askwith T., Schaefer U., Herzlinger D. and Levi R. (2004) Mast cells: a unique source of renin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13607-12.
378. Simarro M., Lanyi A., Howie D., Poy F., Bruggeman J., Choi M., Sumegi J., Eck M. J. and Terhorst C. (2004) SAP increases FynT kinase activity and is required for phosphorylation of SLAM and Ly9. *Int Immunol* **16**, 727-36.
379. Sintes J., Romero X., Marin P., Terhorst C. and Engel P. (2008) Differential expression of CD150 (SLAM) family receptors by human hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol* **36**, 1199-204.
380. Soler M., Matz J., Townley R., Buhl R., O'Brien J., Fox H., Thirlwell J., Gupta N. and Della Cioppa G. (2001) The anti-IgE antibody omalizumab reduces exacerbations and steroid requirement in allergic asthmatics. *Eur Respir J* **18**, 254-61.
381. Sommers C. L., Menon R. K., Grinberg A., Zhang W., Samelson L. E. and Love P. E. (2001) Knock-in mutation of the distal four tyrosines of linker for activation of T cells blocks murine T cell development. *J Exp Med* **194**, 135-42.
382. Songyang Z., Shoelson S. E., McGlade J., Olivier P., Pawson T., Bustelo X. R., Barbacid M., Sabe H., Hanafusa H., Yi T. and et al. (1994) Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol Cell Biol* **14**, 2777-85.
383. Soubeyran P., Kowanetz K., Szymkiewicz I., Langdon W. Y. and Dikic I. (2002) Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* **416**, 183-7.
384. Stark S. and Watzl C. (2006) 2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells. *Int Immunol* **18**, 241-7.
385. Staunton D. E. and Thorley-Lawson D. A. (1987) Molecular cloning of the lymphocyte activation marker Blast-1. *Embo J* **6**, 3695-701.
386. Steinhoff M., Neisius U., Ikoma A., Fartasch M., Heyer G., Skov P. S., Luger T. A. and Schmelz M. (2003) Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J Neurosci* **23**, 6176-80.
387. Stephens L., Anderson K., Stokoe D., Erdjument-Bromage H., Painter G. F., Holmes A. B., Gaffney P. R., Reese C. B., McCormick F., Tempst P., Coadwell J. and Hawkins P. T. (1998) Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* **279**, 710-4.
388. Sumegi J., Seemayer T. A., Huang D., Davis J. R., Morra M., Gross T. G., Yin L., Romco G., Klein E., Terhorst C. and Lanyi A. (2002) A spectrum of mutations in SH2D1A that causes X-linked lymphoproliferative disease and other Epstein-Barr virus-associated illnesses. *Leuk Lymphoma* **43**, 1189-201.

389. Suzuki T., Matozaki T., Mizoguchi A. and Kasuga M. (1995) Localization and subcellular distribution of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains, in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* **211**, 950-9.
390. Szymkiewicz I., Kowanetz K., Soubeyran P., Dinarina A., Lipkowitz S. and Dikic I. (2002) CIN85 participates in Cbl-b-mediated down-regulation of receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* **277**, 39666-72.
391. Takai T., Li M., Sylvestre D., Clynes R. and Ravetch J. V. (1994) FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* **76**, 519-29.
392. Tam S. W., Demissie S., Thomas D. and Daron M. (2004a) A bispecific antibody against human IgE and human Fc gamma RII that inhibits antigen-induced histamine release by human mast cells and basophils. *Allergy* **59**, 772-80.
393. Tam S. Y., Tsai M., Snouwaert J. N., Kalesnikoff J., Scherrer D., Nakae S., Chatterjea D., Bouley D. M. and Galli S. J. (2004b) RabGEF1 is a negative regulator of mast cell activation and skin inflammation. *Nat Immunol* **5**, 844-52.
394. Tangye S. G., Nichols K. E., Hare N. J. and van de Weerd B. C. (2003) Functional requirements for interactions between CD84 and Src homology 2 domain-containing proteins and their contribution to human T cell activation. *J Immunol* **171**, 2485-95.
395. Tangye S. G., Phillips J. H. and Lanier L. L. (2000) The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells. *Semin Immunol* **12**, 149-57.
396. Tangye S. G., van de Weerd B. C., Avery D. T. and Hodgkin P. D. (2002) CD84 is up-regulated on a major population of human memory B cells and recruits the SH2 domain containing proteins SAP and EAT-2. *Eur J Immunol* **32**, 1640-9.
397. Tassi I. and Colonna M. (2005) The cytotoxicity receptor CRACC (CS-1) recruits EAT-2 and activates the PI3K and phospholipase C gamma signaling pathways in human NK cells. *J Immunol* **175**, 7996-8002.
398. Thakurdas S. M., Melicoff E., Sansores-Garcia L., Moreira D. C., Petrova Y., Stevens R. L. and Adachi R. (2007) The mast cell-restricted tryptase mMCP-6 has a critical immunoprotective role in bacterial infections. *J Biol Chem* **282**, 20809-15.
399. Theoharides T. C., Donelan J., Kandere-Grzybowska K. and Konstantinidou A. (2005) The role of mast cells in migraine pathophysiology. *Brain Res Brain Res Rev* **49**, 65-76.
400. Thien C. B. and Langdon W. Y. (2005) c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses. *Biochem J* **391**, 153-66.
401. Thompson A. D., Braun B. S., Arvand A., Stewart S. D., May W. A., Chen E., Korenberg J. and Denny C. (1996) EAT-2 is a novel SH2 domain containing protein that is up regulated by Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Oncogene* **13**, 2649-58.
402. Tian L., Nelson D. L. and Stewart D. M. (2000) Cdc42-interacting protein 4 mediates binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to microtubules. *J Biol Chem* **275**, 7854-61.
403. Tkaczyk C., Beaven M. A., Brachman S. M., Metcalfe D. D. and Gilfillan A. M. (2003) The phospholipase C gamma 1-dependent pathway of Fc epsilon RI-mediated mast cell activation is regulated independently of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **278**, 48474-84.

404. Tkaczyk C., Horejsi V., Iwaki S., Draber P., Samelson L. E., Satterthwaite A. B., Nahm D. H., Metcalfe D. D. and Gilfillan A. M. (2004) NTAL phosphorylation is a pivotal link between the signaling cascades leading to human mast cell degranulation following Kit activation and Fc epsilon RI aggregation. *Blood* **104**, 207-14.
405. Toru H., Eguchi M., Matsumoto R., Yanagida M., Yata J. and Nakahata T. (1998) Interleukin-4 promotes the development of tryptase and chymase double-positive human mast cells accompanied by cell maturation. *Blood* **91**, 187-95.
406. Tovar V., del Valle J., Zapater N., Martin M., Romero X., Pizcueta P., Bosch J., Terhorst C. and Engel P. (2002) Mouse novel Ly9: a new member of the expanding CD150 (SLAM) family of leukocyte cell-surface receptors. *Immunogenetics* **54**, 394-402.
407. Turner H. and Kinet J. P. (1999) Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI. *Nature* **402**, B24-30.
408. Udell C. M., Samayawardhena L. A., Kawakami Y., Kawakami T. and Craig A. W. (2006) Fer and Fps/Fes participate in a Lyn-dependent pathway from Fcepsilon RI to platelet-endothelial cell adhesion molecule 1 to limit mast cell activation. *J Biol Chem* **281**, 20949-57.
409. Urtz N., Olivera A., Bofill-Cardona E., Csonga R., Billich A., Mechtcheriakova D., Bornancin F., Woisetschlager M., Rivera J. and Baumruker T. (2004) Early activation of sphingosine kinase in mast cells and recruitment to Fcepsilon RI are mediated by its interaction with Lyn kinase. *Mol Cell Biol* **24**, 8765-77.
410. Valdez P. A., Wang H., Seshasayee D., van Lookeren Campagne M., Gurney A., Lee W. P. and Grewal I. S. (2004) NTB-A, a new activating receptor in T cells that regulates autoimmune disease. *J Biol Chem* **279**, 18662-9.
411. Valent P., Akin C., Escribano L., Fodinger M., Hartmann K., Brockow K., Castells M., Sperr W. R., Kluin-Nelemans H. C., Hamdy N. A., Lortholary O., Robyn J., van Doormaal J., Sotlar K., Hauswirth A. W., Arock M., Hermine O., Hellmann A., Triggiani M., Niedoszytko M., Schwartz L. B., Orfao A., Horny H. P. and Metcalfe D. D. (2007) Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest* **37**, 435-53.
412. Valent P., Baghestanian M., Bankl H. C., Sillaber C., Sperr W. R., Wojta J., Binder B. R. and Lechner K. (2002) New aspects in thrombosis research: possible role of mast cells as profibrinolytic and antithrombotic cells. *Thromb Haemost* **87**, 786-90.
413. Valent P., Horny H. P., Escribano L., Longley B. J., Li C. Y., Schwartz L. B., Marone G., Nunez R., Akin C., Sotlar K., Sperr W. R., Wolff K., Brunning R. D., Parwaresch R. M., Austen K. F., Lennert K., Metcalfe D. D., Vardiman J. W. and Bennett J. M. (2001) Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res* **25**, 603-25.
414. Valiante N. M. and Trinchieri G. (1993) Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J Exp Med* **178**, 1397-406.
415. Veillette A. (2002) The SAP family: a new class of adaptor-like molecules that regulates immune cell functions. *Sci STKE* **2002**, PE8.
416. Veillette A. (2004) Specialised adaptors in immune cells. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 146-55.

417. Veillette A. (2006) Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol* **6**, 56-66.
418. Veillette A., Cruz-Munoz M. E. and Zhong M. C. (2006) SLAM family receptors and SAP-related adaptors: matters arising. *Trends Immunol* **27**, 228-34.
419. Veillette A., Latour S. and Davidson D. (2002) Negative regulation of immunoreceptor signaling. *Annu Rev Immunol* **20**, 669-707.
420. Vig M., Beck A., Billingsley J. M., Lis A., Parvez S., Peinelt C., Koomoa D. L., Soboloff J., Gill D. L., Fleig A., Kinet J. P. and Penner R. (2006a) CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol* **16**, 2073-9.
421. Vig M., Peinelt C., Beck A., Koomoa D. L., Rabah D., Koblan-Huberson M., Kraft S., Turner H., Fleig A., Penner R. and Kinet J. P. (2006b) CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science* **312**, 1220-3.
422. Vinuesa C. G., Tangye S. G., Moser B. and Mackay C. R. (2005) Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **5**, 853-65.
423. Vliagoftis H. and Befus A. D. (2005) Mast cells at mucosal frontiers. *Curr Mol Med* **5**, 573-89.
424. Volna P., Lebduska P., Draberova L., Simova S., Heneberg P., Boubelik M., Bugajev V., Malissen B., Wilson B. S., Horejsi V., Malissen M. and Draber P. (2004) Negative regulation of mast cell signaling and function by the adaptor LAB/NTAL. *J Exp Med* **200**, 1001-13.
425. Vonakis B. M., Gibbons S., Jr., Sora R., Langdon J. M. and MacDonald S. M. (2001) Src homology 2 domain-containing inositol 5' phosphatase is negatively associated with histamine release to human recombinant histamine-releasing factor in human basophils. *J Allergy Clin Immunol* **108**, 822-31.
426. Wang N., Satoskar A., Faubion W., Howie D., Okamoto S., Feske S., Gullo C., Clarke K., Sosa M. R., Sharpe A. H. and Terhorst C. (2004) The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *J Exp Med* **199**, 1255-64.
427. Welker P., Grabbe J., Gibbs B., Zuberbier T. and Henz B. M. (2000) Nerve growth factor-beta induces mast-cell marker expression during in vitro culture of human umbilical cord blood cells. *Immunology* **99**, 418-26.
428. Wilks A. F. and Kurban R. R. (1988) Isolation and structural analysis of murine c-fes cDNA clones. *Oncogene* **3**, 289-94.
429. Wills-Karp M. (2004) Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* **202**, 175-90.
430. Wood J. D. (2004) Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology. *Gastroenterology* **127**, 635-57.
431. Woolley D. E. (2003) The mast cell in inflammatory arthritis. *N Engl J Med* **348**, 1709-11.
432. Wu C., Nguyen K. B., Pien G. C., Wang N., Gullo C., Howie D., Sosa M. R., Edwards M. J., Borrow P., Satoskar A. R., Sharpe A. H., Biron C. A. and Terhorst C. (2001) SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of TH2 cells. *Nat Immunol* **2**, 410-4.
433. Wu X., Myers A. C., Goldstone A. C., Togias A. and Sanico A. M. (2006) Localization of nerve growth factor and its receptors in the human nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 428-33.

434. Xiao W., Nishimoto H., Hong H., Kitaura J., Nunomura S., Maeda-Yamamoto M., Kawakami Y., Lowell C. A., Ra C. and Kawakami T. (2005) Positive and negative regulation of mast cell activation by Lyn via the FcεRI. *J Immunol* **175**, 6885-92.
435. Xie Z. H., Zhang J. and Siraganian R. P. (2000) Positive regulation of c-Jun N-terminal kinase and TNF-α production but not histamine release by SHP-1 in RBL-2H3 mast cells. *J Immunol* **164**, 1521-8.
436. Yamashita T., Suzuki R., Backlund P. S., Yamashita Y., Yergey A. L. and Rivera J. (2008) Differential dephosphorylation of the FcγRIIIb immunoreceptor tyrosine-based activation motif tyrosines with dissimilar potential for activating Syk. *J Biol Chem* **283**, 28584-94.
437. Yan Q., Malashkevich V. N., Fedorov A., Fedorov E., Cao E., Lary J. W., Cole J. L., Nathenson S. G. and Almo S. C. (2007) Structure of CD84 provides insight into SLAM family function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10583-8.
438. Yang W., Kaur D., Okayama Y., Ito A., Wardlaw A. J., Brightling C. E. and Bradding P. (2006) Human lung mast cells adhere to human airway smooth muscle, in part, via tumor suppressor in lung cancer-1. *J Immunol* **176**, 1238-43.
439. Yeromin A. V., Zhang S. L., Jiang W., Yu Y., Safrina O. and Cahalan M. D. (2006) Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* **443**, 226-9.
440. Yeung Y. G., Soldera S. and Stanley E. R. (1998) A novel macrophage actin-associated protein (MAYP) is tyrosine-phosphorylated following colony stimulating factor-1 stimulation. *J Biol Chem* **273**, 30638-42.
441. Yi T., Mui A. L., Krystal G. and Ihle J. N. (1993) Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor beta chain and down-regulates IL-3-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Mol Cell Biol* **13**, 7577-86.
442. Yi T. L., Cleveland J. L. and Ihle J. N. (1992) Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13. *Mol Cell Biol* **12**, 836-46.
443. Yokoyama S., Staunton D., Fisher R., Amiot M., Fortin J. J. and Thorley-Lawson D. A. (1991) Expression of the Blast-1 activation/adhesion molecule and its identification as CD48. *J Immunol* **146**, 2192-200.
444. Zaiss M., Hirtreiter C., Rehli M., Rehm A., Kunz-Schughart L. A., Andreesen R. and Hennemann B. (2003) CD84 expression on human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* **31**, 798-805.
445. Zappulla J. P., Arock M., Mars L. T. and Liblau R. S. (2002) Mast cells: new targets for multiple sclerosis therapy? *J Neuroimmunol* **131**, 5-20.
446. Zhang J., Chiang Y. J., Hodes R. J. and Siraganian R. P. (2004) Inactivation of c-Cbl or Cbl-b differentially affects signaling from the high affinity IgE receptor. *J Immunol* **173**, 1811-8.
447. Zhang W., Sloan-Lancaster J., Kitchen J., Tribble R. P. and Samelson L. E. (1998) LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* **92**, 83-92.
448. Zhang W., Tribble R. P., Zhu M., Liu S. K., McGlade C. J. and Samelson L. E. (2000) Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-γ1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling. *J Biol Chem* **275**, 23355-61.

449. Zhang W., Wan T., Li N., Yuan Z., He L., Zhu X., Yu M. and Cao X. (2001) Genetic approach to insight into the immunobiology of human dendritic cells and identification of CD84-H1, a novel CD84 homologue. *Clin Cancer Res* **7**, 822s-829s.
450. Zhao M., Janas J. A., Niki M., Pandolfi P. P. and Van Aelst L. (2006) Dok-1 independently attenuates Ras/mitogen-activated protein kinase and Src/c-myc pathways to inhibit platelet-derived growth factor-induced mitogenesis. *Mol Cell Biol* **26**, 2479-89.
451. Zhu D., Kepley C. L., Zhang M., Zhang K. and Saxon A. (2002a) A novel human immunoglobulin Fc gamma Fc epsilon bifunctional fusion protein inhibits Fc epsilon RI-mediated degranulation. *Nat Med* **8**, 518-21.
452. Zhu M., Janssen E., Leung K. and Zhang W. (2002b) Molecular cloning of a novel gene encoding a membrane-associated adaptor protein (LAX) in lymphocyte signaling. *J Biol Chem* **277**, 46151-8.
453. Zhu M., Liu Y., Koonpaew S., Granillo O. and Zhang W. (2004) Positive and negative regulation of Fc epsilon RI-mediated signaling by the adaptor protein LAB/NTAL. *J Exp Med* **200**, 991-1000.
454. Zhu M., Rhee I., Liu Y. and Zhang W. (2006) Negative regulation of Fc epsilon RI-mediated signaling and mast cell function by the adaptor protein LAX. *J Biol Chem* **281**, 18408-13.
455. Zirngibl R. A., Senis Y. and Greer P. A. (2002) Enhanced endotoxin sensitivity in *fps/fes*-null mice with minimal defects in hematopoietic homeostasis. *Mol Cell Biol* **22**, 2472-86.

VIII. ANNEX

The leukocyte receptor CD84 inhibits Fc ϵ RI-mediated signaling through homophilic interaction in transfected RBL-2H3 cells[☆]

Irene Oliver-Vila, Ifigènia Saborit-Villarroya, Pablo Engel, Margarita Martín*

Grup Immunoreceptors, Institut d'Investigació August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Facultat Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 29 August 2007; received in revised form 12 December 2007; accepted 14 December 2007
Available online 19 February 2008

Abstract

Signaling through the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc ϵ RI) results in the coordinated activation of tyrosine kinases, thus leading to calcium mobilization, degranulation, and leukotriene and cytokine synthesis. Here, we show that CD84, a member of the CD150 family of leukocyte receptors, inhibits Fc ϵ RI-mediated mast cell degranulation in CD84-transfected rat basophilic leukaemia-2H3 mast cell line cells (RBL-2H3) through homophilic interaction. There was no reduction in overall protein phosphorylation following IgE triggering in CD84 RBL-2H3 cells. Indeed, phosphorylation of Dok-1 and c-Cbl increased in CD84 RBL-2H3, suggesting that inhibition is mediated by these molecules. MAP kinase phosphorylation (ERK1/2, JNK and p38) and cytokine synthesis were impaired in CD84 RBL-2H3. This inhibitory mechanism was independent of SAP and SHP-2 recruitment. Interestingly, CD84 mutants in tyrosines (Y279F and Δ Y324) reversed this inhibitory profile. These data suggest that CD84 may play a role in modulating Fc ϵ RI-mediated signaling in mast cells. Thus, CD84 could play a protective role against undesired allergic and inflammatory responses.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cell surface molecules; Mast cells/basophils; Signal transduction; Cell activation; Allergy

1. Introduction

Basophils and mast cells are key effector cells in IgE-associated hypersensitivity, as well as in allergic and inflammatory disorders. Furthermore, they participate in the regulation of adaptive immunoresponses and host defence mechanisms associated with innate immunity (Galli et al., 2005a,b; Marshall, 2004; Mekori, 2004). The crosslinking of the high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI)-bound IgE with multivalent antigens activates basophils or mast cells by promoting Fc ϵ RI aggregation. This

process leads to a signaling cascade characterized by activation of the Src, Syk and Tec family of protein kinases, recruitment of adaptor molecules, and activation of enzymes that regulate calcium release and influx, which leads to changes in the actin cytoskeleton. This results in downstream events such as degranulation, the release of inflammatory mediators, and cytokine synthesis (Blank and Rivera, 2004; Kawakami and Galli, 2002; Nadler et al., 2000; Siraganian, 2003). Appropriate activation of these cells is mediated by several factors, including the cells' ability to distinguish activating or inhibitory stimuli and the strength and duration of a given stimulus (Galli et al., 2005a; Gonzalez-Espinosa et al., 2003). Several negative intracellular regulators modulate the signaling events initiated by Fc ϵ RI. Negative regulators of basophils or mast cell signaling include the SH2-containing tyrosine phosphatases (SHP-1 and SHP-2) (Heneberg and Draber, 2002; Kamata et al., 2003), the lipid phosphatase SH2-containing inositol 5' phosphate (SHIP) (Heneberg and Draber, 2002; Rauh et al., 2003), and the E3 ubiquitin ligase c-Cbl (Ota and Samelson, 1997; Qu et al., 2004). In addition, upon coengagement with their ligands, cell surface receptors that contain immunoreceptor tyrosine-based

[☆] This work was supported by grants PI030085 from the Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain, and SAF2006-00574 from the Plan Nacional Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. I. O.-V. is supported by a fellowship from the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. I. S.-V. is supported by a fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain. M.M. is supported by a Ramón y Cajal contract from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain.

* Corresponding author at: Institut d'Investigació August Pi i Sunyer (IDIBAPS), C/Villaruel 170, Barcelona E-08036, Spain.
Tel.: +34 93 2275400x2338; fax: +34 93 4515272.

E-mail address: martin.andorra@ub.edu (M. Martín).

inhibitory motifs (ITIM) provide inhibitory signals to dampen those events initiated by FcεRI (Katz, 2002). Depending on their extracellular domain, these belong either to the immunoglobulin superfamily (e.g., Fcγ RIIB, gp49B) or to the C-type (calcium-dependent) lectin superfamily (e.g., Ly49 and MAFA (mast cell function-associated antigen)). Through their ITIM, these receptors suppress cell activation by promoting dephosphorylation via SHP-1, SHP-2 or the SHIP family (Kraft and Kinet, 2007).

In this report, we identify CD84 as a novel inhibitory receptor for FcεRI. CD84 is a membrane glycoprotein that belongs to the CD150 family of receptors. This family is a subset of the CD2 cell-surface receptor Ig superfamily and is defined by its binding to the cytoplasmic adaptors SAP and EAT-2 (Engel et al., 2003). SAP/SH2D1A is the product of the gene mutated in X-linked lymphoproliferative disease (XLP), a rare immune disorder commonly triggered by Epstein-Barr virus (Sayos et al., 1998).

CD84 is a self-ligand protein (Martin et al., 2001) expressed in a broad range of immune system cell types. Although it presents relatively high levels in basophils and mast cells (Romero et al., 2004), its role in the biology of these cells has yet to be described.

Here, we use a proteomic approach to show that CD84–CD84 interaction inhibits FcεRI degranulation, MAP kinase cascades, and cytokine synthesis in the mast cell line RBL-2H3. Using molecular dissection, we mapped its inhibitory role on Y279 and Y324 in the CD84 cytoplasmic tail. Based on these observations, we proposed the involvement of CD84 in limiting mast cell degranulation and cytokine release. CD84 may provide an unexpected mechanism that could account for the modulation of allergic and inflammatory responses.

2. Materials and methods

2.1. Antibodies and reagents

Anti-human CD84 mAb (clone CD84 1.7) (IgG1, k) and anti-human CD229 mAb (clone Ly9 1.25) used as isotypic control were generated in our laboratory (Martin et al., 2001,

2005). Purified mAbs were biotinylated with biotinamidocaproate *N*-hydroxysuccinimide ester. Biotin, anti-DNP IgE and F(ab')₂ sheep anti-mouse were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Avidin peroxidase (Av-HRP) was obtained from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Phospho-JNK, phospho-p38 and phospho-ERK were acquired from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). HRP-conjugated anti-phosphotyrosine mAb mixture and total ERK were purchased from Zymed Laboratories (San Francisco, CA). Dok-1 was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). c-Cbl was obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Anti-mouse and anti-rabbit IgG peroxidase were obtained from DAKO (Carpinteria, CA) and Biorad (Hercules, CA), respectively. Tosyl-activated beads and Dynabeads sheep anti-mouse IgG were acquired from DYNAL A.S (Oslo, Norway). PMA and ionomycin from Calbiochem (Germany).

2.2. DNA reagents

Full-length human CD84 cloned in pCINeo, SAP cloned in pCMV2-Flag (Sayos et al., 2001), and Fyn cloned in pSRα (Del Valle et al., 2003) were used. The primers utilized for all constructions are summarized in Table 1. A CD244–CD84 chimera was performed using human CD244 cloned in pCINeo (Saborit-Villarroya et al., 2005) as a template and CD244 forward primer plus CD244–CD84 reverse primer and CD224–CD84 forward plus CD84-2 reverse primers. Both PCR products were annealed and a third PCR using CD224 forward and CD84-2 reverse primers was carried out. The product was cloned in PCR3.1 TOPO (Invitrogen, Life Technologies, Gaithersburg, MD). To analyze the contribution of CD84 cytoplasmic tail tyrosine residues, CD84-pCINeo was used as a template and PCR site-directed mutagenesis was developed. PCR products were cloned in PCR 2.1 TOPO (Invitrogen) and sub-cloned in pCINeo using an EcoRI site. PCR products from the Y279F mutant and ΔY324 were cloned in PCR3.1 TOPO. The integrity of all constructs was confirmed by sequencing with an ABI PRISM Big Dyes Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, CA) and universal T7 primer.

Table 1
List of primers used for all constructions

CD84	Forward	5'-CCCAAGCTTTTCCACAGAAGGTTAGAC-3'
CD84	Reverse	5'-AAAGGATCCGCCAGCAGCCTAG-3'
CD244	Forward	5'-AAACTCGAGGAAATGCTGGGGCAAGTG-3'
CD244–CD84	Forward	5'-CAGGAATTCATGGGCTTCCGTACTCACCAC-3'
CD244–CD84	Reverse	5'-GAAGCCCATGAATTCCTGATGGGCATTCTG-3'
CD84-2	Reverse	5'-ACGGTCGACCTAGATACAATTCATAG-3'
Y262F	Forward	5'-GCCTCAAAGAAAACCATATTCACATATATC-3'
Y262F	Reverse	5'-TGTGAATATGGTTTTCTTTGAGGCAGC-3'
Y279F	Forward	5'-GAGTCCAGAATCTTTGATGAAATCCTG-3'
Y279F	Reverse	5'-GGACTGCAGGATTTTCATCAAAGATTCTGGA-3'
Y299F	Forward	5'-CACAGTTTTTCCGAAGTGCAG-3'
Y299F	Reverse	5'-CTGCACTTCGGAAAAAACTGT-3'
Δ cytoplasmic tail	Reverse	5'-TGAGGCAGCTCATTGTCTTCTCTT-3'
ΔY324	Reverse	5'-CCCTCACTTATCAGCAAAGTGCAG-3'

Primers used for introducing changes of tyrosine to phenylalanine (for all described constructs) are shown in this table. Mutation sites with amino acid replacement of tyrosine to phenylalanine are in bold. The forward primer for the deletion mutants correspond to CD84 forward.

2.3. Cell cultures and transfections

COS-7 (10^7) cells were transiently transfected using Nucleofector (Amaxa Inc., Gaithersburg, MD) following the manufacturer's instructions, and then lysed for immunoprecipitation assays, as previously described (Martin et al., 2005). Rat basophilic leukaemia (RBL-2H3) cells were maintained as monolayer cultures in RPMI with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml of penicillin, and 10% heat-inactivated foetal calf serum plus 1% HEPES (Invitrogen). For stable transfection, 20 μ g of linearized expression constructs were cotransfected into 10×10^6 RBL-2H3 cells by electroporation (950 microfarads [μ F], 260 V). Stable transfected cell lines were selected with 1 mg/ml of active G418 (Invitrogen). Cell lines were screened by CD84 expression using flow cytometry with specific antibodies and anti-rat Fc ϵ RI mAb (BD Pharmingen, San Diego, CA) as an internal control. CD84 transfectants were obtained and selected as a polyclonal population. IgE receptor expression proved similar in all the transfectants generated. Expression of polyclonal cells was maintained by further selection with anti-CD84 using sheep anti-mouse IgG magnetic beads (Dynabeads).

2.4. Analysis of β -hexosaminidase release

Degranulation of transfected cells was determined by measuring β -hexosaminidase release. Cells (2×10^5) were seeded in a 96-well plate and cultured overnight either with various concentrations or without anti-DNP IgE. The cell monolayers were washed once with RPMI (without FCS) and then stimulated with 50 ng/ml of the antigen DNP-HSA (Sigma–Aldrich), or with PMA (50 ng/ml) plus ionomycin (2.5 μ M) in the same media. Following incubation for 1 h at 37 °C, the medium was recovered for analysis of β -hexosaminidase release. Total cell lysates were obtained by adding 1% triton to the same medium. The medium and total cell lysates were incubated with 1.3 mg/ml of *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucopyranoside (Calbiochem) in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5) for 1 h at 37 °C. The reaction was terminated by adding 0.2 M sodium carbonate buffer (pH 10.7). The release of 4-*p*-nitrophenol was monitored by the absorbance at 405 nm. The resulting β -hexosaminidase activity was expressed as the percentage of maximum response (samples treated with Triton X-100). β -Hexosaminidase release = (sample release minus spontaneous release/maximum release minus spontaneous release) \times 100.

2.5. Cell activation, immunoprecipitation, and immunoblotting

Cell monolayers cultured overnight with anti-DNP IgE at different doses were washed twice with RPMI without FCS and then stimulated with 50 ng/ml of antigen DNP-HSA in the same media for the indicated times. For immunoprecipitation, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and solubilized in lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 100 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF]). For CD84 immunoprecipitation prior activation and lysis, samples were biotinylated.

Cell lysates were precleared by centrifugation, the whole cell lysate fraction was collected, and the rest was then incubated first with the indicated primary antibodies and, subsequently with protein A-sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden). After rotation for 2 h at 4 °C, the beads were washed three times with lysis buffer. Immunoprecipitated proteins were eluted by heat treatment at 100 °C for 5 min with 3 \times sampling buffer. Immunoprecipitates and total cell lysates were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA). Blots were probed with the indicated antibodies or avidin-HRP. In all blots, proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (Pierce, Rockford IL).

2.6. Luciferase assays

12×10^6 control and CD84 transfectants RBL-2H3 cells were transiently transfected at 260 V, 950 μ F in an electroporator (Biorad) with 10 μ g of a TNF luciferase (0.5 μ g/ 10^6 cells) reporter plasmid plus 1 μ g of TK-Renilla (0.1 μ g/ 10^6 cells) in serum-free RPMI. Following electroporation, cells were plated in 24-well plates in complete media plus or minus anti-DNP IgE and incubated at 37 °C for 24 h. Cells were then stimulated for 6 h with DNP-HSA 50 ng/ml. PMA (50 ng/ml) plus ionomycin (2.5 μ M) was used as a positive control. After washing with PBS, cells were lysed with 5 \times lysis buffer (Promega, Madison, WI) and 100 μ l aliquots were measured for luciferase activity with a Dual Luciferase reporter Kit (Promega) in a luminometer (Lumat LB 9507, EG&G Berthold) following the manufacturer's instructions. Luciferase readings in cell lysates were normalized to TK-Renilla within each point.

3. Results

3.1. IgE-mediated degranulation is inhibited in CD84 RBL-2H3 cells

The immunoreceptor CD84 is expressed in mast cells and basophils (Romero et al., 2004) and interacts with itself through the first extracellular domain, as previously reported (Martin et al., 2001). To study the role of this interaction, the RBL-2H3 mast cell line was transfected with CD84 full-length and the levels of CD84 were measured in control and CD84 transfected RBL-2H3 cells by flow cytometry and Western blot. In the latter instance, cells were biotinylated, lysed, and immunoprecipitated with anti-CD84 mAb (Fig. 1A). Fc ϵ RI expression proved similar in RBL and CD84 transfectants (Fig. 1B). Both cell types were cultured overnight with different concentrations of anti-DNP-IgE and then crosslinked with a fixed concentration of DNP-HSA for 1 h at 37 °C, with β -hexosaminidase release measured thereafter. β -Hexosaminidase release displayed a bell-shaped curve in control transfectants. At low concentrations of IgE, control and CD84 transfectants released similarly low amounts of β -hexosaminidase. Increasing levels of IgE revealed an inhibitory effect on CD84 RBL-2H3 cells compared with controls. IgE-independent β -hexosaminidase release, as mediated by PMA plus ionomycin, remained unaffected in CD84

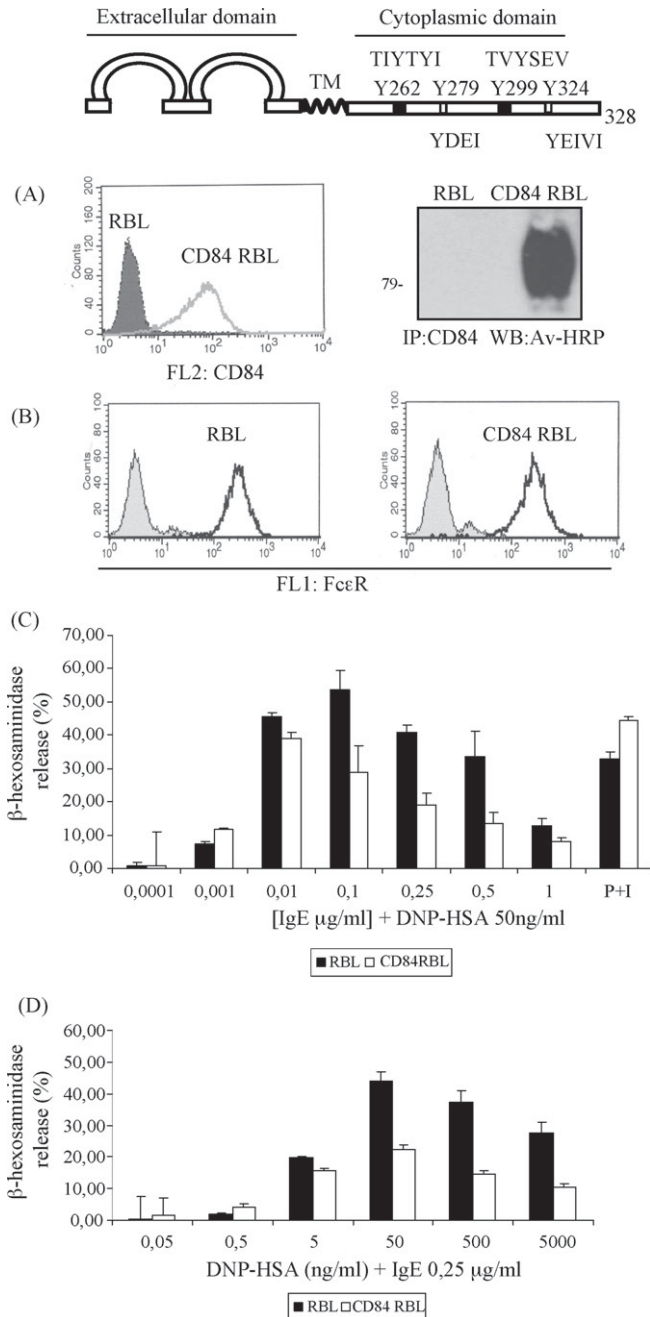


Fig. 1. CD84 RBL-2H3 cells show inhibition of FcεRI-mediated degranulation. CD84 has four tyrosine motifs in its cytoplasmic tail. Two of them, Y262 and Y299, contain the consensus motif for SAP (T-V/I-Y-x-x-V/I). RBL-2H3 cells were transfected with full-length human CD84 and transfectants were selected by magnetic beads. CD84 expression was analyzed by flow cytometry, CD84 immunoprecipitation, and Western blot (A). FcεRI expression was analyzed by flow cytometry (B). An anti-DNP IgE dose–response curve (plus 50 ng/ml DNP-HSA) was carried out in control and CD84 RBL-2H3 cells (C). Control and CD84RBL-2H3 cells were sensitized overnight with IgE 0.25 μg/ml plus DNP-HSA at several concentrations (D). β-Hexosaminidase release is expressed as the percentage of the maximum response (triton treatment) minus spontaneous release. Measurements were performed in triplicate and the data are representative of three independent experiments.

transfectants compared with control cells (Fig. 1C). The IgE concentration for maximum response measured between 0.125 and 0.25 μg/ml. We chose this latter concentration and titered the DNP-HSA optimal amount. The inhibitory effect increased with higher DNP-HSA crosslinking doses, similarly displaying a bell-shaped curve (Fig. 1D). DNP-HSA concentration for maximum response was approximately 50 ng/ml.

3.2. CD84–CD84 interaction inhibits degranulation

In order to determine whether this inhibitory effect was the result of CD84–CD84 homophilic interaction we mixed at several ratios CD84 RBL transfectant with RBL that do not express CD84. As we show in Fig. 2, the hexosaminidase release inhibition was diminished in parallel with a decrease in the number of CD84⁺ cells that putatively provide the homotypic ligand. In order to confirm further these results, we generated a construct involving the extracellular domains of the CD244 and CD84 cytoplasmic domains. CD244 does not interact with itself, and is the only member of the CD150 family that binds heterophilically. Human CD244 interacts with human CD48 (Brown et al., 1998), which is not present in these cells. Stable transfectants were generated, CD244 and FcεRI expression levels were measured (Fig. 3A) and β-hexosaminidase release was carried out. Degranulation was not inhibited in CD244–CD84 RBL, indicating that replacement of the CD84 extracellular domain reverses inhibition of hexosaminidase release (Fig. 3B). In parallel, we also conducted an assay to show that this inhibitory effect occurred through CD84 signaling. To this end we mutated the CD84 gene by deleting its cytoplasmic domain, thereby generating stable transfectants in the RBL-2H3 cell line. CD84 expression levels were similar and comparable to CD84 and CD244–CD84 chimera (Fig. 3C). As expected, the CD84 mutant lacking the cytoplasmic tail abolished inhibition indicating that CD84 homophilic interaction signals negatively in these cells (Fig. 3D). Although cells were selected by a polyclonal selection procedure it is possible that single clones outgrow others with different degranulation capacities. To confirm the inhibitory effect of CD84 we generated various CD84 WT and cytoplasmic deletion transfectants (Fig. 4). Hexosaminidase release was diminished in cells overexpressing the full-length receptor compared to cytoplasmic domain deletion mutant.

3.3. SAP is independent of the CD84 inhibitory mechanism in CD84 RBL-2H3 cells

The cytoplasmic protein SAP (SLAM-associated protein, also called SH2D1a), whose deficiency is responsible for X-linked proliferative syndrome (XLP), has been reported to associate with the CD84 cytoplasmic tail (Sayos et al., 2001). This interaction is dependent on phosphorylation and has been described as being independent of CD84 function in T cells (Tangye et al., 2003). Although the phosphatase SHP-2 has also been described as an intracellular ligand for CD84, the role of this interaction has not yet been elucidated (Sayos et al., 2001). In order to dissect the CD84 inhibitory mechanism, point mutants for all tyrosine motifs were generated (Table 1).

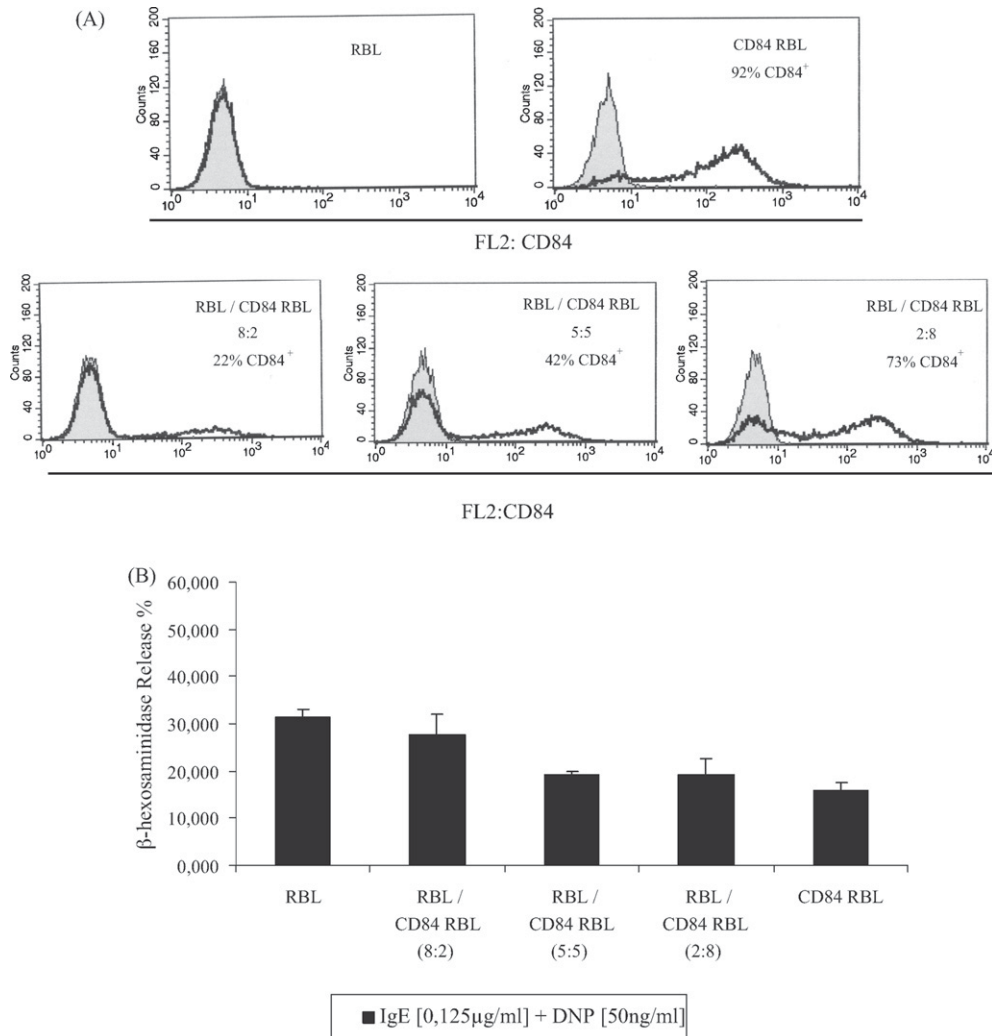


Fig. 2. Lower expression level of CD84 exhibits lower inhibition of Fc ϵ RI signaling. Control RBL, which do not express CD84, were mixed with CD84 WT RBL transfectants at different ratios (8:2, 5:5, 2:8), respectively. CD84 positive cells were stained with specific antibodies in the mixed populations (A) and β -hexosaminidase release was performed (B).

Two of these motifs, Y262 and Y299, are consensus motifs for SAP and SHP-2 interactions, respectively. We generated single and double mutants for these two positions and determined their capability to bind these molecules in COS cells. COS cells were transiently transfected with various cDNAs: CD84 wild type or CD84 Y262F or CD84 Y299F or double mutant CD84 Y262F/Y299F plus Fyn and SAP. SHP-2 is constitutively expressed in these cells (Fig. 5A). As our results demonstrate, the Y262 motif is crucial for SAP recruitment, whereas Y299 is involved in SHP-2 binding. Stable transfectants for single and double mutants were generated in RBL-2H3 cells (Fig. 5B). A degranulation assay was then carried out and none of these mutants reversed CD84 inhibition suggesting that these tyrosine motifs do not mediate the inhibitory effect (Fig. 5C).

3.4. Mutants in tyrosine 279 and 324 reverse the degranulation inhibitory effect

The CD84 cytoplasmic tail has two SH2-interacting motifs (Y279 and Y324) whose role has never been explored. In order

to examine whether these motifs are involved in CD84 negative signaling in RBL-2H3 cells, tyrosine 279 was mutated to phenylalanine while tyrosine 324, at the four amino acid end of the protein's C terminus, was simply deleted.

Stable transfectants for CD84 Y279F and CD84 Δ Y324 mutants were generated (Fig. 6A). β -Hexosaminidase release was performed at those IgE doses in which CD84 inhibition was more sustained. Interestingly, both reversed the inhibition of degranulation mediated by the CD84 wild-type transfectant (Fig. 6B). These results indicate that both tyrosine motifs are equally needed for mediating CD84 inhibition.

3.5. CD84 is phosphorylated after IgE engagement: differential phosphorylated proteins in control and CD84 RBL-2H3 cells

We next investigated the phosphorylation status of CD84 in unstimulated and IgE plus DNP-HSA activated cells. CD84 transfectant cells were left untreated or sensitized with anti-DNP IgE overnight, biotinylated in order to detect total CD84 lev-

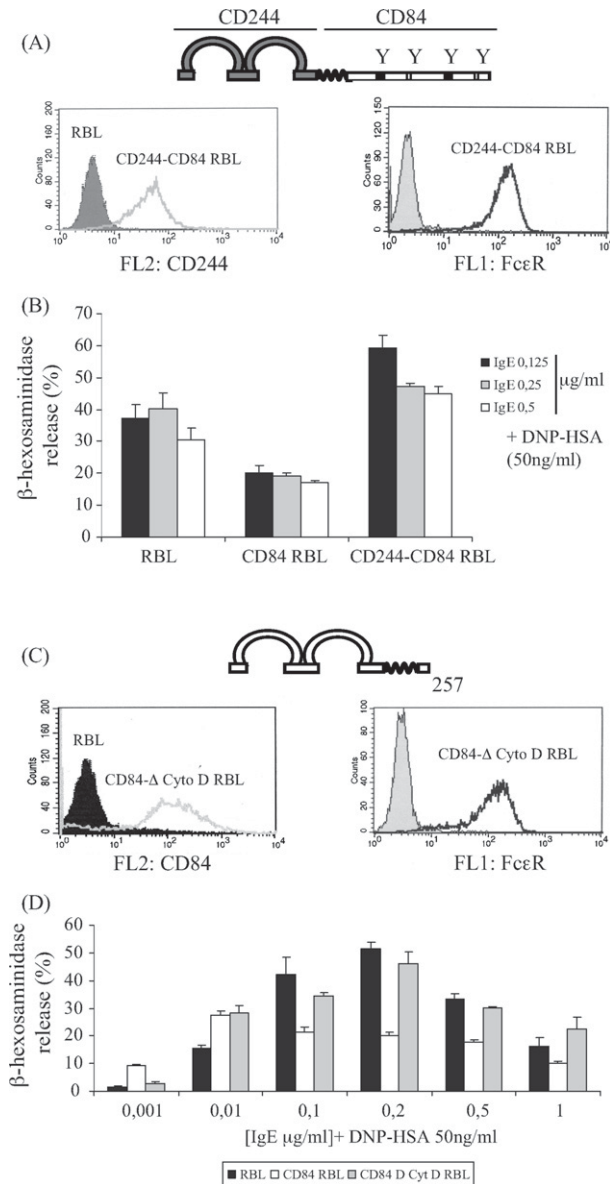


Fig. 3. CD84–CD84 homophilic interaction inhibits FcεRI-mediated degranulation. The CD244–CD84 chimera contains the extracellular domain of CD244, as well as the transmembrane and cytoplasmic domain of CD84. A CD244–CD84 stable transfectant was generated and its expression was measured with antibodies specific against CD244 and FcεRI (A). Control, CD84, and CD244–CD84 transfectants were sensitized overnight with different doses of IgE plus DNP-HSA at 50 ng/ml for 1 h. (B) A CD84 Δ cytoplasmic domain transfectant was generated and CD84 and FcεRI cell surface expression was measured by flow cytometry (C). Control, CD84, and CD84 Δ cytoplasmic domain transfectants were sensitized overnight at different doses of IgE plus DNP-HSA at 50 ng/ml for 1 h (D). β -Hexosaminidase release is expressed as the percentage of the maximum response (triton treatment) minus spontaneous release. Measurements were performed in triplicate and data are representative of three independent experiments.

els and activated with DNP-HSA for 2 and 15 min at 37 °C. Cells were then lysed and immunoprecipitated with either an isotopic IgG or with CD84 mAb. Blots against phosphotyrosine and avidin-HRP were then carried out. Our results show that IgE engagement enhances CD84 phosphorylation (Fig. 7A). To elucidate this inhibitory mechanism, signaling molecules

differentially engaged in control and CD84 RBL-2H3 transfectants were studied. Cells were sensitized overnight with anti-DNP IgE (0.25 μ g/ml) and then challenged with DNP-HSA (50 ng/ml) for 10 min before being lysed and immunoprecipitated with antibody anti-phosphotyrosine. Interestingly, overall phosphorylation did not decrease in CD84 RBL-2H3 cells. Moreover, an increase in phosphorylated bands of approximately 60 and 120 kDa was observed (Fig. 7B). Good candidate molecules were situated downstream of kinase-1 (Dok-1) and c-Cbl, respectively. Both molecules have been described as inhibiting mast cell activation (Ott et al., 2002; Qu et al., 2004). We successfully re-probed our blot with both anti-Dok-1 and anti-c-Cbl antibodies (Fig. 7B). Since β -hexosaminidase release inhibition was reduced at low IgE concentrations in CD84 RBL-2H3 cells (Fig. 1C), we reproduced this experiment at different IgE concentrations, lysing the cells after activation and studying the differential phosphorylated patterns. Interestingly, phosphorylation of Dok-1 and c-Cbl was markedly higher in those IgE concentrations in which CD84 induced higher degrees of inhibition (Fig. 7C). Moreover, the phosphorylation pattern revealed a decrease in Dok-1 and c-Cbl phosphorylated bands in those CD84 Y279F and CD84 Δ Y324 mutants in which degranulation was not inhibited (Fig. 7D).

3.6. Phosphorylation of JNK, ERK1/2, and p38 are affected in CD84 RBL-2H3 cells

Dok-1 was originally identified as a tyrosyl-phosphorylated molecule of 62 kDa, and has been associated with Ras-GAP, a negative regulator of Ras (Carpino et al., 1997). To determine whether CD84's inhibitory mechanism disrupts MAPK cascades, we analyzed the phosphorylation of JNK, ERK1/2, and p38. Control and transfectant cells were sensitized with anti-DNP IgE overnight and then challenged with DNP-HSA for 5, 10, and 20 min. Phosphorylation of JNK and p38 was impaired in CD84 RBL-2H3 cells compared with control transfectants, whereas pERK1/2 was partially affected (Fig. 8A). Phosphorylation of JNK, p38, and ERK was restored in CD84 Y279F and CD84 Δ Y324 mutants, thus again indicating that these motifs play a role in mediating a negative signals (Fig. 8B).

3.7. Cytokine synthesis is impaired in CD84 RBL-2H3 cells

Since phosphorylation of p38 and JNK was mostly impaired in CD84WT cells, we next investigated whether cytokine synthesis was similarly inhibited by CD84 homophilic interaction. Control, CD84, CD84 Y279F, and CD84 Δ Y324 RBL-2H3 cells were transfected with a TNF α -luciferase reporter gene plus TK-Renilla plasmids. They were then sensitized with anti-DNP IgE overnight and activated with DNP-HSA for 6 h. Finally, the cells were lysed and luciferase activity was measured. Our results show not only that CD84 inhibited TNF α induction, but also that it was restored in CD84 Y279F and CD84 Δ Y324 transfectants (Fig. 9). This event was IgE dependent since cells treated with PMA plus ionomycin activated equally, both in control and CD84 transfectants (data not shown). Taken together, these

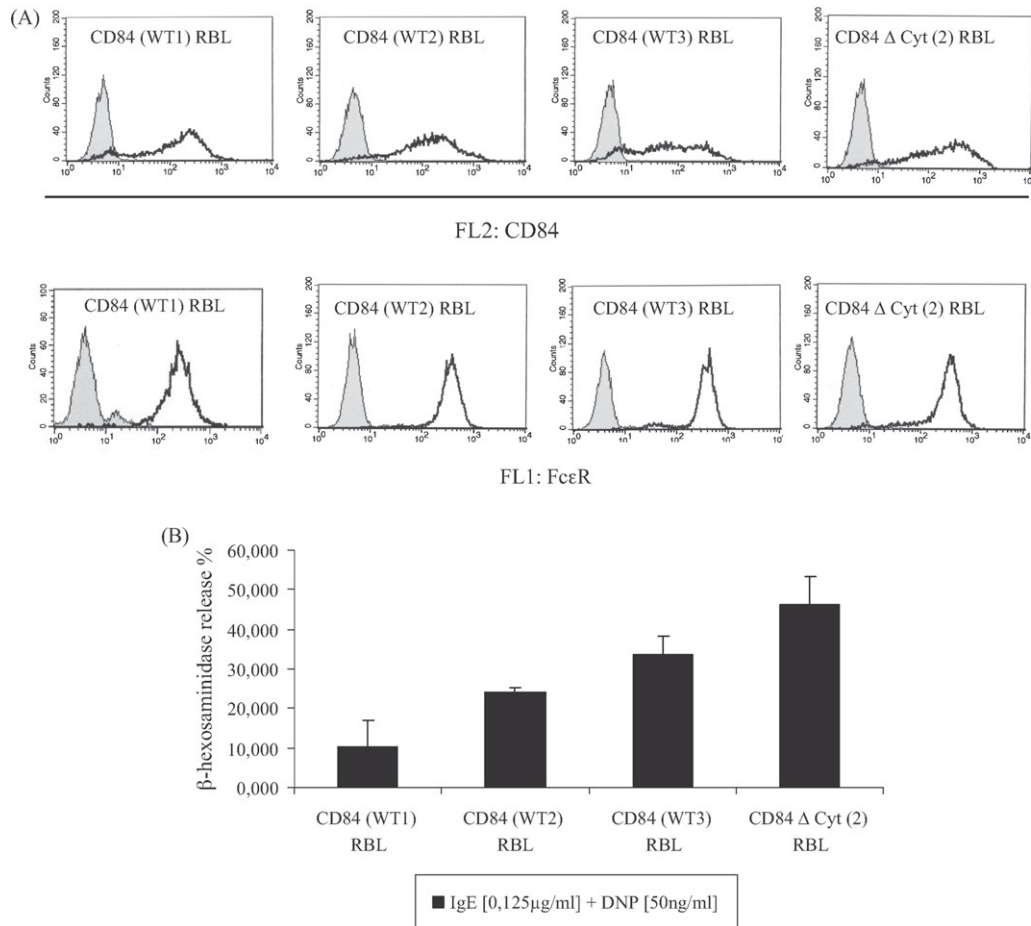


Fig. 4. CD84-RBL transfectants decrease β -hexosaminidase release compared to CD84 cytoplasmic domain deletion transfectant. Various CD84 transfectants were generated: full length and CD84 cytoplasmic domain deletion mutant. CD84, Fc ϵ RI expression (A) and β -hexosaminidase release was assayed (B).

results suggest that CD84 inhibits both upstream and downstream IgE receptor-triggered events in the RBL-2H3 cell line.

4. Discussion

Crosslinking the high-affinity IgE receptor on basophils and mast cells initiates cascades of biochemical events leading to degranulation, membrane ruffling, and other physiological responses. Fc ϵ RI signaling has to be tightly controlled through an array of inhibitory mechanisms to avoid allergic inflammatory responses. In general, these mechanisms involve inhibitory receptors whose activation leads to the recruitment of phosphatases and intracellular mediators in order to produce selective inhibition of degranulation and cytokine synthesis (Galli et al., 2005a; Katz, 2002; Nadler et al., 2000). Here we report that CD84, a leukocyte glycoprotein belonging to the CD150 family of receptors, is a novel inhibitory molecule for Fc ϵ RI-mediated signaling.

Inhibition of degranulation, as measured by β -hexosaminidase release at optimal IgE concentrations, was found in CD84 RBL-2H3 cells. Studies using the CD244–CD84 chimera (extracellular domains of CD244 and CD84 transmembrane and cytoplasmic tail) and CD84 Δ cytoplasmic mutant transfectant show that CD84 negatively signals in these cells via homophilic

interaction. The CD84 cytoplasmic domain has four tyrosine-based motifs: Y262, Y279, Y299 and Y324. Tyrosines 262 and 299 follow the consensus motifs for SAP and SHP-2 (T-V/I-Y-x-x-V/I), whereas x denotes any amino acid (Sayos et al., 2001). SAP has been shown to be an adaptor protein involved in CD150 family signaling, which recruits a Src-like kinase to the receptor (Chan et al., 2003; Chen et al., 2006), while SHP-2, on the other hand, has been reported to compete with SAP for binding to CD150, thus modulating any response (Sayos et al., 1998). Our results show that Y262 preferentially binds SAP, while Y299 does so for SHP-2. Our data indicate that there is no competition for binding between these molecules in the CD84 cytoplasmic tail. Single and double mutants for Y262 and Y299 transfectants do not reverse the inhibitory profile of CD84, suggesting that these tyrosines are not critical in mediating the negative signaling that occurs in such cells. It is possible that SAP involvement is not important due to the low or nil expression in RBL-2H3 cells. In fact, HMC-1, an immature human mast cell line, and KU812, a human basophilic leukaemia cell both express good levels of CD84. However, SAP has not been detected in their cell lysates or by immunoprecipitation (data not shown). Neither did over-expressing SAP in CD84RBL-2H3 cells change the inhibition pattern (data not shown). As Y262 and Y299 reportedly bind Eat-2 (Tangye et al., 2003), and since this adaptor has been shown to

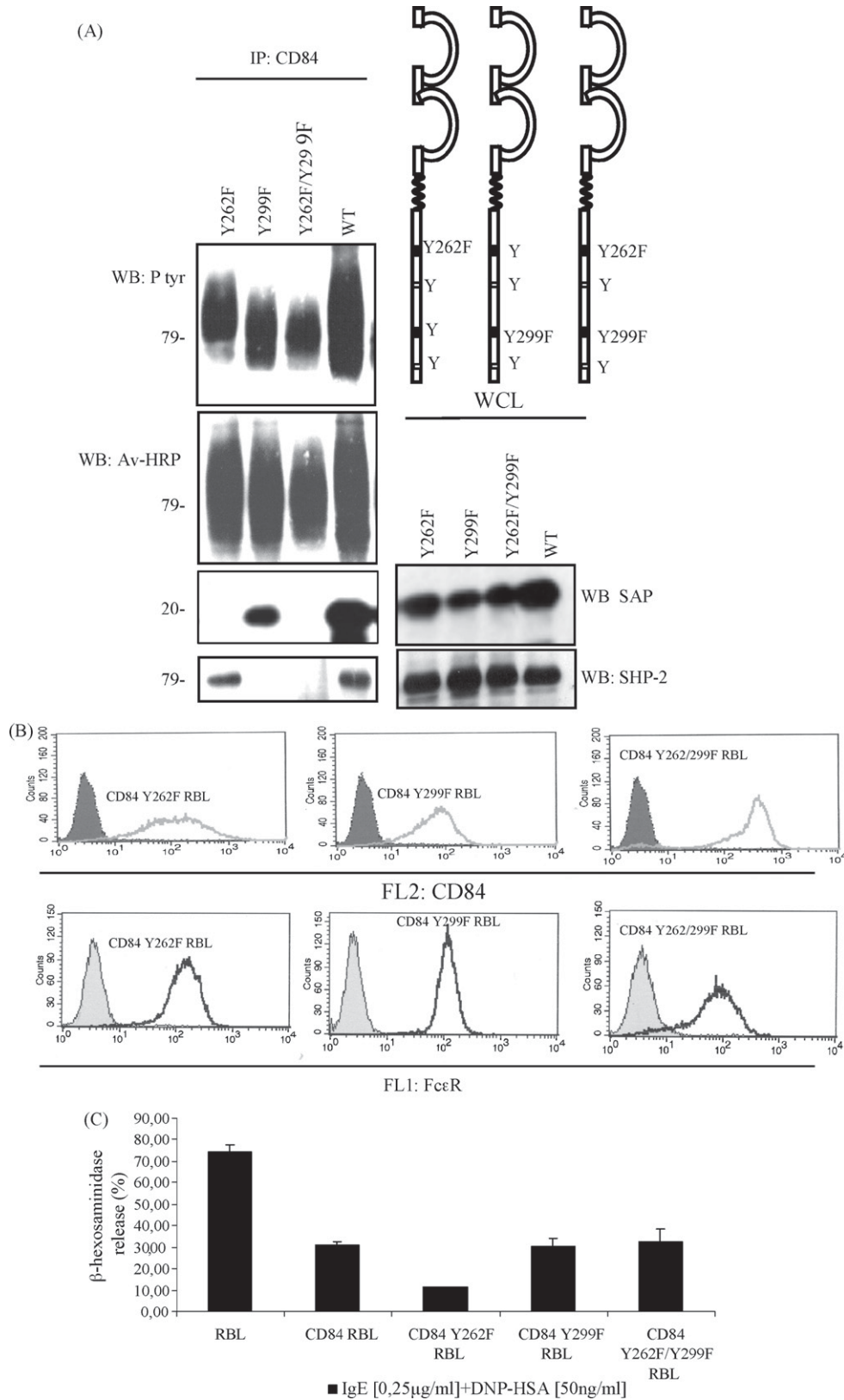


Fig. 5. SAP is not involved in CD84-mediated inhibition. The following CD84 single and double mutants for SAP consensus motifs (T-V/I-Y-x-x-V/I) were generated: CD84 Y262F, CD84 Y299F, and CD84 Y262/299F. COS cells were transfected with full length CD84 or single mutants or double mutants plus SAP and Fyn plasmids. After 48 h cells were biotinylated, a CD84 precipitation was performed, and the blot was incubated as indicated (A). Stable transfectants for these mutants were generated in RBL-2H3. CD84 and FcεRI expression was analyzed by flow cytometry (B). β -Hexosaminidase release was performed in these mutants (C). Results are expressed as the percentage of maximum response (triton treatment) minus spontaneous release. Measurements were performed in triplicate and the data are representative of three independent experiments.

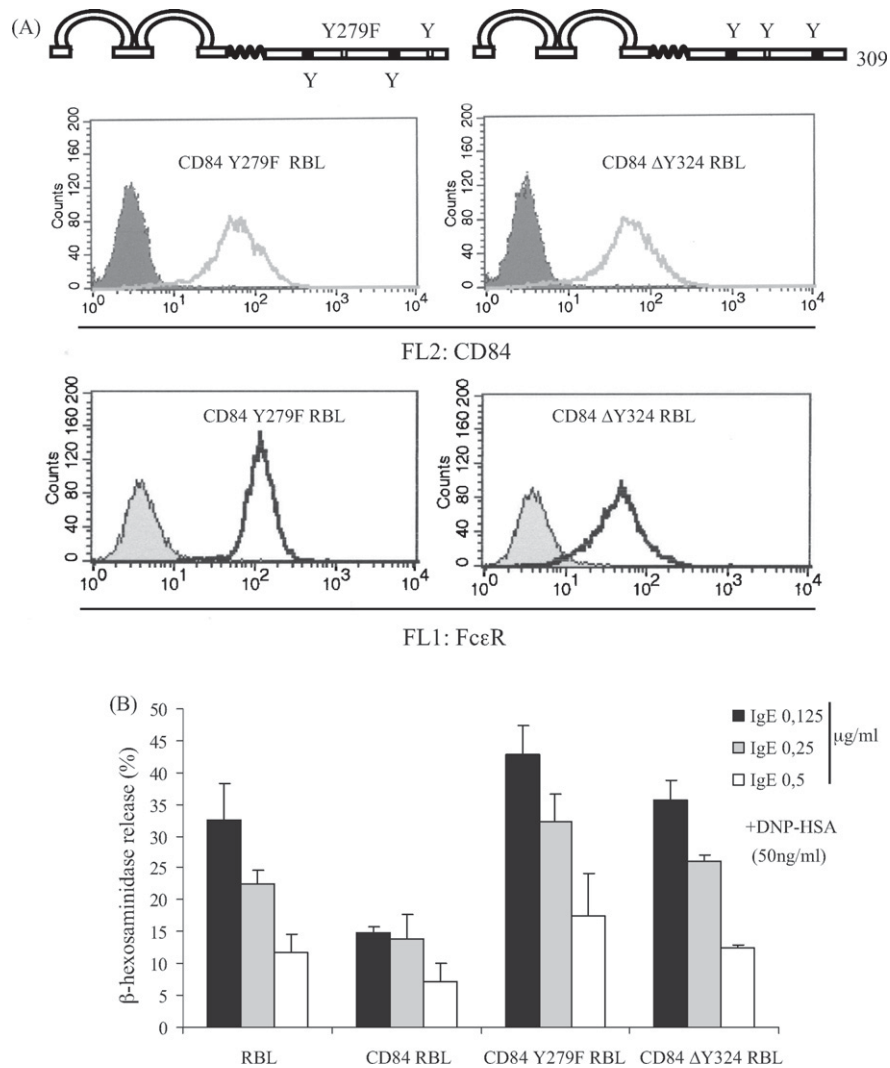


Fig. 6. CD84 Y279F and CD84 Δ Y324 mutants reverse CD84-mediated degranulation inhibition. Mutants for Y279 and Y324 in CD84 cytoplasmic tail were obtained and stable RBL-2H3 transfectants were generated. CD84 and Fc ϵ R1 expression was measured by flow cytometry (A). β -Hexosaminidase release was performed in these mutants (B). Results are expressed as the percentage of maximum response (triton treatment) minus spontaneous release. Measurements were performed in triplicate and the data are representative of three independent experiments.

be involved in CD244-negative signaling in NK cells (Roncagalli et al., 2005), we could conclude from our findings that Eat-2 is not a key effector molecule in CD84-mediated inhibition in RBL-2H3. The two other tyrosines in the CD84 cytoplasmic tail, Y279 and Y324, have proven equally crucial for CD84-mediated degranulation inhibition. Concordantly, calcium influx after IgE triggering was restored in CD84 Y279F and CD84 Δ Y324 mutant transfectants (data not shown). Potential intracellular molecules that mediate CD84-inhibition are c-Cbl and Dok-1; in fact, their phosphorylation levels increased in CD84 RBL-2H3 cells after IgE triggering. c-Cbl is thought to dampen mast cell function, thereby inducing rapid ubiquitination of Src kinases and PTKs involved in Fc ϵ RI-mediated signaling (Kyo et al., 2003; Ota and Samelson, 1997). Dok-1 over-expression reduces Fc ϵ RI-mediated Ras/Raf-1/Erk signaling and the *de novo* synthesis of TNF α , presumably by its ability to recruit the inhibitory effectors RasGAP, SHIP and Csk (Brauweiler et al., 2000; Zhao et al., 2006). Increased phosphorylation of

Dok-1 and c-Cbl was concomitant with CD84-mediated inhibition in CD84 RBL-2H3 cells. Moreover, in CD84 Y279F and CD84 Δ Y324 transfectants, both of which reverse the inhibitory profile, phosphorylation of Dok-1 and c-Cbl was found to be low compared with CD84 transfectants, but similar to control cells. The CD84–CD84 interaction inhibits cytokine synthesis, a process likely mediated by the reduced activation of the MAP kinases ERK, p38, and JNK, since CD84 inhibited the activation of all three. Given that Dok-1 signaling has been shown to attenuate Ras activity, thus leading to the inhibition of downstream MAPK pathways in mast cells (Ott et al., 2002), other molecules may similarly be involved in p38 and JNK inhibition. Consistent with this finding, inhibition of MAP kinases and cytokine synthesis was reversed in CD84 Y279F and CD84 Δ Y324 mutants. Most inhibitory receptors on immune cells contain a consensus amino acid sequence, termed the ITIM cytoplasmic domain (Ravetch and Lanier, 2000). The prototype ITIM consists of the sequence (I/V/L/S)-x-Y-x-x-(L/V), where x denotes

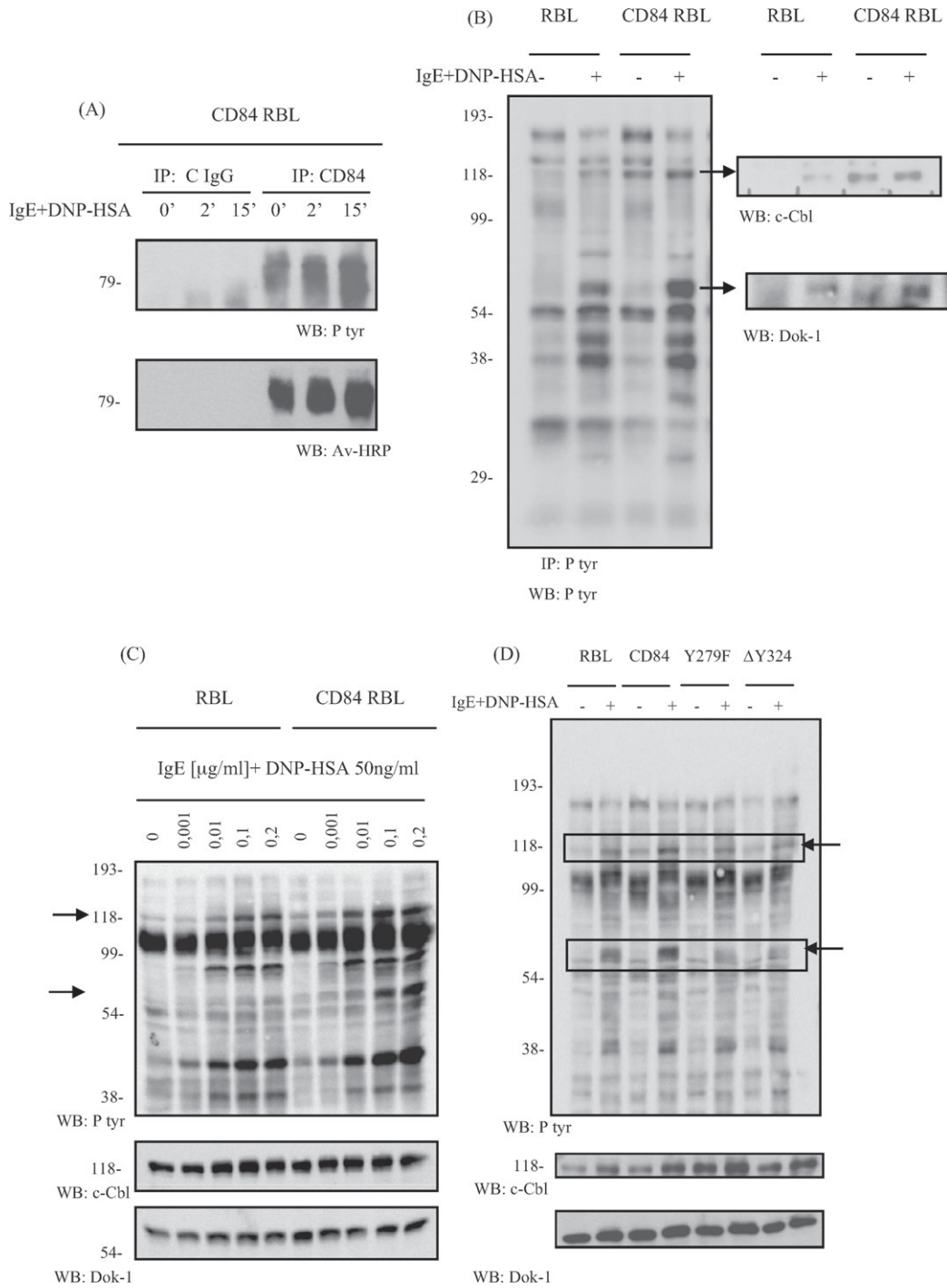


Fig. 7. Phosphorylation levels of c-Cbl and Dok-1 were increased in CD84 RBL-2H3 cells. 10×10^6 of CD84 RBL-2H3 cells were sensitized overnight with anti-DNP IgE (0.25 $\mu\text{g/ml}$). The cells were then washed, biotinylated, and activated with 50 ng/ml DNP-HSA for 0, 2, and 15 min. Cells were lysed and immunoprecipitated with anti-CD84 or isotypic IgG. The blot was re-probed with anti-ptyr and avidin-HRP (A). Control and CD84 RBL-2H3 cells were activated as described above for 10 min. Cells were lysed and immunoprecipitated with anti-ptyr antibody. The blot was re-probed with anti-ptyr, anti-c-Cbl, and anti-Dok-1 antibodies (B). Control and CD84 RBL-2H3 cells were activated at various IgE concentrations plus DNP-HSA (50 ng/ml) for 5 min. Lysates were run in 10% SDS-PAGE and transferred onto a membrane. Blots were re-probed as indicated (C). Control, CD84, CD84 Y279F and CD84 ΔY324 transfectants were sensitized overnight with anti-DNP IgE (0.25 $\mu\text{g/ml}$) plus 50 ng/ml of DNP-HSA for 5 min. Lysates were run in 10% SDS-PAGE and transferred onto a membrane. Blots were re-probed as indicated (D).

any amino acid. Tyrosine 324 (S-S-Y-E-I-V-I) on CD84 features this consensus, whereas tyrosine 279 (R-I-Y-D-E-I) does not. Ligand-induced clustering of these ITIM-containing receptors results in tyrosine phosphorylation, often by a Src-family kinases, which provides a docking site for the recruitment of the

tyrosine phosphatases SHP-1, SHP-2 or SHIP. Studies involving yeast have failed to show any direct interaction between CD84 and SHP-1 (data not shown), nor did we observe any dephosphorylation patterns in our own experiments. As shown previously, the CD84 Y299F mutant abolishes SHP-2 binding

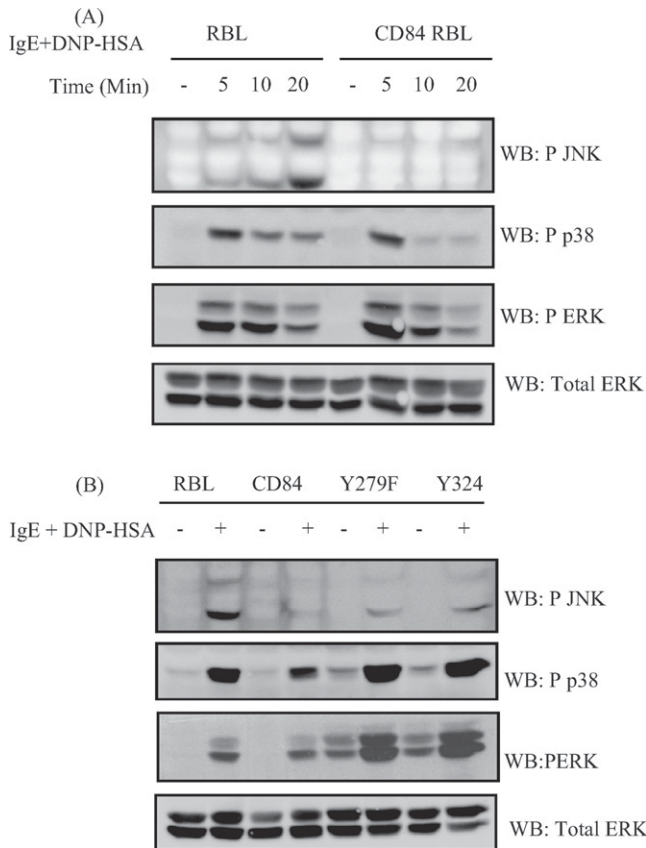


Fig. 8. Phosphorylation of JNK, ERK1/2, and p38 in CD84 RBL-2H3 cells. Control and CD84 RBL-2H3 cells were sensitized overnight with anti-DNP IgE (0.25 μ g/ml) plus 50 ng/ml DNP-HSA for 5, 10 and 20 min. Cells were lysed and run in 10% SDS-PAGE. Blots were re-probed with anti-phospho JNK, anti-phospho p38, anti-phospho ERK1/2, and total ERK1/2 (A). Control, CD84, CD84 Y279F, and CD84 Δ Y324 transfectant RBL-2H3 cells were sensitized overnight with anti-DNP IgE (0.25 μ g/ml) plus 50 ng/ml DNP-HSA for 10 min. Cells were lysed and run in 10% SDS-PAGE. Blots were re-probed with anti-phospho JNK, anti-phospho p38, anti-phospho pERK1/2, and total ERK (B).

and this tyrosine does not mediate inhibition. Deletion of Y324 does not affect SHP-2 binding to CD84 (data not shown). Thus, the role of SHP-2 does not account for CD84-mediated inhibition. Furthermore, while the Y324 motif does not contain the

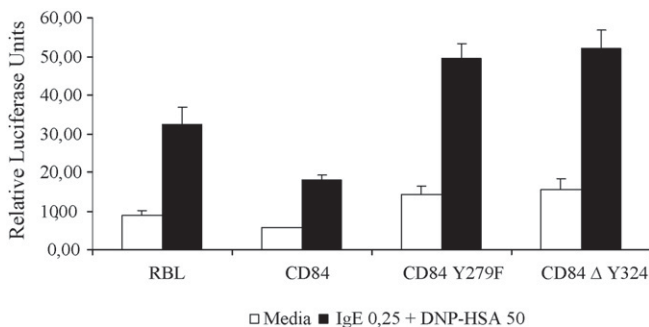


Fig. 9. Cytokine synthesis is impaired in CD84 RBL-2H3 cells. Control, CD84 WT, CD84 Y279F, and CD84 Δ Y324 mutant RBL-2H3 cells were transfected with TNF α reporter gene plus TK-Renilla. Cells were sensitized overnight with anti-DNP IgE (0.25 μ g/ml) plus 50 ng/ml DNP-HSA for 6 h. Cells were lysed and luciferase activity was measured. Measurements were performed in duplicate and the data are representative of three independent experiments.

SHIP consensus-binding motif, it is likely that SHIP also plays a role in CD84-mediated inhibition, since its mediation of negative signaling does not affect overall phosphorylation and can involve Dok-1 recruitment (Brauweiler et al., 2000; Ono et al., 1997). Further studies will be needed to identify those molecules that bind to Y279 and Y324 motifs in the CD84 cytoplasmic domain.

CD84 downregulates cell activation at those IgE concentrations exhibiting a high degranulation response, but not at lower concentrations. One explanation for this could be that some degree of activation is needed in order to elicit CD84 phosphorylation and signaling. It is also conceivable that it would be biologically disadvantageous to completely suppress the functions of these cells, since basophils and mast cells provide an essential and innate protective response to bacterial infections (Marshall, 2004). Conversely, CD84 plays a role as a costimulatory molecule in T cells, increasing IFN gamma and proliferation (Martin et al., 2001; Tangye et al., 2003). Strikingly, this effect was also apparent in SAP-deficient T cells obtained from patients with XLP, suggesting that CD84 can activate human T cells via a SAP-independent mechanism (Tangye et al., 2003). An explanation in support of an opposite role for this molecule, depending on cell type subset, could be that different signaling mechanisms and molecules involved are triggered in basophils/mast cells and T lymphocytes after CD84 engagement. This hypothesis is supported by data involving other members of the CD150 family such as CD244. A positive or negative role has been assigned to this receptor on the basis of SAP or Eat-2 expression in different cell subsets or maturation states (Parolini et al., 2000; Veillette, 2006).

These findings not only suggest that CD84 may contribute to variations in the secretory phenotype of mast cells, but also reveal CD84 to represent a new player that can negatively regulate Fc ϵ RI-dependent signaling. Its possible role in allergic inflammation and/or other associated responses should therefore be taken into consideration.

Acknowledgements

We thank Dr. A. Goldfeld for providing the TNF α -luciferase plasmid. We are grateful to Dr. J. Sayós for his comments on this manuscript.

References

- Blank, U., Rivera, J., 2004. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol.* 25, 266–273.
- Brauweiler, A.M., Tamir, I., Cambier, J.C., 2000. Bilevel control of B-cell activation by the inositol 5-phosphatase SHIP. *Immunol. Rev.* 176, 69–74.
- Brown, M.H., Boles, K., van der Merwe, P.A., Kumar, V., Mathew, P.A., Barclay, A.N., 1998. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J. Exp. Med.* 188, 2083–2090.
- Carpino, N., Wisniewski, D., Strife, A., Marshak, D., Kobayashi, R., Stillman, B., Clarkson, B., 1997. p62 (dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell* 88, 197–204.
- Chan, B., Lanyi, A., Song, H.K., Griesbach, J., Simarro-Grande, M., Poy, F., Howie, D., Sumegi, J., Terhorst, C., Eck, M.J., 2003. SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat. Cell Biol.* 5, 155–160.

- Chen, R., Latour, S., Shi, X., Veillette, A., 2006. Association between SAP and FynT: inducible SH3 domain-mediated interaction controlled by engagement of the SLAM receptor. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5559–5568.
- Del Valle, J.M., Engel, P., Martin, M., 2003. The cell surface expression of SAP-binding receptor CD229 is regulated via its interaction with clathrin-associated adaptor complex 2 (AP-2). *J. Biol. Chem.* 278, 17430–17437.
- Engel, P., Eck, M.J., Terhorst, C., 2003. The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 813–821.
- Galli, S.J., Kalesnikoff, J., Grimaldeston, M.A., Piliponsky, A.M., Williams, C.M., Tsai, M., 2005a. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 749–786.
- Galli, S.J., Nakaie, S., Tsai, M., 2005b. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6, 135–142.
- Gonzalez-Espinosa, C., Odom, S., Olivera, A., Hobson, J.P., 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.
- Heneberg, P., Draber, P., 2002. Nonreceptor protein tyrosine and lipid phosphatases in type I Fc(epsilon) receptor-mediated activation of mast cells and basophils. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 128, 253–263.
- Kamata, T., Yamashita, M., Kimura, M., Murata, K., Inami, M., Shimizu, C., Sugaya, K., Wang, C.R., Taniguchi, M., Nakayama, T., 2003. Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 controls the development of allergic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 111, 109–119.
- Katz, H.R., 2002. Inhibitory receptors and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 698–704.
- Kawakami, T., Galli, S.J., 2002. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 773–786.
- Kraft, S., Kinet, J.P., 2007. New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 365–378.
- Kyo, S., Sada, K., Qu, X., Maeno, K., Miah, S.M., Kawauchi-Kamata, K., Yamamura, H., 2003. Negative regulation of Lyn protein-tyrosine kinase by c-Cbl ubiquitin-protein ligase in Fc epsilon RI-mediated mast cell activation. *Genes Cells* 8, 825–836.
- Marshall, J.S., 2004. Mast-cell responses to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 787–799.
- Martin, M., Del Valle, J.M., Saborit, I., Engel, P., 2005. Identification of Grb2 as a novel binding partner of the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein binding receptor CD229. *J. Immunol.* 174, 5977–5986.
- Martin, M., Romero, X., de la Fuente, M.A., Tovar, V., Zapater, N., Esplugues, E., Pizcueta, P., Bosch, J., Engel, P., 2001. CD84 functions as a homophilic adhesion molecule and enhances IFN-gamma secretion: adhesion is mediated by Ig-like domain 1. *J. Immunol.* 167, 3668–3676.
- Mekori, Y.A., 2004. The mastocyte: the “other” inflammatory cell in immunopathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 52–57.
- Nadler, M.J., Matthews, S.A., Turner, H., Kinet, J.P., 2000. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function. *Adv. Immunol.* 76, 325–355.
- Ono, M., Okada, H., Bolland, S., Yanagi, S., Kurosaki, T., Ravetch, J.V., 1997. Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell* 90, 293–301.
- Ota, Y., Samelson, L.E., 1997. The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science* 276, 418–420.
- Ott, V.L., Tamir, I., Niki, M., Pandolfi, P.P., Cambier, J.C., 2002. Downstream of kinase, p62(dok), is a mediator of Fc gamma IIB inhibition of Fc epsilon RI signaling. *J. Immunol.* 168, 4430–4439.
- Parolini, S., Bottino, C., Falco, M., Augugliaro, R., Giliani, S., Franceschini, R., Ochs, H.D., Wolf, H., Bonnefoy, J.Y., Biassoni, R., Moretta, L., Notarangelo, L.D., Moretta, A., 2000. X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J. Exp. Med.* 192, 337–346.
- Qu, X., Sada, K., Kyo, S., Maeno, K., Miah, S.M., Yamamura, H., 2004. Negative regulation of Fc epsilon RI-mediated mast cell activation by a ubiquitin-protein ligase Cbl-b. *Blood* 103, 1779–1786.
- Rauh, M.J., Kalesnikoff, J., Hughes, M., Sly, L., Lam, V., Krystal, G., 2003. Role of Src homology 2-containing-inositol 5'-phosphatase (SHIP) in mast cells and macrophages. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 286–291.
- Ravetch, J.V., Lanier, L.L., 2000. Immune inhibitory receptors. *Science* 290, 84–89.
- Romero, X., Benitez, D., March, S., Vilella, R., Miralpeix, M., Engel, P., 2004. Differential expression of SAP and EAT-2-binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4). *Tissue Antigens* 64, 132–144.
- Roncagalli, R., Taylor, J.E., Zhang, S., Shi, X., Chen, R., Cruz-Munoz, M.E., Yin, L., Latour, S., Veillette, A., 2005. Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nat. Immunol.* 6, 1002–1010.
- Saborit-Villarroya, I., Del Valle, J.M., Romero, X., Esplugues, E., Lauzurica, P., Engel, P., Martin, M., 2005. The adaptor protein 3BP2 binds human CD244 and links this receptor to Vav signaling, ERK activation, and NK cell killing. *J. Immunol.* 175, 4226–4235.
- Sayos, J., Martin, M., Chen, A., Simarro, M., Howie, D., Morra, M., Engel, P., Terhorst, C., 2001. Cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP. *Blood* 97, 3867–3874.
- Sayos, J., Wu, C., Morra, M., Wang, N., Zhang, X., Allen, D., van Schaik, S., Notarangelo, L., Geha, R., Roncarolo, M.G., Oettgen, H., De Vries, J.E., Aversa, G., Terhorst, C., 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395, 462–469.
- Siraganian, R.P., 2003. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 639–646.
- Tangye, S.G., Nichols, K.E., Hare, N.J., van de Weert, B.C., 2003. Functional requirements for interactions between CD84 and Src homology 2 domain-containing proteins and their contribution to human T cell activation. *J. Immunol.* 171, 2485–2495.
- Veillette, A., 2006. NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adapters. *Immunol. Rev.* 214, 22–34.
- Zhao, M., Janas, J.A., Niki, M., Pandolfi, P.P., Van Aelst, L., 2006. Dok-1 independently attenuates Ras/mitogen-activated protein kinase and Src/c-myc pathways to inhibit platelet-derived growth factor-induced mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2479–2489.