



# La proteïna adaptadora 3BP2 com a regulador de l'activitat cel·lular a través dels receptors de membrana FcεRI i KIT

Erola Ainsua Enrich

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE MEDICINA

Departament de Ciències Fisiològiques I

Unitat de Bioquímica

# **La proteïna adaptadora 3BP2 com a regulador de l'activitat cel·lular a través dels receptors de membrana FcεRI i KIT**

Tesi doctoral presentada per:

**Erola Ainsua Enrich**

Per optar al grau de:

**Doctora per la Universitat de Barcelona**

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

Barcelona, Desembre del 2013



Tesis Doctoral

**LA PROTEÏNA ADAPTADORA 3BP2 COM A REGULADOR DE L'ACTIVITAT  
CEL·LULAR A TRAVÉS DELS RECEPTORS DE MEMBRANA FcεRI I KIT**

Programa de Doctorat en Biomedicina

Treball realitzat per Erola Ainsua Enrich a la Unitat de Bioquímica del Departament de Ciències Fisiològiques I de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona, sota la direcció de la Dra. Margarita Martín Andorrà per optar al títol de Doctora en Biomedicina.

Barcelona, Desembre de 2013

L'autora:

La directora

Erola Ainsua Enrich

Margarita Martín Andorrà





... a la Bestioleta, espero algun dia  
tenir-te entre els meus braços



## AGRAÏMENTS

Sembla mentida que ja hagin passat set anys, encara me'n recordo del dia abans de l'entrevista amb la Dra. Margarita Martín, estava a Santiago de Compostela fent les pràctiques del màster, i hem va comentar que podria passar l'endemà pel laboratori per parlar. No m'ho vaig pensar, vaig comprar un bitllet d'avió i l'endemà al mati ja estava a Barcelona.

Li vull agrair especialment a la Dra. Margarita Martín per la gran oportunitat que em va donar, per les ensenyances, els ànims i per estar lluitant amb mi en tot moment durant aquest trajecte.

En aquests gairebé set anys de tesis he conegut gent molt diversa i de diferents llocs. He pogut compartir rialles i bons moments amb companys de laboratori com la Irene, el Jordi, el Nel, l'Adriana, la Natàlia, la Laia, la Mari Carmen, la Maria el Borja, l'Ester, Cisco i la sort de conèixer a veritables amics, en aquest cas amiga com és la Ivonne.

És pot dir, que en aquest trajecte hi ha un punt d'inflexió com ha estat l'estada al laboratori del Dr. Juan Rivera al NIH, Bethesda, ja que ha significar un repte tan personal com professional, m'he sentit independent i he viscut la ciència amb intensitat. Vull agrair especialment tota la gent que he conegut allà, començant pel Dr. Juan Rivera, per la seva proximitat, per ser un dels millors jefes que he tingut mai, agraeixo els coneixements que hem va transmetre i creure en mi com a professional, a la Damiana, per la seva rebuda, em va acollir a casa seva sense conèixe'm, i ajudar-me en tot moment, a la Sandra Odom, per la seva paciència, la seva complicitat i per donar-me una festa sorpresa pel meu aniversari, al Rio, la Yasuko per la seva ajuda quan no em sortien les coses. al Jose Antonio, la Lorena i l'Ana, pels bons moments i les excursions que vam fer junts, descobrint la costa est. També agrair als meus companys de pis, a l' Alex i el Jesse, al

Brady, al Sebastian i la Bells, als animalons del pis, per fer-me sentir com a casa, quan estava tan lluny d'ella.

A l'arribada van haver-hi molts canvis, nou laboratori nova gent, tot i que alguns van seguir amb mi, com la Ivonne, la Rosa i la Damiana. Al Chiwi i al Ivan per deixar-me forma part encara que fossin uns mesos del club dels pares, a la Rosario i la Carmen per estar allà en tot moment. I als companys que ja no hi són al Javi, la Maggi, la Neus, a l'Ana, al Toni. I com no als meu "compis", el millor grup que vist mai, al Nacho per ser el millor estudiant i per tenir sempre fam, a la Marta per ser com és, tot i que no sigui del grup la considero part d'ell, a l'Arnau per aquests pastissos que fa la seva novia que són boníssims i les fotos de portada, a la Cristina la última adquisició al grup, a l'Eva per l'aire fresc i bon rotllo que ha portat al laboratori. A tots vosaltres gràcies, per l'ajuda i consells d'aquests últims mesos.

A la Rosa Torres i Judith per fer els congressos tan divertits.

Als esmorzars amb la Loli i la Míriam, ens animàvem de bon mati.

I no oblidar-me de l'Anna, la marta la Laia i la Carolina companyes de fatiga des de la universitat, que han estat aquí en tot moment.

En aquest temps han passat moltes coses, tan bones com dolentes. Podria explicar moltes anècdotes, però la que em fa més il·lusió és un 17 de juny després d'un dia molt dolent la Ivonne i jo vam anar a l'Abadia i després de dues cerveses, vaig fer una des les trucades més important i increïbles, on em retrobaria amb la persona que és actualment la meva parella i estimo amb tot el meu cor.

Als meus pares, per l'esforç que van fer perquè pogués estudiar i l'educació que em van transmetre, per la paciència que han tingut amb mi i pels bons consells que m'han donat, per estar amb mi en tot moment i saber que sempre podré comptar amb ells. Al meu cunyat i a la meva increïble germana, gràcies per ser

com és, per poder comptar amb ella en tot moment i ajudar-me que això fos possible. I com no al Josep, per aguantar-me i fer-me feliç.

Aquest últims mesos han estat especialment dolorosos, la pèrdua d'un fill marca molt, però gràcies a la magnífica gent que m'envolta han fet possible que siguin menys tristos.

A tots vosaltres, moltes gràcies. Ho hem aconseguit



# ÍNDEX

<b>AGRAÏMENTS .....</b>	<b>VII</b>
-------------------------	------------

<b>ÍNDEX.....</b>	<b>XI</b>
-------------------	-----------

<b>ABREVIATURES.....</b>	<b>XIX</b>
--------------------------	------------

<b>I. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>25</b>
-----------------------------	-----------

## **1. MASTÒCITS COM A SENTINELLES DEL SISTEMA IMMUNOLÒGIC 27**

1.1 Origen.....	27
-----------------	----

1.2 Biologia dels mastòcits.....	27
----------------------------------	----

1.3 Funcions dels mastòcits.....	30
----------------------------------	----

1.3.1 Funcions efectores.....	32
-------------------------------	----

1.3.2 Funcions immunomoduladores .....	33
--	----

## **2. FISIOPATOLOGIA DEL MASTÒCIT..... 36**

2.1 Paper dels mastòcits en les malalties al·lèrgiques .....	36
--	----

2.1.1 Asma.....	36
-----------------	----

2.1.2 Rinitis al·lèrgica.....	37
-------------------------------	----

2.1.3 Dermatitis atòpica .....	37
--------------------------------	----

2.1.4 Anafilaxi .....	38
-----------------------	----

2.1.5 Malaltia al·lèrgica de l'ull .....	39
--	----

2.1.6 Mastocitosi .....	39
-------------------------	----

2.2 Paper dels mastòcits en les malalties no al·lèrgiques .....	39
---	----



<b>3. RECEPTOR D'ALTA AFINITAT PER LA IgE (FcεRI)</b> .....	<b>41</b>
3.1 Estructura .....	41
3.2 Regulació de l'expressió .....	43
3.3 Funcions biològiques .....	44
<b>4. TRANSDUCCIÓ DE SENYALS EN MASTÒCITS A TRAVÉS DEL FcεRI</b> .....	<b>46</b>
4.1 Proteïnes adaptadores.....	49
4.1.1. Classes de proteïnes adaptadores.....	50
4.1.2. Funcions .....	51
4.2 Via primària a través de Lyn.....	52
4.2.1 SYK.....	54
4.2.2 LAT .....	56
4.2.3 PLCγ .....	57
4.2.4 SLP76-GADS-VAV.....	58
4.2.5 Grb2-SOS .....	59
4.3 Via complementària a través de Fyn .....	61
4.3.1 NTAL.....	62
4.3.2 Grb2, Gab2 i PI3K.....	64
4.3.3 BTK i SK-S1P.....	66
4.3.4 PDK1 i AKT.....	67
4.3.5 Grb2, SOS i Vav.....	68
<b>5. REGULACIÓ DE LA TRANSDUCCIÓ DE SENYALS A TRAVÉS DEL FcεRI</b> .....	<b>70</b>
5.1 Molècules inhibidores de l'activació dels mastòcits .....	70

5.1.1 Regulació negativa a través de receptors que contenen ITIMs .....	71
5.1.2 Regulació negativa a través de fosfatases de tirosines en proteïnes: SHP-1 i SHP-2 .....	72
5.1.3 Regulació negativa a través de fosfatases lipídiques: SHIP .....	73
5.1.4 Regulació negativa a través de molècules adaptadores: DOK .....	74
5.1.5 Regulació negativa a través de receptors que no contenen ITIMs.....	75
5.2 Molècules potenciadores de l'activació dels mastòcits .....	75
5.2.1 Receptors acoblats a proteïna G (GPCRs): S1P1, S1P2, receptor d'adenosina A3 i receptor de C3a. ....	75
5.2.2 KIT .....	76
<b>6. EL RECEPTOR KIT (CD117).....</b>	<b>77</b>
6.1 Estructura del receptor KIT .....	77
6.2 Regulació de l'expressió del receptor KIT .....	81
6.3 Funcions biològiques del receptor KIT .....	82
<b>7. TRANSDUCCIÓ DE SENYALS EN MASTÒCITS A TRAVÉS DEL RECEPTOR KIT .....</b>	<b>85</b>
7.1 Via PI3K.....	86
7.2 Via família Src cinases (SFK).....	87
7.3 Via FOSFOLIPASA C i D .....	88
7.4 Via JAKs/STATs .....	88
7.5 Via MAPK .....	89
<b>8. PATOLOGIA DE KIT I ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES .....</b>	<b>90</b>
8.1. Patologia de KIT .....	91
8.1.1 Mastocitosi .....	91

8.1.2 Tumors gastrointestinals .....	93
8.1.3 Leucèmia mieloide aguda.....	94
8.1.4 Altres patologies.....	94
8.2 Estratègies terapèutiques.....	94
<b>9. LA MOLÈCULA ADAPTADORA 3BP2 .....</b>	<b>96</b>
9.1 Estructura del 3BP2 .....	96
9.2 Funcions del 3BP2 en cèl·lules del sistema immune.....	97
9.3 Deficiències en 3BP2 .....	100
9.4 Mutacions del 3BP2 .....	101
<b>II. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS.....</b>	<b>103</b>
1. PLANTEJAMENT .....	105
2. OBJECTIUS GENERALS.....	105
3. OBJECTIUS ESPECÍFICS .....	106
<b>III. MATERIAL I MÈTODES.....</b>	<b>107</b>
1. LÍNIES CEL·LULARS I REACTIUS.....	109
1.1 Línies cel·lulars .....	109
1.2 Reactius.....	110
1.2.1 Anticossos.....	110
1.2.2 Reactius .....	111
2. DIFERENCIACIÓ DE PROGENITORS CD34+ A MASTÒCITS HUMANS.....	113
3. SISTEMA DE TRANSDUCCIÓ.....	115

3.1 Producció de lentivirus .....	115
3.2 Infecció amb lentivirus.....	117
<b>4. SISTEMA DE TRANSFECCIÓ .....</b>	<b>118</b>
4.1. Construccions de Plàsmids .....	118
4.2 Transfeccions transitòries .....	121
4.2.1 Electroporació de cèl·lules COS amb el sistema AMAXA.....	121
4.3 Transfeccions estables .....	122
4.3.1 Transfecció de SH2-EGFP en la línia cel·lular HMC-1 .....	122
<b>5. ANÀLISI BIOQUÍMIC DE PROTEÏNES .....</b>	<b>123</b>
5.1 Sensibilització de les cèl·lules .....	124
5.2 <i>Starving</i> (Privació de nutrients) cel·lular .....	124
5.3 Activació cel·lular .....	124
5.4 Immunoprecipitació .....	126
5.4.1 Immunoprecipitació de 3BP2 després de l'activació de les vies FcεRI i KIT .....	126
5.4.2 Cèl·lules COS .....	128
5.5 Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE).....	129
5.6 Western-Blot .....	131
<b>6. CITOMETRIA DE FLUX.....</b>	<b>133</b>
6.1 Anàlisi d'expressió de proteïnes de membrana .....	133
6.2 Anàlisis de l'apoptosi cel·lular .....	135
<b>7. ASSAIG D'ALLIBERACIÓ DE B-HEXOSAMINIDASA.....</b>	<b>136</b>
<b>8. ANÀLISI DE FLUX DE CALCÍ PER FLUORIMETRIA .....</b>	<b>138</b>

<b>9. QUANTIFICACIÓ DE CITOCINES I QUIMIOCINES.....</b>	<b>140</b>
9.1 Activació cel·lular .....	140
9.2 ELISA de IL-8 i GM-CSF .....	142
<b>10. ANÀLISI D'EXPRESSION DE GENS.....</b>	<b>144</b>
10.1 Aïllament del RNA missatger d'una línia cel·lular .....	144
10.2 Retrotranscripció de RNA a cDNA .....	146
10.3 Amplificació per PCR en temps real (qPCR) .....	147
<b>11. ANÀLISI DE LA VIA DE LES CASPASES PER FLUORIMETRIA....</b>	<b>148</b>
<b>12. MICROSCOPIA IMMUNOFLUORESCENT.....</b>	<b>150</b>
12.1 Activació .....	150
12.2 Marcatge intracel·lular.....	151
<b>13. TÈCNICA DEL WOUND HEALING .....</b>	<b>153</b>
<b>14. SISTEMA DEL TRIPLE HÍBRID .....</b>	<b>153</b>
14.1 Transformació d'una llibreria de cDNA en llevats.....	154
14.2 Cribatge d'una llibreria .....	157
14.2.1 Assaig Qualitatiu d'Activitat $\beta$ -galactosidasa .....	157
14.2.2 Assaig Semiquantitatiu d'Activitat $\beta$ -galactosidasa .....	158
<b>IV. RESULTATS.....</b>	<b>161</b>
<b>1. LA MOLÈCULA ADAPTADORA 3BP2 ES REQUERIDA TANT EN ELS     ESDEVENIMENTS PRIMERENCS COM TARDANS DE LA SENYALITZACIÓ DELS     MASTÒCITS MEDIADA PEL RECEPTOR FCER1.....</b>	<b>163</b>

<b>2. L'ADAPTADOR 3BP2 ESTÀ INVOLUCRAT EN L'EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR KIT A TRAVÉS DE LA REGULACIÓ DE MITF I PROMOU LA SUPERVIVÈNCIA DELS MASTÒCITS.....</b>	<b>201</b>
<b>3. LA MOLÈCULA ADAPTADORA 3BP2 REGULA L'EXPRESSIÓ I LA FUNCIÓ DE KIT ONCOGÈNIC EN TUMORS GASTROINTESTINAL.....</b>	<b>240</b>
<b>V. DISCUSSIÓ.....</b>	<b>269</b>
<b>VI. CONCLUSIONS.....</b>	<b>289</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>293</b>
<b>VIII. ANNEX.....</b>	<b>339</b>
<b>1. IDENTIFICACIÓ DE L·LIGANDS DEL 3BP2.....</b>	<b>341</b>
1.1 Fonaments de la Tècnica del Triple Híbrid .....	341
1.2 Resultats obtinguts amb la cribatge del triple híbrid amb una llibreria de moll d'os.....	344



## ABREVIATURES

AD: Activating domain (Domini d'activació).

Ala (A): Alanina

ALLN: N-Acetyl-Leuciny-Leuciny-Norleucinal. Inhibidor de la calpaina

AP1: Activation protein 1 (Proteïna d'activació 1).

AP-2: Activation protein 2 (Proteïna d'activació 2).

APC: Cèl·lula presentadora d'Antigen.

APC: Allophycocyanin Fluorochrome (fluorocrom aloficocianin).

APS: Ammonium Persulfate (Persulfat d'amoni).

Arg (R): Arginina.

Asn (N): Asparagina.

Asp (D): Àcid aspartic.

Bcl10: B-cell lymphoma-10 (cèl·lules b del limfoma 10).

BCR: Receptor per la cèl·lula B.

BD: Binding domain (Domini d'unió).

BMMCs: Bone Marrow-derived Mast Cell. (Mastòcit derivat de la medul·la òssia).

BPE: Bovine pituitary Extract (Extracte de pituïtària bovina).

BSA: Bovine serum albumin (Albúmina sèrica bovina).

BTK: Burton's Tyrosine Kinase (Cinasa de tirosines de Burton).

c-Cbl: C-terminal Src kinase (Csk)-binding protein (Proteïna d'unió de Csk a la c-terminal).

CD40L: CD40 Ligand (Lligant del CD40).

CPA3: Carboxypeptidase A3 (Carboxipeptidase A3).

DAG: Diacylglycerol (diacilglicerol).

DC: Cèl·lula dendrítica.

DOK: Downstream of tyrosine kinase (tirosina cinase de la part distal).

DTH: Delayed-Type Hypersensitivity (Hipersensibilitat de tipus retardat).

ECA: Enzim convertidor d'angiotensina.

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Assaig per immunoabsorció lligat a enzims).

ERK: Extracellular-signal-regulated kinase 1 (Cinasa regulada per senyals extracel·lulars).

ET-1 Endothelin-1 (Endoteli 1).



FACS: Fluorescence Analyzer Cell Sorter (Separador de cèl·lules analitzades per fluorescència).

F-actina: Filamentous actin (Actina Filamentosa).

Fc: Fragment constant.

Fc $\alpha$ RI: Receptor per la IgA.

Fc $\epsilon$ RI: Receptor d'alta afinitat per la IgE.

Fc $\gamma$ RI: Receptor d'alta afinitat per la IgG.

Fc $\gamma$ RIII: Receptor de baixa afinitat per la IgG.

FCS: Sèrum Boví Fetal.

fMLF: N-formylmethionyl oligopeptids (N-formilmetionil oligopeptids).

FLT3 o CD135: Fms-like tyrosine kinase 3.

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).

GIST: Gastrointestinal stromal tumors (Tumors gastrointestinals).

GEFs: Guanina exchange factors (Factors intercanviadors de nucleòtids de guanina).

Gln (Q): Glutamina.

Glu (E): Àcid Glutamic.

Gly (G): Glicina.

GDP: guanosine diphosphate (Difosfat de Guanosina).

GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (factor estimulant de colònies de granulòcits i monòcits).

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

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

GTP: guanosine triphosphate (Trifosfat de guanosina).

His (H): Histidina.

HSC: Hematopoietic stem cells (Cèl·lula mare hematopoiètica).

HMC-1: Human Mast Cell line 1 (línia de mastòcits humans).

HRB: HEPES release buffer (Tampó d'alliberació de  $\beta$ -Hexosaminidasa).

HuMCs CD34<sup>+</sup>: Human Mast Cell from CD34<sup>+</sup> (Mastòcits humans derivats de CD34<sup>+</sup>).

ICC: interstitial cells of Cajal (cèl·lules intersticials de Cajal).

I<sub>CRAC</sub>: Calcium-release-activated calcium current (Corrent de calci activada per alliberació de calci).

Ig: Immunoglobulina.

IgE: Immunoglobulina E.

IL: Interleucina.

IP: Immunoprecipitació.

IP3 (InsP<sub>3</sub>): Inositol 1,4,5-trisphosphate (Inositol 1,4,5-trifosfat).

InsP<sub>3</sub>Rs: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (receptor de 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).

JAKs: Janus kinases (cinases Janus).

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

Kd: Constant de dissociació.

kDa: Kilodalton

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

Lck: Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase.

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).

Leu (L): Leucina.

LMA: Acute myeloid leukemia (Leucèmia mieloide aguda).

LPS: Lipopolisacàrids.

LTC4: Leukotrienes C4 (Leucotriens C4).

Lys (K): Lisina.

mAb: Anticòs monoclonal.

MALT1: mucosa-associated-lymphoid-tissue 1 (mucosa associada a teixit limfoide 1).

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

MCP: Mast cell protease (protease de mastòcit).

MCS: Multiple cloning site (Lloc de clonatge múltiple).

M-CSF: macrophage colony-stimulating factor. Factor d'estimulador de colònies de macròfag.

Met (M): Metionina

miR: micro RNA.

MITF: *Microphthalmia associated transcription factor* (factor de transcripció associat a microftalmia).

MZ: Marginal zone (zona marginal).

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

NF- $\kappa$ B: Nuclear factor- $\kappa$ B (Factor nuclear  $\kappa$ B).

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

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

NLN: Neurilysin (neuroolisina).

NT: Neurotensin (neurotensina).

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

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

PARP: poly(ADP-ribose)polymerase catalytic domain.

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

PDGFR: Platelet-derive Growth Factor receptor (receptor del factor de creixement derivat de plaquetes).

PK1: 3-phosphoinositide dependent protein kinase 1 (Proteïna cinasa 1 dependent de 3-fosfoinositol).

PE: Phycoerythrin (Ficoeritrina).

PGD<sub>2</sub>: Prostaglandins D2 (Prostaglandina D2).

PH: *Pleckstrin homology domain* (domini d'homologia a plecstrina).

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

PIR-B: Paired Ig-like receptor B.

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).

PKA: Protein kinase A (Proteïna cinasa A).

PKB: Protein kinase B (Proteïna cinasa B o també anomenada Akt).

PKC: Protein kinase C (Proteïna cinasa C).

PLA: Fosfolipasa A.

PLC: Fosfolipasa C.

PLD: Fosfolipasa D.

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

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fenilmetilsulfonil Fluorós).

PS: Phosphatidylserine (fosfatidilserina).

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

PTK: Proteïna tirosina cinasa.

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

PVDF: Polyvinylidene fluoride (Polivinilidé fluoròs).

Ras: Rat sarcoma.

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

RANK: Receptor activator of NFκB. Receptor activador de NFκB.

RANKL: Receptor activator of NFκB ligand. Lligant del receptor activador de NFκB.

RTK: receptor tyrosine kinase (receptors de citocines o receptors tirosin cinases).

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

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

SAM: Sterile-alpha motif domain.

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

SCLC: Small cell lung carcinoma (carcinoma de cèl·lules petites de pulmó).

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).

SFK: Src family tyrosine Kinases (família de Src tirosines cinases).

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

SH3: SRC homology 3 (Domini 3 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 (SPHKs): Sphingosine kinase (esfingosina cinasa).

SK-S1P: Sphingosine Kinase 1-phosphate (Esfingosina cinasa 1-fosfat).

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

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

SM: Systemic mastocytosis (mastocitosi sistèmica).

SMC: Smooth muscle cell (cèl·lules del múscul llis).

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

SOS: Son of sevenless homologue.

STAT: Signal transducer and activators of transcription (transductors de senyals i activadors de la transcripció).

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

STV: Streptavidin (Estratavidina).

SYK: Spleen tyrosine kinase (tirosina cinasa de la melsa).

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

TCR: Receptor de la cèl·lula T.

TGF $\beta$ 1: Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (Factor  $\beta$ 1 de creixement transformant).

Thr (T): Treonina.

TLR4: Toll-Like receptor 4.

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

TNKS: Tankyrases (tankirases).

Tpsb2: Tryptase  $\beta$ 2 (Tryptasa  $\beta$ 2).

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

Tyr (Y): Tirosina.

Val (V): Valina.

VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor (receptor del factor de creixement endotelial vascular).

WB: Western Blot.

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

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

# I. INTRODUCCIÓ



# 1. MASTÒCITS COM A SENTINELLES DEL SISTEMA IMMUNOLÒGIC

## 1.1 Origen

En 1878 Paul Ehrlich descobreix unes cèl·lules que contenen grànuls intracel·lulars, i les denomina mastòcits, paraula procedent del grec “Mastos”, que significa mames, ja que es considerava que aquests grànuls estaven plens de nutrients (Galli, Maurer et al. 1999).

Els mastòcits són d'origen hematopoiètic i deriven de cèl·lules pluripotencials residents al moll de l'ós, principalment. Els precursors migren com cèl·lules CD13<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> cap a teixits com la pell, mucoses, i vies aèries a on acaben el procés de diferenciació influenciats pels diferents factors ambientals, factors de creixement, SCF (Stem Cell Factor) i citocines de cada teixit (Rivera, Cordero et al. 2002). Com a conseqüència d'aquesta diferenciació in situ els mastòcits es troben ben posicionats, a la pell o les barreres vasculares i mucoses, per ser uns dels primers tipus cel·lulars del sistema immunitari que interaccionen amb antigens i al·lèrgens ambientals, patògens invasors i toxines (Bischoff, 2007; Galli et al., 2008). Els mastòcits participen en la regulació de la resposta immunitària adaptativa (Denburg 1992; Foster, Schwartz et al. 2002) i com a mecanisme de defensa del sistema immunitari innat (Huang, Abrink et al. 1993).

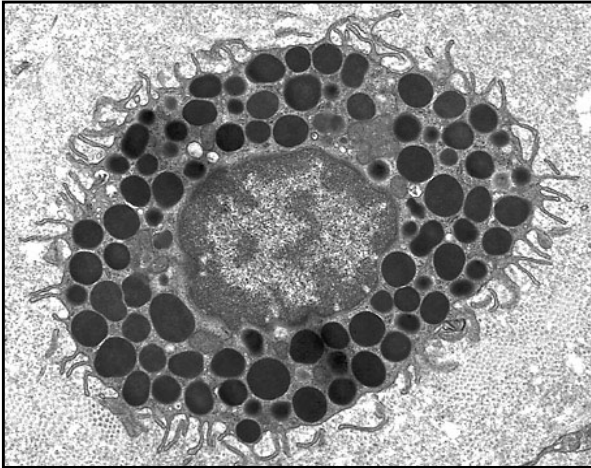
## 1.2 Biologia dels mastòcits

Els mastòcits provenen de precursors del moll de l'ós que circulen per la sang i es diferencien un cop entren als teixits. Són cèl·lules de llarga duració, amb capacitat de sobreviure durant mesos i anys, tot i que estiguin totalment diferenciades, poden proliferar com a resposta a senyals apropiats (Abraham and Malaviya 1997).

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 (Denburg 1992; Huang, Abrink et al. 1993; Agis, Fureder et al. 1996; Nakajima, Matsumoto et al. 2001; Foster, Schwartz et al. 2002).



**Figura 1. Imatge d'un mastòcit.**

Imatge obtinguda per microscopia electrònica 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/>).

El mastòcit humà té forma ovoide o irregularment allargat amb un nucli oval i conté grànuls, amb un diàmetre que oscil·la entre 5 a 15µm. En el pulmó, els mastòcits es troben en el teixit connectiu de les vies aèries bronquials i en l'espai intra-alveolar. En la pell, els mastòcits es concentren al voltant dels vasos sanguinis, el fol·licle pilós, les glàndules sebàcies i les glàndules de la suor (Prussin and Metcalfe 2006).

Normalment, el mastòcit està distribuït en tots els teixits vascularitzats, i és particularment abundant en llocs que interaccionen amb l'exterior com la pell, el tracte gastrointestinal i el sistema respiratori, a més d'estar pròxims a vasos, nervis, en el múscul llis i el sistema nerviós central; però en estats patològics també es poden localitzar en superfícies epitelials (Galli, Kalesnikoff et al. 2005).

Dins dels grànuls hi podem trobar diferents mediadors preformats com proteases, histamina, citocines i proteoglicans (Roth, Chen et al. 2008). Els principals

components dels grànuls dels mastòcits son proteases. En els ratolins, els grànuls dels mastòcits del teixit connectiu inclouen dos tipus de proteases, triptases i quimases, que estan unides a la heparina, mentre que els mastòcits de la mucosa només tenen quimases, que es troben unides al condroitin sulfat (Metcalf, Baram et al. 1997).

Els mastòcits humans també mostren heterogeneïtat respecte aquests dos tipus principals de proteases, encara que la relació teixit – tipus específic és menys estricte (Welle 1997).

L'emmagatzematge de les proteases varia no només entre els subtipus de mastòcits sinó també entre mastòcits individuals depenent de l'estímul que rebin. Per exemple, en ratolí, l'expressió d'aquestes proteases s'ha demostrat que són modulades a nivell transcripcional per la interleucina 10 (IL-10), (Ghildyal, McNeil et al. 1992) i el tractament in vitro de mastòcits humans amb interleucina 4 (IL-4) fa que augmenti la quantitat relativa de quimasa incorporada en els grànuls (Toru, Eguchi et al. 1998).

Dos tipus de mastòcits humans, definits per el contingut relatiu de triptasa i quimasa, també poden variar respecte l'expressió del component C5a del receptor del complement ( C5aR ) (Oskeritzian, Zhao et al. 2005).

Tot i que els mastòcits tenen un llinatge, morfologia granular i funcions comunes, són cèl·lules molt heterogènies i fenotípicament variables (Abe, Swieter et al. 1990; Vliagoftis and Befus 2005; Vliagoftis and Befus 2005). La variada composició dels grànuls (particularment ben caracteritzat en el cas de les proteases) així com altres mediadors pro-inflamatoris i els receptors de superfície mostra la heterogeneïtat dels mastòcits (Abraham and St John 2010).

Darrerament s'ha proposat que la complexitat dels mastòcits i la seva diferent funcionalitat és probable que sigui deguda pels diferents requisits de cada teixit a on resideixen o per trobar-se amb diferents patògens (Abraham and St John 2010).

S'ha vist que els mastòcits secreten una gran varietat de productes biològicament actius que poden potenciar funcions pro-inflamatòries, antiinflamatòries i/o immunosupressores (Mekori and Metcalfe 2000; Galli, Kalesnikoff et al. 2005; Galli, Nakae et al. 2005; Sayed, Christy 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, Kalesnikoff et al. 2005; Gilfillan and Tkaczyk 2006).

Tot això suggereix que les respostes a altres estímuls, inclòs agents patògens, poden diferir dependent dels tipus de mastòcit.

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

### **1.3 Funcions dels mastòcits**

En les primeres etapes de la infecció, els mastòcits són importants per comunicar la presència d'un patogen a molts tipus cel·lulars localitzats a prop del lloc d'infecció i lluny del nòdul limfàtic. Els mastòcits es comuniquen amb diversos tipus cel·lulars: cèl·lules epitelials, cèl·lules del múscul llis i cèl·lules endotelials.; incloent altres cèl·lules del sistema immunitari com són limfòcits, macròfags, cèl·lules dendrítiques i neutròfils, Aquestes interaccions contribueixen a la vigilància dels patògens, la immunitat antipatogen i altres mecanismes d'eliminació de microorganismes.

Per facilitar aquestes interaccions, els mastòcits es troben estratègicament situats a la interfície de l'hoste i el medi ambient, propers als vasos sanguinis i els vasos limfàtics, així com a les fibres nervioses i cèl·lules immunes residents als teixits, incloent les cèl·lules dendrítiques (Abraham and St John 2010).

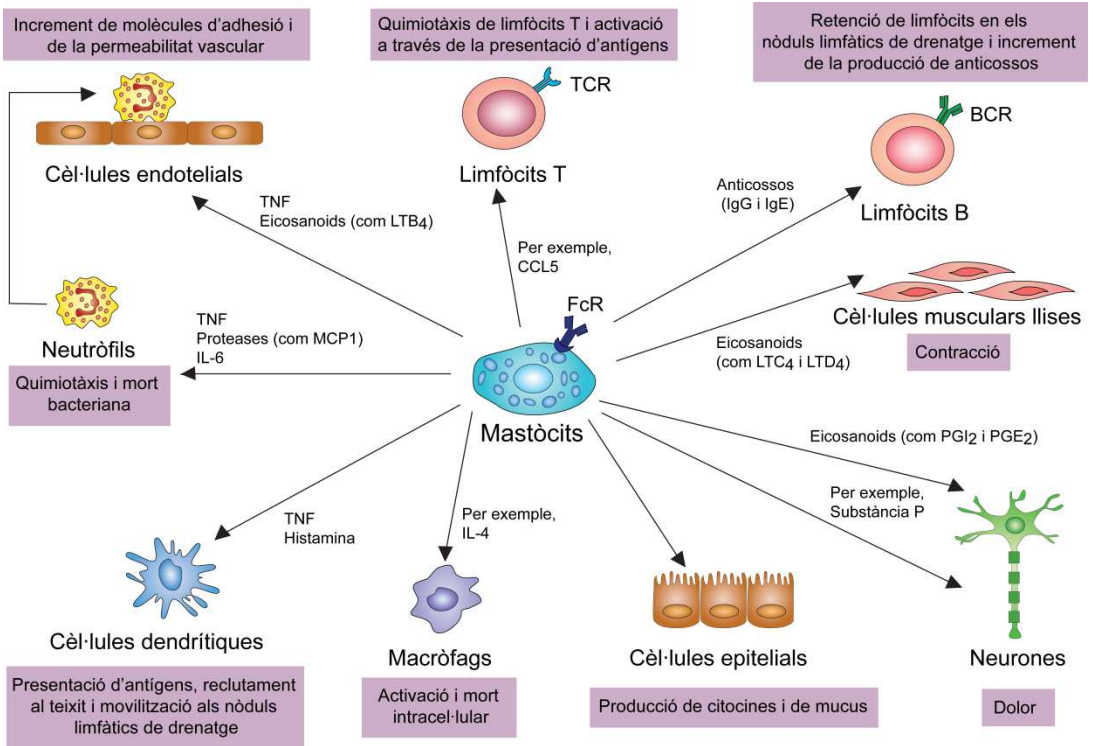
Aquesta comunicació comporta diferents funcions dels mastòcits, entre les quals es troben: la regulació de funcions epitelials (secreció i permeabilitat epitelial); funcions del múscul llis (peristalsis i broncoconstricció); funcions endotelials (flux sanguini, coagulació i permeabilització vascular); funcions immunitàries (regulació de respostes innates i adaptatives, tolerància perifèrica i reclutament i activació de neutròfils, eosinòfils i limfòcits); funcions neuronals (interaccions neuroimmunes, peristalsis i dolor) i d'altres funcions tissulars (cicatrització i fibrosis). Aquestes funcions es troben mitjançades per l'ampli ventall de mediadors alliberats per aquest tipus cel·lular (Figura 2.) (Galli, Nakae et al. 2005; Vliagoftis and Befus 2005; Lu, Lind et al. 2006; Bischoff 2007).

Gràcies als mediadors preformats que contenen en els seus grànuls, els mastòcits tenen el potencial de ser els primers a respondre (en qüestió de segons a minuts) després del reconeixement d'un patogen. Un cop el mastòcit activa la resposta, no només ho fa mitjançant la producció de mediadors apropiats per al patogen que s'ha trobat, com ara la producció selectiva de citocines (Burke, Issekutz et al. 2008), sinó també mitjançant l'alteració de la transcripció i de l'emmagatzematge de mediadors preformats (Ghildyal, McNeil et al. 1992; Toru, Eguchi et al. 1998), fet que pot modular el seu fenotip durant el curs de la infecció.

També tenen la capacitat per reposar els seus grànuls durant una infecció o un cop finalitzada. (Burwen 1982; Metcalfe, Baram et al. 1997).

Segons Abraham et al. l'alteració de la producció de mediadors preformats i, per tant, la composició dels grànuls, si es demostra que és beneficiós en la prevenció o el control de la reinfecció, es podria considerar una forma de memòria immunològica. Això permetria que les respostes dels mastòcits fossin més refinades contra patògens ja coneguts (Abraham and St John 2010).

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 (Bischoff 2007).



**Figura 2. Funcions realitzades pels mastòcits.** Basat en el model de Abraham i St. John, 2010.

### 1.3.1 Funcions efectores

Aquests inclouen les funcions fisiològiques i patològiques dels mastòcits, així com la regulació directa de cèl·lules no immunitàries, com ara les cèl·lules vasculars endotelials, cèl·lules epitelials, fibroblasts, cèl·lules nervioses i les cèl·lules musculars. Entre les quals podem trobar:

Promoure l'aclariment dels patògens per fagocitosi i / o la secreció de pèptids antimicrobians.

Degradació de pèptids endògens potencialment tòxics i components dels verins.

Augment de la permeabilitat vascular (per l'alliberament d'histamina).

Estimular la contracció de cèl·lules del múscul llis bronquial (per l'alliberament de leucotriens C4 ( LTC4 )).

Promoure la síntesi de col·lagen pels fibroblasts (per l'alliberament de triptasa).

### 1.3.2 Funcions immunomoduladores

Els mastòcits poden influenciar molts aspectes de la biologia de les cèl·lules del sistema immunitari (cèl·lules dendrítiques, cèl·lules T, cèl·lules B, monòcits, macròfags i granulòcits) i sobre altres cèl·lules estructurals (cèl·lules endotelials vasculars, cèl·lules epitelials i cèl·lules del múscul llis). En aquest sentit, els efectes dels mastòcits en el reclutament, supervivència, desenvolupament, fenotip o funcions de les cèl·lules del sistema immunitari es refereix com funcions immunomoduladores. Poden tenir un paper immunomodulador positiu i un paper immunomodulador negatiu (Galli, Grimaldeston et al. 2008).

S'han descrit tres possibles hipòtesis que explicarien la capacitat del mastòcit d'exercir funcions immunomoduladores tan positives com negatives:

I) Les funcions immunomoduladores positives o negatives dependrien del llinatge del mastòcit;

II) Els mastòcits podrien tant potenciar com més tard limitar certes respostes immunes innates i adaptatives;

III) Les funcions immunomoduladores positives o negatives dependrien en gran part de les característiques biològiques de l'individu (Galli, Grimaldeston et al. 2008).

El concepte que el mastòcit pugui primer promoure la sensibilització i/o provocar fases de resposta immune, i després limiti o resolgui l'efecte induït, és consistent amb la segona hipòtesi (II) on el mastòcit és important en 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 ell mateix el qui l'ha pertorbat (Maurer, Wedemeyer et al. 2004; Metz, Piliponsky et al. 2006; Schneider, Schlenner et al. 2007; Piliponsky, Chen et al. 2008).

#### 1.3.2.1 Funcions immunomoduladores positives

Els mastòcits presenten funcions immunoreguladores positives que poden promoure la defensa de l'hoste o promoure una malaltia, a partir de 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, Grimbaldston 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 vasculars.

Promoure respostes de cèl·lules T helper 2 a través dels efectes que tenen certes prostaglandines secretades per ells en la maduració de les cèl·lules dendrítiques.

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-reactivitat i la inflamació en models d'inflamació al·lèrgica de les vies aèries (Kim, Ko et al. 2007; Nakae, Ho et al. 2007; Reuter, Heinz et al. 2008).

Promoure la supervivència de l'hoste en models d'infecció bacteriana i la resistència de l'hoste en certes infeccions parasitàries (Matsuda, Watanabe et al. 1990; Echtenacher, Mannel et al. 1996; Malaviya, Ikeda et al. 1996) (Maurer, Echtenacher et al. 1998; Maurer, Lopez Kostka et al. 2006).

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

#### 1.3.2.2 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, Grimaldeston et al. 2008):

Suprimir la sensibilització en la hipersensibilitat per contacte, a través de la producció d'histamina induïda per la llum ultraviolada (Hart, Grimaldeston 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 cèl·lules dendrítiques 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 les malalties al·lèrgiques

#### 2.1.1 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 lligant d'aquest receptor, el SCF (Brightling, Bradding et al. 2002; Al-Muhsen, Shablovsky et al. 2004; Amin, Janson et al. 2005; Brightling and Bradding 2005; Begueret, Berger et al. 2007).

La localització dels mastòcits en el múscul llis de les vies respiratòries facilita la hiperresposta 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 (Brightling, Ammit et al. 2005; Bradding, Walls et al. 2006).

Els mastòcits tenen diversos efectes sobre les cèl·lules del múscul llis de les vies aèries. Aquests són, induir la contracció i l'activació a través de l'alliberació de mediadors (histamina, triptasa, IL-4, IL-13, PGD<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub>) i citocines. Els mastòcits també tenen capacitat per estimular les glàndules secretores de moc (Bradding 2003).

### 2.1.2 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, Kanai 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 (Freeland, Pipkorn et al. 1989; Proud, Bailey et al. 1992). 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 TH2 (TNF $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6 i IL-13) 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 (Wu, Myers et al. 2006).

### 2.1.3 Dermatitis atòpica

Els mastòcits es troben elevats en una gran varietat de desordres crònics inflamatoris de la pell, incloent la dermatitis atòpica (Damsgaard, Olesen 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, Bester et al. 2005).

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 i cimasa són força elevats. Aquesta última 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 (Steinhoff, Neisius et al. 2003; Badertscher, Bronnimann 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, Harvima et al. 2006).

#### **2.1.4 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, Yunginger et al. 1989), tot i que també s'han descrit casos d'anafilaxi amb nivells de triptasa normals (Schwartz 2004). L'anafilaxi clàssica dependent d'IgE es dona posteriorment a l'exposició a antígens específics, tot i que també podrien existir certs agents o estímuls que poden activar els mastòcits d'una manera independent de la IgE (Brown, Wilson 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, Wilson 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, Stellato et al. 1996; Montrucchio, Alloatti et al. 2000; Marone, Bova et al. 2004). Per altra banda, el nombre de mastòcits també és important en l'anafilaxi. S'ha descrit que els individus amb anafilaxis 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, Wilson et al. 2008).

### **2.1.5 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 (Ono and Abelson 2005; Brown, Wilson et al. 2008).

### **2.1.6 Mastocitosi**

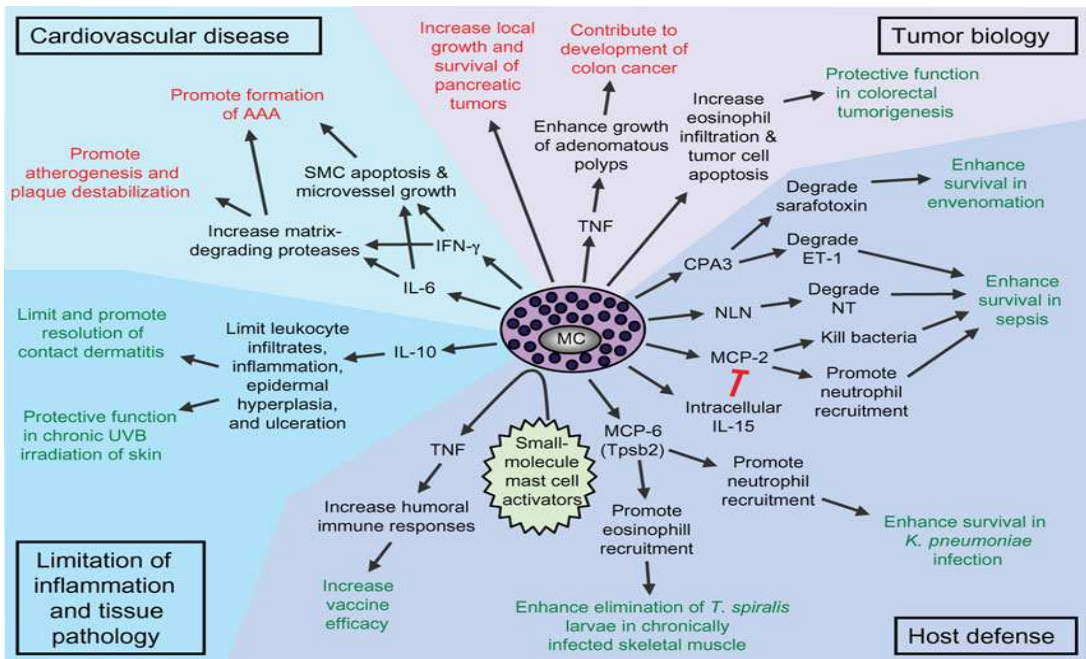
Veure apartat 7.5

## **2.2 Paper dels mastòcits en les malalties no al·lèrgiques**

El mastòcit és una cèl·lula efectora multifuncional, capaç de produir una gran varietat de mediadors tan preformats com sintetitzats de nou. Aquests mediadors estan involucrats en funcions immunològiques i també en processos no immunològics. Degut aquest ampli potencial de reacció, el mastòcit ha guanyat interès pel possible paper en altres patologies en humans (Crivellato, Beltrami et al. 2004).

El mastòcit és una cèl·lula clau en la patogènesis de varies malalties autoimmunes com la esclerosi múltiple o l'artritis reumatoide i altres malalties cròniques com la fibrosi pulmonar (Metz, Grimaldeston et al. 2007).

S'ha suggerit la participació del mastòcit en processos com l'espasme coronari, cardiomiopatia, arteriosclerosi i en isquèmia cardíaca. S'ha demostrat que la quimasa escindeix l'angiotensina I i l'angiotensina II, més eficientment que l'enzim convertidor d'angiotensina (ECA) (Church and Levi-Schaffer 1997). En l'esquema de la figura 3 es presenten els principals processos patològics on el mastòcit està involucrat al igual que les citocines que regulen aquests efectes.



**Figura 3. Participació del mastòcits en processos patològics i immunitaris.**

Identificats com funcions protectores (verd) o perjudicials (vermell) del mastòcit (MC) i productes del mastòcit a la resposta biològica. Aneurisma aòrtic abdominal (AAA), neuroolisina (NLN), neurotensina (NT), cèl·lules del múscul llis (SMC). Model adaptat de Kalesnikoff i Galli, 2008.

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

Els receptors mastocitaris més importants i estudiats són els que reconeixen el fragment Fc de les immunoglobulines (Marshall and Jawdat 2004; Mekori 2004; Galli, Kalesnikoff et al. 2005; Rivera, Fierro et al. 2008). Concretament el principal receptor responsable de les manifestacions clíniques d'aquesta resposta és el FcεRI, el receptor d'alta afinitat per la immunoglobulina E (IgE) (Nadler, Matthews et al. 2000; Blank and Rivera 2004; Rivera and Gilfillan 2006). La senyal del FcεRI pot ser regulada per altres receptors expressats en mastòcits (Kraft and Kinet 2007; Kuehn and Gilfillan 2007).

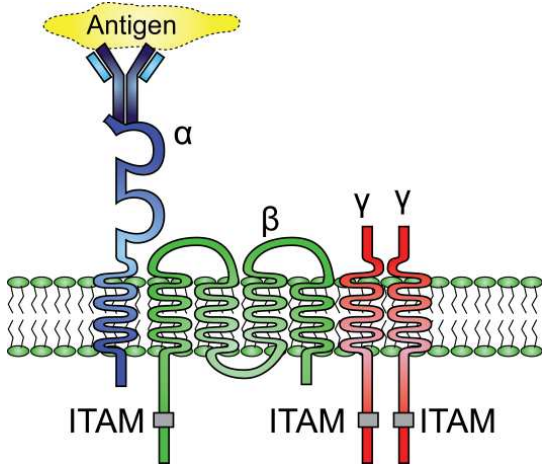
L'expressió, en la superfície cel·lular, del receptor FcεRI és crucial per les reaccions al·lèrgiques. Es regula positivament pel seu lligant IgE i la cadena β del FcεRI. S'ha vist que si la cadena beta té un assemblatge alternatiu pot contrarestar aquesta expressió (Donnadieu, Jouvin et al. 2003).

L'activació dels mastòcits requereix de la coordinació d'una sèrie d'esdeveniments que comencen amb l'agregació dependent 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 l'assemblatge d'una sofisticada xarxa de molècules senyalitzadores que controlen la resposta de la cèl·lula en front de certs estímuls o exposicions a al·lèrgens determinats (Gilfillan and Tkaczyk 2006). La xarxa de senyalització pot diferir segons el tipus i la força de l'estímul (Gonzalez-Espinosa, Odom et al. 2003) i la seva regulació es pot donar a molts nivells, participant proteïnes i lípids que poden tenir rols positius, negatius o duals en la coordinació i regulació de les respostes (Gilfillan and Tkaczyk 2006; Rivera and Gilfillan 2006; Kraft and Kinet 2007).

#### 3.1 Estructura

El FcεRI és un receptor de superfície cel·lular multimèric que s'uneix al fragment Fc de la IgE amb alta afinitat. Pot existir com un complex tetramèric (present en

mastòcits i basofils) i trimèric (present en eosinòfils, cèl·lules de Langerhans, monòcits, cèl·lules presentadores d'antigen (APCs), cèl·lules dendrítiques (DCs), etc. en la qual li falta la cadena beta) (Rivera, Fierro et al. 2008). En la seva forma tetramèrica completa, FcεRI conté una cadena alfa, una cadena beta i un homodímer de cadenes gamma, unides per ponts disulfur (Kraft and Kinet 2007).



**Figura 4. Estructura del receptor d'alta afinitat per la IgE (FcεRI).** Es mostren les subunitats alfa, beta i les dues gammes. Tant la subunitat beta com les dues gammes contenen Motius d'activació dels immunoreceptors basats en tirosina (ITAMs). Basat en el model de Kraft i Kinet, 2007.

La cadena alfa pertany a la superfamília de les immunoglobulines i comprèn dos dominis extracel·lulars d'immunoglobulina que s'uneixen a una sola molècula d'IgE, un domini transmembrana que conté un residu conservat d'àcid aspàrtic i una petita cua citoplasmàtica (Kinet 1999). La cadena alfa humana està N-glicosilada per set llocs. La glicosilació és necessària per la interacció adequada entre la cadena alfa i el mecanisme de plegament que té lloc en el reticle endoplasmàtic (ER) (Letourneur, Sechi et al. 1995). La cua intracel·lular de la cadena alfa no té cap funció aparent de senyalització (Kinet 1999). Mitjançant tècniques de cristal·lització es va poder observar que la cadena alfa s'uneix a la IgE pel fragment Fc. La unió és a través de dos llocs asimètrics, fet que confereix una unió amb baixa taxa de dissociació. Això explica la alta afinitat que hi ha entre IgE i el FcεRI ( $K_d=10^{-10}M$ ) (Kraft and Kinet 2007). Aquesta troballa és important per al desenvolupament d'estratègies per interferir amb la interacció IgE- FcεRI.

Les cadenes beta i gamma no participen amb la unió al lligant extracel·lular, (Kinet 1999) sinó que la seva funció és iniciar la senyalització. Ambdues cadenes

presenten motius d'activació d'immunoreceptors 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)<sup>7-11</sup>-Tyr-X-X-(Leu/Ile), on la X representa un aminoàcid qualsevol (Rivera, Fierro 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  $\beta$  i  $\gamma$  amb molècules de senyalització intracel·lular a través dels seus dominis SH2 (SRC homology 2). La cadena  $\beta$  humana funciona com a amplificadora dels senyals del Fc $\epsilon$ RI i de l'expressió a la superfície cel·lular, mentre que les cadenes  $\gamma$  són les unitats de senyalització principals i indispensables del Fc $\epsilon$ RI (Kinet 1999). En absència de la cadena  $\beta$ , l'activació del mastòcit dependent del receptor es redueix només de manera parcial, mentre que en absència de la cadena  $\gamma$ , aquesta activació s'aboleix completament (Takai, Li et al. 1994; Repetto, Bandara et al. 1996).

Les cadenes beta i gamma, són compartides per altres receptors Fc. Per exemple, receptors per la IgG d'alta i baixa afinitat (Fc $\gamma$ RI i Fc $\gamma$ RIII, respectivament), i el receptor per la IgA ( Fc $\alpha$ RI ) associat amb la cadena gamma en funció del context cel·lular (Kraft and Kinet 2007).

### 3.2 Regulació de l'expressió

Hi ha una ampla expressió del receptor Fc $\epsilon$ RI en humans, com ja hem esmentat anteriorment. En mastòcits i basòfils es troba expressada la forma tetramèrica i en eosinòfils, cèl·lules de Langerhans, monòcits, cèl·lules presentadores d'antigen (APCs) i cèl·lules dendrítiques (DCs) la forma trimèrica. També s'ha reportat que plaquetes i neutròfils expressen el receptor Fc $\epsilon$ RI, pero no es té clar quines subunitats el componen (Hasegawa, Pawankar et al. 1999; Gounni, Lamkhioued et al. 2001).

En mastòcits humans i cèl·lules presentadores d'antigen, la interleucina 4 (IL-4) indueix la producció de cadenes alfa immadures amb "nucli glicosilat" en el reticle



endoplasmàtic. En absència de cadenes beta i gamma, les cadenes alfa queden retingudes en el reticle. Mitjançant associacions no covalents les cadenes alfa, beta i gamma s'uneixen dins el reticle, inhibint la retenció de la cadena alfa i permeten l'exportació de tot el complexa del reticle endoplasmàtic cap al Golgi, a on el receptor Fc $\epsilon$ RI madura completament a través de la glicosilació terminal, i d'allà passa finalment cap a la superfície cel·lular (Letourneur, Sechi et al. 1995; Fiebiger, Tortorella et al. 2005).

L'expressió a la superfície cel·lular del Fc $\epsilon$ RI està regulada per la disponibilitat dels components específics del receptor (per splicing alternatiu es pot generar una cadena  $\beta$  a la qual li manquen una sèrie d'aminoàcids (cadena  $\beta$ T), que competeix per unir-se a la cadena  $\alpha$ , fent disminuir l'expressió del receptor) i per la quantitat del seu lligant (IgE). S'ha descrit que la forma monomèrica de la IgE fa augmentar l'expressió del Fc $\epsilon$ 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 $\epsilon$ RI, mediat per la IgE, condueix a un augment en les funcions efectores dels mastòcits (Kraft and Kinet 2007).

### 3.3 Funcions biològiques

El Fc $\epsilon$ RI expressat en la membrana dels mastòcits i els basòfils és clau en les reaccions al·lèrgiques immediates mitjançades per la IgE. La seva lligació comporta l'alliberament de mediadors preformats com la histamina, heparina i proteases entre d'altres a més de la generació de leucotriens i prostaglandines. Aquests esdeveniments produeixen: vasodilatació, augment de la permeabilitat vascular, regulació positiva de molècules d'adhesió vascular i broncoconstricció. També regula les reaccions al·lèrgiques tardanes, on hi ha una síntesi de novo de citocines i quimiocines. Això provoca vasodilatació, augment de la permeabilitat vascular, augment de les molècules d'adhesió, broncoconstricció, reclutament de leucòcits i activació de les cèl·lules T.

Recentment, també s'ha establert que el FcεRI expressat en mastòcits i basòfils, juga un paper en la hipersensibilitat cutània (CHS), que és una hipersensibilitat de tipus retardat (DTH: Delayed-Type Hypersensitivity) (Kraft and Kinet 2007).

El receptor FcεRI 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, Kitaura et al. 2001; Kalesnikoff, Huber et al. 2001; Kraft and Kinet 2007).

Per altra banda certs estudis mostren que diferents clons d'IgE poden produir l'agregació del FcεRI sense lligació amb l'antigen. La incubació amb aquests clons d'IgE indueixen senyalitzacions intracel·lulars donant lloc a síntesi i alliberació d'histamina, adhesió, migració i síntesis de DNA, fets que generalment es solen donar després d'una lligació "clàssica" del receptor unit a IgE amb el seu antigen (Kraft and Kinet 2007).

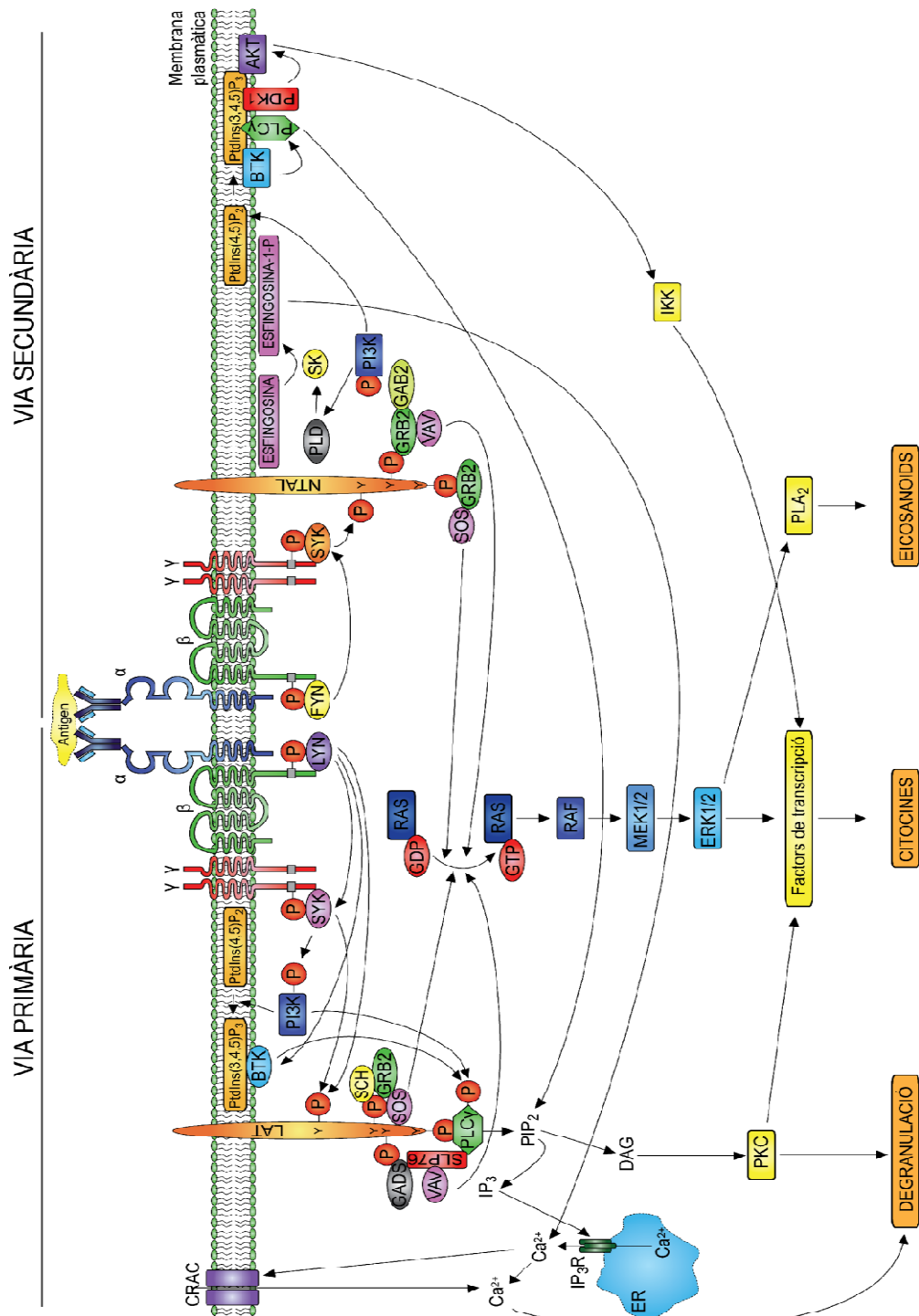
S'han descrit altres funcions biològiques del FcεRI en la seva forma trimèrica, expressada per APCs, monòcits, macròfags, eosinòfils, DCs, etc. (Kraft and Kinet 2007; Rivera, Fierro et al. 2008). El receptor que es troba en la superfície cel·lular de les APCs, té un rol en la patogènesi i la fase efectora 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, Yamamoto et al. 1985).

#### 4. TRANSDUCCIÓ DE SENYALS EN MASTÒCITS A TRAVÉS DEL FcεRI

L'activació del mastòcit dependent d'antigen, ve regulada per la lligació del FcεRI unit a IgE amb l'antigen, per la qual s'inicia una complexa cascada de senyalització intracel·lular, que condueix finalment a les funcions efectores dels mastòcits.

Els esdeveniments bàsics més proximals es produeixen de la següent manera, la manca d'activitat cinasa pròpia del FcεRI fa que necessiti de l'acció de cinases de la família de les Src (Eiseman and Bolen 1992) que es troben en microdominis especialitzats de la membrana plasmàtica coneguts com lípid rafts o basses lipídiques (Field, Holowka et al. 1999).. Després de la lligació del receptor aquest es translocarà a lípids rafst ons'associarà a src cinases que fosforilaran els ITAMs, localitzats en les cadenes  $\beta$  i  $\gamma$ . del receptor (Paolini, Jouvin et al. 1991; Pribluda, Pribluda et al. 1994). Diverses cinases Src poden exercir aquest paper depenent del tipus de cèl·lula o estímul (Gilfillan and Rivera 2009).



.Figura 5. Esquema de la transducció de senyals en mastòcits a través del receptor FcεRI. Basat en el model de Kraft i Kinet, 2007

Per l'activació dels mastòcits a través del FcεRI existeixen dues vies de senyalització mediatees per les dues principals cinases de la família Src, Fyn i Lyn (Parravicini, Gadina et al. 2002). La via primària, involucra les cinases Lyn i Syk i la molècula adaptadora LAT. La via complementària, també requereix l'activació de la cinasa Syk, però involucra la cinasa Fyn enlloc de la cinasa Lyn, i l'adaptadora NTAL, enlloc de LAT (Kraft and Kinet 2007).

Ambdues vies convergeixen en l'activació de Protein cinasa C (PKC), via de les MAPK cinases i via de calci que juntament regularan processos de desgranulació i síntesis de citocines i eicosanoids.

La via primària, Lyn s'activa i fosforila els ITAMs present en les cadenes β i γ del receptor (FcεRI), això permet l'associació de Syk amb les cadenes γ i l'activació de Syk. Syk activat fosforila LAT, que recluta GADS (adaptador relacionat a Grb2 per sota de la proteïna Shc), SLP76 (proteïna leucocitària de 76 Kda que conté un domini SH2), Vav i PLCγ (fosfolipasa C gamma). L'activació de PLCγ produeix DAG (diacilglicerol), que activa PKC (proteïnes cinasa C), i InsP<sub>3</sub> (inositol -1 ,4,5 -trifosfat) , que indueix l'alliberament de Ca<sup>2+</sup> des del RE (reticle endoplasmàtic) a través dels receptors InsP<sub>3</sub> (InsP<sub>3</sub>Rs). Un cop el calci del reticle s'ha exhaurit, STIM1 (molècula 1 d'interacció al sensor estromal) dirigeix l'obertura del canal de calci SOC (canals operats per reserves), que produeix una afluença de Ca<sup>2+</sup> extracel·lular a través del flux anomenat I<sub>CRAC</sub> (corrent de calci activada per alliberació de calci) (Parekh and Penner 1997; Vig, Peinelt et al. 2006). L'activació de la PKC i la mobilització de Ca<sup>2+</sup> en última instància, condueixen a la desgranulació (Kraft and Kinet 2007).

La via complementària, Fyn i l'activació de Syk, indueixen un complex de senyalització amb Vav, Grb2, Gab2 (proteïna d'unió Grb2 associada a 2) i PI3K , possiblement organitzat per NTAL (connector d'activació de cèl·lules no T). A través de PI3K (fosfoinositol -3 cinasa) que recluta la BTK (cinasa de tirosines de Bruton) a la membrana i fosforila PLCγ també s'activa la via de PLCγ conduint a l'alliberament de calci descrit anteriorment. L'activació de PI3K també condueix al

reclutament a la membrana de la PDK1 (proteïna cinasa 1 dependent de 3-fosfoinositol), que llavors activa la PKC $\delta$ , comportant la desgranulació. Per altra banda, PDK1, activa PLD (fosfolipasa D), seguidament s'activen les SPHKs (cinases esfingosines) que poden ser activats per PLD, Lyn o Fyn. L'activació de les SPHK condueix a l'afluència de Ca<sup>2+</sup> extracel·lular, probablement per alleujar l'efecte supressor de la esfingosina en el I<sub>CRAC</sub> (Mathes, Fleig et al. 1998; Kraft and Kinet 2007).

L'associació de Grb2 i SOS (son-of-sevenless homologue), presents tan a la via primària com complementària, permeten activar la via de RAS, seguidament s'activa la via de les MAPKs (cinases de proteïnes activades per mitogen) i això condueix a la producció d'eicosanoids via PLA2 (fosfolipasa A 2).

La producció de citocines està regulada per diversos factors de transcripció, l'activació dels quals és dependent de Ca<sup>2+</sup>. En la producció de citocines intervenen diverses vies: via de les MAPK, via de NF- $\kappa$ B activada per AKT i regulada pel complex Bcl10 (cèl·lules B del limfoma 10)/MALT1 (mucosa associada a teixit limfoide 1) i també via NFAT (Kraft and Kinet 2007; Roth, Chen et al. 2008).

Com hem vist, en l'activació de mastòcits intervenen diferents proteïnes adaptadores que col·laboren amb les molècules implicades activament en la transducció de senyals, per tal de coordinar la senyalització.

#### 4.1 Proteïnes adaptadores

Un cop l'antigen s'uneix al receptor s'inicia el senyal cel·lular, això fa que les cèl·lules necessitin una estructura molecular per respondre als estímuls específics. Això implica una organització i compartimentació d'aquests senyals moleculars, activar selectivament i organitzar els diferents esdeveniments per conduir a la resposta desitjada.

Les proteïnes adaptadores aporten aquesta estructura molecular, la seva funció és organitzar, coordinar i amplificar el senyal dirigit cap el nucli de les cèl·lules (Rivera 2002).

Una característica comuna de les proteïnes adaptadores és la seva estructura modular. En general, contenen un o varis tipus de dominis que permeten interaccions amb altres proteïnes i/o lípids i així poder formar macrocomplexes. No tenen activitat enzimàtica intrínseca però poden unir enzims i poden regular positiva i negativament l'activació cel·lular.

Les proteïnes adaptadores poden trobar-se ancorades a la membrana plasmàtica, residir al citoplasma sota condicions de repòs i ser reclutades a la membrana un cop activada la cèl·lula, o en compartiments intracel·lular com el reticle endoplasmàtic.

No obstant, hi han característiques específiques amb les quals poden distingir dos grups de proteïnes adaptadores, de membrana o de citosol. (Alvarez-Errico, Lessmann et al. 2009).

#### **4.1.1. Classes de proteïnes adaptadores**

##### 4.1.1.1. Proteïnes adaptadores de membrana o TRAPs

Aquest tipus de proteïnes actuen com andamis ancorats a la membrana organitzant grans macrocomplexes, basant-se principalment en la seva capacitat de formar nous llocs d'unió a través de la fosforilació de múltiples residus de tirosina.

Contenen bàsicament motius basats en tirosina encara que també motius rics en prolina, i llocs de fosforilació en serines i treonines.

#### 4.1.1.2. Proteïnes adaptadores citosòliques o CAPs

Aquesta classe de proteïnes, al contrari que les TRAPs, tenen una gran varietat de motius com poden ser dominis SH2, SH3, PTB (phosphotyrosine-binding), PH (pleckstrin homology), tirosines fosforilables... que les permeten actuar tan en condicions dependent com independents de fosforilació reclutant molècules necessàries. Els dominis SH2 i PTB interaccionen amb tirosines fosforilades (van der Geer and Pawson 1995). Els dominis SH3 s'uneixen a seqüències riques en prolines (Pawson 1994). Els dominis PH (pleckstrin homology) són responsables d'interacció proteïna-lípids afavorint l'apropament de molècules a la membrana plasmàtica (Hemmings 1997; Cantrell 2001).

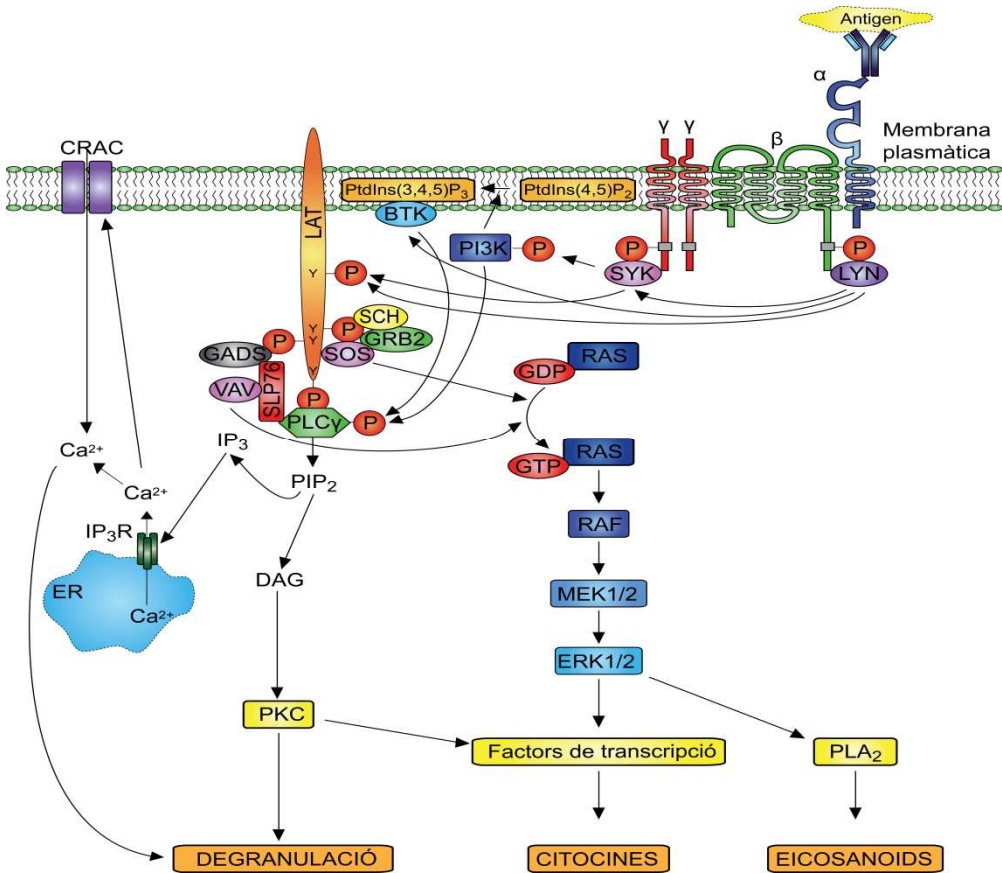
Tots aquests dominis s'utilitzen coordinadament per regular el muntatge i la funció dels senyals generats a partir dels complexos macromoleculars (Rivera 2002; Rivera, Cordero et al. 2002).

#### **4.1.2. Funcions**

Les proteïnes adaptadores tenen múltiples funcions, són responsables de determinar la localització de la senyalització de les proteïnes a la cèl·lula. Coordinar les necessitats que requereixen els diferents senyals en l'activació cel·lular. I aportar els enzims i substrats necessaris pel procés d'activació/inhibició.

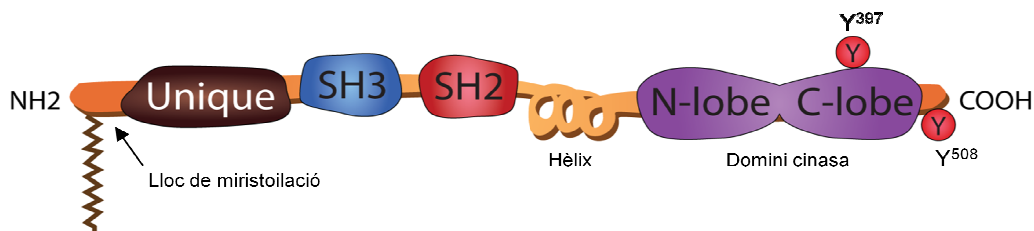


## 4.2 Via primària a través de Lyn



**Figura 6. Esquema de la transducció de senyals de la via primària.** Basat en el model de Kraft i Kinet, 2007.

Com ja hem dit, en els mastòcits, Lyn es una de les cinases de la família Src implicada en aquestes etapes inicials, resideix principalment en *lipids rafts* (Kovarova, Tolar et al. 2001). Aquests microdominis estan enriquits amb colesterol, esfingolípid, i altres fosfolípids saturats, així com amb una varietat de proteïnes senyalitzadores (Gilfillan and Tkaczyk 2006; Rivera, Fierro 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 (Young, Holowka et al. 2003; Gilfillan and Tkaczyk 2006).



**Figura 7. Esquema dels diferents dominis que constitueixen la cinasa Lyn.** Basat en l'esquema de Gilfillan i Rivera, 2009.

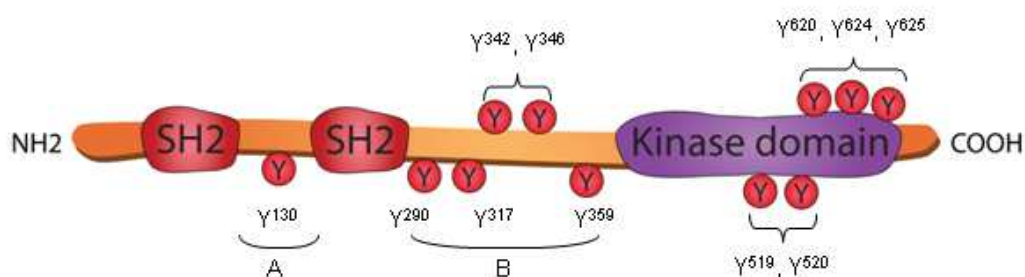
S'ha trobat que petites quantitats de Lyn associades constitutivament a cadenes beta i gamma del Fc $\epsilon$ RI (Yamashita, Mao et al. 1994; Vonakis, Haleem-Smith et al. 2001) són capaces de transfosforilar a cadenes beta i gamma de receptors propers. (Pribluda, Pribluda et al. 1994; Alvarez-Errico, Lessmann et al. 2009).

Alguns estudis sostenen que les interaccions proteïna-proteïna, són necessàries per la fosforilació de Fc $\epsilon$ RI, basats en observacions on una petita fracció de Lyn es pot trobar interaccionant dèbilment amb la subunitat beta del Fc $\epsilon$ RI abans de l'acoblament del receptor (Vonakis, Haleem-Smith et al. 2001) això podria ser crucial per a la fosforilació inicial. Se sap que la interacció de Lyn amb Fc $\epsilon$ RI augmenta després de l'estimulació del receptor. Aquest increment d'interacció, es dona a través del domini SH2 de Lyn que uneix la tirosina fosforilada Y219 present en el ITAM de la cadena beta (Furumoto, Nunomura et al. 2004; On, Billingsley et al. 2004). La mutació de Y219 causa una marcada reducció en la fosforilació del Fc $\epsilon$ RI, fet que suggereix que aquesta interacció és clau pel manteniment de la fosforilació del receptor (Gilfillan and Rivera 2009).

Després de la lligació del receptor, la cinasa Lyn, s'activa i fosforila els ITAMs presents en les cadenes  $\beta$  i  $\gamma$  del Fc $\epsilon$ RI, proporcionant llocs d'unió pel domini SH2 de Lyn i també pels dominis SH2 de Syk.

### 4.2.1 SYK

Syk pertany a la família de les SYK tirosina cinases, i comparteix homologia amb la proteïna associada a la cadena  $\zeta$  de 70KDa (ZAP70) expressada en cèl·lules T. (Chen, Repetto et al. 1996). Syk és un component clau en les vies de senyalització en cèl·lules B i T (Gilfillan and Rivera 2009) i per la funció efectora dels mastòcits i la resposta al·lèrgica. La seva inhibició o pèrdua d'expressió en mastòcits pot resultar una marcada i generalitzada inhibició de la resposta d'aquesta cèl·lula (Alvarez-Errico, Lessmann et al. 2009).



**Figura 8. Esquema dels diferents dominis que formen Syk.** Basat en el model de Gilfillan i Rivera, 2009.

L'estructura de Syk està ben definida, més enllà de les seves funcions catalítiques, podem trobar, dos dominis SH2 en tàndem a l'extrem N-terminal i múltiples residus de tirosina fosforilables, la majoria de les quals les trobem en les regions entre dominis anomenades A i B.

Un cop activat, Syk és essencial en l'amplificació de la senyalització dels mastòcits i en conduir les respostes efectores (Costello, Turner et al. 1996; Zhang, Kimura et al. 1998). La deficiència en Syk mostra una falta d'alliberació de calci, desgranulació, o producció de citocines, després de l'activació del FcεRI. (Costello, Turner et al. 1996; Zhang, Berenstein et al. 1996) Per tant, Syk és crític per l'alliberació de calci i clau en la seva capacitat d'interactuar amb múltiples

proteïnes de senyalització i fosforilar els principals substrats requerit per muntar els macrocomplexes de senyalització (Gilfillan and Rivera 2009).

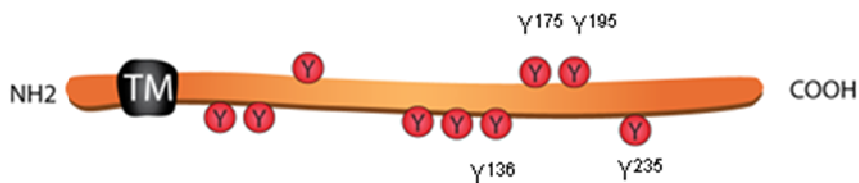
Syk consta de 10 residus de tirosina que poden ser modificats per fosforilació quan s'activa la cinasa. Aquestes tirosines fosforilades intervenen en diferents funcions. Per exemple les tirosines Y317, Y342 semblen ser importants per a la funció de Syk . La mutació de Y317 s'ha demostrat que produeix un guany de funció en mastòcits (Sada, Zhang et al. 2000). Aquesta tirosina en ZAP - 70 s'ha demostrat que pot unir el regulador negatiu c- Cbl (Meng, Sawasdikosol et al. 1999), que s'ha descrit que regula la degradació de Syk actiu. (Rao, Ghosh et al. 2001). La fosforilació de Y342 de Syk es creu que és important per a la interacció i la fosforilació de Vav1, (Deckert, Tartare-Deckert et al. 1996) no obstant, en els mastòcits, la mutació de Y342 no altera la fosforilació de Vav1 però disminueix la fosforilació de PLC $\gamma$  i la capacitat per interactuar amb els ITAM fosforilats (Zhang, Berenstein et al. 2002).

Syk es manté en un estat inactiu a través d' interaccions intramolecular dels seus dominis SH2 amb residus de tirosines fosforilats ( Y130 i Y317 han estat implicats en aquesta unió) en els seus interdominis A i B (Sada, Zhang et al. 2001; Arias-Palomo, Recuero-Checa et al. 2007). La pèrdua d'aquesta unió intramolecular i el pas a l'estat actiu no es coneix, però la causa podria ser simplement a través d'un canvi en l'equilibri de l'abundància de ITAMs fosforilats, fet que podria donar un lloc d'unió més afí que la seva conformació inactiva. Aquest fet suggereix que una regulació negativa potencial podria ser a través de la desfosforilació dels ITAM (Yamashita, Suzuki et al. 2008).

La unió de Syk a la cadena  $\gamma$  del Fc $\epsilon$ RI condueix a la seva propia activació i fosforilació d'una manera dependent de Lyn (El-Hillal, Kurosaki et al. 1997; Kraft and Kinet 2007). La forma de lligament de Syk permet la transfosforilació i autofosforilació dels dominis catalítics, al igual que la fosforilació a través de Lyn, d'aquesta manera hi ha un increment de l'activitat catalítica.

Un cop actiu Syk fosforila proteïnes adaptadores com LAT (connector per l'activació de les cèl·lules T).

#### 4.2.2 LAT



**Figura 9. Esquema de l'estructura de la proteïna adaptadora LAT.** Basat en el model de Alvarez-Errico et al., 2009.

La molècula LAT, és una proteïna adaptadora del tipus transmembrana, es va descriure per primera vegada en cèl·lules T. S'expressa en, limfòcits T, cèl·lules NK, mastòcits, plaquetes (Facchetti, Chan et al. 1999) i cèl·lules pre-B (Oya, Wang et al. 2003). Té aproximadament entre 36-38 kDa, consta d'un curt domini extracel·lular de tres residus a la part N-terminal, un domini transmembrana, un motiu CXXC susceptible a la palmitilació i una llarga cua citoplasmàtica amb deu residus de tirosines, que després de ser fosforilades per les cinases de la família Syk/Zap-70 creen molts motius d'unió directes per dominis SH2 d'altres proteïnes tant adaptadores (família Grb2, SHC) com amb activitat catalítica (PLC $\gamma$ , PI3K, Vav)(Gilfillan and Tkaczyk 2006; Alvarez-Errico, Lessmann et al. 2009).

LAT es localitza en els *lipids rafts*, però aquesta localització no és essencial per la seva funció (Zhu, Shen et al. 2005).

Els últims quatre residus de tirosina són crucials per a la seva fosforilació i la funció dels mastòcits. La mutació d'aquests residus de tirosina suprimeixen en gran mesura la fosforilació de LAT i disminueix notablement la seva funció (Saitoh, Odom et al. 2003).

Les tirosines Y175, Y195 i Y235 tenen el motiu consensos d'unió YXNX pels adaptadors de Grb2 i Gads. A més, la unió a Grb2 és necessari per l'òptima fosforilació de PLC $\gamma$ 1 i PLC $\gamma$ 2. Això és probablement a causa de múltiples interaccions de PLC $\gamma$  amb altres proteïnes que es troben per formar complexos amb LAT, que pot servir per establir la interacció de PLC $\gamma$ 1/2 amb LAT i el reclutament de BTK, necessari per a la fosforilació i funció de PLC $\gamma$ , en el complex. A més, hi ha evidència del reclutament directe i indirecte, a través de SLP-76, de PLC $\gamma$  a LAT (Saitoh, Odom et al. 2003).

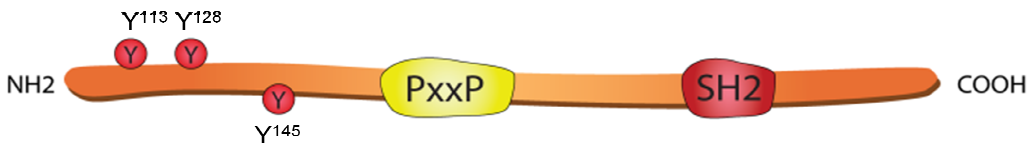
#### 4.2.3 PLC $\gamma$

Troben sis famílies de la fosfolipasa C (PLC) ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ , i  $\eta$ ). Els enzims PLC es poden trobar en totes les cèl·lules eucariotes i la seva funció és hidrolitzar els grups de cap polar de la membrana dels fosfolípids (PIP2) (Lennartsson and Ronnstrand 2012). PLC $\gamma$  un cop activat, catalitza la hidròlisi del PIP2 a la membrana plasmàtica en dos productes resultants: l'IP3, 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, Peinelt et al. 2006). 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, Vig et al. 2006; Prakriya, Feske et al. 2006; Vig, Beck et al. 2006; Yeromin, Zhang et al. 2006). Aquests estímuls donen lloc a un procés de desgranulació (Kraft and Kinet 2007). La inhibició de la PLC $\gamma$  mitjançant l'inhibidor U73122 aboleix completament els processos de mobilització de calci i desgranulació mediats pel Fc $\epsilon$ 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 $\gamma$  s'uneix directament a l'adaptador LAT a través de la Y136, 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 $\gamma$  a la membrana plasmàtica (Gilfillan and Tkaczyk 2006).

#### 4.2.4 SLP76-GADS-VAV



**Figura 10. Esquema de l'estructura de la proteïna SLP-76.** Basat en el model de Alvarez-Errico et al., 2009.

SLP-76 adaptador citosòlic de 76kDa, membre d'una petita família de proteïnes adaptadores molt expressades en cèl·lules hematopoiètiques. Consta d'un regió àcida en N-terminal, conté diverses tirosines fosforilables, una regió central rica en prolines i un domini SH2 a la regió C-terminal. Les tirosines més importants són Y113, Y128 i Y145, aporten llocs d'unió a Vav, Nck i BTK, promovent el seu reclutament a LAT. La unió de Vav al complex de LAT no només és important per la seva funció com activador de la família Rho, petites proteïnes G que regulen els canvis del citoesquelet i activació de les MAPK, sinó també com estabilitzador del reclutament i activació de PLC $\gamma$  i regulador de les respostes de Ca<sup>2+</sup> (Manetz, Gonzalez-Espinosa et al. 2001; Wu and Koretzky 2004). A més el reclutament i activació de BTK en el complexa LAT/SLP-76 també contribueix a l'activació de PLC $\gamma$  en mastòcits (Kawakami, Kitaura et al. 2000).

SLP-76 no s'uneix directament a LAT, sinó que ho fa via un altre proteïna adaptadora anomenada Gads.



**Figura 11. Esquema de l'estructura de la proteïna Gads.** Basat en el model de Alvarez-Errico et al., 2009.

Gads és una proteïna adaptadora citosòlica d'uns 40 kDa. Està constituïda per un domini SH2 central, flanquejat per dos dominis SH3. Gads es troba associat a SLP-76 a través del seu domini SH3 que uneix la regió central rica en prolina de SLP-76. El reclutament de GADS al complexa de LAT, a través de domini SH2, és essencial per la funció de SLP-76. Això fa que SLP-76 es localitzi als *lipids rafts* i pugui modular les respostes de calci (Liu, Fang et al. 1999; Kettner, Pivniouk et al. 2003; Silverman, Shoag et al. 2006).

En mastòcits, el trencament de la interacció Gads-SLP-76 causa una marcada reducció en desgranulació i producció de citocines (Silverman, Shoag et al. 2006).

#### 4.2.5 Grb2-SOS



**Figura 12. Esquema dels diferents dominis que constitueixen la proteïna Grb2.** Basat en el model de Alvarez-Errico et al., 2009.

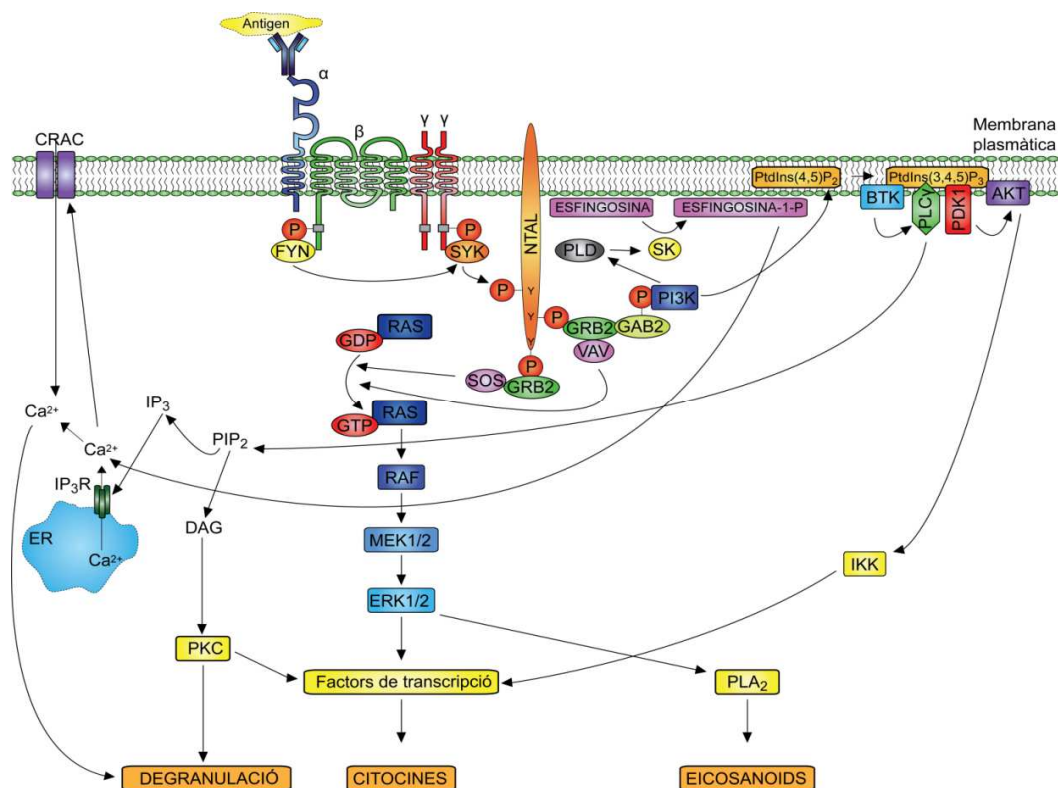
Grb2 és una proteïna adaptadora citosòlica d'uns 25 kDa, molt expressada en cèl·lules de mamífer. Està constituïda per un domini SH2 central, flanquejat per dos dominis SH3. Grb2 recluta el factor intercanviador de guanina SOS, aquest aproxima el substrat adient per passar la proteïna RAS de la seva forma inactiva (unida a GDP: guanosine diphosphate) a la seva forma activa (unida a GTP:



guanosine triphosphate) (Rossman, Der 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-signalregulated kinase 1) i ERK2 (Gilfillan and Tkaczyk 2006)

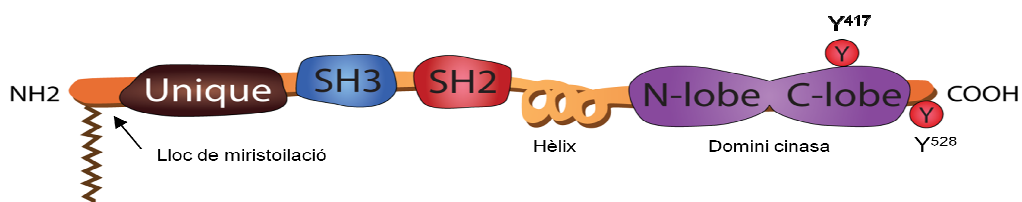
Les MAPK són activades en la part distal per la majoria de receptors de la superfície cel·lular, i per tant juguen papers centrals en una multitud de processos biològics, tant en condicions normals com patològiques. La via de la MAPK té l'arquitectura d'un mòdul de tres capes de cinases, que s'inicia a la membrana plasmàtica i arriba fins al nucli a on regula l'expressió gènica, sovint per fosforilació, de factors de transcripció. No obstant això, també els processos que passen en el citoplasma, per exemple, la traducció i la migració cel·lular, poden ser regulats per MAPK. La cascada de fosforilació es iniciada per una MAPK cinasa cinasa (MAPKKK) que fosforila a la part distal residus específics de serina/treonina MAPK cinasa (MAPKK). Llavors MAPKK fosforila residus de serines i tirosines de MAPK, que permeten que les MAPK interactuïn amb substrats citosòlics i també es dirigeixin cap al nucli a on estan localitzats molts dels seus substrats com factors de transcripció i proteïnes histones, donant lloc a producció de citocines (Turner and Cantrell 1997).

### 4.3 Via complementària a través de Fyn



**Figura 13. Esquema de la transducció de la via complementària.** Basat en el model de Kraft i Kinet, 2007.

El descobriment que Fyn, cinasa de la família Src, era requerit per la desgranulació i producció de citocines dependent d'IgE dels mastòcits va ser la primera evidència que existia una via alternativa. (Parravicini, Gadina et al. 2002)



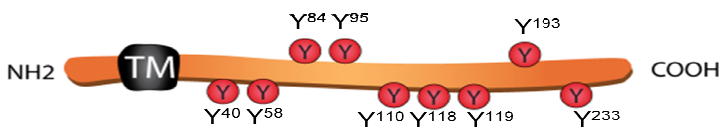
**Figura 14. Esquema dels dominis que constitueixen la cinasa Fyn.** Basat en el model de Gilfillan i Rivera, 2009.

Fyn no està implicada en la fosforilació del receptor en si mateix, sinó més aviat és responsable de la fosforilació de diversos intermediaris que són components essencials per l'activació de mastòcits causada per FcεRI. Fyn pot ser co-immunoprecipitat amb la cadena β de la FcεRI (Parravicini, Gadina et al. 2002) i sembla necessitar l'agregació amb el receptor per activar-se. A diferència de Lyn, que es pot trobar sobretot en *lipids rafts*, només una petita fracció de Fyn sembla residir en aquests dominis (Kovarova, Wassif et al. 2006). Aquesta diferència en la distribució és coherent amb el fet que les funcions dependents de Fyn o Lyn són independents però complementaris entre si. (Parravicini, Gadina et al. 2002).

Les senyals de Fyn iniciades després de l'activació de FcεRI són importants en l'activació de la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) (Parravicini, Gadina et al. 2002), una cinasa que és essencial en la formació de PIP3 (fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfat).

Després de la lligació del FcεRI i activació de Fyn, trobem la fosforilació i activació de Syk, que a la vegada comporta la fosforilació de NTAL. 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 d'altres molècules (Brdicka, Imrich et al. 2002; Janssen and Zhang 2003).

#### 4.3.1 NTAL



**Figura 15. Esquema de l'estructura de la proteïna NTAL.** Basat en el model de Alvarez-Errico et al., 2009.

NTAL va ser identificada i purificada per primera vegada, a partir de les línies cel·lulars THP -1 i HL -60, i com una molècula de cèl·lules no T relacionat amb

LAT que s'expressa per les cèl·lules B , NK, i cèl·lules mieloides com mastòcits (Brdicka, Imrich et al. 2002; Janssen, Zhu et al. 2003).

NTAL és una molècula de 30 kDa en els éssers humans. Al igual que LAT, NTAL és una proteïna transmembrana, consta d'un curt domini extracel·lular, un domini transmembrana, un motiu CxxC susceptible a la palmitilació i una llarga cua citoplasmàtica amb deu residus de tirosines susceptibles a ser fosforilats. Una diferència important entre LAT i NTAL, és que aquest últim no té el motiu d'unió a PLC $\gamma$  (Janssen, Zhu et al. 2004). No obstant, encara pot reclutar PLC $\gamma$  d'una forma indirecta, a través de Grb2, el qual s'uneix a les Y193 i Y233 (Iwaki, Spicka et al. 2008).

Al igual que LAT, NTAL té un motiu de palmitació a prop del domini transmembrana que el localitza als *lípid rafts*. Malgrat les seves similituds estructurals LAT i NTAL ocupen dominis diferents en la membrana plasmàtica dels mastòcits (Lebduska, Korb et al. 2007).

El paper de NTAL en mastòcits no estava del tot clar. Resultats anterior obtinguts a partir de diferents estudis amb ratolins i humans (Tkaczyk, Horejsi et al. 2004; Volna, Lebduska et al. 2004; Zhu, Liu et al. 2004) no mostraven clarament si NTAL exercia un paper regulador positiu o negatiu en les respostes dels mastòcits a través del Fc $\epsilon$ RI. Però segons data recent s'ha suggerit que NTAL pot ser responsable de la localització i fosforilació de SLP-76 possiblement a través de la interacció entre Gads i NTAL i funcions parcials de LAT quan aquest està inhibit (Kambayashi, Okumura et al. 2010).

S'ha observat que NTAL pot activar la via de PLC $\gamma$  i induir alliberació de calci en mastòcits, però aquesta activació de PLC $\gamma$  es curta i transitòria (Kambayashi, Okumura et al. 2010).

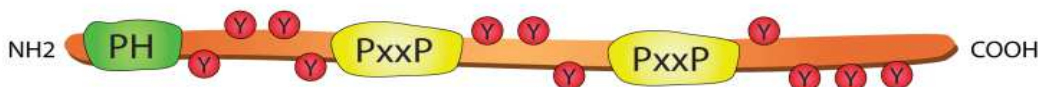
No obstant això, LAT i NTAL poden ser necessaris per impulsar la resposta de desgranulació (Zhu, Liu et al. 2004). Si NTAL juga un paper positiu o negatiu en la resposta dels mastòcits, pot dependre del context en què funciona. Donada la

interdependència i la doble funció aparent, és probable que LAT i NTAL regulin coordinadament les respostes i supervivència mastocitària (Rivera 2005; Rivera and Gilfillan 2006). En aquest cas s'ha vist que NTAL és un regulador negatiu de la quimiotaxis dependent d'antigen però positiu per la polimerització d'actina (Tumova, Koffer et al. 2010).

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 (GEPs), 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). L'enzim PI3K sembla tenir un rol important en aquesta via complementària (Kraft and Kinet 2007).

#### 4.3.2 Grb2, Gab2 i PI3K

Com s'ha explicat en el punt 3.2.5, Grb2 a part d'unir-se a LAT també s'uneix a NTAL i recluta diferents molècules, entre elles trobem Gab2.



**Figura 16. Esquema de l'estructura de la proteïna Gab2.** Basat en el model de Alvarez-Errico et al., 2009.

Gab2 és una proteïna adaptadora citosòlica de 97kDa, que pertany a la família dels adaptadors DOK/GAB. Consta d'un domini plectrina (PH) a la part N-terminal, dues regions riques en prolines i diverses tirosines fosforilables. Aquesta estructura proporciona a Gab2 l'habilitat de poder unir múltiples proteïnes, d'aquesta manera pot coordinar important senyalitzacions del receptor a la part més distal. Gab2 s'expressa majoritàriament en mastòcits, i és sabut que

interacciona amb NTAL via Grb2 (Iwaki, Spicka et al. 2008). Un anàlisi en detall de les funcions i senyalitzacions de Gab2 revelen que actua en la via complementaria dependent de Fyn, però complementant les vies de senyalització dependent de Lyn-LAT (Gu, Saito et al. 2001; Parravicini, Gadina et al. 2002). Un cop el receptor s'estimula, Gab2 es transloca cap a la membrana plasmàtica, a on és fosforilat (Gu, Saito et al. 2001; Xie, Ambudkar et al. 2002). S'uneix a Grb2 a través dels dominis SH3 que uneix les regions riques en prolines de Gab2. A través de les tirosines fosforilables, el domini SH2 de la subunitat reguladora de PI3K, p85, s'uneix a Gab2, activant PI3K i produint PIP3 (Yu, Lowell et al. 2006; Alvarez-Errico, Lessmann et al. 2009).

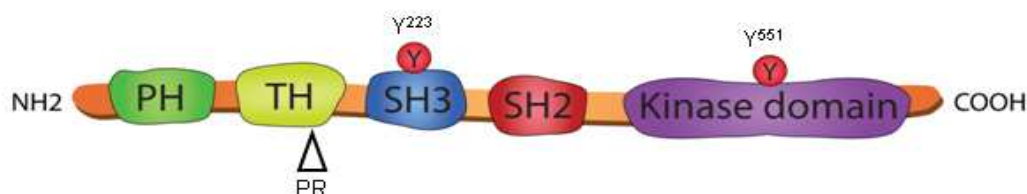
La PI3K és un enzim de senyalització que consta d'una subunitat reguladora, p85, i una subunitat catalítica p110 (la isoforma p110 $\delta$  és la responsable de la desgranulació i la producció de citocines causada per antigen) (Ali, Bilancio et al. 2004; Ali, Camps et al. 2008). Tot i que la subunitat catalítica utilitza diferents isoformes de la subunitat reguladora p85, la isoforma p85 $\alpha$  regula la fosforilació d'Akt, proliferació cel·lular i la quimiotaxis, també està associada al creixement de mastòcits on KIT es troba mutat (càncer i mastocitosis) (Munugalavadla, Sims et al. 2007). La PI3K actua fosforilant el PIP2 que es troba a la membrana plasmàtica i dóna com a resultat el PIP3, proveint d'aquesta manera d'un lloc d'unió per dominis d'homologia a plecstrina (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 plecstrina i són importants per l'activació dels mastòcits, entre les quals es troben PLC $\gamma$ , BTK, Akt i PDK1 (3-phosphoinositide dependent protein kinase 1) (Rivera 2002; Iwaki, Tkaczyk et al. 2005).

Els esdeveniments de senyalització que regula PI3K, juguen un paper central en la biologia dels mastòcits. Les proteïnes que intervenen en l'eix dependent de PI3K intervinguda pels receptors dels mastòcits encara no s'ha aclarit completament. No obstant, la desgranulació i producció de citocines regulades per

PI3K, sembla estar relacionat amb la regulació d'un senyal de calci latent, que probablement requereix l'activació de BTK (Gilfillan and Tkaczyk 2006). Múltiples processos regulats per PI3K semblen contribuir al creixement i la supervivència dels mastòcits, requerint l'activació de PDK, AKT i la cascada mTORC1 i inactivació de FOXO (Vanhaesebroeck and Alessi 2000; Moller, Alfredsson et al. 2005; Yang and Guan 2007). No està tan clar com PI3K pot regular la quimiotaxis dels mastòcits i l'adhesió, però les dades suggereixen que mTORC1 també podria tenir un paper parcial en la regulació de la quimiotaxis dels mastòcits a través de SCF (Kim, Radinger et al. 2008).

### 4.3.3 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 (Fig. 17) i l'enzim PLC $\gamma$ .



**Figura 17. Esquema de l'estructura de la cinasa BTK.** Basat en el model de Gilfillan i Rivera, 2009.

Segons aquesta hipòtesi, l'activació de la PI3K comporta un reclutament a la membrana plasmàtica de les molècules BTK i PLC $\gamma$ , on la PLC $\gamma$  seria fosforilada i activada per la cinasa BTK (Hata, Aikoh et al. 1998; Gilfillan and Tkaczyk 2006). De totes maneres, segons descriu la via primària de l'activació dels mastòcits, la mobilització de calci generada per la PLC $\gamma$  ve generada principalment per un mecanisme independent de PI3K (Tkaczyk, Beaven 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 $\epsilon$ RI d'una manera dependent de Lyn i Fyn (Urtz, Olivera et al.

2004). Lyn té un rol en el reclutament primerenc de SK al FcεRI, permetent la seva posterior activació, mentre que Fyn seria el responsable d'una activació perllongada de la SK (Urtz, Olivera et al. 2004; Olivera, Urtz et al. 2006). SK fosforila l'esfingosina associada a lípid-rafts, i dona 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, Bektas et al. 2004) i unir-se als receptors de la superfície cel·lular S1P1 (participa en la reorganització del citoesquelet) i S1P2 (participa en l'augment de la desgranulació) (Urtz, Olivera et al. 2004; Kalesnikoff and Galli 2008) per transactivar altres mastòcits (Jolly, Bektas 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 IP3 (Choi, Kim 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 FcεRI d'una manera dependent 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 independentment de l'activitat PLCγ (Gilfillan and Tkaczyk 2006).

#### 4.3.4 PDK1 i AKT

L'activació de PI3K i la resultant formació de PIP3, fa que hi hagi un reclutament de la PDK1 (proteïna cinasa 1 dependent de 3- fosfoinositol) a la membrana plasmàtica, on posteriorment la PDK1 fosforila i activa una altra serina/treonina cinasa, AKT (Stephens, Anderson et al. 1998). AKT (també anomenada PKB) és una molècula clau en la part més distal de la via de la PI3K, promou la supervivència cel·lular en interferir amb la iniciació de l'apoptosi (Datta, Dudek et al. 1997). AKT conté un domini PH a l'extrem NH<sub>2</sub>-terminal que interactua amb el producte de la PI3K, PIP3, un domini cinasa serina/treonina, i un domini regulador a l'extrem carboxil terminal. AKT regula positivament la funció del factor de



transcripció NF- $\kappa$ B mitjançant la fosforilació del inhibidor de NF- $\kappa$ B (IKB), que és un regulador clau de NF- $\kappa$ B (Kitaura, Asai et al. 2000).

La via complementaria d'activació dels mastòcits (depenent de PI3K), a més de la via LAT-PLC $\gamma$ , regulen l'expressió de gens de citocines pels mastòcits, causada per Fc $\epsilon$ RI. Els passos que condueixen a la regulació dels gens de transcripció de citocines a través de PI3K són menys clars que els que regulen la desgranulació. La producció de citocines induïda pel Fc $\epsilon$ RI en aquesta via és conseqüència de l'activació de factors de transcripció com NFAT, AP1 (FOS i JUN) i NF- $\kappa$ B, tal com succeeix en la via de LAT-PLC $\gamma$  (Kraft and Kinet 2007), tot i que hi ha certes diferències en els mecanismes que condueixen a aquesta activació (Gilfillan and Tkaczyk 2006).

A més, de la capacitat de PI3K per augmentar la concentració de calci, també podria augmentar la capacitat de PLC $\gamma$ , via activació de la BTK, per regular l'activació del factor de transcripció NFAT (Jascur, Gilman et al. 1997). Així, PI3K podria regular la producció de citocines mitjançant la regulació de les activitats de NF- $\kappa$ B i / o NFAT.

#### **4.3.5 Grb2, SOS i Vav**

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- $\kappa$ B, regulant l'expressió dels gens de citocines (Gilfillan and Tkaczyk 2006).

Vav sembla controlar tant l'activació de la PLC $\gamma$ , 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).

La importància de moltes de les molècules de senyalització que participen en aquest complex s'ha determinat mitjançant la generació de ratolins deficientes per cadascuna d'aquestes molècules. Els efectes de l'anul·lació dels gens que codifiquen per aquestes proteïnes es troben resumits a la taula següent.

<b>Genoanul·lats, silenciaments, mutacions genètiques</b>	<b>Efecte en la desgranulació</b>	<b>Efecte en l'alliberació de citocines</b>	<b>Efecte en la senyalització</b>
Genoanul·lat 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 l'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
Genoanul·lat de FYN	Disminuïda	Disminuïda	Disminució de l'activitat de la PI3K Sense canvis en el senyal de calci
Genoanul·lat de SYK	Abolida	Abolida	Sense dades
Genoanul·lat de Vav	Disminuïda	Disminuïda	Disminució del senyal de calci mediat per la PLCγ i de l'activitat de la PI3K
Genoanul·lat de SLP76	Disminuïda	Disminuïda	Disminució de la fosforilació de la PLCγ i del senyal de calci
Genoanul·lat de Gab2	Disminuïda	Disminuïda la síntesi de mRNA de IL-6	Bloqueig en la via de la PI3K
Genoanul·lat 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
Silenciament de LAT	Disminuïda	Sense dades	Sense dades
Genoanul·lat de NTAL	Incrementada (sense canvis en l'anafilaxi in vivo)	Incrementada	Hiperfosforilació de LAT, PLCγ i ERK
Silenciament de NTAL	Disminuïda	Sense dades	Sense dades
Genoanul·lat de LAT i NTAL	Disminuïda	Disminuïda	Bloqueig de la fosforilació de PLCγ i del senyal de calci
Genoanul·lat de BTK	Disminuïda	Disminuïda	Disminució de la producció de IP <sub>3</sub> i del senyal de calci
Genoanul·lat de BTK i LYN	Disminuïda	Disminuïda	Disminució de les vies de senyalització de PLCγ, d'ERK i de JUN
Genoanul·lat de p85a (subunitat de la PI3K)	Sense canvis	Sense dades	Bloqueig de l'activitat de la PI3K
Mutació de p110d (subunitat de la PI3K)	Disminuïda (bloqueig de les respostes mitjançades per KIT)	Disminuïda	Bloqueig de l'activitat de la PI3K

**Taula 1. Importància de les molècules implicades en les vies d'activació dels mastòcits a través de la generació de genoanul-lats, silenciaments i mutacions genètiques.** Basat en la taula de Gilfillan i Tkaczyk, 2006.

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

La senyalització a través del FcεRI i les funcions efectores es troben sotmeses al control d'altres molècules de superfície (Kraft and Kinet 2007) que poden ser molècules inhibidores, o bé poden activar-se sota condicions apropiades i conduir a un augment en l'activació basal dels mastòcits mitjançada per FcεRI (Gilfillan and Tkaczyk 2006).

### **5.1 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, Peruzzi 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-lligats 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'ubiquitines (Katz 2002; Bruhns, Fremont et al. 2005; Kraft and Kinet 2007; Molfetta, Peruzzi et al. 2007).

### 5.1.1 Regulació negativa a través de receptors que contenen ITIMs

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. Depenent del seu domini extracel·lular poden pertànyer a la superfamília de les immunoglobulines (exemples: FcγRIIB, IRp60 (CD300a), gp49B1, PIR-B (paired Ig-like receptor B), proteïna reguladora α) o a la superfamília de tipus C de les lectines (calci dependent) (exemples: KLRG1, killer cell lectin like receptor G1).

A través del seu ITIM, aquests receptors suprimeixen l'activació cel·lular, reclutant molècules de senyalització negatives, com les fosfatases SHIP i SHP. Així doncs, el seu mecanisme d'acció respecte la supressió de la senyalització del FcεRI es basa en promoure esdeveniments de desfosforilació (Kraft and Kinet 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).

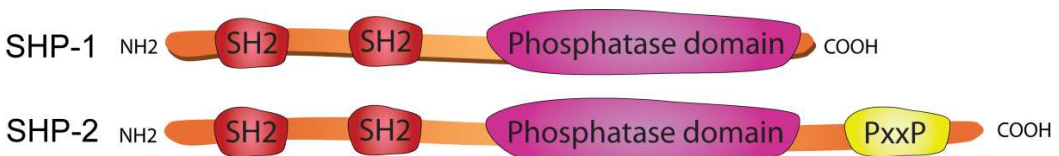
El receptor IRp60 o CD300a pertany a una família de receptors de membrana que s'expressen constitutivament en una varietat de cèl·lules immunes com cèl·lules T, NK, neutròfils, basòfils i mastòcits (Cantoni, Bottino et al. 1999; Bachelet, Munitz et al. 2005; Gibbs, Sabato et al. 2012). Després de l'activació, els motius ITIMs recluten fosfotirosina fosfatases (per exemple, SHP-1, SHP-2) o inositol-fosfatases (per exemple, SHIP-1), que servirà per bloquejar l'activació cel·lular. S'ha demostrat que el CD300a bloqueja la desgranulació causada pel FcεRI i la producció de citocines en mastòcits i redueix la secreció de mediadors en basòfils (Bachelet, Munitz et al. 2005; Gibbs, Sabato et al. 2012). La generació del ratolí

genoanul·lat de CD300a mostra una afectació en la producció de citocines proinflamatòries i antiinflamatòries com TNF i IL-10, respectivament (Nakahashi-Oda, Tahara-Hanaoka et al. 2012). S'ha identificat el CD300a com el primer receptor que uneix fosfatidilserina (PS) però no facilita la fagocitosi per part del macròfag sinó que inhibeix les respostes inflamatòries dels mastòcits a les infeccions microbianes (Nakahashi-Oda, Tahara-Hanaoka et al. 2012) .

Recentment també s'ha vist que un membre de la família de receptors SLAM, o família del CD150, concretament CD84, es un receptor inhibidor de la cascada de senyalització iniciada pel FcεRI, després de la lligació de la IgE, en mastòcits. Pot regular negativament esdeveniments com desgranulació i la secreció de citocines, a través de Fes i SHP-1 (Alvarez-Errico, Oliver-Vila et al. 2011).

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

Les proteïnes tirosina fosfatases (PTP), entre elles trobem SHP-1 i SHP-2 regulen, mitjançant la desfosforilació, l'estat de fosforilació de les proteïnes de senyalització (Gilfillan and Rivera 2009).



**Figura 18. Esquema de les estructures de les proteïnes SHP-1 i SHP-2.** Basat en el model de Gilfillan i Rivera, 2009.

SHP-1 s'expressa principalment en cèl·lules hematopoiètiques, mentre que SHP-2 s'expressa de forma més ubiqua. Tant SHP-1 com SHP-2 contenen dos dominis SH2 a la part NH2 terminal, un domini catalític, i un domini regulador a la part C-terminal que conté dos residus de tirosina que són fosforilats per Src PTK (Ozawa, Nakata et al. 2007). SHP-2 també conté una seqüència rica en prolina en

el seu extrem COOH que pot interaccionar amb dominis SH3 (Gilfillan and Rivera 2009).

La funció d'aquestes fosfatases és regular negativament l'activació dels mastòcits. Encara que, el seu mecanisme 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 de reclutar SHP-1 i SHP-2 (Daeron, Jaeger et al. 2008). També s'ha suggerit que les fosfatases de tirosines en proteïnes, com SHP-1 i SHP-2, podrien 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 dels ITAM de la cadena γ del FcεRI (Yamashita, Suzuki et al. 2008).

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).

### **5.1.3 Regulació negativa a través de fosfatases lipídiques: SHIP**

SHIP és un inositol polifosfat 5' - fosfatasa que desfosforila PIP<sub>3</sub> per produir PIP<sub>2</sub>. Amb aquesta desfosforilació bloqueja el reclutament de molècules com ara PLCγ, Vav i BTK inhibint la desgranulació i l'expressió gènica (Roth, Chen et al. 2008).

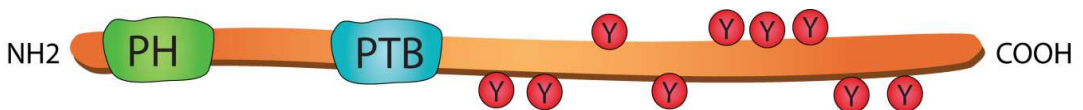
SHIP -1 disminueix la desgranulació dependent de IgE i redueix la mobilització de Ca<sup>2+</sup> per hidròlisi de la 5' - fosfat de PIP<sub>3</sub>, el qual està implicat en la regulació del influx de Ca<sup>2+</sup> (Kalesnikoff, Lam et al. 2002). També s'ha vist en estudis de ratolins deficientes en SHIP-1, un augment de l'activació de les vies de MAPK, Akt i PKC, vies important per la producció de IL-6 (Kalesnikoff, Baur et al. 2002).

SHIP -2 també pot regular negativament l'activació dels mastòcits, al igual que SHIP-1 disminueix la desgranulació. Investigacions posteriors revelen que SHIP-2 regula negativament la formació de microtúbuls durant la desgranulació dels

mastòcits. SHIP- 2 s'uneix constitutivament a la cadena  $\beta$  del Fc $\epsilon$ RI i s'associa amb Lyn i Gab2. Bloquejant la via de Fyn–Gab2 que està implicada en la formació de microtúbuls durant la desgranulació dels mastòcits (Leung and Bolland 2007). Producció de citocines IgE dependent, també està regulada negativament per SHIP-2. SHIP-2 regula l'activitat de GATA -1, un factor de transcripció que regula la transcripció dels gens de IL-4 i IL-13 (Leung and Bolland 2007).

#### 5.1.4 Regulació negativa a través de molècules adaptadores: DOK

Les proteïnes adaptadores de la família DOK s'ha demostrat que interactuen exclusivament, en la part distal de la cascada, amb reguladors negatius de la senyalització de Fc $\epsilon$ RI en els mastòcits (Abramson, Rozenblum et al. 2003). DOK consta d'un domini N- terminal de PH, un domini PTB, nombrosos residus de tirosina que poden ser fosforilats, i diversos motius PXXP que s'uneixen als dominis SH3. De les diferents isoformes descrites, Dok -1, Dok -2, i Dok -3 s'expressen en mastòcits (Lemay, Davidson et al. 2000; Abramson, Rozenblum et al. 2003). L'estimulació a través del Fc $\epsilon$ RI condueix a la fosforilació de la tirosina de Dok -1 i Dok -2 però no de Dok -3 (Abramson, Rozenblum et al. 2003).



**Figura 19. Esquema de l'estructura de la proteïna DOK.** Basat en el model de Alvarez-Errico et al., 2009.

Dok -1, també anomenat p62<sup>dok</sup>, és la isoforma més ben estudiada i s'ha demostrat que té un paper important en la part distal de la regulació negativa de receptors que codifiquen motius d'inhibició basats en tirosines (ITIMs) (Alvarez-Errico, Lessmann et al. 2009). Dok -1 forma un complex amb la proteïna constitutiva Ras GTP vinculant proteïnes activadores ( RasGAP ) i s'associa amb SHIP -1 després de l'activació dels receptors que tenen ITIM. Aquest complex de

proteïnes és reclutat directament, unint-se a les tirosines fosforilades dels ITIM a través de la interacció del domini SH2 de SHIP -1 (Tamir, Stolpa et al. 2000). Per tant, aquest complex regulador negatiu de SHIP-1/RasGAP/Dok-1 regula a la baixa els nivells de PIP3 a través de l'acció de SHIP -1 i inhibeix l'activació de Ras a través RasGAP inhibint la transcripció i la producció de mediadors lipídics. Aquest complex de Dok -1, RasGAP i SHIP -1, es va descriure per primera vegada després de la co-agregació del BCR amb Fc $\gamma$ RIIB (Tamir, Stolpa et al. 2000).

### **5.1.5 Regulació negativa a través de receptors que no contenen ITIMS**

També existeixen altres molècules de superfície, tot i que els hi manquen els motius ITIM, poden igualment inhibir la senyalització a través del Fc $\epsilon$ RI (Kraft and Kinet 2007). El receptor CD200, membre de la superfamília de les immunoglobulines i receptor pel lligant CD200, té capacitat per suprimir la desgranulació dels mastòcits i l'anafilaxi cutània induïdes pel Fc $\epsilon$ RI, tot i que el mecanisme d'aquesta inhibició és desconegut (Cherwinski, Murphy et al. 2005).

El receptor Fc $\alpha$ RI, que té com a lligant la IgA, s'associa amb la cadena  $\gamma$  del Fc $\epsilon$ RI i pot inhibir la desgranulació dels mastòcits induïda pel Fc $\epsilon$ RI, tot i que conté un motiu ITAM (d'activació) en la seva cua citoplasmàtica (Pasquier, Launay et al. 2005).

## **5.2 Molècules potenciadores de l'activació dels mastòcits**

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

Receptors com S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, receptor d'adenosina A<sub>3</sub> i receptor de C3a sota determinades condicions poden potenciar respostes causades per antigen, actuant com a co-estimuladors i incrementant la desgranulació i/o producció de citocines.(Gilfillan and Tkaczyk 2006).



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, Bektas et al. 2004).

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 lligant, l'adenosina. 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. La molècula clau que estaria implicada en els processos d'amplificació lligats a aquests GPCRs sembla ser la PI3K (Laffargue, Calvez et al. 2002).

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, especialment KIT, amb la finalitat de modular l'alliberació de mediadors en mastòcits dependent d'antigen (Gilfillan and Tkaczyk 2006).

### 5.2.2 KIT

KIT, també anomenat CD117, és un receptor de superfície d'una sola cadena, que té activitat proteïna tirosina cinasa inherent (Linnekin 1999). El lligant de KIT és el SCF (stem cell factor), considerat com el factor de creixement més rellevant en mastòcits. Tot i que, les vies de senyalització a través de KIT comparteixen moltes característiques comunes amb les vies iniciades pel FcεRI, KIT no té la capacitat per activar els senyals necessaris per induir la desgranulació en els mastòcits (Hundley, Gilfillan et al. 2004). Encara que KIT activa Src cinases, PLCγ1, PI3K i la cascada de MAPK, no sembla ser capaç de reclutar i activar Syk, fosforilar LAT o activar PKC de la mateixa intensitat que el produït pel FcεRI (Hundley, Gilfillan et al. 2004; Tkaczyk, Horejsi et al. 2004; Iwaki, Tkaczyk et al. 2005). A més, el senyal de calci es redueix molt i va endarrerit en comparació amb l'observat amb l'estimulació del FcεRI (Hundley, Gilfillan et al. 2004; Tkaczyk,

Horejsi et al. 2004). Aquests senyals absents o febles explicarien la incapacitat de KIT per induir una resposta de desgranulació. No obstant això, quan s'inicia l'activació a través de FcεRI, la via de senyalització de KIT, té la capacitat de millorar la desgranulació i la producció de citocines a través del reforç o potenciació dels senyals de FcεRI (Gilfillan and Beaven 2011). 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 (Gilfillan and Rivera 2009).

## 6. EL RECEPTOR KIT (CD117)

A part del FcεRI, hi ha tot una sèrie de receptors que són expressats en mastòcits i poden regular o modificar les seves funcions. El més rellevant d'aquests receptors és KIT (CD117), receptor per *stem cell factor* (SCF), d'aproximadament 145kDa, responsable del desenvolupament i l'homeòstasi dels mastòcits (Gilfillan and Rivera 2009). S'expressa en cèl·lules del llinatge hematopoietic i melanocític. (Broudy, Kovach et al. 1994; Ronnstrand 2004).

El patró d'expressió de KIT i SCF durant l'embriogènesi del ratolí suggereix que estan involucrats en la migració de cèl·lules hematopoietiques, cèl·lules germinals i de llinatge melanoblast, així com en la diferenciació i proliferació d'aquestes cèl·lules. Per tant aquestes dades d'expressió també suggereixen que la senyalització de KIT pot tenir funcions importants en el sistema nerviós, la placenta, cor, pulmó, ronyó (durant la gestació) (Lennartsson and Ronnstrand 2012).

### 6.1 Estructura del receptor KIT

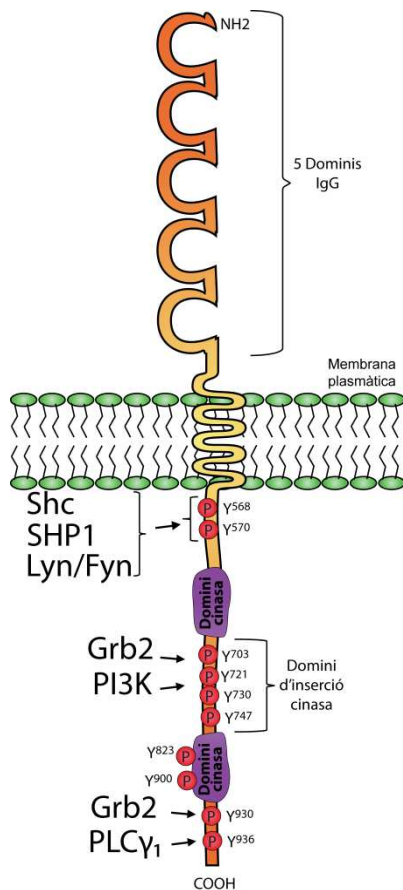
El receptor de KIT és un receptor tirosina cinasa tipus III i està estretament relacionat amb el receptor del factor de creixement derivat de plaquetes (PDGFR),

el receptor de factor estimulant de colònies de macròfags, i FLT3 (Lennartsson and Ronnstrand 2012).

Els receptors tirosina cinases de tipus III es caracteritzen per la presència de cinc dominis similars a les immunoglobulines i la presència d'una seqüència d'inserció de cinasa de 70-100 aminoàcids que resideixen al mig del domini cinasa. En el cas de KIT, la regió d'inserció de cinasa és de ~ 80 aminoàcids de longitud. El

receptor tirosina cinasa codificat pel gen c-KIT és una proteïna transmembrana amb un domini extracel·lular composta de cinc dominis immunoglobulina seguit d'una regió transmembrana.

La part intracel·lular de KIT comença amb la regió juxtamembrana, una regió de gran importància per a la regulació de l'activitat cinasa de KIT. El domini cinasa es compon de dos subdominis, domini tirosina cinasa 1 i 2, que està interromput per una seqüència d'inserció de cinasa, finalment trobem una cua a la part carboxi-terminal. La majoria dels llocs de fosforilació que es produeixen després de l'activació estimulada per lligant de KIT resideixen en la regió juxtamembrana, l'insert de cinasa, o la cua COOH-terminal (Lennartsson and Ronnstrand 2012).



**Figura 20. Esquema de l'estructura del receptor KIT.** Es mostra la part extracel·lular format per 5 dominis immunoglobulina, el domini transmembrana i la cua citoplasmàtica amb els dos dominis cinases, les diferents tirosines i alguns exemples de proteïnes que s'hi uneixen. Basat en el model de Gilfillan i Rivera, 2009.

L'activació de receptors de factors de creixement, generalment requereix la dimerització o oligomerització de molècules del receptor monomèric (Lemmon and Schlessinger 2010).

En alguns casos, el dímer es forma independent del lligant (per exemple, receptors del factor de creixement de tipus insulina i similars a la insulina), però amb més freqüència la dimerització és provocada per la unió del lligant.

La cinètica d'activació de KIT és ràpida, els dímers poden ser detectats ja en qüestió de minuts després de l'addició de lligant (Broudy, Lin et al. 1998). Durant els últims 10 anys hi ha hagut un augment substancial en les dades estructurals que en combinació amb els estudis bioquímics proporciona una detallada descripció del procés d'activació de KIT.

Les primeres investigacions bioquímiques argumenten que el SCF és un homodímer, i la dimerització de KIT és impulsada per la seva capacitat d'interactuar simultàniament amb dos monòmers de KIT (Lemmon, Pinchasi et al. 1997). A més, es va proposar que per la unió amb SCF es requereixen només els tres primers dominis immunoglobulina. Aquestes interpretacions de les dades bioquímiques ja han estat confirmades per estudis estructurals sobre SCF (Zhang, Zhang et al. 2000) i el complex entre la SCF i KIT (Yuzawa, Opatowsky et al. 2007). D'altra banda, a part de la unió de dos monòmers de KIT, formant un dímer, la unió amb el lligant també induïx un canvi conformacional que facilita la interacció homotípica entre els dominis immunoglobulines 4 i 5 de les dues molècules KIT adjacents (Yuzawa, Opatowsky et al. 2007). La mutació dels residus clau implicats en la interacció entre receptors redueix dràsticament la fosforilació de tirosines, però no influeix en la dimerització induïda per SCF de KIT (Lennartsson and Ronnstrand 2012). Una conseqüència del canvi conformacional, del domini extracel·lular de KIT induït per SCF, és que les regions transmembrana de KIT s'apropen entre elles fet que permet les interaccions proteïna-proteïna entre les regions transmembrana, així com el posicionament més pròxim dels dominis tirosina cinasa intracel·lular per facilitar la seva activació i la posterior

transfosforilació de les diferents tirosines presents en la regió de yuxtamenbrana (Tyr 568 i 570), la regió insert de cinasa (Tyr 703, 721, 730 i 747), el domini tirosina cinasa (Tyr 823 i 900) (per Src cinases), i la cua carboxi terminal (Tyr 936) (Yuzawa, Opatowsky et al. 2007).

La idea de l'estabilització de les interaccions entre dues regions transmembrana és recolzat pel que se sap del PDGFR en el qual les regions transmembrana mostren una forta afinitat entre si, mitjançant la formació d'una estructura de cremallera de leucina (Oates, King et al. 2010).

Com el receptor KIT i el PDGFR estan estretament relacionats, el més probable és que es produeixi una situació similar per KIT. A més, les interaccions homotípiques entre els dominis similars a immunoglobulina 4 i 5, formant dues molècules KIT proximals també poden influir en les posicions relatives dels dominis cinasa intracel·lulars dins del dímer d'una manera òptima per la transfosforilació (Lennartsson and Ronnstrand 2012).

Donoghue et al (Bell, Tynan et al. 2000) van mostrar que l'orientació dels dos dominis cinasa intracel·lulars en el dímer del receptor influeix en l'activació del receptor.

Estudis bioquímics utilitzant un pèptid sintètic derivat de la seqüència d'aminoàcids del domini juxtamembrana de KIT mostren que aquesta regió pot interaccionar amb el domini cinasa de KIT i suprimir la seva activitat cinasa (Chan, Ilangumaran et al. 2003).

El concepte d'un domini de juxtamembrana inhibitori en KIT cinasa va ser confirmat per l'estructura de l'estat inactiu del domini cinasa (Mol, Dougan et al. 2004). El domini juxtamembrana conté dos residus de tirosina, Tyr568 i Tyr570, que es converteixen en tirosina fosforilada després del tractament SCF, i això allibera el domini juxtamembrana de la seva configuració inhibidora i permet adoptar al domini cinasa una configuració que li permeti portar a terme la seva funció catalítica (Mol, Lim et al. 2003; Mol, Dougan et al. 2004).

## 6.2 Regulació de l'expressió del receptor KIT

El gen c-KIT, es localitza en el segment del cromosoma 4q11 en humans (Yarden, Kuang et al. 1987; d'Auriol, Mattei et al. 1988) i es compon de 21 exons, que abasten més de 34 kb de DNA. En ratolins es troba en el cromosoma 5, locus W, , a on hi ha més de 30 mutacions conegudes (Kovarova and Rivera 2004). El SCF es va trobar que era el producte del locus Sl, locus on també hi ha mutacions (Kovarova and Rivera 2004).

El *splicing* alternatiu del RNA missatger que codifica c-kit condueix a l'aparició d'almenys quatre isoformes de KIT en els éssers humans. Dues d'aquestes isoformes, difereixen entre si per la presència o absència d'una seqüència de tetrapèptid (GNNK) a la regió jxtamembrana extracel·lular de la proteïna codificada (Reith, Ellis et al. 1991; Crosier, Ricciardi et al. 1993; Zhu, Dong et al. 1994). Altres variants de *splicing* que existeixen difereixen per la presència o absència d'un únic residu de serina a la regió d'inserció de cinasa de KIT (Lennartsson and Ronnstrand 2012).

Estudis en la regió del promotor del c-kit han demostrat que la regió d'aproximadament 139 nucleòtids de la part més proximal del lloc d'iniciació de la traducció és crític per l'activitat del promotor. Aquesta seqüència té llocs d'unió funcionals per als factors de transcripció Ets-2 i Myb, que serveixen com a reguladors de l'expressió de KIT en cèl·lules hematopoètiques (Ratajczak, Perrotti et al. 1998). Park i col·laboradors van demostrar la importància del factor de transcripció Sp1 per obtenir la màxima activitat del promotor de c-kit (Park, Plummer et al. 1998). El promotor c-kit conté tres llocs d'unió funcionals, AP-2 i la pèrdua de l'expressió de KIT en melanomes malignes es produeix a causa de la pèrdua de l'expressió de AP -2 (Huang, Jean et al. 1998).

S'ha reportat que l'expressió del gen de c-kit requereix el reclutament de GATA2 i Sp1 a la regió promotora en mastòcits (Maeda, Nishiyama et al. 2010). També s'ha proposat que GATA3 (tot i que és un regulador de TH2) estabilitza l'expressió

de KIT i promou el desenvolupament dels mastòcits en absència dels senyals de Notch, i en presència de IL-3 i SCF (Zheng and Flavell 1997; Taghon, Yui et al. 2007). El factor de transcripció SCL s'ha mostrat que és necessari per l'expressió i funció de KIT en cèl·lules hematopoètiques (Krosl, He et al. 1998).

El factor de transcripció MITF (factor de transcripció associat a microftalmia) és un important regulador de l'expressió de KIT en mastòcits (Tsuji-mura, Morii et al. 1996). MITF s'uneix a un motiu CACCTG en el promotor de c-kit. Curiosament, dades recents suggereixen que també hi ha una regulació inversa, en la qual la senyalització de KIT regula l'expressió de MITF través dels miRNAs miR - 539 i miR - 381 (Lee, Brandal et al. 2011).

A part de la regulació dels nivells d'expressió per part de factors de transcripció, s'ha reportat que KIT pot ser regulat per microRNAs: miR-193b en leucèmia (Gao, Lin et al. 2011) i el mir-221 en cèl·lules de melanoma (Igoucheva and Alexeev 2009). Els miRNAs: miR-221 i miR-222 s'han descrit com reguladors de l'expressió de KIT en cèl·lules hematopoètiques i s'ha reportat com a potencials reguladors de l'expressió de KIT en tumors gastrointestinals (Felli, Fontana et al. 2005; Koelz, Lense et al. 2011).

### **6.3 Funcions biològiques del receptor KIT**

L'anàlisi de ratolins amb mutacions en els locus *W* o *SI* ha donat molta informació sobre la funció in vivo de KIT. Aquestes mutacions d'origen natural comprenen un espectre de defectes que van des defectes menors en l'activitat de la tirosina cinasa de KIT a una pèrdua completa de la seva activitat cinasa (Chabot, Stephenson et al. 1988; Geissler, Ryan et al. 1988).

Aquestes mutacions ens han donat pistes sobre la funció fisiològica normal de KIT durant l'embriogènesi i l'edat adulta . El gran nombre de diferents mutacions de pèrdua de funció en aquest sistema receptor / lligant suggereixen funcions crucials en el sistema hematopoètic, durant el desenvolupament de gametòcits, la pigmentació, la motilitat intestinal, així com en el sistema nerviós (Russell 1979;

Keshet, Lyman et al. 1991; Lev, Blechman et al. 1994). Dades d'altres models també han suggerit una funció en el sistema immune incloent la inflamació (donada la seva expressió tant en cèl·lules dendrítiques i mastòcits) i en la regulació de la vasculogènesi (Heissig, Werb et al. 2003; Metcalfe 2008; Ray, Krishnamoorthy et al. 2010).

Les cèl·lules mare hematopoiètiques (HSC) es caracteritzen per la seva capacitat d'auto-renovació i per ser capaces de diferenciar-se en tots els llinatges hemopoiètics. Amb poques excepcions, KIT es pot detectar en les cèl·lules hematopoiètiques primerenques (incloent cèl·lules mare i cèl·lules progenitores), i la seva expressió es perd durant la seva diferenciació (Ogawa, Matsuzaki et al. 1991; Okada, Nakauchi et al. 1991; Broudy 1997). Aquestes cèl·lules primerenques depenen dels senyals de KIT per la seva proliferació i supervivència. Això passa, en general, en sinergia amb altres citocines i factors. En dos casos, l'expressió de KIT no es perd durant la maduració, són els casos dels mastòcits i les cèl·lules dendrítiques, (que depenen de KIT per la seva proliferació, supervivència i funció) (Metcalfe, Baram et al. 1997; Ray, Krishnamoorthy et al. 2010).

En el cas dels mastòcits, KIT està involucrat en diferents funcions biològiques com són la mitogènesi, diferenciació, supervivència, adhesió, migració, secreció i reorganització del citoesquelet d'actina (Ronnstrand 2004). No obstant, el consens de diferents estudis suggereixen, que els senyals generats per l'activació de KIT no són suficients per induir la desgranulació però si poden induir la producció de citocines en absència d'altres estímuls (Hundley, Gilfillan et al. 2004; Tkaczyk, Horejsi et al. 2004). Recentment s'ha reportat que el tractament amb inhibidors dels citoesquelet (citocalasina B i lantrunculina B) inhibeixen la quimiotaxi deguda a l'acció de KIT pero incrementen la seva habilitat de desgranular suggerint que la prevenció de la polimerització d'actina canvia la resposta del SCF de quimiotàctica a desgranuladora (Smrz, Bandara et al. 2013).



KIT juntament amb FcεRI interaccionen sinèrgicament per millorar notablement la quimiotaxi i la desgranulació en els mastòcits (Kuehn, Radinger et al. 2010). Aquesta sinergia no es limita amb l'activació del receptor FcεRI, s'ha demostrat que KIT juntament amb el receptor d'Adenosina A<sub>2b</sub> milloren la producció de IL-8 en HMC-1 (línia de mastòcits humans) (Meade, Worrall et al. 2002), juntament amb LPS a través de TLR4, milloren la producció de PGD<sub>2</sub> i citocines en BMMCs (Moon, Murakami et al. 1998). La pigmentació defectuosa observada en el ratolí deficient de la funció de KIT està vinculada a la funció de KIT en la proliferació, la supervivència i la migració dels melanòcits durant l'embriogènesi (Scott, Ewing et al. 1994; Mackenzie, Jordan et al. 1997; Wehrle-Haller 2003). Les vies exactes que enllacen KIT amb la producció de pigments no es coneixen completament. Kimura et al. van demostrar que les tirosines Y568 i Y570 de la regió de jxtamembrana de KIT, estan involucrats en la unió i l'activació de les cinases de la família Src, necessàries per a una pigmentació normal (Kimura, Jones et al. 2004).

L'esterilitat que es troba en els mutants W i SI està vinculada a la pèrdua de protecció en front l'apoptosi de les cèl·lules germinals causada per KIT i també a causa dels defectes en la migració i proliferació causada per KIT (Loveland and Schlatt 1997). Una de les vies que semblen ser importants per a la funció de gametòcits és la via PI3-kinase/Akt (Blume-Jensen, Janknecht et al. 1998).

En el tracte gastrointestinal, trobem les cèl·lules intersticials de Cajal (ICC). Aquestes cèl·lules són KIT positives i regulen la motilitat de l'intestí. Una pèrdua completa de les ICC provoquen trastorns d'obstrucció intestinal (Lennartsson and Ronnstrand 2012).

La senyalització de KIT té un paper en la funció d'aprenentatge espacial de la regió del hipocamp del cervell. A més, KIT juga un paper important en la migració de les cèl·lules mare i progenitors neuronals als llocs de lesió en el cervell (Sun, Lee et al. 2004).

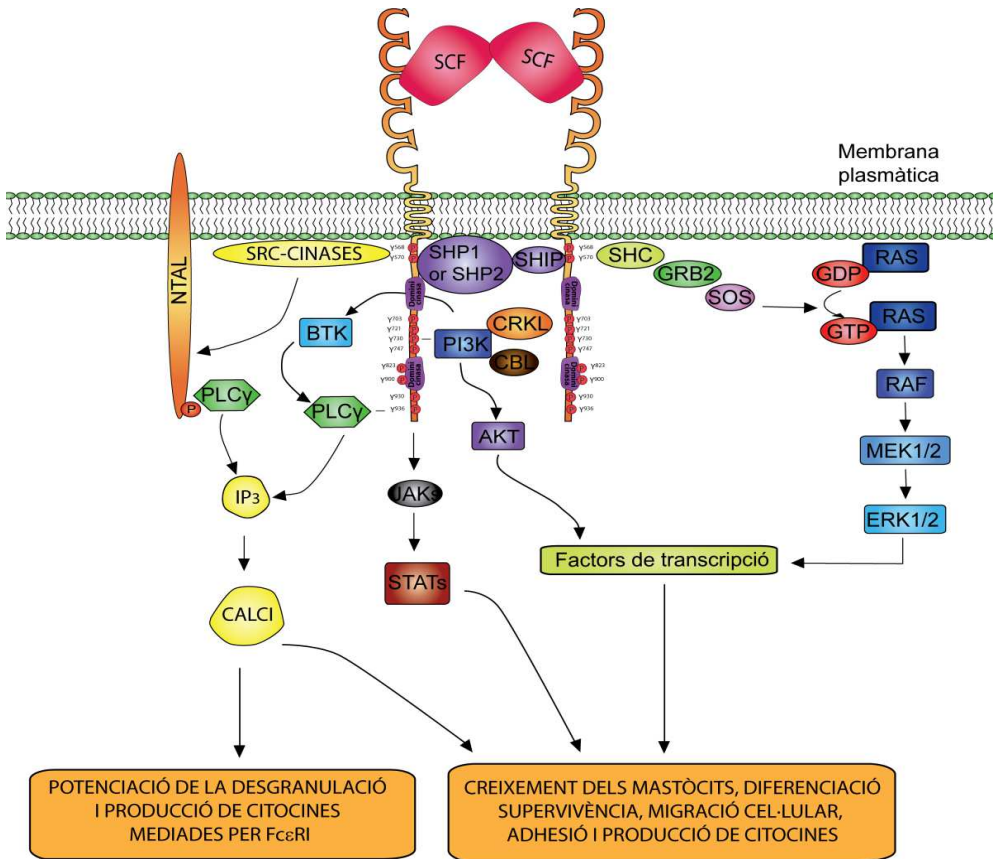
KIT també juga un paper important en la diferenciació de cèl·lules mare cardíques i la regulació de la diferenciació terminal de les cardiomiòcits (Li, Naqvi et al. 2008).

Dades recents suggereixen que el KIT té una funció important en el manteniment de la integritat del teixit pulmonar. Un possible mecanisme per explicar-ho, podria ser que KIT regule l'expansió de cèl·lules progenitores epitelials, i per tant protegiria el teixit pulmonar de la destrucció (Reinhard, Meyer et al. 2005; Lindsey, Ganguly et al. 2011).

## **7. TRANSDUCCIÓ DE SENYALS EN MASTÒCITS A TRAVÉS DEL RECEPTOR KIT**

Com hem descrit anteriorment KIT consta d'una part intracel·lular amb diferents tirosines fosforilables, la qual cosa indica que múltiples proteïnes s'hi poden unir. Així la PLC  $\gamma$ 1 s'uneix a la Tyr 936, la subunitat p85 de la PI3K a la Tyr 721, la família de les Src cinases Lyn i Fyn a les Tyr 568 i 570, les proteïnes adaptadores Grb2 a la Tyr 703 i 936 i SHC a les Tyr 568 i 570, i SHP-1 (Fosfatasa de tirosines en proteïnes que conté un domini SH2) en la Tyr 568 i 570 (Gilfillan and Rivera 2009).

Així, la senyalització causada per KIT involucra diferents vies de senyalització com poden ser la de la PI3K, les cinases de la família Src, les vies de la proteïna cinasa activada per mitògens (MAPK), fosfolipases, via de JAK-STAT. No obstant això, és important tenir en compte que aquestes vies no operen aïlladament i que s'integren en un circuit de senyalització.



**Figura 21. Esquema de la transducció de senyals en mastòcits a través del receptor KIT.** Basat en el model de Gilfillan i Tkaczyk, 2006 i Jensen et al., 2008.

## 7.1 Via PI3K

El receptor s'autofosforila i interactua amb el domini SH2 de la subunitat p85, el que resulta en un canvi de conformació en la subunitat enzimàtica associada p110, el que porta a la seva activació (Klippel, Escobedo et al. 1994). D'altra banda, la translocació des del citoplasma fins a la membrana plasmàtica, on es troba el receptor activat, posiciona la PI3K pròxima als seus substrats lipídics, donant lloc a la producció de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3). Una funció important de PIP3 és permetre a la membrana tenir llocs d'acoblament de proteïnes que contenen dominis PH, com ara la serina/treonina cinasa AKT, la cinasa BTK, entre d'altres.

PI3K és activada pel SCF tant a través de la unió directa amb la tirosina Tyr-721 al KIT (Lev, Givol et al. 1992; Serve, Hsu et al. 1994) o indirectament a través de la unió al complexa format per Gab2-Grb2 un cop el receptor és activat (Nishida, Wang et al. 2002; Yu, Luo et al. 2006; Sun, Pedersen et al. 2008).

AKT activat promou la supervivència de les cèl·lules per diferents vies, que inclouen la fosforilació de Bad (proteïna involucrada en el control d'alliberació de citocrom C de la mitocondria, un esdeveniment inicial en l'activació de la cascada de les caspases), Foxo, i l'activació del NF- $\kappa$ B (Blume-Jensen, Janknecht et al. 1998; Kitaura, Asai et al. 2000; Lennartsson and Ronnstrand 2012).

## 7.2 Via família Src cinases (SFK)

En resposta a l'estimulació del SCF, KIT es fosforila en dos residus a la regió juxtamembrana (Tyr-568 i Tyr-570) (Linnekin, DeBerry et al. 1997; Price, Rivnay et al. 1997; Krystal, DeBerry et al. 1998; Lennartsson, Blume-Jensen et al. 1999). Aquests llocs de fosforilació interactuen amb el domini SH2 de les SFK (Lennartsson, Blume-Jensen et al. 1999), desplaçant d'aquesta manera la cua carboxi terminal de la interacció intermolecular amb el domini SH2 de la Src cinasa, resultant una obertura de l'estructura i augment de l'activitat catalítica (Lennartsson and Ronnstrand 2012).

L'activació de les SFK, s'ha demostrat que contribueixen a l'activació de diverses vies de senyalització de KIT en la part distal com l'activació de les MAPK (Lennartsson, Blume-Jensen et al. 1999).

SFK són una part integral dels sistemes de senyalització de les respostes causades per KIT com la proliferació, la supervivència i la migració. D'altra banda, la naturalesa de la participació de SFK en les respostes a través de KIT és diferent en els diversos tipus cel·lulars, probablement és un reflex de quin membre de SFK i substrat s'expressen en el tipus cel·lular concret (Lennartsson and Ronnstrand 2012).

### 7.3 Via FOSFOLIPASA C i D

Com ja hem esmentat en l'apartat 4.2.3 l'enzim PLC catalitza la hidròlisi dels fosfolípids de la membrana (PIP<sub>2</sub>), generant diacilglicerol (DAG) i inositol 1,4,5 - trifosfat soluble (IP<sub>3</sub>). DAG interactua amb les proteïnes efectores, per exemple, certes isoformes de PKC promovent així la seva activació, mentre que IP<sub>3</sub> condueix a la mobilització de Ca<sup>2+</sup> de les reserves internes del reticle endoplasmàtic. Una altra lipasa que s'ha trobat que és important en la senyalització de KIT és la fosfolipasa D (PLD). La funció enzimàtica de la PLD és hidrolitzar la fosfatidilcolina dels lípids de membrana en àcid fosfatídic i colina soluble. L'àcid fosfatídic s' hidrolitza ràpidament a DAG per la hidrolasa d'àcid fosfatídic, fet necessari per l'alliberament d'àcid araquidònic, essencial en la síntesi d'eicosanoids, del mastòcits (Koike, Mizutani et al. 1993)

La PLC $\gamma$  conté dominis SH2 que els permeten interactuar amb els receptors de tirosina cinasa activats. S'ha trobat que la PLC $\gamma$  pot interactuar amb el residu de tirosina 730 en KIT. S'ha demostrat que la proliferació cel·lular es induïda per la associació de PLC $\gamma$  amb KIT activat (Gommerman, Sittaro et al. 2000; Trieselmann, Soboloff et al. 2003). També s'ha observat que KIT a través de l'activació de PLC $\gamma$  pot protegir les cèl·lules dels efectes de la radiació (Plo, Lautier et al. 2001; Maddens, Charruyer et al. 2002).

### 7.4 Via JAKs/STATs

La via de JAK-STAT s'activa després de l'estimulació amb SCF. KIT estimula la fosforilació ràpida i transitòria de la tirosina de JAK2 (Brizzi, Zini et al. 1994). JAK2 es troba associada constitutivament amb KIT, i amb l'estimulació de KIT a través del seu lligant s'incrementa aquesta associació (Weiler, Mou et al. 1996).

Les cinases Janus (JAKs), JAK1, JAK2, JAK3 són tirosines cinases citoplasmàtiques, que s'activen a través de l'estimulació del lligant de receptors de citocines o receptors tirosina cinases (RTK). JAK2 es requereix per la

diferenciació de cèl·lules progenitores KIT<sup>+</sup> a mastòcits (Kerr, Costa-Pereira et al. 2003; Ronnstrand 2004).

A la part distal de JAK trobem els transductors de senyals i activadors de la transcripció (STAT), que són fosforilats per JAK. Les proteïnes STAT són una classe de factors de transcripció amb dominis d'unió a ADN, un domini SH2 i un domini transactivador a la part carboxi-terminal. Després de la fosforilació de la tirosina, STAT dimeritza a través de la interacció fosfotirosina amb els seus dominis SH2, un cop dimeritzat es dirigeix cap al nucli, on regula l'expressió dels gens de resposta, (Kerr, Costa-Pereira et al. 2003) com són els de proliferació, producció de citocines, entre d'altres.

L'activació de KIT condueix a l'associació física amb JAK2 i activació de STAT1a, STAT3, STAT5A i STAT5B (Deberry, Mou et al. 1997; Ryan, Huang et al. 1997; Brizzi, Dentelli et al. 1999; Ning, Li et al. 2001). S'ha demostrat que l'activació de STAT3 es requereix pel mutant de KIT D816H que està constitutivament activat (Ning, Li et al. 2001).

## 7.5 Via MAPK

L'estimulació de KIT promou el reclutament del complex Grb2-Sos al receptor. Grb2 s'uneix al receptor a través de les tirosines Tyr-703 i 936 (Thommes, Lennartsson et al. 1999), però també ho pot fer a partir de Shc. La importància relativa de la unió indirecte de Grb2 a través de Shc no està clara. Apropant Sos en la proximitat de la GTPasa RAS provoca un intercanvi de nucleòtids de GDP a GTP, que indueix un canvi conformacional en RAS que li permet interactuar amb els seus efectors a la part distal. Un d'aquests efectors és la serina/treonina cinasa RAF. Amb la interacció amb RAS activat i translocat a la membrana plasmàtica, RAF s'activa a través d'un procés que implica tant la fosforilació i desfosforilació (Chong and Guan 2003). RAF fosforila i activa Mek1 / 2, que al seu torn pot fosforilar i activar ERK1/2. Moltes de les proteïnes en la part distal de ERK1/2 són

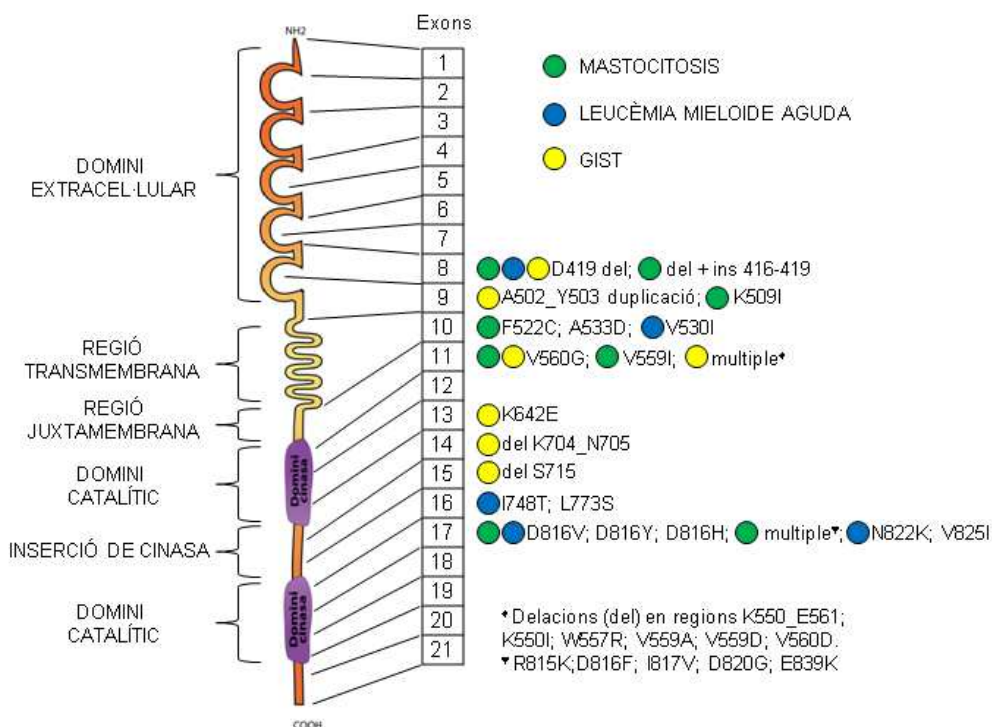
factors de transcripció, com c-Fos i Elk-1 involucrat en producció de citocines (Turner and Cantrell 1997).

S'ha demostrat que l'activació de KIT promou la fosforilació de Gab2 dependent de SFK, llavors Gab2 recluta SHP2, això és crític per la inducció de Rac / JNK , i també per l'activació de RAS parcialment. (Yu, Luo et al. 2006)

## **8. PATOLOGIA DE KIT I ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES**

Mutacions en el receptor KIT estan associades a processos patològics com les mastocitosi i processos tumorals com les leucèmies mieloides agudes. A més, KIT s'ha implicat en més del 80% dels casos de tumors de l'estroma gastrointestinal i en el carcinoma de cèl·lules petites de pulmó, melanomes malignes, càncer colonorectal. En aquests tipus de càncer mutacions en el gen KIT s'observen amb freqüència. S'han descrit més de 500 mutacions diferents de KIT en tumors humans. Tot i que les mutacions més comunes s'agrupen en l'exó 11 i l'exó 17 (Lennartsson and Ronnstrand 2012).

## 8.1. Patologia de KIT



**Figura 22. Esquema de les principals mutacions de KIT, exó que es troba afectat i malaltia implicada.** Basat en el model de Ashman i Griffith, 2013.

### 8.1.1 Mastocitosi

La mastocitosi és una malaltia que es caracteritza per un augment patològic del nombre de mastòcits als teixits. 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 (Metcalf 2008). Els símptomes de la mastocitosi (erupció cutània, urticària, etc.) es produeixen a causa de l'alliberament de mediadors dels mastòcits en els teixits. Encara que la malaltia en general avança lentament, en rares ocasions pot



transformar-se en leucèmia dels mastòcits altament maligne (Lennartsson and Ronnstrand 2012).

Sol aparèixer com una malaltia transitòria i limitada en nens, mentre que és persistent i progressiva en adults. A causa de la seva heterogènia, la mastocitosi es classifica en varies categories (Horny, Sotlar et al. 2007; Gotlib, Pardanani et al. 2013).

1) Mastocitosi cutània, malaltia benigna a on la infiltració dels mastòcits es concentra només a la pell: s'observa preferentment en nens i tendeix a revertir espontàniament.

2) Mastocitosi sistèmica, majoritàriament es diagnostica en adults i inclou varis subgrups

2.1) Mastocitosi sistèmica indolent és la forma més comú i afecta la pell, la medul·la òssia i el tracte gastrointestinal.

2.2) Mastocitosi sistèmica avançada, en la qual s'engloben:

2.2.1) Mastocitosi associada a un trastorn hematològic, es refereix als casos en què els símptomes d'urticària pigmentosa s'acompanyen d'una varietat de troballes hematològiques causades per la infiltració de mastòcits en la medul·la òssia, la melsa, el fetge i els ganglis limfàtics.

2.2.2) Leucèmia de mastòcits, es caracteritza per la proliferació i la infiltració de mastòcits immadurs a la medul·la òssia, sang perifèrica, i diversos teixits extramedul·lars.

2.2.3) Mastocitosi agressiva, es caracteritza per l'afectació greu de la medul·la òssia, el fetge, la melsa, i el sistema limfàtic. Gairebé tot els casos presenten la mutació D816V, localitzat en l'exó 17.

3) Tumors de mastòcits localitzats extracutanis, tan malignes com benignes.

El pronòstic de la mastocitosi depèn molt del tipus. Tot i que la mastocitosi indolent, la forma més comuna, no és generalment fatal, les altres tres formes de mastocitosi avançada ho poden ser (Lennartsson, Jelacic et al. 2005).

Les mutacions d'activació de KIT es troben en gairebé tots els pacients adults amb mastocitosi. Entre elles, més del 90 % dels pacients presenten la mutació D816V, encara que també podem observar mutacions D816Y/H (Longley, Metcalfe et al. 1999; Garcia-Montero, Jara-Acevedo et al. 2006).

L'expressió alterada de SCF també pot estar implicada en la mastocitosi (Lennartsson, Jelacic et al. 2005).

### **8.1.2 Tumors gastrointestinals**

Els tumors gastrointestinals (GIST) són els tipus de tumor d'origen mesenquimal més comú en el tracte gastrointestinal. No obstant això, representen només l'1 % de tots els tumors gastrointestinal (Corless, Fletcher et al. 2004). S'originen en les cèl·lules intersticials de Cajal (ICC). Tot i que és un tumor maligne, poques vegades fa metàstasi als ganglis limfàtics. Gairebé totes les GIST expressen KIT, i aproximadament entre el 80-85% dels casos son mutacions en l'activació de KIT, mentre que una petita part, aproximadament un 6% dels casos trobem mutacions en el receptor PDGF alfa (Corless, Fletcher et al. 2004).

Les mutacions es localitzen en l'exó 11, que codifica la regió juxtamembrana de KIT (Hirota, Isozaki et al. 1998). Aquesta regió en la proteïna salvatge està associada amb el primer domini cinasa i suprimeix la seva activitat cinasa. Les mutacions en aquesta regió condueixen a un alliberament d'aquesta repressió i l'activació de la tirosina cinasa (Mol, Dougan et al. 2004). Altres mutacions no tan comunes es troben en l'exó 9, que codifica la part extracel·lular de KIT, i l'exó 17, que codifica les regions dins del segon domini cinasa. Tot i això, la mutació més comú vista en altres neoplàsies malignes, D816V, poques vegades es detecta en les GIST .

### 8.1.3 Leucèmia mieloide aguda

Aproximadament en el 85% del casos de leucèmia mieloide aguda expressen majoritàriament KIT fosforilat constitutivament (Heinrich, Blanke et al. 2002). Tot i que el receptor de tirosina cinasa mutat més comú en la leucèmia mieloide aguda (LMA) és la FLT3, en certs subtipus de LMA, presenten el KIT mutat a l'exó 17(D816X, N822K) (Paschka, Marcucci et al. 2006).

### 8.1.4 Altres patologies

També s'ha trobat mutacions de KIT en melanoma, anafilaxi, carcinoma testicular i carcinoma de cèl·lules petites de pulmó (SCLC). En el cas del melanoma s'han descrit diferents mutacions, algunes s'han trobat en diverses ocasions, com són L576P en l'exó 11 i K642E en l'exó 13, tot i que, la mutació D816X s'ha descrit en els melanomes, no sembla ser tan comuna com les altres dues (Lennartsson and Ronnstrand 2012). En el cas de l'anafilaxi, certs estudis van determinar que en un 43% dels pacients presentaven la mutació D816V (Lawley, Hird et al. 2005). En el carcinoma testicular aproximadament un 25% dels casos, presenten mutacions en l'activació de KIT, concretament en l'exó 17, on la mutació més comuna és D816V/H (Oosterhuis and Looijenga 2005). La sobreexpressió de KIT ha estat reportat en el 70% dels pacients de SCLC (Sekido, Obata et al. 1991; Hida, Ueda et al. 1994). No obstant això, encara és en debat si l'expressió de KIT pot tenir transcendència en el pronòstic (Fischer, Marinov et al. 2007).

## 8.2 Estratègies terapèutiques

Per combatre aquest processos patològics es duen a terme diferents teràpies, aplicant tractament amb inhibidors de l'activitat cinasa del receptor. El component més àmpliament reconegut que bloqueja l'activitat catalítica de KIT es l'imatinib mesylate (imatinib), també conegut com Gleevec o Glivec. L'imatinib és el primer inhibidor de tirosin cinasa aprovat pel tractament de malalties humanes. L'objectiu de l'imatinib és ocupar el lloc d'unió a l'ATP, així manté el receptor en un estat de

repòs. És relativament selectiu, a part de KIT, s'ha reportat que també inhibeix Bcr-Abl i PDGFR. Això explica perquè l'imatinib indueix relativament pocs efectes secundaris i és tolerable (Levitzki and Mishani 2006). L'imatinib no només bloqueja KIT normal o endogen, sinó també KIT amb la mutació V560G (Heinrich, Griffith et al. 2000). No obstant, la mutació D816V associada a la mastocitosi sistèmica és resistent a la inhibició de l'imatinib, presenta doncs una resistència primària, deguda al canvi de la configuració del lloc d'unió a l'ATP per la mutació, bloquejant així, el lloc d'unió de l'imatinib a KIT (Scheinfeld 2006). Posteriorment, s'han identificat altres compostos que inhibeixen l'activitat catalítica del KIT amb la mutació D816V, com dasatinib, midostaurin, entre d'altres (Jensen, Akin et al. 2008). Aquests compostos són inhibidors multicinasa i, per tant, menys específics que l'imatinib.

S'ha observat que en pacients tractats amb aquests inhibidors apareixen resistències secundàries, gairebé sempre, per mutacions secundàries presents en el mateix al·lel de la mutació inicial. Les mutacions secundàries més comunes es troben en els exons 13 i 14, resultants de la substitució dels aminoàcids V654A o T670I, que confereixen resistència a l'imatinib interferint el lloc d'unió de la droga.

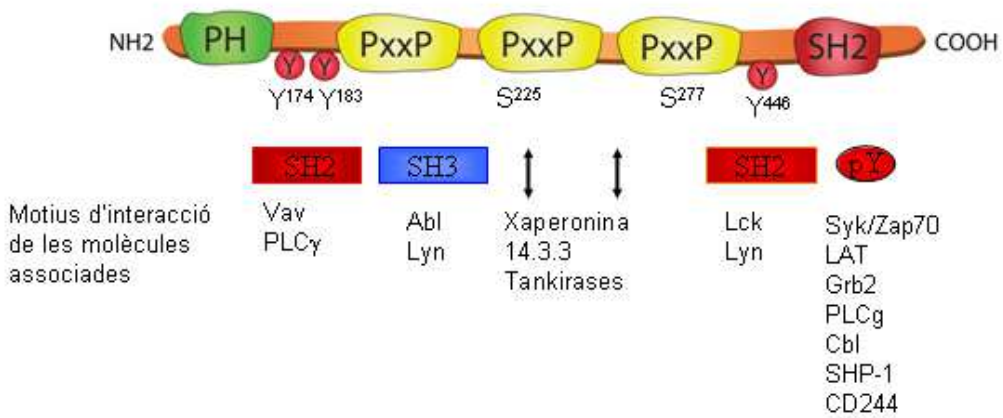
S'han trobat que certs inhibidors de VEGFR, a més, poden inhibir KIT, però, la seva capacitat per inhibir la mutació de KIT D816V no està reportada. Sunitinib (SU11248), per exemple, inhibeix el VEGFR, PDGFR, KIT, FLT3 i s'ha mostrat que inhibeix certes mutacions de KIT com la mutació V559D i V559D/T670I presents en la mastocitosi sistèmica i mutacions de KIT resistents a imatinib en tumors de l'estroma gastrointestinal (V645A i T670I) (Prenen, Cools et al. 2006; Chow and Eckhardt 2007; Patnaik, Tefferi et al. 2007).

El tractament d'elecció dependrà de les mutacions en KIT i de les resistències generades, per la qual cosa es requereix d'un estudi i tractament personalitzat. La recerca de nous agents terapèutics i el tractament combinat seran doncs fonamentals per garantir l'eradicació dels tumors.

## 9. LA MOLÈCULA ADAPTADORA 3BP2

El 3BP2 és una proteïna adaptadora citosòlica d'uns 80 kDa, s'expressa preferentment en cèl·lules del sistema immune. Es va identificar per primera vegada com una proteïna d'unió a la proteïna-tirosina cinasa (PTK) c-Abl (Ren, Mayer et al. 1993). Es localitza en el braç curt del cromosoma 4 p16.3.

### 9.1 Estructura del 3BP2



**Figura 23. Esquema de l'estructura del 3BP2, i molècules associades.** Representació gràfica de l'arquitectura del 3BP2 indicant els dominis estructurals i motius que modulen la interacció amb els motius de les proteïnes amb les quals estableix una associació. Basat en el model de Alvarez-Errico et al., 2009.

Està composta per un domini PH a l'extrem amino-terminal, una regió central amb tres dominis rics en prolines i motius tirosina i serina susceptibles a la fosforilació i a l'extrem carboxi-terminal un domini SH2 (Ren, Mayer et al. 1993; Deckert, Tartare-Deckert et al. 1998). Diversos estudis han determinat que el 3BP2 participa en l'activació de diferents cèl·lules de llinatge limfoide i mieloide, ja que la seva arquitectura modular li permet establir interaccions amb una diversitat de proteïnes que intervenen la senyalització intracel·lular de diferents receptors (Deckert, Tartare-Deckert et al. 1998; Jevremovic, Billadeau et al. 2001; Sada,

Miah et al. 2002; Foucault, Liu et al. 2003; Maeno, Sada et al. 2003; Foucault, Le Bras et al. 2005; Qu, Kawauchi-Kamata et al. 2005; Saborit-Villarroya, Del Valle et al. 2005; Saborit-Villarroya, Martinez-Barriocanal et al. 2008).

## 9.2 Funcions del 3BP2 en cèl·lules del sistema immune

### *Cèl·lules T*

En el limfòcit T, en situació basal el 3BP2 es distribueix entre el citosol i la membrana, després de l'activació del receptor per l'antigen (TCR), el 3BP2 es fosforila i transloca a rafts (Deckert, Tartare-Deckert et al. 1998). El domini SH2 del 3BP2 interacciona directament amb el domini catalític de Syk, cinasa que fosforila el 3BP2 en diferents residus tirosina (174, 183, 446) (Deckert, Tartare-Deckert et al. 1998; Maeno, Sada et al. 2003). S'ha descrit que, en un sistema de llevats, el 3BP2 murí estableix interaccions directes amb la cinasa Fyn (Deckert, Tartare-Deckert et al. 1998). En limfòcit T, el domini SH2 de Lck interacciona amb la tirosina 446 fosforilada del 3BP2 (Qu, Kawauchi-Kamata et al. 2005). Després de l'activació del TCR in vitro, el domini SH2 del 3BP2 coprecipita amb un complex compost per LAT, Grb-2, PLC $\gamma$ , Cbl i Zap70. També Vav-1 està integrat en el multicomplex articulat pel 3BP2, tot interaccionant amb la tirosina 183 fosforilada de l'adaptador (Zakaria, Gomez et al. 2004). El 3BP2 promou la transcripció del gen de la IL-2 tot activant els factors de transcripció d'aquesta citocina: NFAT i AP-1. El 3BP2 a través dels seus dominis SH2 i PH i amb la col·laboració de Syk, assegura l'activació de Vav-1, Ras, Rac i Calcineurina, proteïnes involucrades en l'activació d'AP-1 i NFAT (Deckert, Tartare-Deckert et al. 1998; Qu, Kawauchi-Kamata et al. 2005).

### *Cèl·lules B*

En l'activació del receptor per l'antigen de la cèl·lula B, el 3BP2 també hi participa activament (Foucault, Le Bras et al. 2005). En aquest tipus cel·lular el 3BP2 interacciona amb Syk, Vav-1 i la PLC $\gamma$ , molècules que intervenen en l'activació de NFAT (Foucault, Le Bras et al. 2005).

La funció del 3BP2 en el limfòcit T i B, està regulada a través de la interacció amb la xaperonina 14.3.3 (Foucault, Liu et al. 2003). La fosforilació per la PKC o la PKA en les serines S225 i S277 de la regió rica en prolines del 3BP2, incrementen la interacció constitutiva amb la xaperonina 14.3.3, fenomen que condueix a una inhibició de NFAT i terminació de l'activitat positiva (Foucault, Liu et al. 2003).

### *Natural killer (NK)*

Pel què fa l'activació de la cèl·lula NK, el 3BP2 incrementa la resposta citotòxica (Jevremovic, Billadeau et al. 2001). Durant l'activació dels receptor Fc de la cèl·lula NK, el 3BP2 es fosforila i s'associa a molècules efectores: a través del domini SH2 interacciona amb LAT i mitjançant la tirosina 183 fosforilada, recluta Vav i PLC $\gamma$ . Per assegurar una bona citotoxicitat mitjançada per receptors Fc cal un 3BP2 complet; tots els seus dominis i tirosines són imprescindibles (Jevremovic, Billadeau et al. 2001). En aquestes cèl·lules s'observa la interacció del 3BP2 amb CD244 (Saborit-Villarroya, Del Valle et al. 2005). CD244 és un membre de la família de CD150 i posseeix ITSMs en la regió citoplasmàtica. La unió del CD244 a 3BP2 provoca la fosforilació de la tirosina Y183 de 3BP2 i el reclutament de Vav1 a 3BP2. La sobreexpressió de 3BP2 augmenta la citotoxicitat causada per CD244, però no la secreció d'IFN $\gamma$ . Aquests resultats demostren que 3BP2 té un paper regulador sobre la citotoxicitat causada per cèl·lules NK (Saborit-Villarroya, Martinez-Barriocanal et al. 2008).

### *Neutròfils*

La funció del 3BP2 en neutròfils es veu gràcies a la generació del ratolí genoanul·lat, el qual, és incapaç de muntar una resposta efectiva a una infecció aguda per *L. Monocytogenes*. Els neutròfils d'aquests ratolins són defectuosos en el rastreig intravascular i migració endotelial en resposta a fMLF (N-formylmethionyl oligopeptids) in vivo. La incapacitat dels neutròfils Sh3bp2<sup>-/-</sup> per respondre a fMLF in vivo es reflecteix en la seva incapacitat per produir una resposta quimiotaxis a un gradient de fMLF in vitro. D'altra banda, neutròfils que

no tenen 3BP2 fallen en la polarització del seu citoesquelet d'actina cap al gradient fMLF, un pas obligat durant la quimiotaxis. Els neutròfils no són capaços de generar nivells normals de espècies reactives d'oxigen (ROS) a fMLF in vitro. Aquestes observacions proporcionen l'evidència que 3BP2 es necessari per la polarització de l'actina i la producció de ROS en els neutròfils (Chen, Dimitriou et al. 2012).

### *Osteoclast*

El procés de diferenciació dels osteoclasts a partir de precursors monocítics implica l'activació del receptor activador de NFκB (RANK), un gran nombre de molècules de senyalització i factors de transcripció (Teitelbaum and Ross 2003). És ben sabut que un esdeveniment crucial durant la osteoclastogènesi és la regulació de NFATc1, un membre de la família de factors de transcripció NFAT, l'activitat transcripcional del qual està regulat per la calcineurina fosfatasa dependent de  $Ca^{2+}$  (Takayanagi 2007). Durant la fase primerenca de la diferenciació dels precursors d'osteoclasts, la inducció inicial de proteïna NFATc1 després de la interacció RANK / RANKL està intervinguda per una via dependent de TRAF6 i condueix a l'autoamplificació de NFATc1, que a continuació regula l'expressió de gens osteoclastogènics implicats en la maduració dels osteoclasts i la resorció d'os (Boyle, Simonet et al. 2003; Teitelbaum and Ross 2003; Takayanagi 2007). El 3BP2 connecta la senyalització de RANK amb l'activació de NFATc1, i ho fa a través de reclutament de molècules que s'associen al 3BP2 i que participen en el desenvolupament ossi com són Abl (Li, Boast et al. 2000), Src (Soriano, Montgomery et al. 1991), PLCγ (Mao, Epple et al. 2006), Cbl (Tanaka, Amling et al. 1996), i Vav3 (Faccio, Teitelbaum et al. 2005). Les interaccions observades de 3BP2 amb Src, Syk i Vav en cèl·lules mieloides proporcionen algunes idees de com 3BP2 podria participar en la formació d'osteoclasts intervinguda per RANK i la reorganització del citoesquelet (GuezGuez, Prod'homme et al. 2010; Levaot, Simoncic et al. 2011).



### 9.3 Deficiències en 3BP2

S'han obtingut dos ratolins genoanul·lats del 3BP2. En el primer, de la Fuente et al (2006), observa una deficiència en la diferenciació i activació de les cèl·lules B, però no en el desenvolupament i activació de les cèl·lules T. La via de senyalització de les pre-BCR és clau per la transició de les cèl·lules pre-B a cèl·lules B immadures i involucra vies similars de senyalització activades per BCR. La deficiència en la via de les pre-BCR pot resultar una acumulació de cèl·lules pre-BCR en el ratolí genoanul·lat. Aquest ratolí també mostra un increment de cèl·lules B T1 i disminució de les cèl·lules B T2 en la melsa, consistent amb el paper de senyalització del BCR en el desenvolupament de les cèl·lules T1 cap a T2. S'observa nivells normals de fosforilació de Syk i AKT, tot i que s'observa una disminució de l'activitat de PLC $\gamma$ 2 provocant una disminució de la mobilització de calci en aquests ratolins després de l'activació pel BCR, això suggereix que 3BP2 és important per l'activitat transcripcional, dependent de calci, de NFAT després de la lligació de BCR. També es veu afectada la via de les MAPK (de la Fuente, Kumar et al. 2006).

En el segon, Chen et al (2007) mostra que per una òptima senyalització del receptor de les cèl·lules B, 3BP2 és necessari i és part del complex coestimulador CD19 i té una funció distintiva en els limfòcits B implicats en la resposta humoral de TI-2 (timus independent). Els ratolins que no tenen 3BP2 tenen una disminució en les cèl·lules B B1 peritoneals i acumulen cèl·lules B en la zona marginal (MZ) que demostren tenir una major sensibilitat a la mort cel·lular in vitro, induïda pel receptor. Cèl·lules B de la melsa i de la zona marginal en els ratolins genoanul·lats deixen de proliferar, sobreviure i senyalitzar de forma òptima, després de l'activació del receptor. Les poblacions de cèl·lula B B1 i les de la zona marginal estan disminuint en nombre o funció o ambdues amb l'absència del 3BP2, conduint a una resposta defectuosa TI-2 in vivo. Després de l'activació de la cèl·lula B a través del BCR s'observa una fosforilació atenuada de Syk comparant amb les cèl·lules control, però no es veu afectació de Abl, ERK,

AKT o PLC $\gamma$ 2. Tot i que hi ha una reducció del flux de calci. Per tant, en absència del 3BP2, els subòptims senyals del BCR afecten la via de desenvolupament de les cèl·lules B perifèriques, de la zona marginal i les cèl·lules B1, i impedeixen la supervivència in vitro i funcions in vivo de les cèl·lules B de la zona marginal en resposta a l'activació del BCR (Chen, Dimitriou et al. 2007).

#### 9.4 Mutacions del 3BP2

Mutacions en el gen que codifica pel 3BP2 obtenint un guany de funció, en la regió p16.3 del cromosoma 4, s'han relacionat amb una malaltia autosòmica dominant poc freqüent anomenada querubisme (Ueki, Tiziani et al. 2001). Aquesta malaltia es caracteritza per una degradació excessiva dels ossos de les mandíbules superior i inferior, seguida de l'aparició de bosses cístiques plenes d'una massa tissular fibrosa composta per osteoclasts patològicament activats i cèl·lules estromals.

Les mutacions responsables d'aquesta malaltia es concentren en la seqüència peptídica RSPPDG entre les regions riques en prolines i el domini SH2, Levaot et al i Guettler et al, mostren que el guany de funció del 3BP2 és degut a la pèrdua o manca de degradació del 3BP2 causada per les Tankirases (TNKS) (Guettler, LaRose et al. 2011; Levaot, Voytyuk et al. 2011).

Les tankirases formen part de la família de les poly(ADP-ribose)polimerases; existeixen dues Tankirases TNKS i TNKS2, totes dues s'uneixen a 3BP2, però les mutacions del querubisme no permeten la unió entre 3BP2 i la TNKS2. La TNKS2 està formada per cinc ARCs, cada ARC està format per cinc grups repetits d'ankirin (estructura constituïda per un loop-helix1-loop-helix2-loop), un domini SAM (sterile-alpha motif, domini que media l'oligomerització de les tankirases) i un domini PARP (domini catalític de la poli(ADP-ribosa) polimerasa). Com es mostra en l'estudi 3BP2 s'uneix a través del motiu d'unió format per 8 aminoàcids (RSPPDGQS) al ARC4 de la TNKS2. Les mutacions del querubisme no permeten la interacció del 3BP2 amb la TNKs i la subsegüent ADP-ribosilació

que comporta la ubiquitinilació de la proteïna mitjançant l'acció de la E3-ubiquitin lligases, RNF 146, i posterior degradació al proteosoma.

En mutacions trobades en el querubisme, el 3BP2 no es degrada, per tant trobem elevats nivells de proteïna, fet suficient per induir un increment de l'activació d'osteoclast i una elevada secreció de TNF $\alpha$  en macròfags, dos característiques crítiques del fenotip del querubisme. Aquests estudis han posat de manifest que els nivells d'expressió proteica de 3BP2 representen un factor limitant per l'activitat de Src, Syk i Vav que conduiran a l'activació dels osteoclasts (Guettler, LaRose et al. 2011; Levaot, Voytyuk et al. 2011).

Ueki et al. són els primers a establir un model experimental de la malaltia, introduint la mutació més comuna del querubisme (P416R) en el gen del SH3BP2 del ratolí, creant un model de ratolí knock-in. En aquest estudi, es demostra que el 3BP2 regula la diferenciació dels monòcits del moll d'os cap a osteoclasts i macròfags a través de la via de senyalització dels receptor M-CSF i RANKL que impliquen el control de l'activitat d'ERK  $\frac{1}{2}$  i la cinasa Syk (Ueki, Lin et al. 2007).

Així doncs, la molècula adaptadora 3BP2 participa en la regulació de processos inflamatoris, citotòxics i de diferenciació cel·lular en el sistema immune. La xarxa d'interaccions moleculars que involucren 3BP2 també participen en les cascades de senyalització dels mastòcits a través dels seus receptors més importants. En aquesta tesi varem estudiar el paper de 3BP2 en la biologia i funció del mastòcit.

# II. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS



## 1. PLANTEJAMENT

Els mastòcits són cèl·lules claus en la immunitat innata i adaptativa i són les cèl·lules efectores en el processos asmàtics, al·lèrgics i altres patologies d'origen inflamatori. La seva activació indueix l'alliberació de mediadors pro inflamatoris localitzats en els grànuls citoplasmàtics, però també la síntesi de novo de citocines, quimiocines i mediadors d'origen lipídic com els eicosinoids.

3BP2 (SH3-binding protein 2) és una proteïna adaptadora citoplasmàtica, d'expressió preferent en el sistema hematopoietic. El grup d'investigació on s'emmarca la tesi va caracteritzar la rellevància d'aquesta molècula adaptadora en la senyalització del receptor CD244 i en l'alliberació de grànuls citotòxics en la cèl·lula NK. El mastòcits desgranulen de forma similar després de l'agregació del receptor d'alta afinitat per la IgE (FcεRI). El grup de Yamamura (Sada et, al. Blood, 2002) havia descrit que la sobreexpressió del domini SH2 de 3BP2 en una línia cel·lular de mastòcits de rata (RBL-2H3) inhibia la desgranulació cel·lular suggerint un paper important de 3BP2 en la funció mastocitària.

Malgrat això , l'expressió i funció de 3BP2 en mastòcits humans era desconeguda. Així ens varem proposar estudiar-la seguint el següent esquema d'objectius generals i específics:.

## 2. OBJECTIUS GENERALS

- Caracteritzar l'expressió i funció del 3BP2 en mastòcits humans.
- Estudiar les vies de senyalització en que participa en mastòcits humans.
- Identificar lligands extracel·lulars i intracel·lulars del 3BP2 .
- Estudiar les implicacions de 3BP2 en patologia en el context del mastòcit.

### 3. OBJECTIUS ESPECÍFICS

- Estudiar la funció del 3BP2 en varies línies cel·lulars humanes mastocitàries: LAD2 i HMC-1 i en cultius primaris de mastòcits diferenciats a partir de progenitors CD34+
- Analitzar la funció del 3BP2 en les vies de senyalització que inicien els receptors FcεRI i KIT
- Determinar quines proteïnes involucrades en la senyalització iniciada per aquests receptors formen part del signalosoma del 3BP2
- Identificar lligands de 3BP2 utilitzant tècniques bioquímiques.
- Identificar lligands del 3BP2 mitjançant la tècnica del triple híbrid i l'ús de llibreries d'expressió de cDNA procedent del moll de l'os.
- Estudiar la regulació de l'expressió i funció de 3BP2 en patologies d'origen mastocitari i en malalties on el receptor KIT es troba mutat.

# III. MATERIAL I MÈTODES





## 1. LÍNIES CEL·LULARS I REACTIUS

### 1.1 Línies cel·lulars

**Línia cel·lular LAD-2 (Laboratory of allergic diseases 2):** Mastòcits humans. Condicions de cultiu: Medi StemPro-34 Sèrum Free Media (SFM) complementat amb StemPro-34 Nutrient Supplement, 1% de penicilina-estreptomina (mixture 5k/5k), 1% de L-glutamina a 200mM i 100µg/ml de SCF. El medi de cultiu és de Invitrogen Life Technologies, de LONZA la L-glutamina, penicil·lina-estreptomina. El SCF és de PeproTech EC Ltd. Procedents dels Drs. A. Kirshenbaum i D.D. Metcalfe.

**Línia cel·lular HMC-1 (Human Mast cell leukemia cells):** Mastòcits humans que contenen dues mutacions Asp816Val i Val560Gly en el receptor KIT. Condicions de cultiu: Medi RPMI 1640 complementat amb 10% de sèrum boví fetal (FCS) inactivat per calor, 1% de penicilina-estreptomina (mixture 5k/5k), 1% de L-glutamina A 200mM. Tots els reactius són de LONZA, excepte el Fetal que és Biosera. Procedents del laboratori del Dr. J.H. Butterfield.

**Línia cel·lular GIST 882 (Tumors gastrointestinals):** cèl·lules gastrointestinals procedents d'un pacient sensible al Imatinib, que contenen una mutació Lys642Glu, en l'exó 13 del receptor KIT. Condicions de cultiu Medi RPMI 1640 complementat amb 15% de sèrum boví fetal (FCS), 1% de penicilina-estreptomina (mixture 5k/5k), 1% de L-glutamina A 200mM. Procedents del laboratori del J.A. Fletcher.

**Línia cel·lular GIST 48/48B (Tumors gastrointestinals):** GIST 48: cèl·lules gastrointestinals procedents d'un pacient resistent al Imatinib, que contenen dues mutació Val560Asp en l'exó 11 i Asp820Ala en l'exó 17 del receptor KIT. GIST 48B: línia cel·lular 48 on s'ha silencià el receptor KIT. Condicions de cultiu Medi Ham's F10 (500ml) complementat amb 90ml de sèrum boví fetal (FCS), 6ml de penicilina-estreptomina (mixture 5k/5k), 6ml de L-glutamina a 200mM, 1ml

MITO+sèrum extender, 2ml de Bovine pituitary Extract (BPE). El MITO i BPE són de Biosciences Becton Dickinson (BD). Procedents del laboratori del J.A. Fletcher.

**Línia cel·lular COS-7:** Fibroblasts de mico verd africà. Condicions de cultiu: Medi DMEM complementat amb 10% de sèrum boví fetal (FCS), 1% de penicilina-estreptomicina (mixture 5k/5k), 1% de L-glutamina A 200mM.

**Línia cel·lular 293 LTV:** Cèl·lules humanes embrionàries de ronyó. Condicions de cultiu: Medi DMEM complementat amb 10% de sèrum boví fetal (FCS) inactivat per calor, 1% de penicilina-estreptomicina (mixture 5k/5k), 1% de L-glutamina A 200mM, 1% de Piruvat sòdic 100mM (GIBCO. Invitrogen).

## 1.2 Reactius

### 1.2.1 Anticossos

Anticossos anti-3BP2 (clone 470), anti-3BP2 C5, anti-KIT (clone Ab 81), anti-pAKT 1/2/3 (Ser 473), anti Myo1f (B-5) i anti-PLC $\gamma$  de Santa Cruz Biotechnology.

Anticòs anti-Ly9 (CD229) produït en el laboratori (Martin, Del Valle et al. 2005).

Anticòs anti- $\beta$ -Actina (AC-15), anti- $\alpha$ -Tubulin (DM1A) i anti-Flag m2Ab (fusion proteins) de Sigma-Aldrich

Anticòs anti-Syk de Biolegend.

Anticossos anti-phosphotyrosine i anti-total ERK de Zymed Laboratories (Invitrogen).

Anticòs anti-pSTAT1 (ST1P-11A5) de Invitrogen.

Anticossos anti-LAT, anti-pLAT Y191, anti-pSyk Y352, anti-pPLC $\gamma$ 1 Y783, anti-pP38 Thr180/Tyr182, anti-p-ERK Thr202/Tyr204, anti-MITF (D5G7V), anti-Akt, anti-pKIT Tyr 703 (D12E12), anti-PDGFR $\alpha$  i anti-p-JNK Thr183/Tyr185 de Cell Signaling.

Anticòs anti-GFP (clon 7.1 i 13.1) de Roche Molecular Biochemical.

Anticòs anti-mouse IgG conjugat a peroxidasa de DAKO

Anticòs anti-rabbit IgG conjugat a peroxidasa de BioRad.

Anticòs rabbit anti-Mouse IgG Antibody, Cy3 conjugate Millipore (AP160C) [1.4mg/ml]

### 1.2.2 Reactius

- Puomicina (dihydrochloride from Streptomyces alboniger) de Sigma-Aldrich.
- Estreptavidina (STV) recombinant (de Streptomyces avidinii) de Sigma-Aldrich.
- Tampó d'alliberació de  $\beta$ -Hexosaminidasa o Buffer release (HRB): (10mM HEPES, 137mM NaCl, 2.70mM KCl, 0.4mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6mM (D)-glucosa, 1.8mM CaCl<sub>2</sub>, 1.3mM MgSO<sub>4</sub>, 0.025% BSA, filtrat estèril).
- Tampó de Lisi: 1% Tritó X-100, 50mM Tris-Base (pH 7.4), 150mM NaCl, 100mM

NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride), 1mM NaPirofosfat.

- Sample buffer per llisar HuMCs, LAD2 i HMC-1 (20ml). NuPage LDS Sample Buffer (4x)10ml; LB 4x 4ml; 0.5M DTT 4ml;  $\beta$ -Mercaptoetanol 2ml. 5x Phosphatase inhibitor (10ml): Sodium Fluoride (NaF) 105mg; Sodium Orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) 9mg; Sodium Pyrophosphate 650mg; TBS fins a 10ml. LB 4x (10ml): Protease inhibitor cocktail 8 tablets; 5x Phosphatase inhibitor 8ml; Sigma Protease inhibitor cocktail 2ml; Dichloroïsocoumarin (5mg resuspès en 110 $\mu$ l DMSO) 44 $\mu$ l; Benzamidina 1M 40 $\mu$ l. Barrejar-ho en un vas de vidre a 50°C, no tot es dissolt.

- Buffer de Lysis 2x per immunoprecipitar (10ml): Tris 1M-pH=7.5 (0.4ml), NaCl 1M (3ml), H<sub>2</sub>O miliQ (6.6ml), Tritó 2% (200µl), inhibidors de fosfatases i proteases 2x (100mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride), 1mM NaPirofosfat 200µl), cocktail de inhibidors 2x (400µl), OBG 40mM (10ml – 117mg).
- Tampó de càrrega (3X): 200mM Tris pH 8.6; 6% SDS, 0.06% Bromophenol, 5% 2-β-Mercaptoetanol, 30% Glicerol.
- 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
- Tampó de stripping, pH 2-3, 1L: 8.75gr NaCl; 1.57gr Trizma.
- Tampó de bloqueig (20ml): 0.2% llet desnatada (0.04gr), 2% FCS (0.4ml), 1% BSA (0.2gr), 0.01% tritó X-100 (2µl), 0.01% NaN<sub>3</sub> (20µl al 10%), 20% Sèrum de conill (4ml), PBS fins a 20ml.
- Tampó fixador : 4% PF(Paraformaldehyd), PBS. El PF esta al 16% amb H<sub>2</sub>O, afegim PBS 2x quedant al 8% amb PBS 1x i d'aquí afegim el doble del volum per tenir al 4% amb PBS 1x.
- Tampó de permeabilització (5ml):0.05% Saponina (0.0025gr), PBS fins a 5ml.
- Tampó per diluir anticòs (10ml): 1% BSA (0.1gr), 0.01% NaN<sub>3</sub> (10µl al 10%), PBS fins a 10ml.

## 2. DIFERENCIACIÓ DE PROGENITORS CD34+ A MASTÒCITS HUMANS

Aquest protocol detalla el mètode per diferenciar mastòcits humans a partir de cèl·lules progenitores CD34+ procedents de sang perifèrica de donant sans. Procedeixen del laboratori de malalties al·lèrgiques dirigit per Alasdair M. Gilfillan, Ph.D.

Tipus cel·lular: Progenitors CD34+

Reactius: STEMPRO-34 de Invitrogen

Penicillin-Streptomycin Mixture 5k/5k (1%) de LONZA

L-Glutamine (200mM)(1%) de LONZA

Recombinant Human IL-6, SCF i IL-3 de PEPROTECH

Procediment:

- Descongelar a 37°C (procés ràpid), afegim a un tub amb 10 ml de medi Stem Pro (precalentat a 37°C).
- Centrifugar les cèl·lules 1000rpm durant 5'
- Eliminem el medi amb pipeta
- Resuspendre el pèl·let en 10ml de medi Stem Pro.
- Barregem agafem una petita part per comptar.
- Deixem les cèl·lules a una concentració aprox.  $[0.1 \times 10^6 \text{ cell/ml}]$ . Depenent d'això posarem mes o menys medi al igual que la quantitat de citocines.
- En la setmana 0: posem SCF (0.1µg/ml), IL-6 (0.1µg/ml) i IL-3 (30ng/ml).

- En les següents setmanes ja només posarem SCF (0.1µg/ml), IL-6 (0.1µg/ml)
- Setmana 1 i 2 no podem centrifugar per tant anirem afegint volum, sempre com a mínim dividir a la meitat.
- Setmana 3 ja podem centrifugar eliminant la meitat de medi i afegint meitat de fresc, sempre mirant la concentració de les cèl·lules sigui l'adequada entre [0.1 – 0.15x10<sup>6</sup> cell/ml].
- Setmana 4 centrifuguem, eliminant la meitat de medi i afegint meitat de fresc. S'ha de canviar el flasc.
- Setmana 5 centrifuguem, eliminant la meitat de medi i afegint meitat de fresc, sempre tenint en compte la concentració de les cèl·lules. En aquest punt, s'han de preparar el virus.
- Setmana 6 centrifuguem, eliminant la meitat de medi i afegint meitat de fresc. Infectar les cèl·lules amb els virus.
- Setmana 7 centrifuguem, eliminant la meitat de medi i afegint meitat de fresc,. Afegir la puromicina a una concentració de [0.2µg/ml], per seleccionar les cèl·lules infectades.
- Setmana 8 centrifuguem, eliminant la meitat de medi i afegint meitat de fresc. Analitzem la correcta diferenciació fem els marcatges dels receptors KIT i FcεRI.
- Les cèl·lules poden ser utilitzades des de la setmana 8 fins la setmana 10 per fer els experiments.

### 3. SISTEMA DE TRANSDUCCIÓ

El sistema d'elecció és la infecció de les cèl·lules amb lentivirus. En cèl·lules de divisió lenta com els mastòcits la infecció per virus és la millor opció, ja que el virus entra a la cèl·lula i s'integra sense necessitat que s'estigui dividint. En el nostre cas farem servir tan virus produïts per nosaltres com virus comercials.

#### 3.1 Producció de lentivirus

Tipus cel·lular: 293 LTV

Reactius: Lipofectamine 2000 de Invitrogen Life Technologies

OPTI-MEM de Invitrogen Life Technologies

MISSION® Lentiviral Packaging Mix

Plàsmids MISSION™ shRNA technology de Sigma-Aldrich

pLKO.1-PURO Non-Mammalian shRNA plàsmid control

Diferents plasmids pLKO.1-PURO SH3BP2 amb les seqüències:

3BP2 21 shRNA: 5'CCG GGC GAA GTG GAA AGG TTG TTC ACT  
CGA GTG AAC AAC CTT TCC ACT TCG CTT TTT G 3',

3BP2 19 shRNA: 5' CCG GCT CTA ACA AAG TGA GGA ACT ACT  
CGA GTA GTT CCT CAC TTT GTT AGA GTT TTT G 3',

3BP2 17 shRNA: 5' CCG GGC ACC CAA TTA TGC AAG CAT TCT  
CGA GAA TGC TTG CAT AAT TGG GTG CTT TTT G 3'.

Procediment:

1. Les plaques amb les 293LTV han d'estar confluents (en plaques de 150cm<sup>2</sup>).



## 2. LIPOFECTAMINE 2000 mix:

OPTI-MEM	3,5ml
Lipofectamine 2000	72 $\mu$ l

Ho barregem i incubar-ho a temperatura ambient durant 5min

## 3. PLÀSMID mix:

OPTI-MEM	3,5ml
shRNA	7,2 $\mu$ g
Packaging mix	71.3 $\mu$ l

Cada plàsmid mix es farà en tubs de 15ml (bacteris)

4. Posar 3.5ml del LIPOFECTAMINE 2000 mix a cada tub, barregem amb la pipeta.
5. Incubació a temperatura ambient durant 20min.
6. Preparar medi DMEM sense antibiòtic, 13ml per placa. Amb un 10% de fetal, 1% de L-glutamine. Eliminar el medi de les plaques i afegim els 13ml de medi.
7. Afegir a les plaques la barreja (Lipofectamine + plàsmid).
8. Incubar 8h a 37°C + 5% CO<sub>2</sub>
9. Eliminem el medi de la transfecció i afegim 35ml de medi DMEM complet, per placa de 150cm<sup>2</sup>
10. Ho deixem a 37°C + 5% CO<sub>2</sub> durant 48hores.
11. Passats els dos dies, recollim el sobrenedant en tubs de 50ml
12. Centrifuguem a 1500rpm per eliminar les restes cel·lular

13. Agafem el sobrenedant i el passem a tubs de centrifuga
14. Centrifuguem a 20000rpm a 4°C durant 2 hores
15. Eliminem sobrenedant i resuspenem el pèl·let amb 1ml del medi de les cèl·lules que anirem a infectar.

### **3.2 Infecció amb lentivirus**

#### INFECCIÓ VIRUS PRODUITS

Un cop tenim els virus concentrats en el medi de les cèl·lules, els passem per la xeringa de 25G per disgregar-los i infectem les cèl·lules. La relació virus/cèl·lules és per cada placa de 150cm<sup>2</sup> de cèl·lules 293LTV infectarem entre 3-5x10<sup>6</sup> cèl·lules (mastòcits primaris o línies cel·lulars). Afegim puromicina (rang: 0,2 fins 5 µg/ml depenent del tipus cel·lular) a la setmana d'infecció i després de 5 dies fem els experiments.

#### INFECCIÓ AMB VIRUS COMERCIALS

Reactius: Virus de Santa Cruz:

3BP2 shRNA (h) partícules lentivirals

c-kit shRNA (h) partícules lentivirals

Control shRNA partícules lentivirals

Polybrene ® de Santa Cruz Biotechnology

Puromicina

Procediment:

DIA 1

- Agafem  $2 \times 10^6$  cell/ml, centrifuguem i eliminem el medi.
- Les posem a una concentració [ $0.3 \times 10^6$  cell/ml], en un volum de 6.6ml de medi complet SENSE antibiòtic més Polybrene [ $5 \mu\text{g/ml}$ ]final., en flasc de  $25\text{cm}^2$ .
- Afegim el virus, descongelats a temperatura ambient, Afegim  $10 \mu\text{l}$  de virus per ml de medi. Els barregem suaument abans d'infectar. Un cop descongelat els virus els mantenim en gel.
- Moure'm una mica el flasc per barrejar una mica i ho deixarem incubant O/N.

## DIA 2

- Centrifuguem tot el medi per eliminar-lo i afegim 7ml de medi complet.

## DIA 5

- Comencem la selecció amb puromicina (rang: 0,2 fins  $5 \mu\text{g/ml}$  depenent del tipus cel·lular).

## Dia 10

- Aproximadament després de 5 dies de selecció, procedim a fer els experiments.

## 4. SISTEMA DE TRANSFECCIÓ

Diferents construccions s'han utilitzat per transfectar diverses línies cel·lulars, ja sigui de manera estable, o bé de manera transitòria.

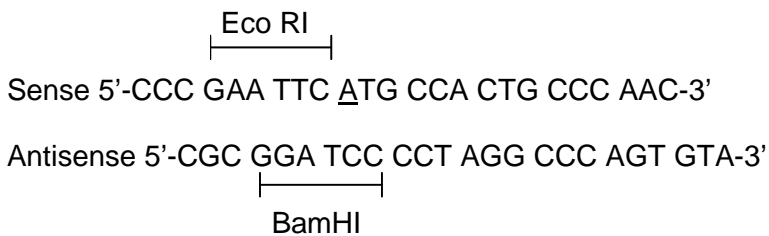
### 4.1. Construccions de Plàsmids

## SH2-EGFP

Fem ús d'un un vector fluorescent (pN3-EGFP de Clontech Laboratories) insereixen el fragment clonat en pauta de lectura amb la proteïna fluorescent, quedant aquesta a l'extrem carboxi-terminal de la proteïna clonada.

Primer de tot es fa una PCR per obtenir el fragment de la proteïna que volem inserir al plàsmid, en aquest cas es el domini de SH2 de 3BP2.

- **Domini SH2 del 3BP2:** Com a motlle s'usa el 3BP2 *full length* en pN3-EGFP i es treballa amb els oligonucleòtids que engloben la seqüència corresponent domini SH2. En el sense ha calgut afegir una A per tenir una MET (ATG) i l'Eco RI i en l'antisense, Bam HI.



Programa PCR: (35 cicles)

Desnaturalització	1'	95°C
Anneling	50"	55°C
Elongació	40"	72°C
Elongació final	10'	72°C

- **Clonatge en el vector TOPO:** El producte de PCR el clonem en un vector TOPO i ho transformem en bacteris, utilitzant el kit pcDNA3.1/V5-His® TOPO® TA EXPRESSION KIT d'INVITROGEN. Aquest protocol el portem a terme ja que així controlem la digestió completa de l'insert a ser clonat en el vector pN3-EGFP.

- **Digestió i clonatge en el vector pN3-EGFP:** Tenim el fragment en TOPO, s'ha de digerir utilitzant les dianes de restricció que hem col·locat (EcoRI i Bam HI), al mateix moment digerim amb els mateixos enzims el plàsmid pN3-EGFP.

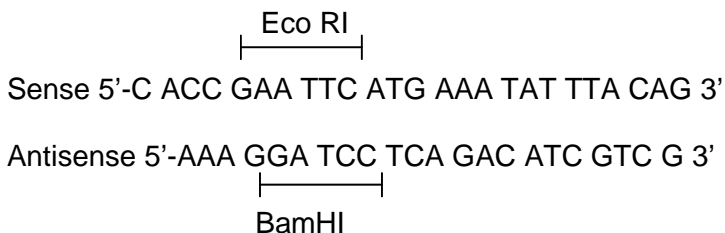
Fem una digestió seqüencial primer amb EcoRI 2h a 37°C i després amb l'enzim BamHI, i ho deixem durant tota la nit a 37°C. Purifiquem els fragments mitjançant el kit "QIAquick Gel Extraction KIT (50)" comprovem la purificació fent una electroforesi en gel d'agarosa i calculem el ràtio insert-vector.

Procedim a la lligació entre vector i insert amb una relació 1:6,5 utilitzant la T4 DNA lligasa, i transformem amb tot el producte de la lligació amb bacteris competents DH5α. Els deixem créixer amb plaques LB+kanamicina. Analitzem les colònies per anàlisi de restricció o PCR i les positives les enviem a seqüenciar,

### Domini citoplasmàtic de KIT-pBridge

Primer de tot es fa una PCR per obtenir el fragment de la proteïna que volem insertar al plàsmid, en aquest cas és la cua citoplasmàtica de KIT.

- **Cua citoplasmàtica de KIT:** Com a motlle s'usa el KIT *full length* d'ORIGENE (NM-000222.1) que es troba clonat dins d'un plàsmid pCMV6-XL5. Dissenyem els oligos per tal d'obtenir la cua citoplasmàtica. En el sentit s'hi afegeix la diana EcoRI i en l'antisentit, BamHI.



PCR Program (35 cicles)

Desnaturalització inicial 3' 95°C

Desnaturalització 1' 95°C

Anneling	50"	55°C
Elongació	1'40"	72°C
Elongació final	10'	72°C

En aquests cas, fem un clonatge directe amb el pBridge. Del cDNA obtingut en la PCR, el precipitem i el digerim al mateix temps que el plàsmid pBridge. Purifiquem els fragment mitjançant el kit "QIAquick Gel Extration KIT (50)" mirem com ha anat la purificació i calculem el ràtio.

Procedim a la lligació entre vector i insert amb una relació 1:8 utilitzant la T4 DNA lligasa, i transformem amb tot el producte de la lligació amb bacteris competents OMNIMAX. Les colònies positives s'analitzen si contenen l'insert i es seqüencien per tal que no hi hagin mutacions.

## 4.2 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.

### 4.2.1 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.

Reactius: Kit Nucleofector d'AMAXA d'electroporació

Electroporador Amaxa

Plàsmids produïts al laboratori com comercials Myo1f full length + TAG d'ORIGENE (NM\_012335) que es troba clonat dins d'un plàsmid pCMV6-Entry.

Procediment:

1. Temperar els medis de cultiu i la solució Nucleofector per minimitzar la mortalitat cel·lular.
2. Les cèl·lules COS creixen adherides, per tant les hem de tripzinitzar, les centrifugarem (1500 rpm, 5 minuts, temperatura ambient) i les resuspenem amb medi RPMI.
3. Fem un rentar amb medi RPMI.
4. Barrejar els micrograms del DNA d'interès amb les cèl·lules resuspeses en 70 $\mu$ l de la solució Nucleofector. Generalment, se sol utilitzar 1 $\mu$ g 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. Afegim 0.5ml de DMEM complet.
7. Cultivem les cèl·lules en plaques p100 amb un volum total de 10ml. Mantenir fins la realització de l'experiment (almenys 24 hores perquè s'expressin els plàsmids).

### **4.3 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 com és la resistència a drogues.

#### **4.3.1 Transfecció de SH2-EGFP en la línia cel·lular HMC-1**

Tipus cel·lular: HMC-1

Reactius: OPTI-MEM de Invitrogen

Lipofectamina de Invitrogen

Plàsmids SH2-EGFP produïts

Procediment:

DIA 1

- Barregem 20µg DNA en 250µl de OPTI-MEM + 20µl Lipofectamine en 250µl de Optimem.
- Incubar 20 minuts a temperatura ambient
- Afegim  $1 \times 10^6$  cell en 1,5ml de medi DMEM complet SENSE antibiòtics en placa de 24 pous.
- Moure'm una mica el flasc per barrejar una mica i ho deixarem incubant O/N.

DIA 2

- Centrifuguem tot el medi per eliminar-lo i afegim 2ml de medi complet.

DIA 5

- Comencem la selecció amb puromicina [5µg/ml].

## 5. ANÀLISI BIOQUÍMIC 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, cal primer procedir a la preparació de les cèl·lules, depenent de la via que vulguem activar necessita diferents requeriments, seguidament procedirem a l'activació cel·lular.



## 5.1 Sensibilització de les cèl·lules

Per estudiar les molècules implicades en la via FcεRI, prèviament necessitem sensibilitzar les cèl·lules.

Tipus cel·lular: LAD2 /HuMCs

Reactius: Human IgE (Biotin) monoclonal antibody 1mg/ml (ABBIOTEC)

Procediment:

- Agafem  $1 \times 10^6$  cell/punt, el posem a  $0.12 \times 10^6$  cell/ml.
- Afegir hIgE(Biotin) a [100ng/ml]
- Incubació a  $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$  durant la nit.

## 5.2 *Starving* (Privació de nutrients) cel·lular

Per estudiar les molècules implicades en la via KIT, prèviament necessitem que estiguin privades de nutrients, eliminant el SCF o el fetal del medi, depenent del tipus cel·lular.

Tipus cel·lular: HMC-1/ LAD2

Procediment:

- Agafem  $1 \times 10^6$  cell/punt, les posem a  $0.5 \times 10^6$  cell/ml. Eliminem el medi i les posem en el seu medi però sense SCF en el cas de les LAD2 i en RPMI Ø en el cas de les HMC-1.
- Incubació a  $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$  durant la nit.

## 5.3 Activació cel·lular

Tipus cel·lular: LAD2 /HuMCs/HMC-1

Reactius: Tampó d'alliberació de  $\beta$ -Hexosaminidasa (HRB)

Sample Buffer per llisar

Estímuls: Estreptavidina (STV) 10x (2.5 $\mu$ g/ml) o SCF 10x [1 $\mu$ g/ml]

Procediment:

- Recollim les cèl·lules sensibilitzades o privades de nutrients.
- Centrifuguem a 1500rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant.
- Afegim 5ml HRB per rentar, fem dos rentats més amb 3ml i 1ml respectivament.
- Centrifuguem a 1500rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant
- Resuspenem el pèl·let en 45 $\mu$ l HRB/punt
- Temperem estímuls 10x a 37°C.
- Afegim 5 $\mu$ l de HRB al punt no estimulat i 5 $\mu$ l d'estímuls per activació i activem els temps corresponents.
- El Sample Buffer preparat el posem a bullir prèviament.
- Un cop activat afegim a cada tub 100 $\mu$ l S. Buffer bullint.
- Llisem les cèl·lules amb Xeringa de 20G (les passem 10 vegades).
- Bullim 5 minuts a 100°C.
- Centrifuguem 10 minuts a 14000 rpm (màxima potència) a temperatura ambient.

- Transferim el sobrenedant a un nou tub. Les mostres ja estan preparades per córrer en un gel SDS-PAGE (8%-10%).

## 5.4 Immunoprecipitació

Aquesta tècnica ens permet identificar associacions entre proteïnes. Mitjançant anticossos específics contra la proteïna d'interès, la immunoprecipitem en condicions natives i després de l'electroforesi, en la membrana de nitrocel·lulosa es determinen les proteïnes associades, 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.

Prèviament a la immunoprecipitació s'han de preparar les cèl·lules seguint els punts 5.1 via FcεRI o 5.2 via KIT. L'única diferència és que, per cada punt, en comptes d'agafar  $1 \times 10^6$  cèl·lules s'agafaran  $25 \times 10^6$  cèl·lules.

### 5.4.1 Immunoprecipitació de 3BP2 després de l'activació de les vies FcεRI i KIT

Tipus cel·lular: LAD2/HMC-1

Reactius: Tampó d'alliberació de β-Hexosaminidasa (HRB)

Anti-3BP2 (clon 470)

Anti-Ly9 o CD229

Proteïna A Sepharosa CL-4B d'Amersham

Buffer de Lysis 2x

Estímuls: STV 10x [2.5µg/ml] o SCF 10x [1µg/ml]

Procediment:

- Recollim les cèl·lules
- Centrifuguem a 1500rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant.
- Afegim 5ml HRB per rentar.
- Centrifuguem a 1500rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant
- Resuspenem els pèl·lets en 450µl en HRB
- Temperem els estímuls a 37°C i mostres. Volum d'activació 0.5ml.
- Activar les mostres el temps indicat i per parar la reacció afegim 0.5ml de *Lysis buffer* 2x fred.
- Fem un *up/down* amb la pipeta, un vòrtex i ho deixem incubant en gel durant 20min.
- Centrifuguem 20minuts a 13200 rpm (màxima potencia) a 4°C.
- Transferim el sobrenedant a un nou tub.
- Agafem aproximadament  $0.5 \times 10^6$  cèl·lules pels llisats + 30µl S.Buffer
- Comencem la immunoprecipitació posem 2µg de l'anticòs corresponent, en aquest cas fem servir el 3BP2 i com a control isotípic el Ly9 (o CD229) que no s'expressa en mastòcits.
- Ho deixem incubant amb l'anticòs 3h a 4°C a la NORIA
- Afegim 50µl de Proteïna A incubem 1h a 4°C a la NORIA
- Fem 3 rentats amb Lysis buffer diluït (primer afegim 7ml d'H<sub>2</sub>O per ser 1x després diluïm amb Tris /NaCl + inhibidors, per tenir el tritó 0.5%)
- Afegir tampó reductor o Sample Buffer (50µl).

- Bullir 10 min a 100°C
- Transferim el sobrenedant a un nou tub. Les mostres ja estan preparades per córrer en un gel SDS-PAGE (8%-10%).

#### 5.4.2 Cèl·lules COS

Tipus cel·lular: cèl·lules COS

Reactius: Tampó de Lisi

Procediment:

1. Eliminem el medi de les plaques.
2. Fem un rentat amb medi DMEM per eliminar les cèl·lules mortes.
3. Eliminem el sobrenedant i afegim 1ml de tampó de lisi a la placa i es rasca amb una espàtula, recollint tota la mostra llisada en nou tub de 1.5ml.
4. Incubació 20 minuts en gel i centrifuguem a màxima velocitat (14000rpm) 20 minuts.
5. Recollim el sobrenedant en un nou tub.
6. Agafem 30µl pels llisats totals (WCL: *Whole Cell Lysate*) i amb la resta procedim afegint entre 1-10µg d'anticòs específic contra la proteïna d'interès que es vol immunoprecipitar.
7. Incubar durant 2 hores, en rotació, a 4°C.
8. Afegir als tubs 50µl de proteïna A Sepharosa per immunoprecipitar l'anticòs afegit.
9. Incubar durant 1 hora 30 minuts, en rotació, a 4°C.

10. Rentar tres vegades la immunoprecipitació amb el tampó de lisi diluït a la meitat sense detergent (en cada rentat, fer un pols de centrífuga, 14000rpm, 11 segons a 4°C 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).

11. Afegir 50µl del tampó de càrrega 3x (en condicions reductores) a totes les mostres, incloses les mostres corresponents als llisats cel·lulars totals.

12. Bullir les mostres a 100°C durant 10 minuts per tal de desnaturalitzar-les i separar la proteïna A Sepharosa.

13. Les mostres ja estan preparades per córrer en un gel SDS-PAGE.

## 5.5 Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE)

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. 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, tot això fa que la migració depengui únicament de la longitud de la cadena polipeptídica.

Es preparen dos fases de gel d'acrilamida, que varien en el percentatge d'acrilamida, pH i molaritat, per tal d'aconseguir un empaquetament (gel apilador) correcte de les mostres, prèvia a l'entrada a la fase resolutive (gel separador) on les mostres es separen en funció del pes molecular. En funció del pes de les proteïnes a resoldre, es treballa amb major (15%) o menor grau (8%) d'empaquetament d'acrilamida en el gel separador.

Reactius: 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'-Tetrametiletilenodiamida)

Tampó d'electroforesi 10x, pH 8.4, 1L: 30gr Tris-Base, 144gr Glicina i 10gr SDS. Es treballa a l'1x.

Procediment:

- 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 SEPARADOR			GEL APILADOR
	8%	10%	12%	
PA	8ml	10ml	12ml	1.5ml
TRIS 1M pH 8.8	11.1ml	11.1ml	11.1ml	
TRIS 1M pH 6.8				1.25ml
H <sub>2</sub> O	10.8ml	8.7ml	6.7ml	7ml
SDS 10%	300µl	300µl	300µl	100µl
APS 20%	150µl	150µl	150µl	100µl
TEMED	20µl	20µl	20µl	10µl

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

## 5.6 Western-Blot

La tècnica del Western Blot consisteix en la transferència del gel d'electroforesi a una membrana, que actualment utilitzem membranes de PVDF (Polyvinylidene Fluoride). La membrana permet diverses incubacions amb els anticossos d'interès.

Reactius: Tampó de transferència.

Tampó TBS-T (Tris-Buffered Saline Tween-20) 1x.

Membranes de PVDF, de Millipore

Tampó de stripping.

Western bright Quantum d' Ecogen

Western Blotting Luminol Reagent de Santa Cruz.

Pel·lícules CP-BU, d'AGFA.

Procediment:

- 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 cm<sup>2</sup> en el cas de gels grans, o 5.5mA per cm<sup>2</sup> en el cas de minigels. Generalment s'utilitza un amperatge de 0.8mA per cm<sup>2</sup> per gels grans.
- Un cop finalitzada la transferència, descartar el gel i incubar la membrana amb els anticossos desitjats, seguint els següents passos:



- 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 o durant tota la nit a 4°C sense agitació.
- Rentar 2-3 cops amb TBS-T, durant 5 minuts en agitació, a temperatura ambient.
- Incubar amb l'anticòs primari, durant 1 hora en agitació, a temperatura ambient; o bé durant tota la nit a 4°C en agitació.
- Rentar 2-3 cops amb TBS-T, durant 5 minuts en agitació, a temperatura ambient.
- Incubar amb l'anticòs secundari, durant 20-45 minuts en agitació, a temperatura ambient. En el cas que l'anticòs primari estigui directament conjugat a peroxidasa, aquest pas s'elimina.
- Rentar 2-3 cops amb TBS-T, durant 5 minuts en agitació, a temperatura ambient.
- Revelar amb el Western bright Quantum o el Western blotting Luminol Reagent, utilitzant pel·lícules CP-BU per al revel·lador CURIX AGFA 60.

En el cas que vulguem incubar altres anticossos, farem un pas per eliminar l'anticòs enganxat a la membrana amb el tampó de Stripping. Fem tres rentat d'aproximadament 5-7 minuts amb aquest tampó 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.

## 6. 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.

### 6.1 Anàlisi d'expressió de proteïnes de membrana

En aquest cas analitzem els receptors de membrana dels mastòcits, com son FcεRI i KIT, fem un marcatge de superfície.

Tipus cel·lular: LAD2/HuMCs/HMC-1 infectades

Reactius: Tampó de rentat: PBS, 2% FCS, 0.01% Azida Sòdica.

Tampó de fenotipat: tampó de rentat + 20% de sèrum de conill inactivat.

Anticòs isotypic IgG2b PE mouse (IMMUNOTOOLS)

Anticòs PE mouse anti-Human CD117 (cKit) (BD Pharmingen Biociences) [0.2mg/ml]

Anticòs PE anti-Human FcεRI alpha (eBiociences)

Procediment

- Agafem  $0.2 \times 10^6$  cèl·lules per marcatge
- Centrifuguem a 1000rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant
- Afegim 2ml de tampó de rentat
- Centrifuguem a 1000rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant
- Resuspenem el pèl·let amb tampó de fenotipat (per bloquejar els receptors de Fc)
  - Pels marcatges isotipic i Fc $\epsilon$ RI alpha - 90 $\mu$ l/tub
  - Pel marcatge de KIT - 95 $\mu$ l/tub
- Incubar en gel (4°C) durant 15min-20min
- Afegim els anticossos als tubs
  - Fc $\epsilon$ RI alpha 1/10 - 10 $\mu$ l/tub
  - isotipic IgG2b 1/10 - 10 $\mu$ l/tub
  - Anti-Human CD117 1/20 - 5 $\mu$ l/tub
- Ho deixem incubant 30minuts en gel (o a la nevera), protegit de la llum
- Rentar una vegada afegint 3ml de tampó de rentat a cada tub centrifugar 5 minuts a 1000rpm a 4°C.
- Decanem el sobrenedant.
- Resuspenem amb 300 $\mu$ l/tub de tampó de rentat
- Llegim les mostres al citòmetre (FACs Calibur), el fluorocrom que utilitzem es PE, que es llegeix al canal FL-2.

## 6.2 Anàlisi de l'apoptosi cel·lular

Per analitzar l'apoptosi cel·lular de les cèl·lules infectades utilitzarem l'annexin V com a marcador. Entre les característiques de l'apoptosi, trobem el canvis d'organització del fosfolípids en la membrana cel·lular, després de l'inducció d'aquest procés, la fosfatidilserina que normalment s'ubica en la cara citoplasmàtica de la membrana cel·lular canvia la seva ubicació quedant a la part extracel·lular, fet que representa un estímul per la fagocitosi, la detecció d'aquest fosfolípid *in vitro* s'aconsegueix mitjançant l'utilització de l'anticoagulant ANNEXINA V, el qual en presència de calci, augmenta la seva afinitat per aquest fosfolípid, d'aquesta manera l'Annexina V marcada amb un fluorocrom pot ser detectada en cèl·lules per citometria de fluxe.

Tipus cel·lular: LAD2/HuMCs infectades

Reactiu: Tampó d'alliberació de  $\beta$ -Hexosaminidasa (HRB):

Annexin V-APC (cat. 550474) (BD Pharmingen Biociences)

7ADD (cat. 51-6898 1E) (BD Pharmingen Biociences)

Procediment

- Agafem  $0.1 \times 10^6$  cèl·lules per marcatge
- Centrifuguem a 1500rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant
- Afegim 5ml de PBS fred per rentar, ho fem dues vegades.
- Centrifuguem a 1500rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant
- Resuspenem el pèl·let amb 400 $\mu$ l de HRB (buffer release).
- Es transfereix 100 $\mu$ l/tub, tenim un total de 4 tubs

- Cèl·lules no marcades
  - Annexin V-APC sola
  - 7ADD sola
  - Annexin V-APC + 7ADD
- Afegim 5µl de annexin o 7ADD o les dues.
  - Incubar a RT durant 15min, protegit de la llum.
  - Afegint 400µl/tub de HRB (buffer release).
  - Llegim les mostres al citòmetre (FACs Calibur), dins de la primera hora.
  - El canals que utilitzem són FL-3 i FL-4. El fluorocrom APC, que es llegeix al canal FL-4.

## 7. ASSAIG D'ALLIBERACIÓ DE $\beta$ -HEXOSAMINIDASA

L'anàlisi de la secreció de  $\beta$ -hexosaminidasa, mediador contingut al lisosomes cel·lulars dels mastòcits, s'utilitza com una mesura de desgranulació mastocitària.

Tipus cel·lular: HuMCs

Reactius : Buffer release (HRB):

Human IgE (Biotin) monoclonal antibody 1mg/ml (ABBIOTEC)

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

Substrat P-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside de Calbiochem

Triton X-100.

Tampó de citrat de sodi 0.1M (pH 4.5).

Tampó carbonat de sodi 0.2M (pH 10.7).

Estímuls : STV 100x (10µg/ml)

IONOMICINA 100x [200µg/ml]

PMA 100X [5ng/ml]

Procediment (1er dia)

- Comptem les cèl·lules per saber al concentració.
- Agafem  $2 \times 10^4$  cell/punt, el posem a  $0.5 \times 10^6$  cell/ml. Les que demà s'han d'activar amb STV.
- Afegir hlgE(Biotin) a [100ng/ml]
- Incubació a  $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$
- Procediment (2on dia)
- Recollim les cèl·lules
- Centrifuguem a 1000rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant
- Afegim 5ml HRB 5 per rentar
- Centrifuguem a 1000rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant
- Resuspenem el pèl·let en 180µl/condició de HRB i afegim els estímuls apropiats:
  - 1.8µl d'estreptavidina (10µg/ml)
  - 1.8µl PMA (50ng/ml) més Ionomicina (2.5µM),

- Incubem durant 30 minuts, a 37°C.
- Centrifuguem a 1000rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant
- Recollim SN i els repartim 50µl per cada pou (triplicat per mostra).
- Afegim 150µl de tritó a l'1% (en HRB) als llisats cel·lulars totals. I repartim 50µl a cada pou.
- Els sobrenedants recollits i els llisats cel·lulars totals obtinguts s'incuben en 100µl del substrat P-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucopyranoside, 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.
- Per aturar la reacció cal afegir 200µl per pou d'un tampó carbonat de sodi 0.2M (pH 10.7).
- L'absorbància de 4-P-nitrophenol es monitoritza mitjançant l'absorbància a 405nm. Amb correcció (Reference wavelength) 620nm.

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.

## 8. ANÀLISI DE FLUX DE CALCI PER FLUORIMETRIA

El calci (Ca<sup>2+</sup>) és un element abundant, present ja sigui en forma lliure o unida a proteïnes i és essencial per diferents processos bioquímics tant en cèl·lules eucariotes como procariotes. En molts processos d'activació cel·lular es donen canvis de calci intracel·lular. Aquests canvis de calci es mesuren mitjançant l'ús de sondes, entre les quals trobem el FLUO-4, que és el que hem utilitzat.

Tipus cel·lular: HuMCs/LAD2

Reactius : Fluo 4/AM, Molecular Probes, Invitrogen® 1mg/ml

Buffer release (HRB)

Human IgE (Biotin) monoclonal antibody 1mg/ml (ABBIOTEC)

Ionicina de Calbiochem

Estímuls : STV 100x (10µg/ml)

IONOMICINA 100x (200µg/ml)

Procediment (1er dia)

- Agafem  $1 \times 10^6$  cell/punt, el posem a  $0.5 \times 10^6$  cell/ml.
- Afegir hIgE(Biotin) a [100ng/ml]
- Incubació a  $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$

Procediment (2on dia)

- Recollim les cèl·lules i centrifuguem a 1000rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant.
- Afegim 2ml HRB (o 3ml) per rentar
- Centrifuguem a 1000rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant
- Resuspenem el pèl·let en 995µl HRB
- Afegim 5µl Fluo 4/AM (5µg/ml = 5µM total)
- Incubar 30 min a  $37^\circ\text{C}$  (protegit de la llum)



- Rentar dues vegades (1er 1ml/tub, 2on 300µl/tub de HRB) amb la minispin durant 30segons
- Resuspenem les cèl·lules en 600µl HRB i repartim 200µl/pou
- Mantenim la placa protegida de la llum en tot moment i a temperatura ambient
- Fluorímetre Modulus<sup>TM</sup> II Microplate Multimode Reader, Turner Biosystems.
- Fem lectura basal (1 cicle, programant la placa)
- Traiem la placa del fluorímetre i posem l'estímul STV 100x (2µl a tots els pous)
- Fem 10 cicles de lectures (1min per lectura)
- Traiem la placa i posem l'estímul Ionomicina 100x (2µl a tots els pous)
- Fem 5 cicles de lectures (1min per lectura)

Transformació de les dades a Excel i representació en GraphPad Prism 5.

## 9. QUANTIFICACIÓ DE CITOCINES I QUIMIOCINES

Un cop el mastòcit s'activa hi ha tot una sèrie d'esdeveniments, primerencs com és la desgranulació i tardans com són la producció de citocines i quimiocines. En els mastòcits les quimiocines més expressades són IL-8 i GM-CSF. Primer activarem les cèl·lules i després mesurarem la secreció per ELISA i la producció per Real Time.

### 9.1 Activació cel·lular

Tipus cel·lular: HuMCs

Reactius: Human IgE (Biotin) monoclonal antibody 1mg/ml (ABBIOTEC)

## STEM PRO COMPLET (+ IL-6 + SCF (100ng/ml))

Estímuls: STV 10x (10µg/ml)

hlgE 100x (10µg/ml)

### Procediment (1er dia)

- Agafem  $2 \times 10^6$  cell/punt, el posem a  $1 \times 10^6$  cell/ml.
- Afegim hlgE(Biotin) a [1µg/ml]
- Incubació a 37°C + 5% CO<sub>2</sub>

### Procediment (2on dia)

- Recollim les cèl·lules i centrifuguem a 1000rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant.
- Afegim 2ml STEM PRO + IL6 + SCF (100ng/ml) per rentar.
- Centrifuguem a 1000rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant.
- Resuspenem el pèl·let en 3240µl STEM PRO + IL6 + SCF (100ng/ml)
- Repartim a cada pou 1620µl (activat i no activat)
- Afegim 180µl d'estímuls per activació i al no activat afegim medi STEM PRO + IL6 + SCF.
- Ho deixem a 37°C + 5% CO<sub>2</sub> durant 6hores.
- Passades les 6 hores recollim els sobrenedants.
- També recollirem les cèl·lules, les rentarem amb PBS i procedirem a extreure el RNA (explicat en l'apartat 10.1)

## 9.2 ELISA de IL-8 i GM-CSF

Tipus cel·lular: HuMCs (sobrenedants del cèl·lules activades 6h)

Material: Kit DuoSet® ELISA: human CXCL8/IL-8 (#DY208)

Kit DuoSet® ELISA: human GM-CSF (#DY215)

Reactius: WASH BUFFER: 0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.2 - 7.4

BLOCKING BUFFER (IL-8): 1% BSA en PBS + 0.05% NaN<sub>3</sub>

REAGENT DILUENT (GM-CSF): 1% BSA in PBS, pH 7.2 - 7.4

REAGENT DILUENT(IL-8): 0.1% BSA, 0.05% Tween 20 en TBS

SUBSTRATE SOLUTION: 1:1 Mixt Reagent A i Reagent B

STOP SOLUTION: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Procediment (1er dia): Preparació de la placa

1. Diluïm l'anticòs de captura amb PBS i afegim 100µl/pou

Tapem amb una coberta de plàstic i ho incuben o/n a temperatura ambient.

	GM-CSF	IL-8
[STOCK]	360µg/ml	720µg/ml
[TREBALL]	2µg/ml	4µg/ml

Procediment (2on dia)

2. Rentem la placa eliminant el sobrenedant, afegim WASH BUFFER (400µl aprox.), això ho repetim en total 3 vegades, l'última ens assegurem que la placa quedi seca.

3. Bloquejar la placa, afegim 300µl/pou de BLOCKING BUFFER (IL-8) o REAGENT DILUENT (GM-CSF). Incubem a temperatura ambient, mínim 1 hora.
4. Rentem la placa, repetim pas 2.
5. Afegim 100µl de mostra o Standard. Tapem amb una tira adhesiva i incubem dos hores a temperatura ambient. Cada Standard té el seu propi diluent.

GM-CSF: Reagent diluent (1% BSA en PBS, pH 7.2 - 7.4)

IL-8: Reagent diluent (0.1% BSA, 0.05% Tween 20 en TBS)

standard	GM-CSF	IL-8
[STOCK]	110ng/ml	110ng/ml
[TREBALL]	1000pg/ml	2000pg/ml

6. Rentem la placa, repetim pas 2.
7. Afegim 100µl/pou de l'anticòs de Detecció diluït en el seu propi diluent. Tapem amb una tira adhesiva i incubem dos hores a temperatura ambient.

GM-CSF: Reagent diluent (1% BSA en PBS, pH 7.2 - 7.4)

IL-8: Reagent diluent (0.1% BSA, 0.05% Tween 20 en TBS)

	GM-CSF	IL-8
[STOCK]	90µg/ml	3,6µg/ml
[TREBALL]	0,5µg/ml	20ng/ml

8. Rentem la placa, repetim pas 2.

9. Afegim 100µl de Streptavidin-HRP per pou a una dilució 1/200 diluït en el seu propi diluent. Tapem amb una tira adhesiva i protegit de la llum, l'incubem 20 minuts a temperatura ambient.

GM-CSF: Reagent diluent (1% BSA en PBS, pH 7.2 - 7.4)

IL-8: Reagent diluent (0.1% BSA, 0.05% Tween 20 en TBS)

10. Rentem la placa, repetim pas 2.
11. Afegim 100µl/pou de la solució de Substrat (A+B), incubem 20 minuts a temperatura ambient , protegim la placa de la llum.
12. Afegim 50µl de la solució STOP.
13. Llegim a una absorbància 450nm amb una correcció a 540nm o 570nm.

Transformació de les dades a Excel i representació en GraphPad Prism 5.

## 10. 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.

### 10.1 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.

Tipus cel·lular: HuMCs/LAD2

Material: Kit d'extracció de RNA: RNAeasy Mini Kit de QUIAGEN®

### Procediment

- Centrifugar 5 minuts 1800 rpm a 23°C i obtenir el pèl·let de cèl·lules activades i sense activar, normalment entre  $2-3 \times 10^6$  cèl·lules.
- Afegir al volum de cèl·lules **350µl de lisis buffer**,  $\geq 5 \times 10^6 - 10 \times 10^6$  cèl·lules utilitzarem 600µl (10µl de mercaptoetanol per cada ml de RLT) i canviar a un tub de base rodona.
- Politronar la mostra a una velocitat de 4/4.5 durant aproximadament uns 30segons.
- En aquest punt podem congelar les mostres a -80°C.
- Afegir 350µl de ETOH al 70% a la mostra i barrejar.
- Recollir 600µl de la mostra en la columna i fer un pols de 15/20 segons a 12000rpm i decantar novament el líquid que queda en el tub.
- Recollir 600µl del que queda de la mostra i fer novament un pols de 15/20 segons a 12000rpm i decantar.
- Afegir 350µl de buffer RW1 i fer novament un pols e 15/20 segons a 12000rpm i decantar el que queda en el tub.
- Afegir 350µl de buffer RW1 i fer novament un pols de 15/20 segons a 12000rpm i canviar el tub.
- Afegir 500µl de buffer RPE i fer novament un pols de 15/20 segons a 12000rpm i decantar el que queda en el tub.
- Afegir 500 µl de buffer RPE i centrifugar durant 2 minuts a 12000rpm i decantar el que queda en el tub.

- Centrifugar con la columna buida durant un minut a 12000rpm.
- Traspasar la columna a un tub eppendorf estèril i afegir 30µl de agua RNAasa free i centrifugar durant 1 minut a 12000 rpm.

Mesurem la quantitat de RNA obtinguda al NANODROP 2000.

## 10.2 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. Dependent de la concentració de RNA obtingut fem retrotranscrpcions de 0.5 o 1µg.

Material: GeneAmp® RNA PCR kit, d'Applied Biosystems.

### Procediment

- Agafar 1µg de RNA i afegir-hi aigua estèril fins a tenir un volum final de 10µl.
- 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

- Fer un pols a 14000rpm, durant 11 segons, a temperatura ambient.

- Programa RT Applied en el Termociclador de GS Storm 482
  - 25°C, 10 minuts.
  - 37°C, 2 hores.
  - 85°C, 5 segons.
  - Mantenir a 4°C.

### 10.3 Amplificació per PCR en temps real (qPCR)

És una variant de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) utilitzada per amplificar i simultàniament quantificar de forma absoluta el producte de l'amplificació de l'àcid desoxiribonucleic (ADN).

Material: TaqMan Gene Expression Assays per c-KIT, GATA3, GATA2, MITF, SCL, i IL-8 d'Applied Biosystems

Taqman® Gene Expression Master Mix d'Applied Biosystems

SONDES		llargada de l'amplicó	
18s	Hs 99999901_s1	187	FAM
IL-8	Hs00174103_m1	101	FAM
KIT	Hs00174029_m1	64	FAM
GATA3	Hs 00231122_m1	80	FAM
GATA2	Hs 00231119_m1	64	FAM
MITF	Hs 01117294_m1	81	FAM
SCL (TAL1)	Hs 01097987_m1	84	FAM

Procediment:

- Descongelarem les sondes i el cDNA en gel, i les mantindrem en gel.



- Farem una barreja de sonda amb el TAQMAN (Mix sonda)

sonda        1 $\mu$ l

taqman      10 $\mu$ l

- Diluirem el cDNA depenent de la sonda i la concentració de la retrotranscripció.
- En la placa afegirem els següents reactius fent un volum total de 20 $\mu$ l

Mix sonda    11 $\mu$ l

DNA diluït   9 $\mu$ l

- Condicions del programa ABI-Prism 7300 Sequence detector d'Applied Biosystems
  - 50°C, 2 minuts
  - 95°C, 10 minuts
  - 95°C, 15 segons
  - 60°C, 1 minut
  - Repetir durant 40 cicles

Analitzarem els resultats mitjançant 7500 SDS Software d'Applied Biosystems.

## 11. ANÀLISI DE LA VIA DE LES CASPASES PER FLUORIMETRIA

L'assaig de caspases es tracta d'un assaig luminescent que mesura les activitats de les caspases efectores 3 i 7, aquestes formen part de la família de les caspases i juguen un paper important en l'apoptosi de les cèl·lules de mamífer. L'assaig proporciona un substrat luminogènic que conté una seqüència de

tetrapèptit DEVD, que és el reactiu òptim per l'activitat de les caspases, l'activitat de luciferasa i la lisi cel·lular. Quan aquest substrat es trenca per acció de les caspases presents en les cèl·lules, genera un senyal luminescent, produït per la luciferasa. La luminescència és proporcional a la quantitat d'activitat de la caspasa.

Tipus cel·lular: LAD2 i HMC-1 infectades

Reactius: Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Buffer

Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Substrate

Procediment (1er dia)

- Comptem les cèl·lules per saber al concentració.
- Igualem concentracions
- Incubació a 37°C + 5% CO<sub>2</sub>

Procediment (2on dia)

- Reconstituïm el Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Substrat amb el buffer, tempera-ho a temperatura ambient.
- Pel blanc agafarem medi sense completar.
- Agafem 10<sup>4</sup> cèl·lules per pou fent n=3, per tant necessitarem 3x10<sup>4</sup>cell en un volum total de 300µl de medi.
- Repartim 100µl/pou.
- Afegim 100µl/pou del Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 reagent.
- Barregem amb l'agitador 30" a 200-300rpm.

- Incubem a temperatura ambient durant 1 hora.
- Llegim amb el luminòmetre (lectura cada 0.3segons/mostra).

Transformació de les dades a Excel i representació en GraphPad Prism 5

## 12. MICROSCOPIA IMMUNOFLUORESCENT

Per observar si proteïnes del nostre interès colocalitzen, en alguns casos necessitem activacions prèvies.

### 12.1 Activació

Prèviament a l'activació sensibilitzarem les cèl·lules seguin el punt 5.1

Tipus cel·lular: LAD2

Reactius: Tampó d'alliberació de  $\beta$ -Hexosaminidasa (HRB)

Streptavidin Alexa Fluor® 488 conjugate [1mg/ml] (Molecular Probes®)

Procediment:

- Recollim les cèl·lules i centrifuguem a 1500rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant.
- Rentar amb HRB (aproximadament 5ml centrifugar i eliminar SN).
- Resuspendre el pèl·let en un volum total 300 $\mu$ l i repartir 50 $\mu$ l/epp.
- Volum d'activació 100 $\mu$ l afegir 50 $\mu$ l STV 2x.
- En el punt 0 afegir l'estreptavidina i deixar-ho en gel.
- En els punt 2' i 10' afegir i activar a 37°C el temps indicat.

- Parar la reacció amb 100µl de PBS fred i fer un pols (11segons) a 4°C.

## 12.2 Marcatge intracel·lular

Tipus cel·lular: LAD2

Reactius: Tampó de bloqueig

Tampó Fixador: fet a base de Paraformaldehid (PF al 16%, Electron Microscopy Sciences)

Tampó de permeabilització

Tampó per diluir anticòs

Medi de muntatge Fluoromount-G, de Southern Biotechnology.

Cubres

Poli-Lys per tractar els cubre.

Hoechst stain stock [10mg/ml] work [1µg/ml]

Procediment

1. Agafem  $1 \times 10^6$  cèl·lules per marcatge o les cèl·lules que prèviament hem activat.
2. Centrifuguem a 1500rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant.
3. RENTAT amb 1ml PBS, centrifugant a 1500rpm 5 min (o pols de centrífuga a màx. velocitat 10”), eliminant el sobrenedant.
4. FIXACIÓ amb 0.5ml del tampó de fixació 15 minuts en gel.
5. Rentar com el pas 3.

6. PERMEABILITZACIÓ amb 0.5ml PBS – 0.05% Saponina 10 minuts en gel.
7. Rentar com el pas 3.
8. BLOQUEIG amb 0.5ml del tampó de bloqueig 1 hora en gel.
9. Centrifuguem a 1500rpm durant 5 min, eliminem el sobrenedant.
10. Preparar l'anticòs primari a una dilució 1:50, diluir l'anticòs amb el tampó adequat, a un volum de 100 µl per mostra.
11. INCUBAR les mostres 2 hores en gel.
12. Rentar com el pas 3. Repetir-ho 2o3 vegades.
13. Preparar l'anticòs secundari dilució 1:500, volum de 100 µl per mostra
14. INCUBAR les mostres 45 minuts en gel.
15. Rentar com el pas 3. Repetir-ho 2o3 vegades.
16. Resuspendre el pèl·let amb 300µl de PBS
17. Afegir Hoechst, serveix per tenyir el nucli.
18. Un dia abans s'han tractat els cubres amb Poli-Lisina, s'elimina l'excés i es fa un rentat amb PBS per treure l'excedent.
19. INCUBAR als cubres les cèl·lules perquè s'enganxin 30 minuts a temperatura ambient.
20. Muntatge als portes afegint aproximadament 9µl de fluoromont, agafant els cubres i girant-los perquè quedin les cèl·lules en contacte amb el fluoromont.
21. Ho deixem assecant i ho protegim de la llum, es guarda a 4°C.
22. Analitzar les mostres al microscopi confocal de fluorescència Leica TCS NT.

### 13. TÈCNICA DEL WOUND HEALING

La tècnica de *wound healing* (curació d'una ferida), determina la capacitat migratòria de les cèl·lules.

Tipus cel·lular: GIST 48 i 48B

Procediment (1er dia):

- Plaquagem  $1 \times 10^6$  cèl·lules per pou en una placa de 6 pous
- Incubació a  $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$

Procediment (2on dia):

- Les cèl·lules estan al 95% de confluència.
- Fem una ferida a la capa de cèl·lules amb la punta groga (tres ferides per pou)
- Immediatament rentem amb PBS 1x i afegim medi fresc.
- Fem fotografies de cada ferida a temps 0h, 4h, 8h, 12h, 24h, 36h i 48 hores. Canviant el medi a cada punt.

Utilitzant el temps 0 com a basal anem mesurant com es va tancant la ferida i calculant el % de migració.

### 14. SISTEMA DEL TRIPLE HÍBRID

Aquest sistema ens permet detectar interaccions directes entre proteïnes conegudes i també detectar noves unions concretament amb el sistema del triple híbrid, permet la incorporació d'un element extra, en el nostre cas una cinasa, així es podran determinar interaccions dependents de fosforilació (Explicat més àmpliament en l'Annex).

## 14.1 Transformació d'una llibreria de cDNA en llevats

### Material

- Soca de llevats CG1945 amb els gens HISS i  $\beta$ -galactosidasa
- Medi YPD: per 1 L: afegir a 950 ml d'aigua Mili-Q, 20 gr peptona, 10 gr extracte llevat, 20 gr agar (si sòlid). 121°C 15 minuts a l'autoclau. Quan la temperatura sigui d'un 55°C, s'afegeixen els 50 ml de la Glucosa al 40% (dissolta en aigua Mili-Q i filtrada)
- Medis SD -Trp, -Trp/-Met, -Trp/-Met/-Leu/-His: per 1 L: afegir a 950 ml d'aigua Mili-Q, 6,7 gr de Font de Nitrogen, 20 gr d'agar (si sòlid), 0,6 gr Drop out (medi amb aminoàcids, però li manca la Met, Trp, His, Leu), afegir els aminoàcids que calgui. 121°C 15 minuts a l'autoclau. Quan la temperatura sigui d'un 55°C, s'afegeixen els 50 ml de la Glucosa al 40% (dissolta en aigua Mili-Q i filtrada)
- 3-AT a 3mM en les plaques de 150 mm de diàmetre -Trp/-Met/-Leu/-His
- 50% PEG 3350
- 1 L Aigua Mili-Q i autoclavada
- Tampó TE 10X: 0,1 M Tris-Base; 10 mM EDTA a pH 7,5. Autoclavar
- LiAc 10X: 1 M Acetat de Liti a pH 7,5 amb acètic glacial. Autoclavar
- 100% DMSO
- DNA carrier (10mg/ml)

### Procediment:

1. El llevat CG1945 es descongela tot plaquejant-lo en medi YPD. Es deixa a 30°C durant 2-3 dies

2. Picar unes 3 colònies (d'1-3 mm diàmetre) de llevat CG1945 en 1 ml medi YPD i fer vòrtex per disgregar bé.
3. Les deixem créixer en 50 ml de YPD 16-18 h a 30°C a 250 rpm fins a una densitat òptica ( $OD_{600}$ ) superior a 1,5
4. Fer una dilució 1/4-1/5, per deixar la població de llevat a  $OD_{600\text{ nm}} = 0,2-0,3$  en 300 ml
5. Es creix fins a  $OD_{600\text{ nm}} = 0,4-0,6$  durant 2-3 h en les mateixes condicions que l'apartat 2
6. Es recull el cultiu i es centrifuga a 1200 rpm 5 minuts a temperatura ambient
7. El pèl·let es resuspèn amb 50 ml aigua Mili-Q i autoclavada
8. Centrifugació com pas 6
9. El pèl·let es resuspèn amb 1,5 ml TE/LiAc 1X (1 ml TE 10 X, 1 ml LiAc 10X, 8 ml aigua). Aquest pas és per fer les cèl·lules competents i es pot deixar fins 1 hora
10. Agafar 100  $\mu\text{l}$  de llevats del pas 8 i afegir-los en un tub eppendorf amb (i barrejar-ho bé):
  - 1  $\mu\text{g}$  DNA pBrigde
  - 100  $\mu\text{g}$  DNA carrier
11. Afegir 600  $\mu\text{l}$  de la solució PEG/LiAc (8 ml PEG 50%, 1 ml TE 10 X, 1 ml LiAc 10X)
12. Agitar-ho a 200 rpm a 30°C durant 30 minuts
13. Afegir-hi 70  $\mu\text{l}$  de DMSO i barrejar per immersió



14. Col·locar les mostres 15 minuts a 42°C i anar barrejant
15. Col·locar les mostres 1-2 minuts en gel
16. Centrifugar 5 segons a 1200 rpm a temperatura ambient
17. Resuspendre els pèl·lets amb 100 µl de TE 1X
18. Plaquejar-ho en una placa de 10 cm amb –Trp/-Met i deixar-ho a 30°C uns 2-3 dies fins que les colònies són d'uns 2 mm

Les colònies que creixen es transformen amb la llibreria de cDNA de moll de l'ós (1 mg). El protocol és el mateix, però els volums de creixement són superiors. 150 ml de cultiu líquid de –Trp/-Met (pas 1), després es posa en 1 L (pas 4), el rentat és amb 500 ml d'aigua (pas 7), solució de TE/LiAc 1 X és de 10 ml (pas 9), es barreja 1 mg de la llibreria amb 20 mg DNA carrier amb la solució PEG/LiAc 1 X de 60 ml (pas 10). Tot segueix igual fins que s'afegeixen, en aquest cas, 7 ml de DMSO. Passos 13-14 iguals, es centrifuga 5 minuts a 1200 rpm a temperatura ambient. El pèl·let es resuspèn amb 10 ml TE 1 X. Es plaquegen 200 µl per placa de 15 cm de –Trp/-Met/-Leu/-His + 3-AT 3 mM. La concentració de 3-AT primer es titula, mirant a partir de quina concentració deixen, els llevats parentals transformats amb vectors buits, de créixer en un medi deficient en His.

Per calcular l'eficiència de transformació es fan tres dilucions de 1/10, 1/100 i 1/1000 (a partir del volum total en què s'ha resuspès la transformació) i se'n plaquegen 100 µl en un medi -Trp/-Met/-Leu. Així es pot conèixer l'eficiència de transformació; quantes vegades s'ha analitzat la llibreria.

Les plaques es mantenen a 30°C i cap el dia 3-4 ja comencen a créixer colònies. Es deixen créixer fins a 2-3 mm de diàmetre i ja s'analitzen per assaig enzimàtic d'activitat β-galactosidasa, ja que el primer cribatge ha estat el nutricional.

També es poden cotransformar els llevats amb els vector pBridge i pACT2 alhora, per determinar interaccions entre proteïnes (clonades en aquests vectors) ja

descrites. En aquest cas els llevats es cotransformen alhora amb 1 µg de cada vector i 100 µg del DNA carrier. La cotrasformació es plaqueja en plaques –Trp/-Met/-Leu.

## 14.2 Cribatge d'una llibreria

Les colònies que creixen en el medi de selecció (primer cribatge) passen a un segon cribatge: s'analitza l'activitat β-galactosidasa. Es van utilitzar dos tipus d'assaigs per determinar l'activitat β-galactosidasa. Un assaig qualitatiu que indica si existeix o no activitat i l'altre, es un assaig semiquantitatiu, que mesura el nivell de l'activitat enzimàtica i pot donar una idea del grau d'interacció. És semiquantitatiu perquè depèn de la densitat de creixement del llevat i eficiència de transformació, en aquest cas les poblacions que s'analitzen han d'estar en fase exponencial de creixement per poder-les comparar.

### 14.2.1 Assaig Qualitatiu d'Activitat β-galactosidasa

Material

- Paper Whatman
- Tampó-Z: per 500 ml: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 8,05 gr; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 2,75 gr; KCl 0,375 gr; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,123 gr. Ajustar a pH 7,0 i autoclavar
- Solució X-gal: 100 ml Tampó-Z, 0,27 ml β-mercaptoetanol; 1,67 ml X-gal (Sigma) de 20 mg/ml l'stock
- Nitrogen líquid

Procediment:

1. Cal fer una rèplica de la colònia que està creixent en el medi –Trp/-Met/-Leu/-His + 3-AT 3 mM, en aquest mateix medi. Aquesta es tant per analitzar com per congelar en YPD amb 25% DMSO

2. Posar dins una placa de 15 cm de diàmetre dues circumferències de Paper Whatman
3. Humitejar un tros petit de Paper Whatman sobre la colònia replaquejada
4. Aquest tros petit de paper haurà agafat llevats que s'hauran de matar fent tres cicles d'1 minut en nitrogen líquid i d'1 minut a temperatura ambient. Cal que el llevat mori per tal de que la solució X-gal entri a la cèl·lula i reaccioni amb l'enzim  $\beta$ -galactosidasa
5. Es col·loca el tros petit de paper amb el llevat mort dins la placa i s'afegeixen suaument 5 ml de la solució X-gal
6. Aquesta reacció es deixa desenvolupar fins que apareix una coloració blava en les colònies positives i les negatives no viren. Triga unes 3 hores (o menys) i màxim 16 hores.

#### **14.2.2 Assaig Semiquantitatiu d'Activitat $\beta$ -galactosidasa**

Les colònies que han donat positiu per primer assaig es reanalitzen amb un assaig d'activitat semiquantitatiu. Aquest mètode és més sensible i permet semiquantificar el grau d'interacció. Aquest assaig també s'utilitza per determinar interaccions directes entre proteïnes conegudes.

Material

- ONPG (O-Nitophenyl  $\beta$ -galactopyranoside) 4 mg/ml en Tampó-Z (pH 7), que en aquest cas és el substrat de la reacció
- Medis de creixement -Trp/-Met/-Leu
- Tampó-Z
- Nitrogen líquid

## Procediment

1. En 2 ml medi -Trp/-Met/-Leu picar 3-4 colònies, vòrtex bé per evitar agregats i precipitats del llevat
2. 6-18 hores 30°C 200-250 rpm
3.  $OD_{600\text{ nm}} \geq 1,5$  (al mirar la OD vòrtex bé, per evitar agregats)
4. Agafar 1 ml del cultiu pas 2 i posar-lo amb 4 ml medi selectiu (o una dilució equivalent per tenir una  $OD_{600\text{ nm}}$  d'uns 0,3)
5. 2-3 hores 200-250 rpm 30°C
6.  $OD_{600\text{ nm}}$  0,5-0,8 (anotar cada OD)
7. Agafar 1,5 ml del cultiu
8. 30 segons a 14000 rpm
9. Eliminar el sobrenedant i resuspendre el pèl·let cel·lular amb 1.5 ml Z-Buffer
10. 30 segons a 14000 rpm
11. Eliminar el sobrenedant i resuspendre el pèl·let en 300 µl de Z-Buffer (el factor de dilució és  $1,5/0,3 = 5$  vegades)
12. Transferir 100 µl d'aquesta suspensió cel·lular
13. Lisi; 3 x (1 minut a Nitrogen Líquid + 1 minut bany 37°C)
14. Preparar un blanc amb 100 µl de Z-Buffer
15. Afegir 0,7 ml de Z-Buffer + β- Mercaptoetanol (100ml de Z-Buffer + 0.27ml β-Mercaptoetanol) a tots els tubs

16. Afegir i barrejar 160 µl ONPG en Z-Buffer (4mg/ml ONPG en Z-Buffer)
17. Incubar a temperatura ambient o 30°C
18. A les 3 hores fer lectura: Afegir en un tub eppendorf net 200 µl de la solució llevat + 80 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M (inhibidor de la reacció)
19. Centrifugar 10 minuts a 14000 rpm
20. Transferir el sobrenedant a placa de ELISA
21. Lectura a 405<sub>nm</sub> o 420<sub>nm</sub>
22. Fer lectura també a les 16-18 hores (passos 18-21)

L'activitat β-galactosidasa es calcula aplicant la fórmula:

$$\beta\text{-Galactosidasa units} = \frac{1000 \times \text{OD}_{405}}{t \times V \times \text{OD}_{600}}$$

A on t = temps (minuts) d'incubació amb ONPG

V= 0,1 ml (volum mostra) x 5 (factor dilució)

OD<sub>405</sub> = OD mostra X - OD blanc

# IV. RESULTATS



## **1. La molècula adaptadora 3BP2 es requerida tant en els esdeveniments primerencs com tardans de la senyalització dels mastòcits mediada pel receptor FcεRI**

Les molècules adaptadores són essencials en l'organització de les molècules de senyalització i en la coordinació i compartimentació de la seva activitat. 3BP2 és una proteïna adaptadora citoplasmàtica expressada ubiqüament però principalment en cèl·lules hematopoètiques. S'ha demostrat que actua com un regulador positiu transduint la senyal cel·lular en cèl·lules T, B i NK. 3BP2 és un important regulador en l'alliberació de grànuls citotòxics en les cèl·lules NK. Els mastòcits es desgranulen de manera similar després de l'agregació depenent d'antigen de l'alta afinitat del receptor per IgE (FcεRI) a la superfície cel·lular. L'activació d'aquestes cèl·lules indueix l'alliberament de mediadors inflamatoris preformats i la síntesi de novo i també la secreció de citocines i quimiocines. Així, els mastòcits participen tant en respostes innates com adquirides. Hem observat que 3BP2 s'expressa en mastòcits humans (HuMCs) de diversos orígens. A més 3BP2 co-immunoprecipita amb mediadors essencials per la senyalització dels mastòcits com són Lyn, Syk i PLCγ, per tant 3BP2 pot tenir un paper en la funció dels mastòcits. Per esbrinar quin rol pot tenir en els mastòcits s'utilitza la tècnica del shRNA lentiviral per silenciar l'expressió de 3BP2 en mastòcits humans. Els nostres resultats apunten que 3BP2 es necessari per obtenir una òptima resposta del mastòcit tant en respostes immediates com es la desgranulació i tardanes com la secreció de IL-8 i de GM-CSF. 3BP2 s'ha determinat que es necessari per la fosfolilació òptima de diferents molècules involucrades en la senyalització des mastòcits com són SYK, LAT i PLCγ1, molècules claus per l'alliberament de calci des dels dipòsits intracel·lulars. En conjunt, els nostres resultats mostren que en la transducció de senyals a través del FcεRI, 3BP2 és un important regulador de l'activació de mastòcits humans. Per tant, 3BP2 podria ser una diana terapèutica potencial per les malalties inflamatòries mediades pels mastòcits depenents d'IgE.



## Article publicat

Ainsua-Enrich E, Álvarez-Errico D, M. Gilfillan A, Picado C, Sayós J, Rivera J, Martín M. (2012). The Adaptor 3BP2 Is Required for Early and Late Events in FcεRI Signaling in Human Mast Cells. *J Immunol.* 2012 Sep 15;189(6):2727-34. Epub 2012 Aug 15.

# The adaptor 3BP2 is required for early and late events in FcεRI signaling in Human Mast Cells

Erola Ainsua-Enrich <sup>\*,†</sup>, Damiana Álvarez-Errico <sup>\*,†</sup>, Alasdair M. Gilfillan <sup>§</sup>, César Picado <sup>†,‡</sup>, Joan Sayós <sup>¶,||</sup>, Juan Rivera <sup>#</sup> and Margarita Martín <sup>\*,†</sup>

<sup>\*</sup>Biochemistry Unit, Faculty of Medicine, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain;

<sup>†</sup>Laboratory of Clinic and Experimental Immunoallergy, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, 08036 Barcelona, Spain;

<sup>‡</sup>Networking Research Center on Respiratory Diseases, Institute of Health Carlos III, 28029 Madrid, Spain;

<sup>§</sup>Laboratory of Allergic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892;

<sup>¶</sup>Immunobiology Group, Molecular Biology and Biochemistry Research Center for Nanomedicine, Nanomedicine Program, Vall Hebron Hospital Research Institute, Autonomous University of Barcelona, 08035 Barcelona, Spain;

<sup>||</sup>Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, Institute of Health Carlos III, 28029 Madrid, Spain; and

<sup>#</sup> Molecular Immunology Section, Laboratory of Molecular Immunogenetics, National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

Address correspondence and reprint requests to Dr. Margarita Martín, Biochemistry Unit, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Carrer de Casanova 143, E-08036 Barcelona, Spain. E-mail address: martin\_andorra@ub.edu

Running title: Role of 3BP2 adaptor in human mast cells

## ABSTRACT

Adaptor molecules are essential in organizing signaling molecules and in coordinating and compartmentalizing their activity. 3BP2 is a cytoplasmic adaptor protein mainly expressed by haematopoietic cells that has been shown to act as a positive regulator in T, B and NK cell signal transduction. 3BP2 is an important regulator of cytotoxic granule release in NK cells. Mast cells similarly degranulate following antigen-dependent aggregation of the high affinity receptor for IgE (FcεRI) on the cell surface. Activation of these cells induces the release of preformed inflammatory mediators and the de novo synthesis and secretion of cytokines and chemokines. Thus, mast cells participate in both innate and acquired responses. We observed that 3BP2 is expressed in human mast cells from diverse origins. Moreover 3BP2 co-immunoprecipitates with essential mast cell signaling mediators such as Lyn, Syk, and PLCγ, thus a role for this adaptor in mast cell function was postulated. In the present work, we used shRNA lentiviral targeting approach to silence 3BP2 expression in human mast cells. Our findings point to a requirement for 3BP2 in optimal immediate and late mast cells responses such as degranulation and IL-8 or GM-CSF secretion. 3BP2 was determined to be necessary for optimal phosphorylation of Syk, LAT and PLCγ1, critical signals for calcium release from intracellular stores. Taken together, our results show that by participating in FcεRI- mediated signal transduction 3BP2 is an important regulator of human mast cell activation. Thus, 3BP2 could be a potential therapeutic target for IgE-dependent mast cell-mediated inflammatory disease.

## INTRODUCTION

Mast cells are key effector cells in IgE-dependent hypersensitivity, as well as in allergic and inflammatory disorders. Ligation of the high affinity receptor for IgE (FcεRI), constitutively expressed on mast cells, promotes cell activation and

immediate release and production of proinflammatory mediators (1, 2). FcεRI-mediated mast cell activation can be dramatically enhanced by concurrent activation of the tyrosine kinase type III KIT (CD117), that plays a role in cell survival, proliferation and differentiation (3, 4). The signals generated as a consequence of antigen interaction with specific IgE bound to FcεRI is a highly ordered process where adaptor molecules are essential in organizing, coordinating and compartmentalizing signaling molecules in order to direct specific cellular responses. Adaptors display several motifs and domains that coordinate protein-protein and protein-lipid interactions and can be transmembrane or cytoplasmic (5). SH3-binding protein 2 (3BP2) is a cytoplasmic adaptor originally identified as a protein interacting with the SH3 domain of the protein tyrosine kinase (PTK) Abl (6). The 3BP2 encoding gene is located on human chromosome 4 (4p16.3 region). Human 3BP2 is a 561-aa protein containing an N-terminal pleckstrin homology (PH) domain, an SH3-binding proline-rich regions, and a C-terminal SH2 domain. The proline-rich region (PR1, PR2 and PR3) are known to associate to Src family PTKs (Fyn, Lyn and Lck) (7, 8). The SH2 domain of 3BP2 interacts with Syk family PTKs, Syk and ZAP-70 (7). 3BP2 is known to regulate bone homeostasis through osteoclast activation and osteoblast differentiation and function (9). Mutations in the proline rich region of 3BP2 are responsible for the cherubism autosomal dominant inherited disorder characterized by excessive bone degradation of the upper and lower jaws which results in facial swelling (10). It has been recently shown that these mutations uncouple 3BP2 from the poly (ADP-ribose) polymerase Tankyrase reducing ADP ribosylation and subsequent destruction of 3BP2 via ubiquitylation. Tankyrase Ankyrin repeats bind 3BP2 RxxPDG hexapeptide, and disruption of such interaction stabilizes 3BP2 protein (11). Consequently, elevated 3BP2 protein levels result in increased Src, Syk and Vav activity and osteoclasts hyperactivation which leads to cherubism (12). 3BP2 is preferentially expressed in hematopoietic tissues where it contributes to the regulation of immune responses (13). This molecule regulates transcriptional activities via calcineurin- and Ras-dependent pathways in T lymphocytes (7). 3BP2 mediated signals are regulated on T cells via SHP-1 tyrosine phosphatase

which acts as a negatively regulated by dephosphorylation of the adaptor (14). A positive regulatory role for 3BP2 in B cell receptor (BCR) function has been described (15) wherein 3BP2-deficient mice show impaired optimal B cell activation and thymus-independent humoral responses (16, 17). Regarding 3BP2 phosphorylation, in B cells 3BP2 gets tyrosine phosphorylated in a Syk dependent manner after BCR stimulation (18). 3BP2 also plays an important function in NK cells, where it regulates cell-mediated cytotoxicity via its PH, SH2, and proline-rich regions (19). Moreover, phosphorylation of 3BP2 Tyr 183, which mediates the interaction with Vav-1 and PLC- $\gamma$ , is critical for the ability of 3BP2 to positively regulate NK cell-mediated killing (19). In NK cells, 3BP2 was described to directly associate with the SLAM family member, CD244 (2B4), and to regulate CD244-mediated cytotoxicity through a SAP -and PKC-dependent mechanism, that does not affect IFN $\gamma$  secretion (20, 21). Although it has been described that the overexpression of 3BP2 SH2 domain impairs Fc $\epsilon$ RI dependent degranulation in rat basophilic leukaemia cell line RBL-2H3 (22), evidence for a role for endogenous 3BP2 in human mast cells (huMCs) function has remained elusive. Furthermore, as overexpression of dominant negative mutant constructs can cause off-target effects by interfering with other SH2-domain-containing proteins and/or may have incomplete effects on their specific targets, how 3BP2 regulates mast cell function in general is not clear. Thus, in this work we investigated the role of endogenous 3BP2 on Fc $\epsilon$ RI signaling and function in huMCs using a shRNA knock down approach. Our data indicates that 3BP2 is important for Syk phosphorylation and, consequently, for short and long term events in mast cells activation through Fc $\epsilon$ RI. Altogether our data show an important role for this adaptor in mast cell function through one of the major mast cell receptors.

## MATERIALS AND METHODS

### *Cells and antibodies*

The LAD2 human mast cell line, kindly provided by Drs. A Kirshenbaum and D.D. Metcalfe (NIH, Bethesda, MD, USA), was grown in StemPro-34 Serum-Free Medium (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), supplemented with StemPro-34 Nutrient and with L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), and 100 ng/ml recombinant stem cell factor (SCF) (Amgen, CA, USA). The LUVA human mast cell line, kindly provided by Dr. J. Steinke (University of Virginia) was grown as indicated above without SCF. Primary HuMCs derived from CD34-positive peripheral blood cells were obtained from healthy donors following informed consent on a protocol (98-I-0027; PI: Dr. A. Kirshenbaum) approved by the NIAID IRB and differentiated in vitro for 8 weeks in the presence of 100 ng/ml IL-6 and 100 ng/ml SCF as described (23). Mouse anti-3BP2 (clone 470) and rabbit anti-PLC $\gamma$  antibodies were purchased from Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA). Monoclonal anti-Syk was from Biologend (San Diego, CA, USA). Anti-phosphotyrosine monoclonal and anti-total ERK antibodies were from Zymed Laboratories (Invitrogen). Anti-LAT, anti-pLAT Y191, anti-pSyk Y352, anti-pPLC $\gamma$  1Y783, anti-pP38 Thr180/Tyr182, anti-p-ERK Thr202/Tyr204 and anti p-JNK Thr183/Tyr185 were purchased from Cell Signaling (Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA). Biotinylated human IgE was from Abbotec (San Diego, CA, USA).

### *ShRNA silencing by lentiviral infection*

Lentiviral particles to silence the 3BP2 gene expression were generated using Mission<sup>®</sup> shRNA technology according to manufacturer's instructions (Sigma, St. Louis, MO, USA). The 3BP2 specific shRNA sequence selected was: 5'CCG GGC GAA GTG GAA AGG TTG TTC ACT CGA GTG AAC AAC CTT TCC ACT TCG CTT TTT G 3'. Non-target shRNA was used as a control. Virus preparations

were done by transfection of 293LTV (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) cells and harvesting of supernatant 3 days post transfection as described (24). Briefly, supernatants were concentrated 35X by centrifugation and used to infect huMCs.  $5 \times 10^6$  of 6 week huMCs per shRNA preparation were infected. Selection was started 1 week later with 0, 2  $\mu\text{g/ml}$  Puromycin (Sigma) and the extent of 3BP2 knock down was determined by western blot 1 week after starting selection. All experiments in huMCs were performed at weeks 8 and 9 of cell culture.

#### *RNA extraction and retrotranscription.*

Total RNA was extracted with RNAeasy Mini Kit Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany) from  $2 \times 10^6$  non-transduced, non-target control and 3BP2 knockdown mast cells sensitized with biotinylated IgE and challenged with streptavidin (SA) (Sigma). cDNA was generated from mRNA High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

#### *Real Time PCR*

Real-time PCR for IL-8 was performed using TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) on an ABI-Prism 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems). 18S RNA amplification control was used for cycle normalization. Data were analyzed with 7500 SDS Software (Applied Biosystems). All PCR reactions were set up in triplicates.

#### *Degranulation assays*

Human mast cells were sensitized overnight with 100 ng/ml biotinylated IgE, in StemPro-34 media with SCF and IL-6. After washing, cells were stimulated with 100 ng/ml streptavidin (SA) at 37 °C for 30 min in Tyrode's buffer (10 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2.7 mM, KCl, 0.4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.3 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5.6 mM glucose and 0.025% BSA) for 30 min at 37 °C. IgE-dependent mast cell degranulation was monitored by  $\beta$ -hexosaminidase release as described

(25). The resulting  $\beta$ -hexosaminidase activity was expressed as the percentage of total cell content (samples lysed with triton X-100). %  $\beta$ -hexosaminidase release = (sample release minus spontaneous release/ maximum release minus spontaneous release) X 100.

### *Calcium mobilization*

Calcium mobilization in CD34+-derived huMCs and LAD2 cells was followed by fluorimetric analysis of free calcium with Fluo 4 AM fluorescent dye (Molecular Probes ®, Invitrogen).  $0.2 \times 10^6$  cells/ point were loaded with  $5 \mu\text{M}$  Fluo 4 AM for 30 min at  $4^\circ\text{C}$  in the dark, washed twice with Tyrode's buffer and resuspended. Fluorimetric measurements were done in a Modulus™ II Microplate Multimode Reader, Turner Biosystems (Promega, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

### *Cell activation, immunoprecipitation and immunoblotting*

Cells were sensitized overnight with biotinylated-IgE (100 ng/ml) in culture media. The following day, the cells were stimulated with 100 ng/ml of SA in the Tyrode's buffer for the indicated times. Whole cell lysate preparations were obtained as described elsewhere (26). For immunoprecipitation experiments, cells were washed twice with ice-cold PBS and solubilized in lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 20mM octyl- $\beta$ -glucoside, 100 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 1 mM sodium pyrophosphate and protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemical, IN, USA) ). Cell lysates were pre-cleared by centrifugation. Pre-cleared lysates were first incubated with the indicated primary antibodies and, subsequently with protein A-sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden). After rotation for 3 h at  $4^\circ\text{C}$ , the beads were washed three times with lysis buffer and immunoprecipitated proteins were eluted by heat treatment at  $100^\circ\text{C}$  for 5 min with 3 fold 4XX concentrated sampling buffer. The immunoprecipitates and total cell lysates were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)



and electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes PVDF (Millipore, Bedford, MA, USA). Blots were probed with the indicated antibodies. In all blots, proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

### *Immunofluorescence microscopy*

Unstimulated and FcεRI-activated LAD2 cells at various times (1 x 10<sup>6</sup> cells of each), or unstimulated non-target shRNA and 3BP2 shRNA infected LAD2 cells (Supplementary Figure 1) were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and permeabilized with 0,05% Saponin in PBS. After washing with PBS and incubated for 1 h with blocking buffer (0,2% non fat dry milk, 2%FCS,1%BSA, 20% rabbit serum, 0,01% NaN<sub>3</sub> and 0,01% Triton). Cells were labeled in suspension with anti-human 3BP2 or mouse IgG1 isotype control (1 µg/ml) at 4°C for 1 h. After washing with ice-cold PBS, cells were incubated with 1 µg/ml anti-mouse Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) at 4°C (control) for 30 min. For supplementary figure 2 anti-pSyk (Cell Signalling) was incubated for 1h at 4°C and developed with Alexa488 conjugated anti-rabbit secondary (Molecular Probes). Cells were then washed twice with ice-cold PBS, immobilized on polylysine-treated coverslips at 4°C for 30 min. Samples were washed and mounted in Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates). Fluorescence images were obtained using an Axio Observer.Z1 microscope (Zeiss) or a confocal microscope (TCS NT; Leica) for Supplementary Figure 2. Digital images were processed using Adobe Phostshop 8.0 (Adobe Systems Inc, San Jose CA) programs.

### *GM-CSF and IL-8 production*

IgE/antigen-dependent GM-CSF and IL-8 production and release was measured by ELISA with the DuoSet® ELISA Development System as described by the manufacturer (R&D Systems, Inc. MN, USA). Briefly, after overnight sensitization with biotinylated IgE (100ng/ml), cells were incubated with SA (1 µg/ml) for 6 h. Supernatants were collected and analyzed by ELISA.

### *Statistical data analysis.*

All results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of the mean (SD). Student's t-test was used to determine significant differences (p value) between two experimental groups after determination of normal distribution of the sample and variance analysis.

## **RESULTS**

### **3BP2 is expressed and relocalized towards membrane upon Fc $\epsilon$ RI activation.**

In order to elucidate the role of the 3BP2 adaptor in huMCs we first determined its expression in primary huMCs as well as in LAD2, LUVA and tissue-derived lung mast cells by western blot (Fig. 1A). We also examined its cellular distribution in resting and Fc $\epsilon$ RI dependent-activated human mast cells by fluorescent microscopy (Fig.1 B). 3BP2 shows a cytoplasmic staining pattern in human mast cells in resting conditions. Interestingly, the protein distribution in the cytoplasm is not diffuse but shows a punctate expression pattern. Similar punctuated pattern was observed in non-target shRNA infected cells, whereas no 3BP2 staining was observed in 3BP2 knock down cells (Supplementary Fig. 1). Moreover, 3BP2 relocalizes mainly at the plasma membrane after early Fc $\epsilon$ RI activation, where it co-localizes with phosphorylated Syk kinase (Supplementary Figure 2). Ten minutes following activation the 3BP2 distribution resembles the basal situation. This data suggests a rapid and transient translocation of the adaptor to the plasma membrane induced by Fc $\epsilon$ RI aggregation.

### **3BP2 recruits essential signaling mediators in human mast cells.**

We next analyzed 3BP2 phosphorylation and signalosome assembly after Fc $\epsilon$ RI signaling. Biotinylated IgE-sensitized LAD2 cells were stimulated with streptavidin (SA) for various times and 3BP2 was immunoprecipitated. As shown in Figure 2,

3BP2 is phosphorylated as early as 5" after receptor ligation, and co-immunoprecipitates with several phosphoproteins. The essential FcεRI signalling molecules Lyn, Syk, and PLCγ were identified as 3BP2 binding partners in huMCs. After the interaction of cell-bound IgE with cognate Ag, Lyn kinase phosphorylates the β- and γ-chain ITAMs of proximal receptors (27). These phosphorylated ITAMs become docking sites for Syk kinase (28), which propagates downstream signals by phosphorylation of several mediators including LAT and PLCγ (29). In our experiments, 3BP2 consistently co-immunoprecipitated with a 35-40kD phosphoprotein with apparent characteristics of LAT, however, we failed to identify this interaction by immunoblots with the anti-LAT available antibodies. Nevertheless, others have reported that LAT associates with the SH2-domain of 3BP2 (22). Given that these findings suggested that 3BP2 could play a central role in the FcεRI-anchored signalosome, we investigated the consequences of 3BP2 depletion to FcεRI signaling. We first analyzed the efficiency of lentiviral-encoded shRNA sequences for their ability to silence 3BP2, as compared to non-transduced cells or control /non target (NT) shRNA transduced cells. As shown in Fig 3A, we identified shRNA sequences that could effectively suppress 3BP2 expression in human mast cell lines and CD34+ derived huMCs. We evaluated Lyn (Fig. 3B) as well as FcεRI expression (Fig. 3C) in NT and 3BP2-silenced LAD2 and CD34+ derived huMCs cells. Our results show that both FcεRI and Lyn expression were unaffected by 3BP2 knock down.

### **3BP2 is required for FcεRI-dependent Syk phosphorylation.**

3BP2 was first identified as a Syk binding partner in a two hybrid screening (7). This interaction involves the 3BP2 SH2 domain and Syk, suggesting that the 3BP2 SH2 domain associates with autophosphorylated Tyr residues in the Syk linker or kinase domain (7). In our work, we found that 3BP2 interacts with Syk in human mast cells after FcεRI activation (Figure 2). Syk has an essential role in early and late mast cell responses (30), binding the phosphorylated FcεRIγ chain ITAMs after receptor aggregation resulting in a conformational change that increases its enzymatic activity (29) which leads to downstream propagation of signals. To

evaluate whether 3BP2 participates in the regulation of Syk activation we examined the kinase phosphorylation in 3BP2-silenced versus NT shRNA transduced huMCs following FcεRI stimulation. We found reduced Syk phosphorylation in Tyr352 when 3BP2 expression is reduced both in LAD2 and huMCs cells while total levels of the kinase remain unaffected (Fig.4 A and B). Reduction in Syk phosphorylation in 3BP2 knock down cells occurs as early as 5" after FcεRI stimulation (Supplementary Figure 3).

### **3BP2 is required for FcεRI-dependent LAT and PLCγ phosphorylation and calcium signaling.**

Activated Syk phosphorylates LAT which acts as a scaffold for a multimolecular signaling complex that includes PLCγ among other molecules (31). As 3BP2 expression modulates Syk phosphorylation, we expected that LAT and PLCγ phosphorylation could also be negatively affected after 3BP2 silencing. Thus, we examined phosphorylation of these molecules in 3BP2-silenced versus NT shRNA-transduced huMCs following FcεRI stimulation and we found a decrease in LAT and PLCγ1 phosphorylation when 3BP2 expression was reduced (Fig.5 A). PLCγ activation and phosphorylation facilitated by LAT, are key steps in Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores (29), (32). Hence, we measured calcium fluxes following FcεRI aggregation in 3BP2-silenced huMCs and LAD2 cells and compared these responses to those obtained in the NT shRNA-transduced cells. Our analysis showed that the initial calcium rise was similar in both control and 3BP2-silenced huMCs, but calcium mobilization in the 3BP2-silenced cells was not equally sustained with time (Fig.5 B). Conversely, the calcium mobilization was equal in both control and 3BP2-silenced cells after ionomycin treatment (Fig. 5C). Importantly, the maintenance of high calcium concentration is mediated through the influx of calcium from the extracellular environment and is a requirement for optimal MC degranulation (33). Thus, our findings indicate that 3BP2 is an important regulator of calcium influx after FcεRI stimulation.

### **3BP2 silencing affects ERK1/2 and p38 phosphorylation**

Once phosphorylated LAT recruits a number of signalling intermediaries that include Gab2, guanosine triphosphate exchangers, SOS that further activate small GTPases such as Ras resulting in the stimulation of the MAP kinase pathways. Previously, we have reported that overexpression of 3BP2 increases ERK1/2 phosphorylation, without affecting p38 phosphorylation, in NK cells after CD244 triggering, which correlate with enhancement of cytotoxicity (20). Herein, we studied how these pathways were altered after 3BP2 silencing in huMCs and LAD2 cells. Our data shows that FcεRI-mediated ERK1/2 and p38 phosphorylation was decreased following 3BP2 knockdown (Figure 6), supporting the idea of an important role for 3BP2 in signal propagation from the FcεRI.

### **3BP2 is a positive regulator of MC degranulation and cytokine responses.**

Given the relationship between calcium mobilization and MC activation, we explored the effect of 3BP2 silencing on huMC degranulation. Thus, we examined β-hexosaminidase release in 3BP2 shRNA- versus NT-infected cells. Reduced levels of 3BP2 expression in huMCs resulted in reduced FcεRI-mediated degranulation compared to that observed in NT transduced cells. When the non immunologic stimulus PMA plus ionomycin (P+I) was added, 3BP2 silencing did not affect granule release indicating that 3BP2 acts specifically downstream of FcεRI and upstream of late events (Figure 7). Late responses after IgE stimulation on MCs include the de novo synthesis and secretion of cytokines and chemokines (34). IL-8 and GM-CSF constitute two of the most abundant of such mediators; hence we evaluated the role of 3BP2 in their production. Biotinylated IgE-sensitized 3BP2-silenced and NT shRNA- transduced huMCs were stimulated with SA for 6h and IL-8 and GM-CSF contents were measured in cell culture supernatants (Fig. 8A and 8B). In addition, in the case of IL-8, 3BP2 was required for optimal production at the transcriptional level, as evidenced by a marked reduction in IL-8 mRNA levels after 3BP2 silencing (Fig. 8C). Collectively, the

findings demonstrate that the 3BP2 adaptor molecule is necessary for optimal triggering of early and late FcεRI signaling events.

## DISCUSSION

Mast cells are involved in both innate and adaptive immunity and they induce the release of preformed and the de novo synthesis of inflammatory mediators after activation. The final outcome will depend on the balance of engaging inhibitory and activating cell surface receptors as well as the positive and negative intracellular molecular events that involve kinases and phosphatases as well as other protein and lipid mediators with adaptor functions. Here we report for first time that 3BP2 is expressed in human mast cells and that it is required for FcεRI signaling.

3BP2 was tyrosine phosphorylated at early times after FcεRI stimulation and consequentially was observed to co-immunoprecipitate with the src kinase Lyn implicating this adaptor in the organization of early events in mast cell signaling. Lyn is constitutively associated with the β subunit of the FcεRI and activated upon antigen-mediated FcεRI aggregation (35). Following antigen stimulation, 3BP2 was recruited to the plasma membrane, presumably by its PH domain. Once in close proximity to the plasma membrane, 3BP2 could interact by its proline rich domain with the Lyn SH3 domain and be a target for phosphorylation by this Src kinase. This view is supported by experiments in COS-7 cells showing that 3BP2 interacts with, and is a substrate for, Lyn. In addition, phosphorylation of Y446 in 3BP2 can create a binding site for the Lyn SH2 thereby increasing Lyn autophosphorylation (8). Our data show that 3BP2 also binds Syk in human mast cells after FcεRI stimulation, Both 3BP2 and phosphorylated Syk are translocated to the membrane where they colocalize following receptor crosslinking. 3BP2 (via its SH2 domain) has been shown to interact with phosphorylated and activated Syk after antigen receptor engagement of B cells (15). Syk, also binds to the tyrosine phosphorylated γ ITAM of the FcεRI through its SH2 domains (35) and is

essential for all known FcεRI-mediated responses (36). 3BP2 also undergoes rapid dephosphorylation within two minutes upon stimulation, which could be mediated by SHP-1 phosphatase which has been described as a 3BP2 substrate in T cells (Yu, 2006). The afore mentioned early phosphorylation events lead to the recruitment of molecules such as LAT, and to the activation of enzymes like phospholipase C $\gamma$ , which regulates intracellular calcium release and PKC activation (31, 35). We observed that 3BP2 can bind PLC $\gamma$  when the adaptor is phosphorylated. Indeed, it has been described that Syk can also induce phosphorylation of Y183 in 3BP2 (18), which then binds PLC $\gamma$ 1 stabilizing the interaction of this enzyme with LAT and contributing to optimal phosphorylation of these molecules in B cells (18). The above interactions of 3BP2 would likely constitute an amplification mechanism that promotes Lyn -Syk - LAT- PLC $\gamma$  signaling through stabilizing this complex. Reduction in 3BP2 expression did not completely ablate signaling but we observed weaker phosphorylation of Syk Y352 as early as 5" after stimulation, and downstream of this, reduced LAT Y191 and PLC $\gamma$ 1 Y738 phosphorylation. Pharmacological inhibitors of Syk kinase catalytic activity bearing therapeutic potential have been developed (37). However, Syk is widely distributed in different cell types, and inhibiting its catalytic activity could result in unwanted consequences. Inhibition of Syk interactions with its cellular partners, even while maintaining its kinase activity, might well result in the dampening of cellular responses and could be useful as a strategy with therapeutic potential (38). Because 3BP2 is a Syk binding protein it constitutes an interesting candidate for potential intervention in Syk mediated-signals. In addition to participating in early signaling events, 3BP2 also affects other downstream signaling molecules, which would account for the observed reduction in cytokine production following 3BP2 knock down. Our findings show that ERK1 and 2 and p38 MAPKs are less active in 3BP2 silenced cells. Optimal activation of MAPKs requires LAT function as revealed in LAT deficient BMMCs (39, 40). Thus the contribution of 3BP2 in achieving complete phosphorylation of LAT could explain the observed effects in late FcεRI responses, including MAPKs and transcription factor activity. In support of this view, 3BP2 has been reported to contribute to B

cell antigen receptor (BCR) (18) dependent activation of transcription factors like NFAT, creating a multiprotein signalosome with the SH2 domain(s) of PLC $\gamma$ 2 and Vav1.

In this work, we show that in mast cells, 3BP2 regulates and is necessary for GM-CSF production following Fc $\epsilon$ RI stimulation. Transcription of GM-CSF is known to be NFAT-dependent (41). The two murine models in which the 3BP2 gene is deleted have generated some controversy as to whether there is a role for 3BP2 in cell viability and in Syk, PLC $\gamma$ 2 and MAP kinase activation. However, it is quite clear that B cell proliferation and BCR signaling are impaired while there is normal T cell development, proliferation, cytokine secretion, and signaling in response to TCR ligation in 3BP2 deficient mice (16), (17). These findings suggest that 3BP2 is critical for BCR, and humoral responses but not for TCR signaling. T cells could still have a homologous molecule which has a redundant function of 3BP2. The presence of a 3BP2 homologue is consistent with the observation of wild type sequence of 3BP2 in 3 out of 12 families with cherubism, a disease where mutation of 3BP2 results in molecule's gain of function (42).

Cherubism involves a chronic non-infectious inflammation of the bone which occurs in the absence of a detectable adaptive immune response. Cherubism mice exhibit increased myeloid responses to macrophage-colony-stimulating factor (M-CSF) and RANK (receptor activation of NF $\kappa$ B) ligand (RANKL) leading to the activation of osteoclast. As we learn more about the immunological features of this disease it appears that TNF- $\alpha$  secreting myeloid cells are emerging as primary players (9) (43). Although such cells are likely to be important players, mast cell involvement can not be excluded. Recently, it has been demonstrated that cherubism mutations disrupt the interaction between 3BP2 and Tankyrase, a poly (ADP-ribose) polymerase resulting in higher 3BP2 levels due to increased protein stability, leading to hyperactive Src, Syk, and Vav pathways in osteoclasts (12). Structural evidence that deregulation of substrate recognition by Tankyrase is indeed the underlying mechanistic basis of cherubism has been as well provided (11). Conversely, it was published that overexpression of the cherubism 3BP2



mutants suppress Vav and MAP kinase activation attenuating the FcεRI-mediated activation in RBL-2H3 cells, suggesting that point mutations of 3BP2 cause dysfunction of 3BP2 in vivo (44). These data revealed the importance of elucidating the role of the protein in the most appropriate and physiological context.

In conclusion, herein we present evidence for the expression and critical role of 3BP2 in human mast cells activation. This function is related to its essential role as an adaptor molecule for both early and late signal transduction responses required for respectively degranulation and the generation and release of cytokine. Increasing our knowledge on how 3BP2 functions will be crucial towards further understanding its role in the regulation of FcεRI signaling, which may also open new avenues of research with therapeutic promise in mast cell derived diseases.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Unitat Microscopia Confocal, Serveis Cientificotècnics, Universitat de Barcelona-IDIBAPS) for technical assistance.

## FOOTNOTES

This work was supported by grant SAF2009-07548 from the Plan Nacional Ministerio de Ciencia e Innovación. Spain. E. A-E is supported by a FPI fellowship both from Ministerio de Ciencia e Innovación. D. A-E is supported by a Juan de la Cierva contract. J.S. is supported by a contract Miguel Servet from Fondo de Investigaciones Sanitarias from Instituto de Salud Carlos III (CP06/00058). Work conducted in the laboratory of A.M.G. is supported by the Intramural Research Program within the National Institute of Allergy and Infectious Disease of the National Institutes of Health, USA. Work done in J.R. laboratory is funded by the Intramural Research Program within the National Institute of Arthritis, Musculoskeletal and Skin Disease of the National Institutes of Health, USA.

## REFERENCES

1. Galli, S. J., J. Kalesnikoff, M. A. Grimaldeston, A. M. Piliponsky, C. M. Williams, and M. Tsai. 2005. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 23:749-786.
2. Galli, S. J., M. Grimaldeston, and M. Tsai. 2008. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 8:478-486.
3. Mekori, Y. A., C. K. Oh, and D. D. Metcalfe. 1995. The role of c-Kit and its ligand, stem cell factor, in mast cell apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 107:136-138.
4. Ronnstrand, L. 2004. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61:2535-2548.
5. Alvarez-Errico, D., E. Lessmann, and J. Rivera. 2009. Adapters in the organization of mast cell signaling. *Immunol Rev* 232:195-217.
6. Ren, R., B. J. Mayer, P. Cicchetti, and D. Baltimore. 1993. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259:1157-1161.
7. Deckert, M., S. Tartare-Deckert, J. Hernandez, R. Rottapel, and A. Altman. 1998. Adaptor function for the Syk kinases-interacting protein 3BP2 in IL-2 gene activation. *Immunity* 9:595-605.
8. Maeno, K., K. Sada, S. Kyo, S. M. Miah, K. Kawauchi-Kamata, X. Qu, Y. Shi, and H. Yamamura. 2003. Adaptor protein 3BP2 is a potential ligand of Src homology 2 and 3 domains of Lyn protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 278:24912-24920.
9. Ueki, Y., C. Y. Lin, M. Senoo, T. Ebihara, N. Agata, M. Onji, Y. Saheki, T. Kawai, P. M. Mukherjee, E. Reichenberger, and B. R. Olsen. 2007. Increased myeloid cell responses to M-CSF and RANKL cause bone loss and inflammation in SH3BP2 "cherubism" mice. *Cell* 128:71-83.

10. Hatani, T., and K. Sada. 2008. Adaptor protein 3BP2 and cherubism. *Current medicinal chemistry* 15:549-554.
11. Guettler, S., J. LaRose, E. Petsalaki, G. Gish, A. Scotter, T. Pawson, R. Rottapel, and F. Sicheri. 2011. Structural basis and sequence rules for substrate recognition by Tankyrase explain the basis for cherubism disease. *Cell* 147:1340-1354.
12. Levaot, N., O. Voytyuk, I. Dimitriou, F. Sircoulomb, A. Chandrakumar, M. Deckert, P. M. Krzyzanowski, A. Scotter, S. Gu, S. Janmohamed, F. Cong, P. D. Simoncic, Y. Ueki, J. La Rose, and R. Rottapel. 2011. Loss of Tankyrase-mediated destruction of 3BP2 is the underlying pathogenic mechanism of cherubism. *Cell* 147:1324-1339.
13. Deckert, M., and R. Rottapel. 2006. The adaptor 3BP2: how it plugs into leukocyte signaling. *Adv Exp Med Biol* 584:107-114.
14. Yu, Z., M. Maoui, Z. J. Zhao, Y. Li, and S. H. Shen. 2006. SHP-1 dephosphorylates 3BP2 and potentially downregulates 3BP2-mediated T cell antigen receptor signaling. *Febs J* 273:2195-2205.
15. Foucault, I., S. Le Bras, C. Charvet, C. Moon, A. Altman, and M. Deckert. 2005. The adaptor protein 3BP2 associates with VAV guanine nucleotide exchange factors to regulate NFAT activation by the B-cell antigen receptor. *Blood* 105:1106-1113.
16. de la Fuente, M. A., L. Kumar, B. Lu, and R. S. Geha. 2006. 3BP2 deficiency impairs the response of B cells, but not T cells, to antigen receptor ligation. *Mol Cell Biol* 26:5214-5225.
17. Chen, G., I. D. Dimitriou, J. La Rose, S. Ilangumaran, W. C. Yeh, G. Doody, M. Turner, J. Gommerman, and R. Rottapel. 2007. The 3BP2 adapter protein is required for optimal B-cell activation and thymus-independent type 2 humoral response. *Mol Cell Biol* 27:3109-3122.

18. Shukla, U., T. Hatani, K. Nakashima, K. Ogi, and K. Sada. 2009. Tyrosine phosphorylation of 3BP2 regulates B cell receptor-mediated activation of NFAT. *J Biol Chem* 284:33719-33728.
19. Jevremovic, D., D. D. Billadeau, R. A. Schoon, C. J. Dick, and P. J. Leibson. 2001. Regulation of NK cell-mediated cytotoxicity by the adaptor protein 3BP2. *J Immunol* 166:7219-7228.
20. Saborit-Villarroya, I., J. M. Del Valle, X. Romero, E. Esplugues, P. Lauzurica, P. Engel, and M. Martin. 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.
21. Saborit-Villarroya, I., A. Martinez-Barriocanal, I. Oliver-Vila, P. Engel, J. Sayos, and M. Martin. 2008. The adaptor 3BP2 activates CD244-mediated cytotoxicity in PKC- and SAP-dependent mechanisms. *Mol Immunol* 45:3446-3453.
22. Sada, K., S. M. Miah, K. Maeno, S. Kyo, X. Qu, and H. Yamamura. 2002. Regulation of FcepsilonRI-mediated degranulation by an adaptor protein 3BP2 in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *Blood* 100:2138-2144.
23. Radinger, M., B. M. Jensen, H. S. Kuehn, A. Kirshenbaum, and A. M. Gilfillan. 2010. Generation, isolation, and maintenance of human mast cells and mast cell lines derived from peripheral blood or cord blood. *Current protocols in immunology* / edited by John E. Coligan ... [et al.] Chapter 7:Unit 7 37.
24. Furumoto, Y., S. Brooks, A. Olivera, Y. Takagi, M. Miyagishi, K. Taira, R. Casellas, M. A. Beaven, A. M. Gilfillan, and J. Rivera. 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* 176:5167-5171.
25. Alvarez-Errico, D., I. Oliver-Vila, E. Ainsua-Enrich, A. M. Gilfillan, C. Picado, J. Sayos, and M. Martin. 2011. CD84 negatively regulates IgE high-affinity receptor signaling in human mast cells. *J Immunol* 187:5577-5586.

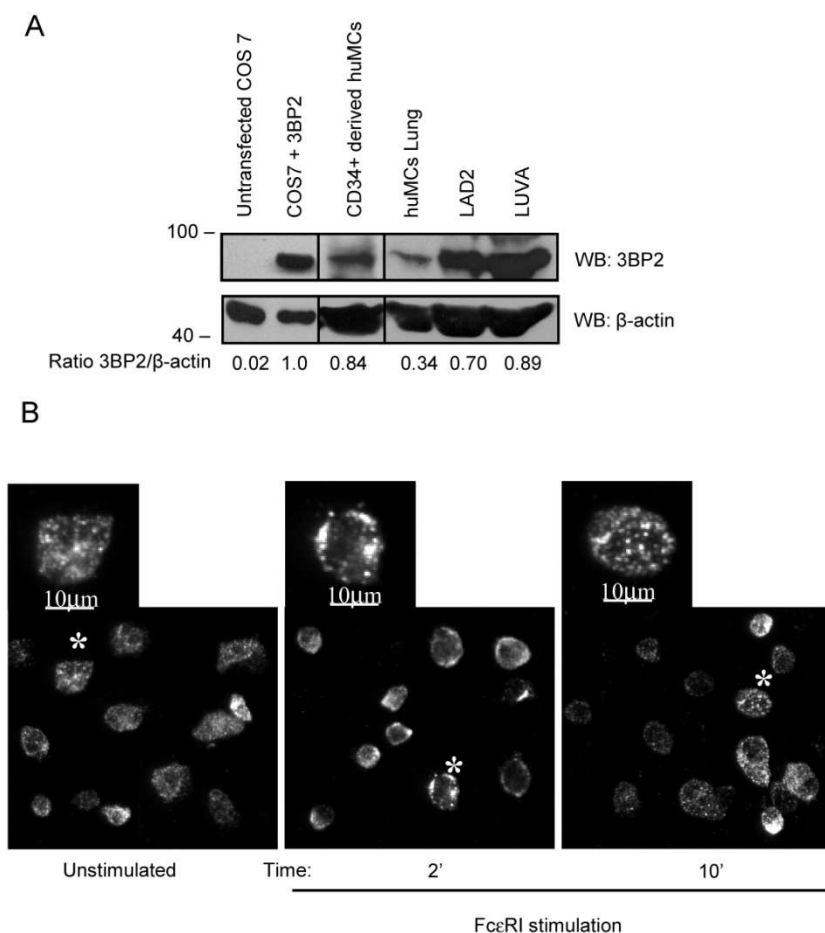
26. Tkaczyk, C., D. D. Metcalfe, and A. M. Gilfillan. 2002. Determination of protein phosphorylation in Fc epsilon RI-activated human mast cells by immunoblot analysis requires protein extraction under denaturing conditions. *Journal of immunological methods* 268:239-243.
27. Pribluda, V. S., C. Pribluda, and H. Metzger. 1994. Transphosphorylation as the mechanism by which the high-affinity receptor for IgE is phosphorylated upon aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11246-11250.
28. Jouvin, M. H., M. Adamczewski, R. Numerof, O. Letourneur, A. Valle, and J. P. Kinet. 1994. Differential control of the tyrosine kinases Lyn and Syk by the two signaling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor. *J Biol Chem* 269:5918-5925.
29. Parravicini, V., M. Gadina, M. Kovarova, S. Odom, C. Gonzalez-Espinosa, Y. Furumoto, S. Saitoh, L. E. Samelson, J. J. O'Shea, and J. Rivera. 2002. Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol* 3:741-748.
30. Siraganian, R. P., R. O. de Castro, E. A. Barbu, and J. Zhang. 2010. Mast cell signaling: the role of protein tyrosine kinase Syk, its activation and screening methods for new pathway participants. *FEBS Lett* 584:4933-4940.
31. Gilfillan, A. M., and C. Tkaczyk. 2006. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* 6:218-230.
32. Vig, M., and J. P. Kinet. 2009. Calcium signaling in immune cells. *Nat Immunol* 10:21-27.
33. Ma, H. T., and M. A. Beaven. 2009. Regulation of Ca<sup>2+</sup> signaling with particular focus on mast cells. *Critical reviews in immunology* 29:155-186.
34. Rivera, J., and A. M. Gilfillan. 2006. Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 117:1214-1225; quiz 1226.
35. Siraganian, R. P. 2003. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Curr Opin Immunol* 15:639-646.

36. Costello, P. S., M. Turner, A. E. Walters, C. N. Cunningham, P. H. Bauer, J. Downward, and V. L. Tybulewicz. 1996. Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells. *Oncogene* 13:2595-2605.
37. Riccaboni, M., I. Bianchi, and P. Petrillo. 2010. Spleen tyrosine kinases: biology, therapeutic targets and drugs. *Drug discovery today* 15:517-530.
38. Villoutreix, B. O., G. Laconde, D. Lagorce, P. Martineau, M. A. Miteva, and P. Dariavach. 2011. Tyrosine kinase syk non-enzymatic inhibitors and potential anti-allergic drug-like compounds discovered by virtual and in vitro screening. *PLoS one* 6:e21117.
39. Saitoh, S., R. Arudchandran, T. S. Manetz, W. Zhang, C. L. Sommers, P. E. Love, J. Rivera, and L. E. Samelson. 2000. LAT is essential for Fc(epsilon)RI-mediated mast cell activation. *Immunity* 12:525-535.
40. Saitoh, S., S. Odom, G. Gomez, C. L. Sommers, H. A. Young, J. Rivera, and L. E. Samelson. 2003. The four distal tyrosines are required for LAT-dependent signaling in FcepsilonRI-mediated mast cell activation. *J Exp Med* 198:831-843.
41. Johnson, B. V., A. G. Bert, G. R. Ryan, A. Condina, and P. N. Cockerill. 2004. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhancer activation requires cooperation between NFAT and AP-1 elements and is associated with extensive nucleosome reorganization. *Mol Cell Biol* 24:7914-7930.
42. Ueki, Y., V. Tiziani, C. Santanna, N. Fukai, C. Maulik, J. Garfinkle, C. Ninomiya, C. doAmaral, H. Peters, M. Habal, L. Rhee-Morris, J. B. Doss, S. Kreiborg, B. R. Olsen, and E. Reichenberger. 2001. Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. *Nat Genet* 28:125-126.
43. Ferguson, P. J., and H. I. El-Shanti. 2007. Autoinflammatory bone disorders. *Current opinion in rheumatology* 19:492-498.

44. Miah, S. M., T. Hatani, X. Qu, H. Yamamura, and K. Sada. 2004. Point mutations of 3BP2 identified in human-inherited disease cherubism result in the loss of function. *Genes Cells* 9:993-1004.



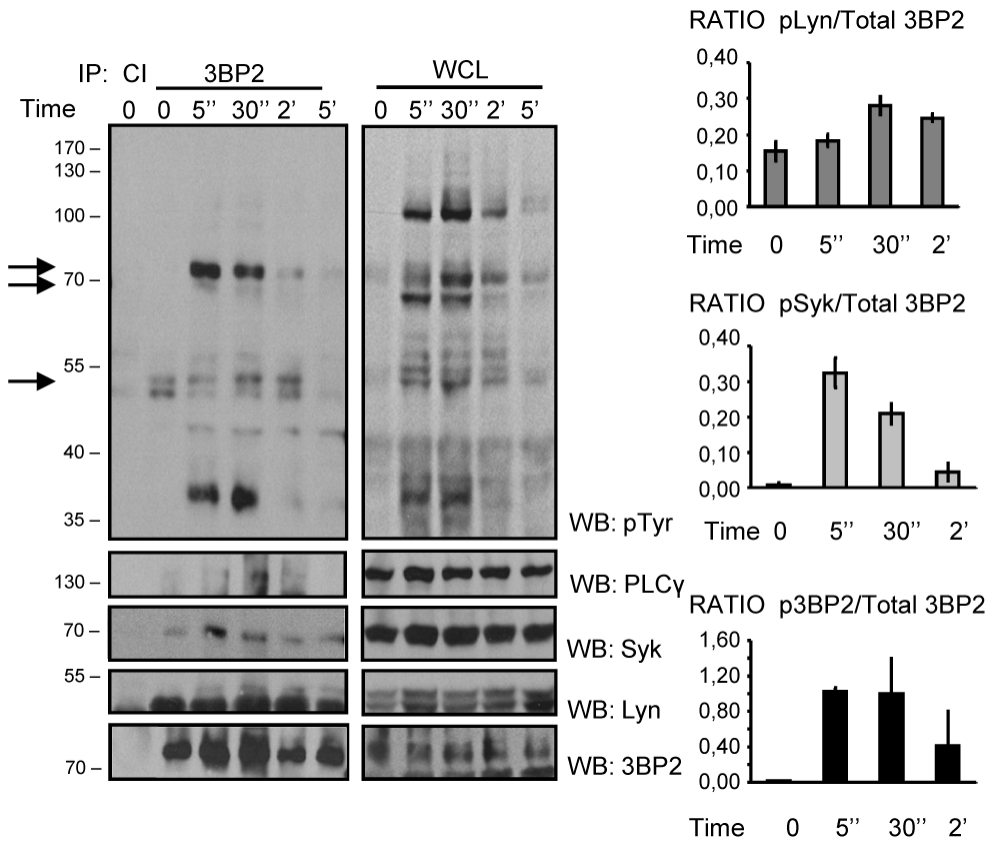
## FIGURE 1



### Figure 1. 3BP2 is expressed in human mast cells

Anti-3BP2 western blot analysis was performed on non-transfected and 3BP2-transfected COS 7, LAD2 and CD34<sup>+</sup> peripheral blood-derived huMCs whole cell lysates, LUVA and lung mast cells. Membrane was reprobed with anti-β-actin, to calculate 3BP2/total protein ration and to check loading levels per lane. (A). IgE-bound LAD2 cells were activated with streptavidin (SA) at 2 and 10 min. Non-stimulated and activated cells were fixed, permeabilized and stained with anti-3BP2 and isotype control antibodies (data not shown) and further stained with anti-mouse-Cy3 as indicated in Materials and Methods section (B). Bars equal to 10μm.

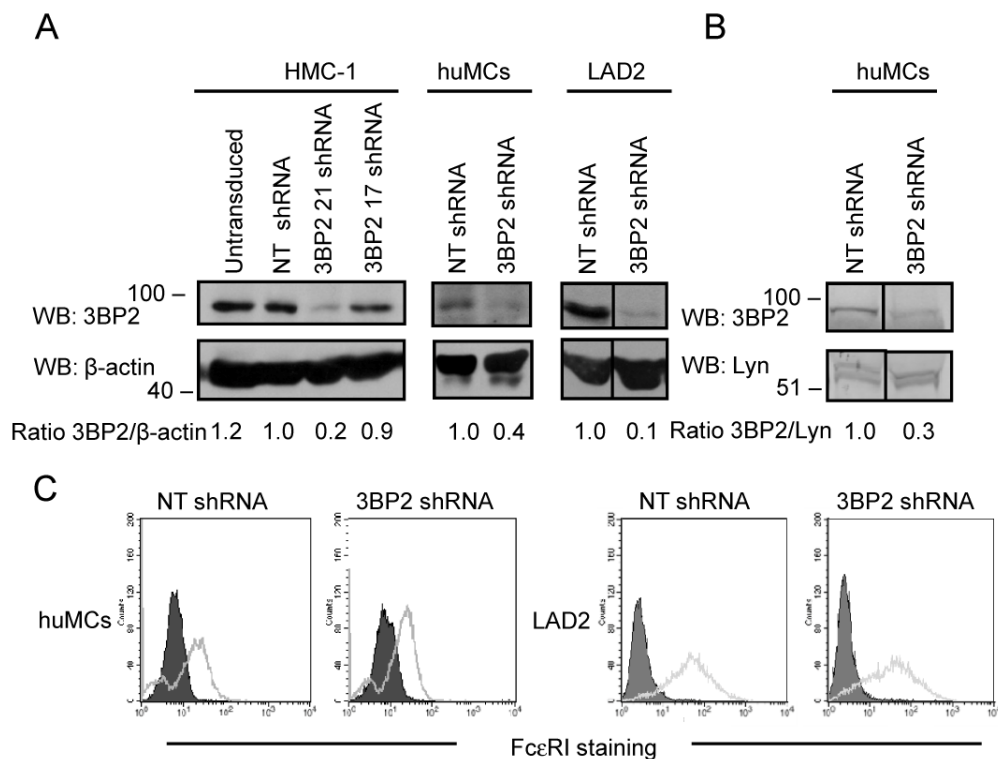
FIGURE 2



**Figure 2. 3BP2 coprecipitates with Lyn, Syk and PLC $\gamma$  in human mast cells.**

Biotinylated IgE-bound LAD2 cells (25 million cells per point) were activated with streptavidin (SA) at the indicated times and lysed as discussed in Materials and Methods. The lysates were immunoprecipitated using control Ig (CI) and 3BP2 antibodies. Western blot was performed with the following antibodies: anti-phosphotyrosine, anti-PLC $\gamma$ , anti-Lyn and anti-Syk. The immunoprecipitates and WCL (one million and a half) were loaded in the same gel. WCL stands for whole cell lysate. The experiment has been performed various times and the graphics comparing phosphorylation of Lyn, Syk and 3BP2 from 3BP2 immunoprecipitation versus total 3BP2 immunoprecipitated are the mean of three independent experiments.

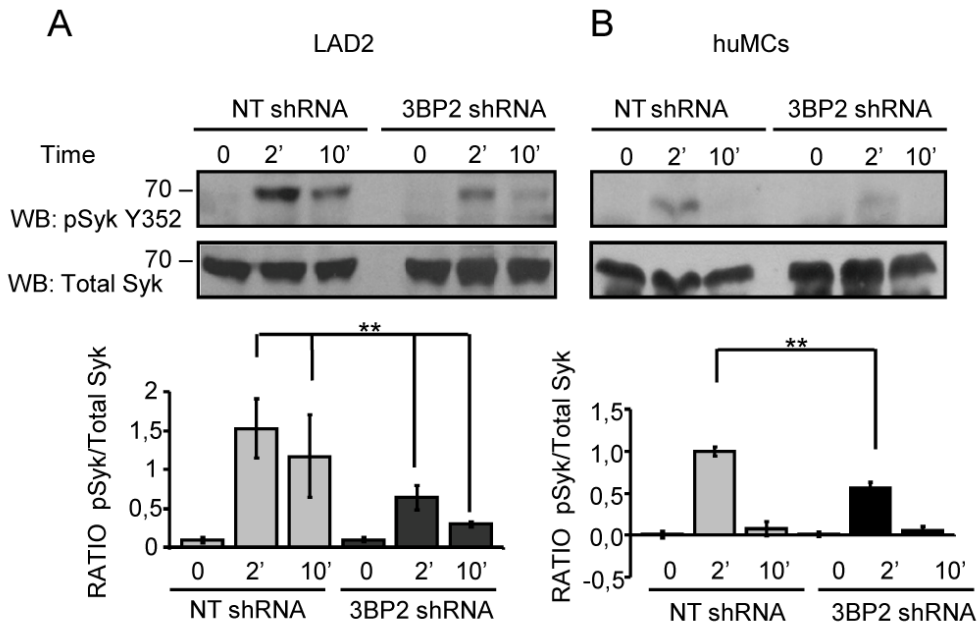
## FIGURE 3



**Figure 3. Selective knock down of 3BP2 in human mast cells.**

3BP2 expression was analyzed in HMC-1 cells by western blot following treatment of the cells with control (NT shRNA) and 2 different 3BP2-targetting shRNAs. The sequence corresponding to shRNA clone 21 was chosen for further assays in CD34<sup>+</sup> peripheral blood-derived huMCs and LAD2 cells (A). Quantitation of the band intensity was performed by densitometry. Lyn (B) and FcεRI expression (C) were similar in 3BP2 shRNA and control- transduced huMCs and LAD2 cells. FcεRI expression was determined by FACS using PE-conjugated α-FcεRI. The isotype control is grey filled. Data are representative of 3 experiments.

FIGURE 4

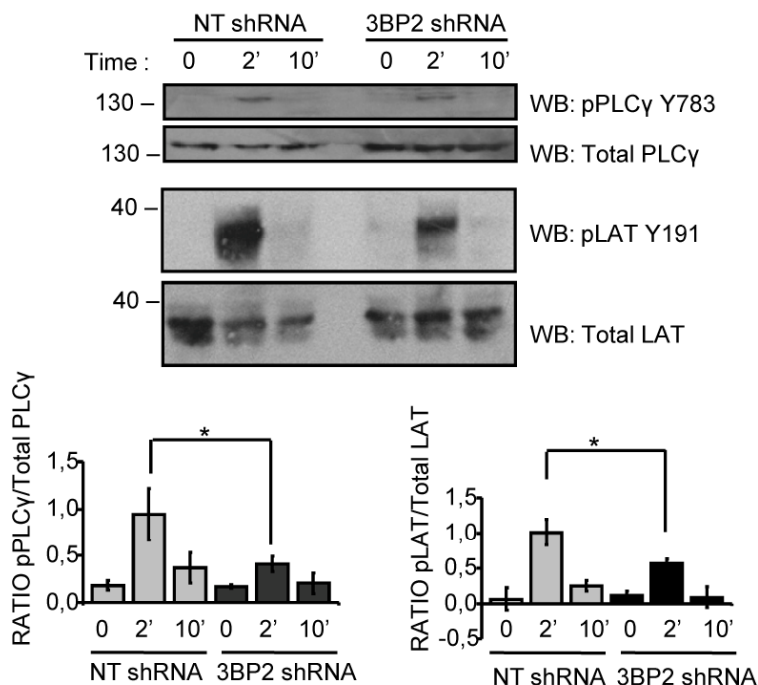


**Figure 4. Silencing of 3BP2 reduces FcεRI-induced Syk<sub>Y352</sub> phosphorylation**

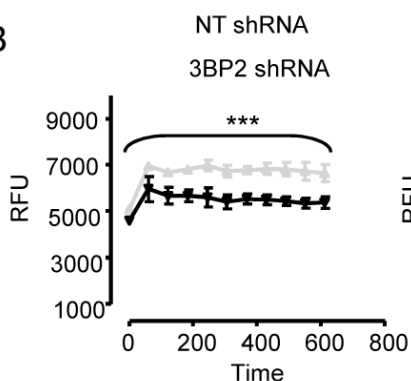
Specific antibodies recognizing phosphorylated Syk<sub>Y352</sub> and total Syk were used to immunoprobe for these proteins in huMC lysates of 3BP2 shRNA- and NT shRNA- transduced cells following biotinylated IgE crosslinking with 100 ng/ml SA at indicated times. Western blots correspond to LAD2 cells (A) and CD34<sup>+</sup> peripheral blood-derived huMCs (B). The band intensity quantitation was performed by densitometry. Densitometric analysis and phosphorylated/total ratio for each molecule from 3 independent experiments is represented in the bar charts on the bottom (C). Statistical significance (\*\*p < 0.001,) is relative to NT shRNA.

FIGURE 5

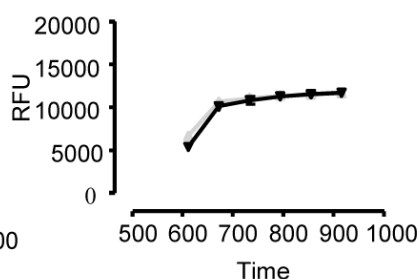
A



B



C

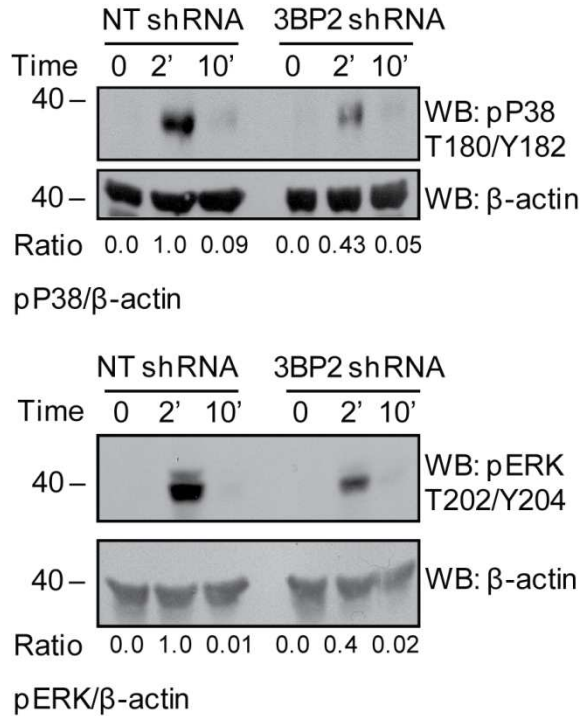


**Figure 5. FcεRI-mediated phosphorylation of PLCγ and LAT and resulting calcium signal are reduced in 3BP2 shRNA- silenced cells.**

Specific anti-phosphorylated LAT<sub>Y191</sub> and PLCγ<sub>Y783</sub> antibodies were used to blot membranes with 3BP2 knockdown versus control shRNA huMCs cell lysates upon biotinylated IgE crosslinking with 100ng/ml SA for various times as indicated.

Densitometric analysis and phosphorylated/total ratio for each molecule from 3 independent experiments is represented in the bar charts next to the blot (A). Calcium fluxes following FcεRI stimulation were measured in biotinylated IgE sensitized 3BP2 shRNA silenced and NT shRNA transduced LAD2 (B) cells loaded with Fluo4. Cells were stimulated with 100 ng/ml streptavidin (SA) and analyzed by fluorimetric measure of free calcium concentrations. Results are expressed as mean +/- SD of triplicates and it is representative of 6 independent experiments. 3BP2 shRNA and NT shRNA transduced LAD2 cells responses to ionomycin, respectively are shown in (C). Statistical significance (\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ) is relative to NT shRNA. RFU means relative fluorescence units.

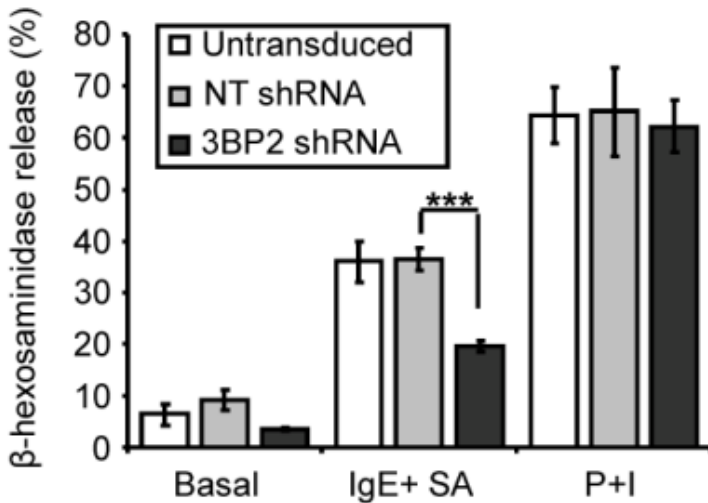
FIGURE 6



**Figure 6. ERK and p38 MAPK phosphorylation is reduced in 3BP2 silenced huMCs.**

Biotinylated IgE-sensitized 3BP2 shRNA- and NT shRNA-transduced huMCs were stimulated with 100 ng/ml SA for 2 and 10 min. Cells were lysed and total cell lysates were analyzed for ERK1/2 and p38 MAPK phosphorylation. Actin was used as loading control. Band intensity quantitation for each blot was performed by densitometry. The experiment is representative of 3 independent assays.

FIGURE 7

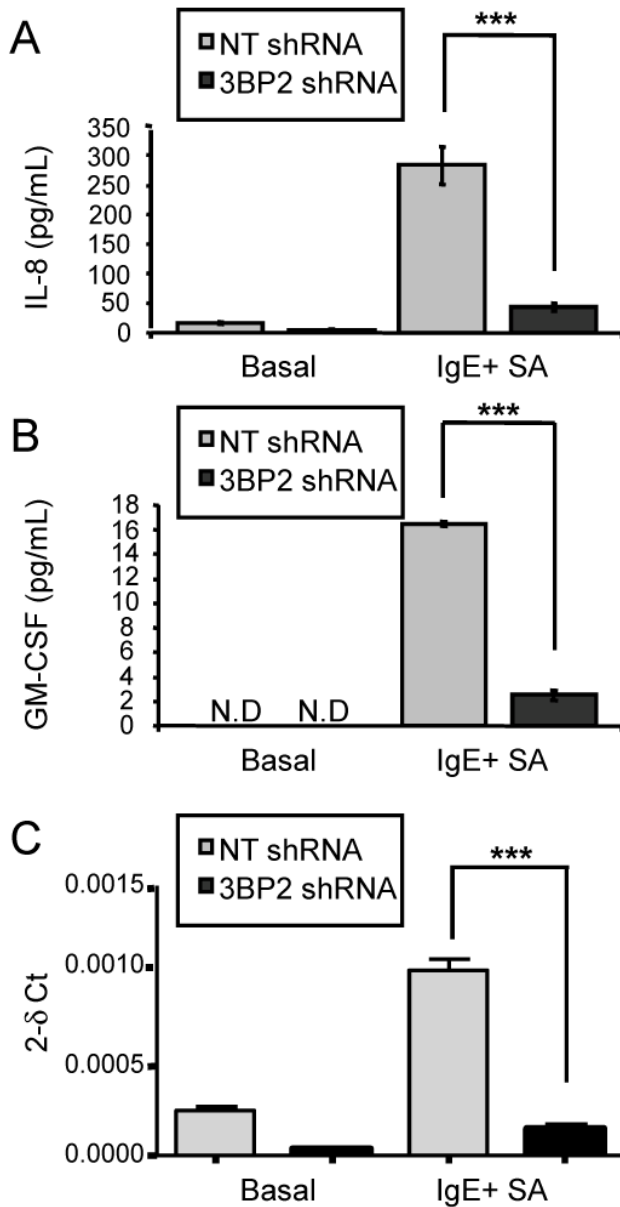


**Figure 7. 3BP2 silencing impairs Fc $\epsilon$ RI mediated degranulation in huMCs.**

Biotinylated-IgE-sensitized CD34<sup>+</sup> peripheral blood-derived huMCs with normal or reduced levels of 3BP2 (shRNA silenced) were stimulated with 100 ng/ml SA for 30 min.  $\beta$ -hexosaminidase release was measured in collected supernatants. Results are expressed as a percent of total  $\beta$ -hexosaminidase content reported as mean  $\pm$  SE. Data represent the mean of 3 independent experiments. Statistical significance (\*\*\*)  $p < 0.0001$  is relative to NT shRNA.



FIGURE 8

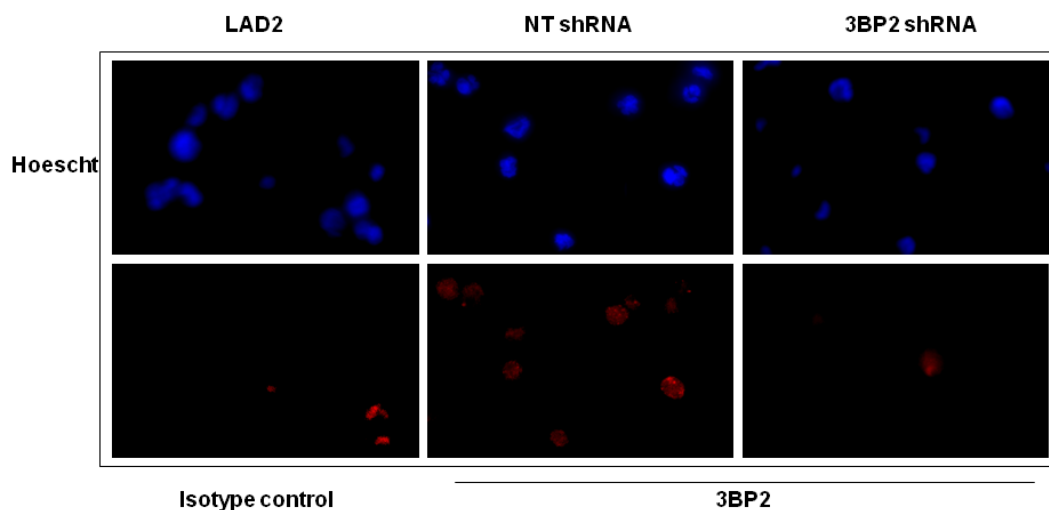


**Figure 8. 3BP2 is required for normal huMC cytokine production.**

CD34<sup>+</sup> peripheral blood-derived huMCs with normal or reduced levels of 3BP2 (NT shRNA and 3BP2 shRNA respectively) were sensitized O/N with biotinylated IgE and stimulated for 6 h with 1 μg/ml streptavidin (SA). IL-8 and GM-CSF production

were measured by ELISA (A and B) and IL-8 transcripts relative to a control RNA were measured by real time PCR (C). Results are expressed as the mean +/- SD. Significant (\*\*\*) $p < 0.0001$ ) difference was found between NT shRNA and 3BP2 shRNA. Data are the mean of triplicates and it is representative of 3 independent experiments from 3 different donors. N.D. means not detectable.

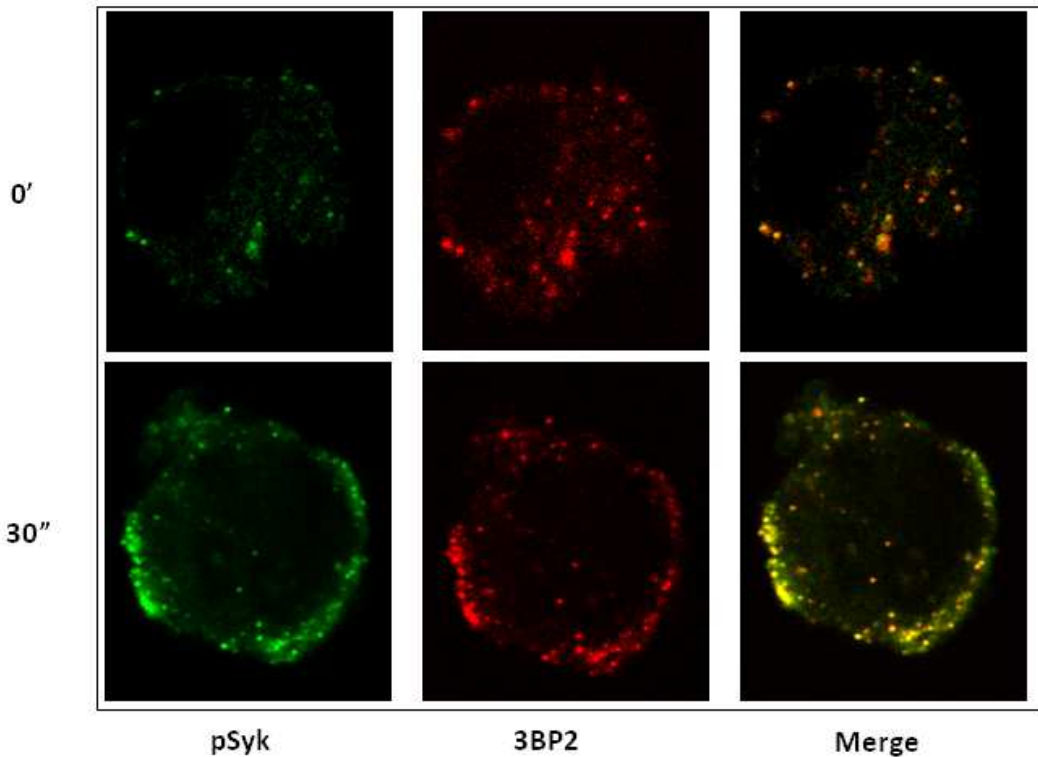
## SUPPLEMENTAL FIGURE 1



### Supplemental Figure 1. 3BP2 intracellular punctuated pattern.

Non target shRNA infected, 3BP2 shRNA infected and uninfected LAD2 cells were fixed, permeabilized and stained with anti-3BP2 (bottom middle and bottom right panels) and isotype control antibodies (bottom left panel) and further stained with Cy3 conjugated anti-mouse secondary antibodies as indicated in Materials and Methods section . Nuclei were visualized with Hoescht staining (upper panels).

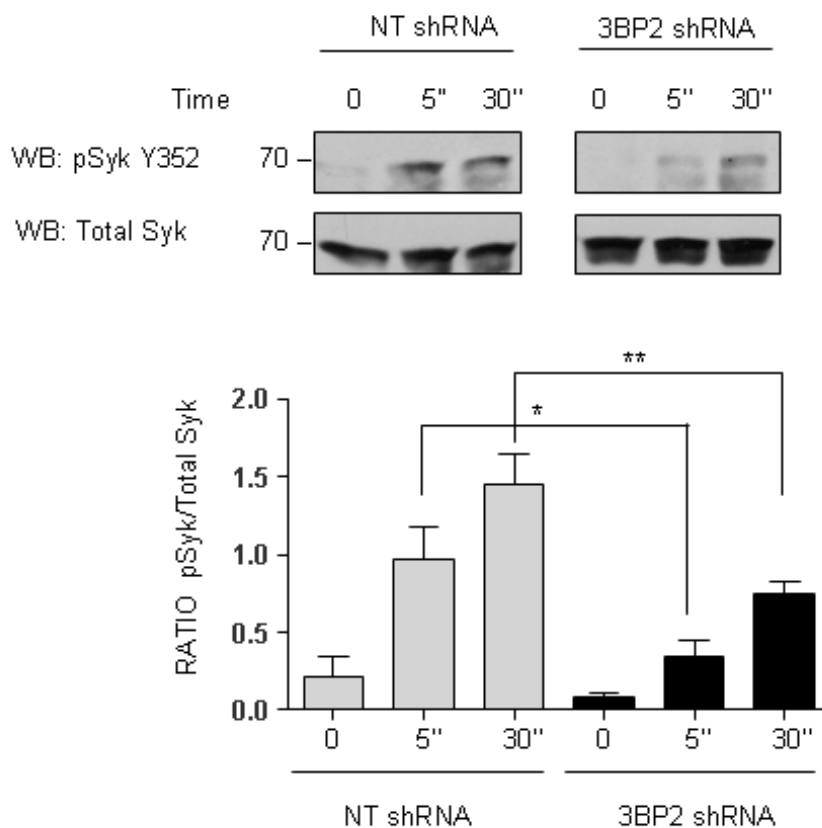
## SUPPLEMENTAL FIGURE 2



### **Supplemental Figure 2. 3BP2 relocalizes at the plasma membrane and co-localizes with phospho Syk kinase.**

Unstimulated and FcεRI-activated LAD2 cells at 30 seconds were fixed, permeabilized and stained against phospho-Syk and 3BP2 antibodies as indicated in Material and Methods Section. Fluorescence images were obtained using confocal microscope (TCS NT; Leica).

## SUPPLEMENTAL FIGURE 3



### Supplemental Figure 3. Silencing of 3BP2 reduces FcεRI-induced Syk Y352 phosphorylation at early times

Specific antibodies recognizing phosphorylated Syk Y352 and total Syk were used to immunoprobe these proteins in 3BP2 shRNA- and NT shRNA- transduced LAD2 cells following biotinylated IgE crosslinking with 100 ng/ml SA at indicated times. Densitometric analysis and phosphorylated/total ratio for Syk from 3 independent experiments is represented in the bar charts on the bottom. Statistical significance (\* p < 0.05, \*\*p < 0.001,) is relative to NT shRNA.

## **2. L'adaptador 3BP2 està involucrat en l'expressió del receptor KIT a través de la regulació de MITF i promou la supervivència dels mastòcits.**

3BP2 és una proteïna adaptadora citoplasmàtica expressada principalment en cèl·lules hematopoïètiques. Recentment s'ha demostrat que actua com un regulador positiu en la senyalització dependent de FcεRI dels mastòcits. El receptor KIT forma part dels receptors factors de creixement tirosin cinasa. 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, així com per a una òptima desgranulació dependent d'IgE i producció de citocines. En el present treball, utilitzant la tècnica del shRNA lentiviral per silenciar l'expressió de 3BP2 en mastòcits humans, hem descobert que el silenciament del 3BP2 redueix la supervivència dels mastòcits augmentant l'activitat de les caspasa 3-7. En conseqüència amb aquesta troballa, el silenciament del 3BP2 redueix la fosforilació KIT, conduint a una reducció en la fosforilació de STAT1 , AKT i el PLC gamma després de l'acoblament del SCF, indicant una participació d'aquest adaptador en la senyalització del KIT. D'altra banda el silenciament de 3BP2 redueix l'expressió del receptor tan, la seva expressió a la superfície com a nivell transcripcional, fet que implica un paper pel 3BP2 en aquest procés. De fet, el silenciament del 3BP2 condueix a una reducció en MITF, factor de transcripció implicat en l'expressió de KIT. Les mutacions d'activació en KIT s'han associat amb diverses malalties com la mastocitosi. Per tant analitzem la capacitat de 3BP2 per regular l'expressió de KIT en la línia cel·lular HMC-1 on KIT es troba mutat. Trobem que el silenciament de 3BP2 en aquestes cèl·lules també redueix l'expressió de KIT i incrementa l'activitat de les caspases. Curiosament el silenciament de KIT i la inhibició de l'activitat cinasa del receptor redueix l'expressió de 3BP2, tot això suggereix una estreta relació entre ambdues molècules. En conjunt els nostres resultats mostren que el 3BP2 endogen es un

important regulador dels mastòcits humans i participa en la transducció del senyal mediat per KIT. Per tant, 3BP2 podria ser una possible diana terapèutica, en malalties inflamatòries mediades per mastòcits i en trastorns on el KIT esta desregulat.

Article enviat a publicar

# **The adaptor 3BP2 is involved in KIT receptor expression through MITF regulation and promotes mast cell survival.**

Erola Ainsua-Enrich<sup>1,2</sup>, Damiana Álvarez-Errico<sup>1,2</sup>, César Picado<sup>2,3</sup>, Joan Sayós<sup>4,5</sup>, Juan Rivera<sup>6</sup> and Margarita Martín<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Biochemistry Unit, Faculty of Medicine. University of Barcelona, Casanova 143. Barcelona, 08036, Spain.

<sup>2</sup> Laboratory of Clinic and Experimental Immunoallergy, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

<sup>3</sup> Networking Research Center on Respiratory Diseases (CIBERES)

<sup>4</sup> Immunobiology Group, CIBBIM-Nanomedicine Program, Hospital Universitari Vall

d'Hebrón, Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>5</sup> Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBERBBN), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain

<sup>6</sup>Molecular Immunology Section, Laboratory of Molecular Immunogenetics, National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

Correspondence: Dr. Margarita Martín, Biochemistry Unit, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Carrer de Casanova 143, E-08036 Barcelona, Spain. E-mail address: martin\_andorra@ub.edu. Phone: (34) 93-4020582. Fax: (34) 93-4035882.

Running head: Role of 3BP2 adaptor in KIT signalling

Keypoints:

Reciprocal regulation of 3BP2 adaptor molecule and KIT receptor in mast cells

3BP2 a novel potential target for KIT disorders



## ABSTRACT

3BP2 is a cytoplasmic adaptor protein that acts as a positive regulator in mast cell FcεRI dependent signaling. The KIT receptor whose ligand is the stem cell factor (SCF) is necessary for mast cell development, proliferation and survival as well as for optimal IgE dependent signal. In the present work, we have found that 3BP2 silencing reduces mast cell survival increasing caspase 3-7 activity. 3BP2 silencing also reduced KIT phosphorylation and led to a decrease in phosphorylation of KIT mediators after SCF treatment indicating an involvement of this adaptor in KIT signaling. Unexpectedly, silencing of 3BP2 also reduced transcription of KIT and its cell surface expression. Concomitantly, 3BP2 silencing decreased MITF expression, a transcription factor involved in KIT expression. Activating mutations in KIT have been associated with several diseases including mastocytosis. We found that silencing of 3BP2 also reduces KIT expression increasing the caspase activity in HMC-1 cells where KIT is mutated. Interestingly, downregulation of KIT expression by silencing or bortezomib treatment reduced 3BP2 expression as well, demonstrating a tight relationship between these two molecules. Taken together, our results suggest a potential of 3BP2 as a therapeutic target in mast cell-mediated inflammatory diseases and deregulated KIT disorders.

## INTRODUCTION

Mast cells are key effectors in IgE-dependent hypersensitivity reactions, as well as in allergic and inflammatory disorders. Ligation of the high affinity receptor for IgE (FcεRI), constitutively expressed on mast cells, promotes cell activation and immediate release and production of proinflammatory mediators (Galli, Kalesnikoff et al. 2005; Galli, Grimaldeston et al. 2008). FcεRI-mediated mast cell activation can be dramatically enhanced by concurrent activation of KIT (CD117), a tyrosine kinase type III that plays a role in cell survival, proliferation and differentiation

(Mekori, Oh et al. 1995; Ronnstrand 2004). KIT binds its natural ligand, stem cell factor (SCF), resulting in receptor dimerization and activation of protein kinase activity. The activated receptor becomes autophosphorylated at tyrosine residues that serve as docking sites for signal transduction molecules containing SH2 domains. KIT activates Akt, Src family kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase C gamma, and Ras/mitogen-activated protein kinases (Lennartsson and Ronnstrand 2012). Subsequent activation of these signaling enzymes as well as JAK-STAT pathway leads to mast cell growth, survival, chemotaxis and cytokine production (Gilfillan and Tkaczyk 2006). Gain-of-function mutations on KIT are associated with several human neoplasms including mastocytomas (Verstovsek 2013) and gastrointestinal stromal tumors (Joensuu 2012).

SH3-binding protein 2 (3BP2) is a cytoplasmic adaptor originally identified as a protein interacting with the SH3 domain of the protein tyrosine kinase (PTK) Abl (Ren, Mayer et al. 1993). Human 3BP2 is a 561-aa protein containing an N-terminal pleckstrin homology (PH) domain, an SH3-binding proline-rich region, and a C-terminal SH2 domain. The 3BP2 encoding gene is located on human chromosome 4 (4p16.3 region). Mutations in the proline rich region of 3BP2 are responsible for the cherubism autosomal dominant inherited disorder characterized by excessive bone degradation of the upper and lower jaws which results in facial swelling (Hatani and Sada 2008). It has been described that 3BP2 regulates bone homeostasis through osteoclast activation and osteoblast differentiation and function (Ueki, Lin et al. 2007). 3BP2 is preferentially expressed in hematopoietic tissues where it contributes to the regulation of immune responses (Deckert and Rottapel 2006). 3BP2 regulates transcriptional activities via calcineurin- and Ras-dependent pathways in T lymphocytes (Deckert, Tartare-Deckert et al. 1998). A positive regulatory role for 3BP2 in B cell receptor (BCR) function (Foucault, Le Bras et al. 2005) has also been established, in that 3BP2-deficient mice show impaired optimal B cell activation and thymus independent humoral responses (de la Fuente, Kumar et al. 2006; Chen, Dimitriou et al. 2007).

3BP2 also plays an important function in NK cells, where it regulates cell-mediated cytotoxicity via its PH, SH2, and proline-rich regions (Jevremovic, Billadeau et al. 2001). Moreover, phosphorylation of Tyr183 on 3BP2, which mediates the interaction with Vav-1 and PLC- $\gamma$ , is critical for the ability of 3BP2 to positively regulate NK cell-mediated killing (Jevremovic, Billadeau et al. 2001). Recently we have reported the essential role of 3BP2 in early and late events in Fc $\epsilon$ RI dependent signaling in human mast cells (huMCs) (Ainsua-Enrich, Alvarez-Errico et al. 2012). In the current work, we delve into the role of endogenous 3BP2 in KIT signaling and function in huMCs using a shRNA silencing and SH2-3BP2 overexpression approaches. Our findings demonstrate that silencing of 3BP2 increases apoptosis and caspase 3/7 activity in human mast cells. Moreover 3BP2 regulates wild type and mutated KIT expression on huMCs through the basic helix-loop-helix transcription factor microphthalmia associated transcription factor, (MIFT), an important regulator of KIT expression in mast cells. Furthermore KIT expression decrease by shRNA infection or bortezomib treatment leads to downregulation of 3BP2 expression, suggesting a positive feedback loop between these two molecules in mast cells.

## METHODS

### *Cells and antibodies*

The LAD2 human mast cell line, kindly provided by Drs. A Kirshenbaum and D.D.Metcalf (NIH, Bethesda, MD, USA), was grown in StemPro-34 Serum-Free Medium (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), supplemented with StemPro-34 Nutrient and with L-glutamine (2mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100Kg/ml), and 100ng/ml recombinant stem cell factor (SCF) (Amgen, CA, USA). Primary HuMCs derived from CD34-positive peripheral blood cells were obtained from healthy donors following informed consent on a protocol (98-I-0027; PI: Dr. A. Kirshenbaum) approved by the NIAID IRB and differentiated

*in vitro* for 8 weeks in the presence of 100 ng/ml IL-6 and 100 ng/ml SCF as described (Radinger, Jensen et al. 2010). After 8 weeks, purity of the cultures was assessed by surface FcεRI and KIT expression. The human mast cell line HMC-1 was obtained from J.H. Butterfield (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) and it was grown in Iscove's medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml). Mouse antibodies, anti-3BP2 C5, anti-phospho AKT 1/2/3 (Ser 473)-R and anti-KIT (clone Ab81) were purchased from Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA). Anti-phospho STAT1 monoclonal (clon ST1P-11A5) antibody was from Zymed Laboratories (Invitrogen). Anti-pKIT Tyr 703 (D12E12), anti- p-ERK Thr202/Tyr204, anti-AKT and anti-MITF were purchased from Cell Signaling (Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA). Anti-β-actin peroxidase monoclonal (clon AC-15) and anti-α-tubulin (clon DM1A) were purchased from Sigma (Sigma, St. Louis, MO, USA). Anti-GFP antibody was from Roche (Roche Molecular Biochemical, IN, USA).

#### *ShRNA silencing by lentiviral infection*

Lentiviral particles to silence the 3BP2 gene expression were generated using Mission® shRNA technology according to manufacturer's instructions (Sigma, St. Louis, MO, USA) and the infection in huMC cells was performed as described elsewhere (Ainsua-Enrich, Alvarez-Errico et al. 2012).

Lentiviral particles carrying human KIT short hairpin RNA (shRNA) or no target (NT) control shRNA sequences were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Infection of LAD2 cells and HMC-1 cells were done according to manufacturer's instructions and were selected with puromycin for 1 week. KIT expression was analyzed by Western blot, and the silencing efficacy was determined by normalizing to α-tubulin.

### *RNA extraction and retrotranscription*

Total RNA was extracted with RNAeasy Mini Kit Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany) from  $2 \times 10^6$  non-transduced, non-target control and 3BP2 knockdown mast cells. cDNA was generated from mRNA High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

### *Real Time PCR*

Real-time PCR for KIT, GATA2, GATA3, SCL and MITF were performed using TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) on an ABI-Prism 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems). 18S RNA amplification control was used for cycle normalization. Data were analysed with 7500 SDS Software (Applied Biosystems). All PCR reactions were set up in triplicates.

### *Cell activation, immunoprecipitation and immunoblotting*

Cells were starved in culture media without SCF. The following day, cells were stimulated with 100 ng/ml of SCF in the Tyrode's buffer for the indicated times. Whole cell lysates preparations were obtained as described elsewhere (Tkaczyk, Metcalfe et al. 2002). For immunoprecipitation experiments, the procedure described elsewhere (Ainsua-Enrich, Alvarez-Errico et al. 2012) was followed.

### *FACS staining*

KIT expression was detected by direct staining with the indicated Abs for 30 min at 4°C. Cells were then analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (FACScan; BD Biosciences, Mountain View, CA).

### *Detection of Apoptosis and Caspase-3 and -7 Activities*

Apoptosis in 3BP2 silenced LAD2 and huMcs was measured with the APC Annexin V (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) following the manufacturers suggested protocol and analyzed by flow cytometry.

Caspase activity was assayed using the Caspases-Glo® 3/7 Assay (Promega, San Luis Obispo, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

### *Cell Transfection*

HMC-1 cells ( $1 \times 10^6$  cells) were transfected with empty p-EGFP N3 (Clontech Laboratories) and the SH2 domain of 3BP2 cloned in p-EGFPN3. To generate the SH2-3BP2 construct, SH2 was amplified by PCR using 3BP2p-EGFPN3 as a template and the sense 5'-CCC GAA TTC ATG CCA CTG CCC AAC-3' and antisense primer 5'-CGC GGA TCC CCT AGG CCC AGT GTA-3'. The PCR product was cloned in frame into the pEGFPN3 (where EGFP is at the C-terminal of the fusion protein) vector (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) using EcoRI and BamHI. Cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and were selected in medium containing G418 (1 mg/ml). Cells were then sorted based on EGFP fluorescence.

### *Yeast three-hybrid assay*

The yeast three-hybrid system was performed, as described elsewhere (Sayos, Martin et al. 2001). The cytoplasmic tail of human KIT, cloned in the bicistronic pBridge vector- which carried src-Fyn cloned- was obtained after PCR using KIT full length d'Origene (NM-000222.1) as a template and the primers 5' C ACC GAA TTC ATG AAA TAT TTA CAG 3' and 5'-AAA GGA TCC TCA GAC ATC GTC G 3'. The PCR product was cloned in pBridge using EcoRI and BamHI. KIT-pBridge was cotransformed with 3BP2 cloned in pACT2 (Saborit-Villarroya, Del Valle et al. 2005), in the yeast strain CG1945. CD244 cloned in pBridge (Saborit-Villarroya, Del Valle et al. 2005) and Grb2 cloned in pGAD (Martin, Del Valle et al. 2005)

were used as a positive control for 3BP2 and KIT, respectively, and empty pGAD was used as a negative control. Yeast clones were then tested by the  $\beta$ -galactosidase assay. The  $\beta$ -galactosidase liquid culture assay using *o*-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside as a substrate was carried out as described in the Clontech yeast protocols handbook.

#### *Statistical data analysis.*

All results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of the mean (SD). Student's *t*-test was used to determine significant differences (*p* value) between two experimental groups after determination of normal distribution of the sample and variance analysis.

## RESULTS

### **3BP2 silencing leads to downregulation of KIT signalling in mast cells**

The adaptor 3BP2 was recently shown to be required for optimal high affinity IgE receptor signaling in mast cells (Ainsua-Enrich, Alvarez-Errico et al. 2012). These cells are defined by their cell surface expression of the KIT receptor (Mekori, Oh et al. 1995; Ronnstrand 2004), a receptor that can synergize with Fc $\epsilon$ RI signaling (Hundley, Gilfillan et al. 2004). Here we explored the role of 3BP2 on KIT receptor signaling following lentiviral shRNA silencing of 3BP2 expression in huMCs. Non target (NT) shRNA was used as a control. As shown in Figure 1, KIT phosphorylation was markedly reduced and its ability to activate PI3 kinase was also impaired as measured by phosphorylation of Akt, a surrogate marker of this pathway. In addition, ERK and STAT-1 phosphorylation at 5 and 15 min following SCF addition was also impaired. Our results show that silencing of 3BP2 decreases the phosphorylation of KIT and multiple molecules associated with KIT signalling indicating a role for 3BP2 as an upstream regulator in KIT signalling. Unexpectedly, but interestingly, the expression levels of the KIT receptor were

decreased after 3BP2 silencing (Figure 1) prompting further exploration of this observation.

### **3BP2 silencing blocks mutated KIT signaling in HMC-1**

Given that 3BP2 regulates KIT expression and signaling we further investigated the ability of 3BP2 to regulate a constitutively active KIT receptor. We took advantage of the human mast cell line HMC-1 that express a constitutively active form of KIT on the membrane (Butterfield, Weiler et al. 1988). Two activating mutations in the proto-oncogene of c-kit cause its autophosphorylation and activation of its kinase activity, thereby inducing ligand-independent proliferation (Furitsu, Tsujimura et al. 1993; Kitayama, Kanakura et al. 1995). KIT autophosphorylation in HMC-1 cells results in the permanent activation of other signaling pathways, including the Ras-MAPK-ERK and the PI3K pathways, which are involved in cell survival and proliferation (Kitayama, Kanakura et al. 1995). Although the basal phosphorylation of KIT and multiple downstream effectors was increased in these cells, because of SCF independent activation, the addition of SCF at 5 minutes still caused some enhancement of the global phosphorylation (Figure 2). Interestingly, silencing of 3BP2 in HMC-1 cells resulted in a marked decrease in basal and induced phosphorylation of KIT and other effectors and caused the downregulation of the mutant form of KIT (Figure 2).

### **3BP2 dominant negative (SH2) blocks AKT and ERK signals**

To further dissect the relationship of 3BP2 with KIT, we overexpressed a 3BP2 SH2 domain construct in HMC-1 cells. Under these conditions it was expected that KIT receptor levels in control and SH2-3BP2 domain transfectants would be similar allowing us to explore the effects of blocking 3BP2 signals independently of a large loss of KIT receptor. As shown in Figure 3, AKT and ERK1/2 phosphorylation were decreased in the presence of the 3BP2-SH2 domain. Unexpectedly, we found that the endogenous 3BP2 was reduced after transfection with 3BP2-SH2 domain. While the reduction in endogenous 3BP2 was not enough



to cause a marked downregulation of KIT, the data demonstrate that alterations in 3BP2 signaling impinge on KIT signaling pathways and suggest as well that KIT signaling may target 3BP2 expression since KIT signaling impairment through SH2-3BP2 dominant negative decreased endogenous 3BP2 levels (Figure 3).

### **Silencing of 3BP2 results in downregulation of KIT mRNA expression**

KIT expression on both CD34<sup>+</sup> derived huMCs and LAD2 cells was reduced when 3BP2 was silenced comparing to NT shRNA transduced or non-transduced huMCs, as observed by flow cytometry (Figure 4A) or western blot (Figure 4B). One possibility to explain our findings was that 3BP2 stabilizes KIT expression by preventing proteasome-mediated degradation of KIT. To test this, we incubated control and 3BP2 silenced cells with the proteasome inhibitors MG132 and ALLN for 3 and 24 hours respectively. However, following proteasome inhibition KIT expression decreased in about 50% in NT cells compared to untreated cells, whereas in 3BP2 silenced cells KIT levels were undetectable (data not shown), indicating that prevention of proteasome degradation did not reverse the decreased expression of KIT following 3BP2 silencing. This raised the possibility that 3BP2 was controlling KIT expression at the mRNA level. Samples from control and 3BP2 silenced cells were analyzed for c-kit mRNA by real time PCR. As shown in Figure 4C, c-kit mRNA levels were reduced in 3BP2 silenced cells compared to control cells. Thus, the data demonstrate that 3BP2 is required for normal expression of c-kit mRNA.

### **Analysis of the transcriptional regulation of KIT expression in silenced 3BP2 mast cells**

Since decreased Kit mRNA levels could result from transcriptional or post-transcriptional regulation, we explored the effect of 3BP2 silencing in mast cells on various transcription factors involved in the regulation of KIT expression. The promoter region of human c-kit has been thoroughly investigated (Yamamoto, Tojo et al. 1993). It has been reported that gene expression of c-kit in mast cells

requires GATA2 and Sp1 recruitment to the promoter region (Maeda, Nishiyama et al. 2010). GATA 3, although is a Th2 master regulator (Zheng and Flavell 1997), has also been proposed to stabilize KIT expression in mast cells and promote mast cell development in the absence of Notch signals when IL-3 and SCF are present (Taghon, Yui et al. 2007). In addition, the transcription factor SCL has been reported as necessary for KIT expression and function in hematopoietic cells (Krosl, He et al. 1998). Another transcription factor, the basic helix-loop-helix microphthalmia associated transcription factor (MITF) binds to a CACCTG motif in the c-Kit promoter and it has been shown to be an important regulator of KIT expression in mast cells (Tsuji-mura, Morii et al. 1996) as well as melanocytes (Opdecamp, Nakayama et al. 1997).

Analysis of the expression of GATA 2, GATA3, SCL and MITF by real time PCR in control versus 3BP2 silenced cells revealed that the mRNA levels of GATA 2, GATA3, SCL and MITF were not decreased in 3BP2 silencing cells. Conversely, we found that the mRNA for most of these transcription factors increased in 3BP2 silenced mast cells suggesting a compensatory mechanism activated by 3BP2 mediated-KIT down regulation (Supplemental figure 1).

Interestingly, recent findings suggested that there is also an inverse regulation, in that KIT signaling regulates MITF expression at the posttranscriptional level (Lee, Brandal et al. 2011). We explored whether 3BP2, as a component of KIT signaling, might play a role in regulating posttranscriptional levels of MITF as well. Analysis of the levels of MITF protein after 3BP2 silencing demonstrated decreased MITF levels compared to control-transduced LAD2 and HMC-1 cells (Figure 5). The results suggest that MITF protein expression is stabilized by 3BP2 consistent with the marked reduction of KIT expression by 3BP2 silencing in these cells.

## **Silencing of 3BP2 results in increase apoptosis and caspase 3/7 activity in huMCs**

Our findings showed that 3BP2 silencing resulted in decreased phosphorylation of the serine/threonine kinase AKT. This kinase is activated downstream of PI3K and it is involved in delivering survival signals in response to SCF (Blume-Jensen, Janknecht et al. 1998). Thus, we explored the impact of 3BP2 silencing on mast cell survival. Annexin staining was performed in CD34<sup>+</sup>-derived huMCs from and LAD2 cells. As described elsewhere (Ainsua-Enrich, Alvarez-Errico et al. 2012), CD34<sup>+</sup>-derived huMCs were infected on week 6 and efficacy of silencing as well as cell viability was checked two weeks later (experiment day 0). In the case of LAD2, after infection with 3BP2 shRNA for one week and selection in the presence of puromycin for an additional week, cells were assayed for cell survival. As shown in Figure 6, cells in which 3BP2 was silenced showed increased mortality after 6 days in culture (Figure 6 A,B,C). Further apoptosis was evaluated by assaying functional caspase 3/7 activity after NT or 3BP2 shRNA transduction in LAD2 cells. The study was extended to HMC-1 cells. As reported above 3BP2 silencing strongly induced (2-3 fold) caspase 3/7 activity compared to controls (Figure 6E). Thus, the loss of 3BP2 expression has a marked effect on huMC survival.

### **The reciprocal regulatory relationship of KIT and 3BP2.**

Our findings demonstrate that 3BP2 is involved in KIT signaling and expression but clues emerged in our analysis suggesting a reciprocal relationship whereby KIT signaling might regulate 3BP2 levels. To test this possibility, KIT expression was silenced by infecting mast cells with KIT shRNA lentivirus or alternatively by using the proteasome inhibitor bortezomib. Bortezomib has been reported to induce proapoptotic activity in gastrointestinal stromal tumour cells due to a blockage in degradation of proapoptotic factors, and to cause oncogenic KIT downregulation by inhibition of the transcriptional machinery (Bauer, Parry et al. 2010).

Use of these complementary strategies to silence KIT expression in LAD2 cells revealed a decreased expression of 3BP2 expression under both treatments (Figure 7 A-B). Collectively, these results argue for a tight link in the regulation of KIT and 3BP2 and suggest a common regulatory pathway may be in play.

## DISCUSSION

Here we report that the 3BP2 is an important adaptor molecule for mast cell survival acting to promote KIT receptor signaling. This receptor upon ligand recognition initiates signals that are critical for mast cell growth, development, and survival (Okayama and Kawakami 2006). We found that silencing of 3BP2 in mast cell decreases PI3K and ERK1/2 signaling pathways and induces apoptosis as measured by annexin V staining and increased caspase 3/7 activity. Unexpectedly, we also found a marked requirement for 3BP2 in the expression of KIT receptor. In order to understand how 3BP2 regulates KIT expression we explore various possibilities. One could be that 3BP2 stabilizes the receptor expression by competing for binding with molecules that regulate KIT expression, such as c- Cbl. This molecule binds to various tyrosines (Y568, Y570 and Y936) in the KIT cytoplasmic domain, and regulates proteasomal degradation of this receptor(Masson, Heiss et al. 2006). Although we observe that 3BP2 co-immunoprecipitates with KIT after SCF stimulation our findings, using three hybrid system, point to an indirect association between these two molecules (supplemental figure 2). Such indirect interaction could potentially be mediated by molecules like Grb2, PLC gamma or PI3K that are known to bind to KIT and to 3BP2 (Deckert, Tartare-Deckert et al. 1998; Jevremovic, Billadeau et al. 2001; Saborit-Villarroya, Martinez-Barriocanal et al. 2008). This, however, does not preclude the possibility that in the absence of 3BP2, binding of c-Cbl to KIT could increase and hence, promote its degradation. However the proteasome inhibitors (ALLN and MG132) treatment do not revert KIT expression showing a reduction in KIT levels in the treated control cells, and a more pronounced reduction in 3BP2

silenced cells (data not shown). These findings are consistent with data from gastrointestinal stromal tumour (GIST) cell lines, where KIT mutation confers an oncogenic phenotype and treatment with bortezomib, an inhibitor of the ubiquitin proteasome machinery, leads to a marked KIT reduction expression and the death of these cells (Bauer, Parry et al. 2010). Interestingly, our data show that bortezomib treatment also reduces 3BP2 expression supporting a close regulation of 3BP2 and KIT molecules. Moreover, a reduction in KIT transcription has been reported as an underlying mechanism for bortezomib-mediated inhibition of KIT expression (Bauer, Parry et al. 2010). This is consistent with our findings that this drug also inhibits 3BP2 expression and that 3BP2 decreased levels leads to downregulation of c-kit mRNA. Interestingly, we found that the basic helix-loop-helix transcription factor microphthalmia associated transcription factor, MIF1, an important regulator of KIT expression in mast cells (Tsujiura, Morii et al. 1996) is reduced in 3BP2 silenced cells. Mice with a deficiency of MIF1 display an absence of mast cells, and MIF1-deficient cultured mast cells appear immature and do not express genes critical for mast cell function (Shahlaee, Brandal et al. 2007). The in vivo and in vitro mast cell and melanocyte phenotype of *Mif1* mutant mice is strikingly similar to that of SCF or KIT-deficient mice (Witte 1990; Moore 1995). In this context, our findings suggest that 3BP2 is an important post-transcriptional regulator of the KIT-MIF1 axis as we found that 3BP2 silencing led to a reduction of MIF1 protein but not of MIF1 transcripts. Interestingly, recent data shows that there is also an inverse regulation, in that KIT signaling regulates MIF1 expression at posttranscriptional levels as well through miRNAs miR-539 and miR-381 (Lee, Brandal et al. 2011). The levels of these miRNAs after 3BP2 silencing remain to be examined. Our 3BP2 silencing and overexpression data also show a bidirectional regulation between KIT and 3BP2 in human mast cells. These findings strongly argue for an important role of 3BP2 in the regulation of KIT biology and function potentially including mast cell proliferation, differentiation and survival.

Dysregulation of KIT function (through gain of function mutations) results in certain pathologies like systemic mastocytosis and mast cell leukemias. In humans the D816V mutation of KIT is highly prevalent and it is associated with deregulated cell growth and clonal accumulation of mast cells in tissues (Furitsu, Tsujimura et al. 1993; Metcalfe 2008). Our finding that the adaptor 3BP2 may regulate KIT expression is of particular interest with regards to control of KIT D816V expression in mastocytosis. Specifically, substitutions at position D816 in the activation loop rendered the KIT kinase almost completely resistant to Imatinib (Frost, Ferrao et al. 2002), the kinase inhibitor selected in the treatment of KIT oncogenic diseases (Ashman and Griffith 2013). Thus, the apoptosis promoted by 3BP2 silencing in HMC-1 cells, where oncogenic KIT harbours this mutation, confers 3BP2 an attractive new potential target to develop for therapy. Interestingly we found a decrease in MITF protein expression after 3BP2 silencing and a KIT oncogenic reduction over the time, the apoptosis events are also more pronounced over the time. Thus, we hypothesize that decreased MITF expression after 3BP2 silencing leads to a subsequent reduction in KIT expression. This is a previously unrecognized link between MITF and 3BP2 expression. MITF is essential for osteoclast development and function (Hershey and Fisher 2004) and 3BP2 in coordinating bone homeostatic signals in both osteoclast and osteoblast lineages (Levaot, Simoncic et al. 2011). In the bone metabolism context 3BP2 has been shown to regulate the bone marrow monocyte responses to macrophage and osteoclast differentiation signals downstream of the receptors for macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) through mechanisms that involve control of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and spleen tyrosine kinase (SYK) activity, respectively (Ueki, Lin et al. 2007). In the RAW264.7 cells it has been found that 3BP2 is a key regulator of RANK-mediated macrophage differentiation into osteoclast through Src and NFATc1 activation (GuezGuez, Prod'homme et al. 2010).

Interestingly, MITF has been shown to reside downstream of the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)

signaling pathways that are critical for osteoclast proliferation, differentiation and function (Weilbaecher, Motyckova et al. 2001; Mansky, Sankar et al. 2002). This suggests that further exploration of the link between MITF and 3BP2 in osteoclasts is warranted. Amino acid missense mutations in 3BP2 have been identified in several cherubism patients (Ueki, Tiziani et al. 2001). Cherubism is a fibrous dysplasia-like syndrome characterized by excessive bone resorption in the jaw with accumulation of inflammatory/fibrous tissue. Recently it has been reported that Tankyrase, a member of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) family, regulates 3BP2 stability through ADP-ribosylation and subsequent ubiquitylation by the E3-ubiquitin ligase RNF146 in osteoclasts. Cherubism mutations uncouple 3BP2 from Tankyrase-mediated protein destruction, which results in its stabilization and subsequent hyperactivation of the Src, Syk, and Vav signaling pathways explaining the pathological features observed in the disease (Guettler, LaRose et al. 2011; Levaot, Voytyuk et al. 2011).

Collectively, our findings reveal a new role for 3BP2 as an important player and regulator of KIT receptor expression and function in mast cells. Uncovering the details of how 3BP2 functions to regulate KIT expression and signalling will be essential towards understanding the therapeutic potential of 3BP2 as a target for mast cell proliferative diseases and those resulting from mutations of KIT receptor.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant PI120032 from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain. E. A-E is supported by a FPI fellowship both from Ministerio de Ciencia e Innovación. D. A-E is supported by a Juan de la Cierva contract. J.S. is supported by a contract Miguel Servet from Fondo de Investigaciones Sanitarias from Instituto de Salud Carlos III (CP06/00058). Work done in J.R. laboratory is funded by the Intramural Research Program within the National Institute of Arthritis, Musculoskeletal and Skin Disease of the National Institutes of Health, USA.

We thank Dr. Alasdair M. Gilfillan (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, USA) for providing the CD34<sup>+</sup> positive peripheral blood cells.

## AUTHORSHIP CONTRIBUTION

Contribution: E.A-E. designed and performed the research, analyzed the data; D. A-E. performed the research and analyzed data; C.P, J.S. and J. R. analyzed data and edited the paper; and M.M. designed the research, analyzed the data, and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Dr. Margarita Martin, Biochemistry Unit, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Casanova 143, E-08036 Barcelona, Spain. E-mail address: martin\_andorra@ub.edu



## REFERENCES

1. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:749-786.
2. Galli SJ, Grimbaldston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(6):478-486.
3. Mekori YA, Oh CK, Metcalfe DD. The role of c-Kit and its ligand, stem cell factor, in mast cell apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995;107(1-3):136-138.
4. Ronnstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(19-20):2535-2548.
5. Lennartsson J, Ronnstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev.* 2012;92(4):1619-1649.
6. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(3):218-230.
7. Verstovsek S. Advanced systemic mastocytosis: the impact of KIT mutations in diagnosis, treatment, and progression. *Eur J Haematol.* 2013;90(2):89-98.
8. Joensuu H. Adjuvant treatment of GIST: patient selection and treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012;9(6):351-358.
9. Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science.* 1993;259(5098):1157-1161.
10. Hatani T, Sada K. Adaptor protein 3BP2 and cherubism. *Curr Med Chem.* 2008;15(6):549-554.

11. Ueki Y, Lin CY, Senoo M, et al. Increased myeloid cell responses to M-CSF and RANKL cause bone loss and inflammation in SH3BP2 "cherubism" mice. *Cell*. 2007;128(1):71-83.
12. Deckert M, Rottapel R. The adapter 3BP2: how it plugs into leukocyte signaling. *Adv Exp Med Biol*. 2006;584:107-114.
13. Deckert M, Tartare-Deckert S, Hernandez J, Rottapel R, Altman A. Adaptor function for the Syk kinases-interacting protein 3BP2 in IL-2 gene activation. *Immunity*. 1998;9(5):595-605.
14. Foucault I, Le Bras S, Charvet C, Moon C, Altman A, Deckert M. The adaptor protein 3BP2 associates with VAV guanine nucleotide exchange factors to regulate NFAT activation by the B-cell antigen receptor. *Blood*. 2005;105(3):1106-1113.
15. Chen G, Dimitriou ID, La Rose J, et al. The 3BP2 adapter protein is required for optimal B-cell activation and thymus-independent type 2 humoral response. *Mol Cell Biol*. 2007;27(8):3109-3122.
16. de la Fuente MA, Kumar L, Lu B, Geha RS. 3BP2 deficiency impairs the response of B cells, but not T cells, to antigen receptor ligation. *Mol Cell Biol*. 2006;26(14):5214-5225.
17. Jevremovic D, Billadeau DD, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ. Regulation of NK cell-mediated cytotoxicity by the adaptor protein 3BP2. *J Immunol*. 2001;166(12):7219-7228.
18. Ainsua-Enrich E, Alvarez-Errico D, Gilfillan AM, et al. The adaptor 3BP2 is required for early and late events in FcepsilonRI signaling in human mast cells. *J Immunol*. 2012;189(6):2727-2734.
19. Radinger M, Jensen BM, Kuehn HS, Kirshenbaum A, Gilfillan AM. Generation, isolation, and maintenance of human mast cells and mast cell lines derived from peripheral blood or cord blood. *Curr Protoc Immunol*. 2010;Chapter 7:Unit 7 37.

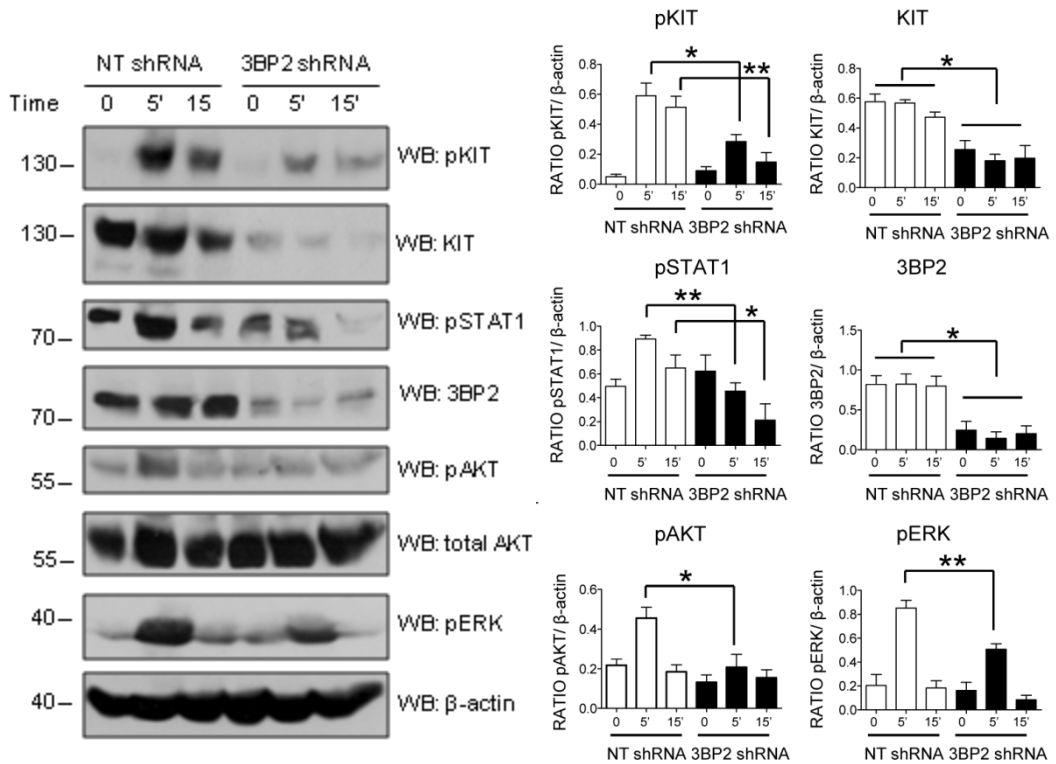
20. Tkaczyk C, Metcalfe DD, Gilfillan AM. Determination of protein phosphorylation in Fc epsilon RI-activated human mast cells by immunoblot analysis requires protein extraction under denaturing conditions. *J Immunol Methods*. 2002;268(2):239-243.
21. Sayos J, Martin M, Chen A, et al. Cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP. *Blood*. 2001;97(12):3867-3874.
22. Saborit-Villarroya I, Del Valle JM, Romero X, et al. The adaptor protein 3BP2 binds human CD244 and links this receptor to Vav signaling, ERK activation, and NK cell killing. *J Immunol*. 2005;175(7):4226-4235.
23. Martin M, Del Valle JM, Saborit I, Engel P. Identification of Grb2 as a novel binding partner of the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein binding receptor CD229. *J Immunol*. 2005;174(10):5977-5986.
24. Hundley TR, Gilfillan AM, Tkaczyk C, Andrade MV, Metcalfe DD, Beaven MA. Kit and Fc epsilon RI mediate unique and convergent signals for release of inflammatory mediators from human mast cells. *Blood*. 2004;104(8):2410-2417.
25. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk Res*. 1988;12(4):345-355.
26. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest*. 1993;92(4):1736-1744.
27. Kitayama H, Kanakura Y, Furitsu T, et al. Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood*. 1995;85(3):790-798.

28. Yamamoto K, Tojo A, Aoki N, Shibuya M. Characterization of the promoter region of the human c-kit proto-oncogene. *Jpn J Cancer Res.* 1993;84(11):1136-1144.
29. Maeda K, Nishiyama C, Ogawa H, Okumura K. GATA2 and Sp1 positively regulate the c-kit promoter in mast cells. *J Immunol.* 2010;185(7):4252-4260.
30. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell.* 1997;89(4):587-596.
31. Taghon T, Yui MA, Rothenberg EV. Mast cell lineage diversion of T lineage precursors by the essential T cell transcription factor GATA-3. *Nat Immunol.* 2007;8(8):845-855.
32. Krosi G, He G, Lefrancois M, et al. Transcription factor SCL is required for c-kit expression and c-Kit function in hemopoietic cells. *J Exp Med.* 1998;188(3):439-450.
33. Tsujimura T, Morii E, Nozaki M, et al. Involvement of transcription factor encoded by the mi locus in the expression of c-kit receptor tyrosine kinase in cultured mast cells of mice. *Blood.* 1996;88(4):1225-1233.
34. Opdecamp K, Nakayama A, Nguyen MT, Hodgkinson CA, Pavan WJ, Arnheiter H. Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. *Development.* 1997;124(12):2377-2386.
35. Lee YN, Brandal S, Noel P, et al. KIT signaling regulates MITF expression through miRNAs in normal and malignant mast cell proliferation. *Blood.* 2011;117(13):3629-3640.
36. Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol.* 1998;8(13):779-782.

37. Bauer S, Parry JA, Muhlenberg T, et al. Proapoptotic activity of bortezomib in gastrointestinal stromal tumor cells. *Cancer Res.* 2010;70(1):150-159.
38. Okayama Y, Kawakami T. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res.* 2006;34(2):97-115.
39. Masson K, Heiss E, Band H, Ronnstrand L. Direct binding of Cbl to Tyr568 and Tyr936 of the stem cell factor receptor/c-Kit is required for ligand-induced ubiquitination, internalization and degradation. *Biochem J.* 2006;399(1):59-67.
40. Saborit-Villarroya I, Martinez-Barriocanal A, Oliver-Vila I, Engel P, Sayos J, Martin M. The adaptor 3BP2 activates CD244-mediated cytotoxicity in PKC- and SAP-dependent mechanisms. *Mol Immunol.* 2008;45(12):3446-3453.
41. Shahlaee AH, Brandal S, Lee YN, Jie C, Takemoto CM. Distinct and shared transcriptomes are regulated by microphthalmia-associated transcription factor isoforms in mast cells. *J Immunol.* 2007;178(1):378-388.
42. Witte ON. Steel locus defines new multipotent growth factor. *Cell.* 1990;63(1):5-6.
43. Moore KJ. Insight into the microphthalmia gene. *Trends Genet.* 1995;11(11):442-448.
44. Metcalfe DD. Mast cells and mastocytosis. *Blood.* 2008;112(4):946-956.
45. Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(12):1115-1124.
46. Ashman LK, Griffith R. Therapeutic targeting of c-KIT in cancer. *Expert Opin Investig Drugs.* 2013;22(1):103-115.
47. Hershey CL, Fisher DE. Mitf and Tfe3: members of a b-HLH-ZIP transcription factor family essential for osteoclast development and function. *Bone.* 2004;34(4):689-696.

48. Levaot N, Simoncic PD, Dimitriou ID, et al. 3BP2-deficient mice are osteoporotic with impaired osteoblast and osteoclast functions. *J Clin Invest.* 2011;121(8):3244-3257.
49. GuezGuez A, Prod'homme V, Mouska X, et al. 3BP2 adapter protein is required for receptor activator of NFkappaB ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. *J Biol Chem.* 2010;285(27):20952-20963.
50. Weilbaecher KN, Motyckova G, Huber WE, et al. Linkage of M-CSF signaling to Mitf, TFE3, and the osteoclast defect in Mitf(mi/mi) mice. *Mol Cell.* 2001;8(4):749-758.
51. Mansky KC, Sankar U, Han J, Ostrowski MC. Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling. *J Biol Chem.* 2002;277(13):11077-11083.
52. Ueki Y, Tiziani V, Santanna C, et al. Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. *Nat Genet.* 2001;28(2):125-126.
53. Levaot N, Voytyuk O, Dimitriou I, et al. Loss of Tankyrase-mediated destruction of 3BP2 is the underlying pathogenic mechanism of cherubism. *Cell.* 2011;147(6):1324-1339.
54. Guettler S, LaRose J, Petsalaki E, et al. Structural basis and sequence rules for substrate recognition by Tankyrase explain the basis for cherubism disease. *Cell.* 2011;147(6):1340-1354.

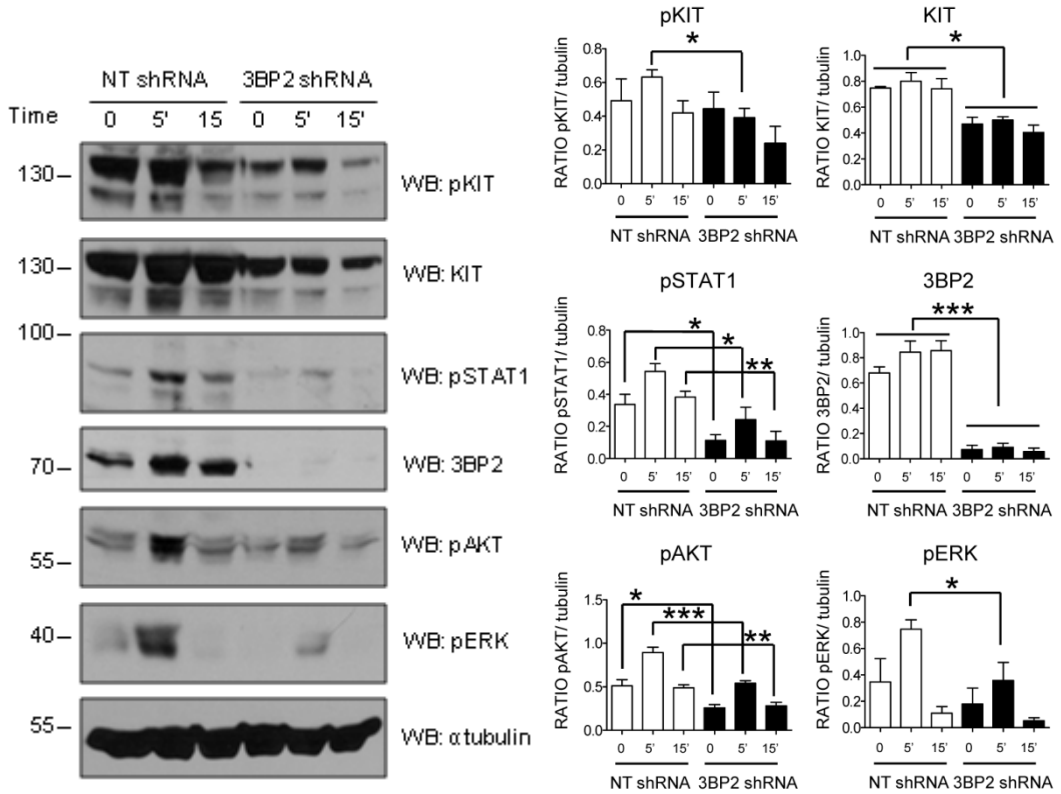
FIGURE 1



**Figure 1. 3BP2 silencing reduces KIT expression and signals in mast cells.**

LAD2 cells transduced with either 3BP2 shRNA or control NT (non target) shRNA were starved in culture media without SCF. The following day, cells were stimulated with 100 ng/ml SCF in the Tyrode's buffer for the indicated times. Left panel, Western blots probed with the following antibodies: anti-phospho KIT, anti-KIT, anti-phosphoSTAT1, anti-3BP2, anti-phospho AKT, anti-AKT, anti-phospho ERK and anti-β-actin (used as loading control). Right panel shows densitometric quantitation of band intensity from 3 independent experiments. Statistical significance (\* $p \leq 0.005$ , \*\* $p \leq 0.001$ ) is relative to NT shRNA signal at each specific time.

FIGURE 2

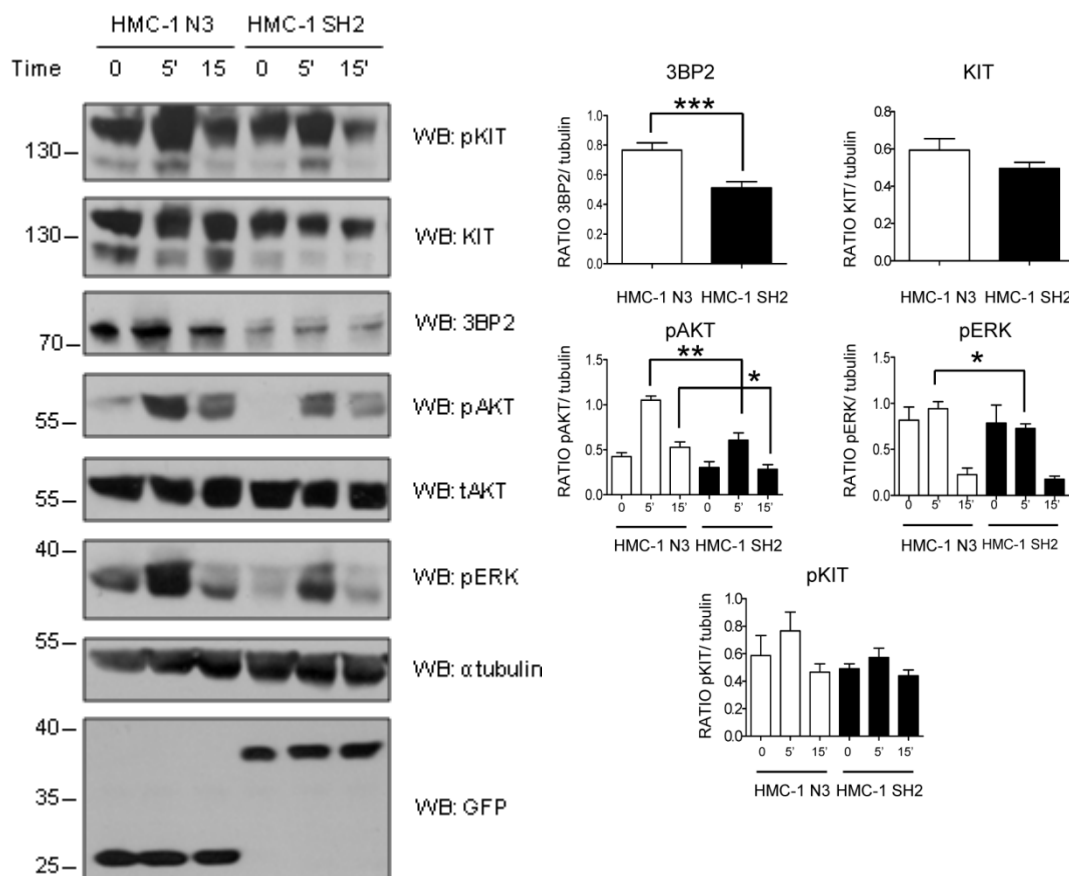


**Figure 2. 3BP2 silencing blocks mutated KIT signaling in HMC-1 cell line.**

3BP2 shRNA - and NT (non target) shRNA-transduced HMC-1 cells were stimulated with 100 ng/ml SCF for 5 and 15 min. Cells were lysed as described elsewhere (Ainsua-Enrich, Alvarez-Errico et al. 2012). Western blot was performed with the following Abs: anti-phospho KIT, anti-KIT, anti-phospho STAT1, anti-3BP2, anti-phospho AKT, anti-phospho ERK and anti- $\alpha$ tubulin (as loading control). Band intensity quantitation for each blot was performed by densitometry. The experiment is representative of 3 independent assays. Statistical significance (\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ) is relative to NT shRNA.



FIGURE 3

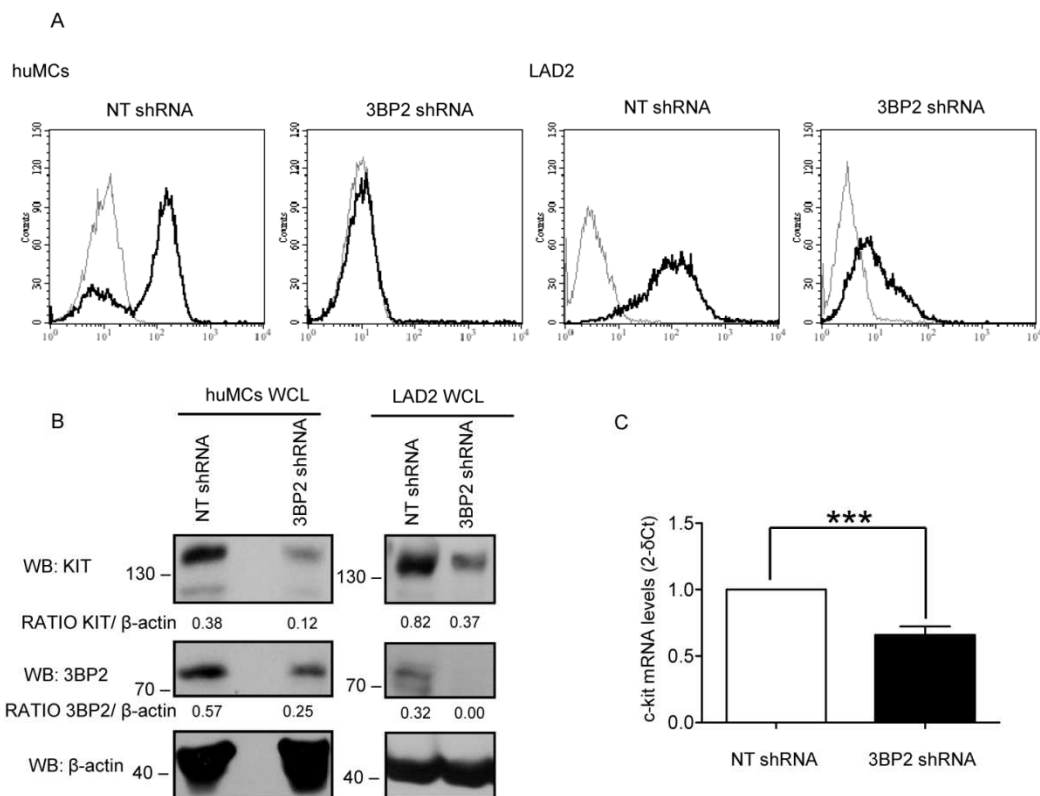


**Figure 3. 3BP2-SH2 domain dominant negative construct impairs AKT and ERK signal.**

HMC-1 cells transfected with either 3BP2-SH2 in pEGFP or empty pEGFP (as a control) were starved in culture media without SCF. The following day, the cells were stimulated with 10 ng/ml SCF in the Tyrode's buffer for the indicated times. Left panel, Western blots were probed with the following antibodies: anti-phospho KIT, anti-KIT, anti-3BP2, anti-phospho AKT, anti-AKT, anti-phospho ERK and anti-

$\alpha$ tubulin and anti-GFP. Right panel shows densitometric quantitation of band intensity from 3 independent experiments. Statistical significance (\* $p \leq 0.005$ , \*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ) is relative to control transfected cells.

FIGURE 4

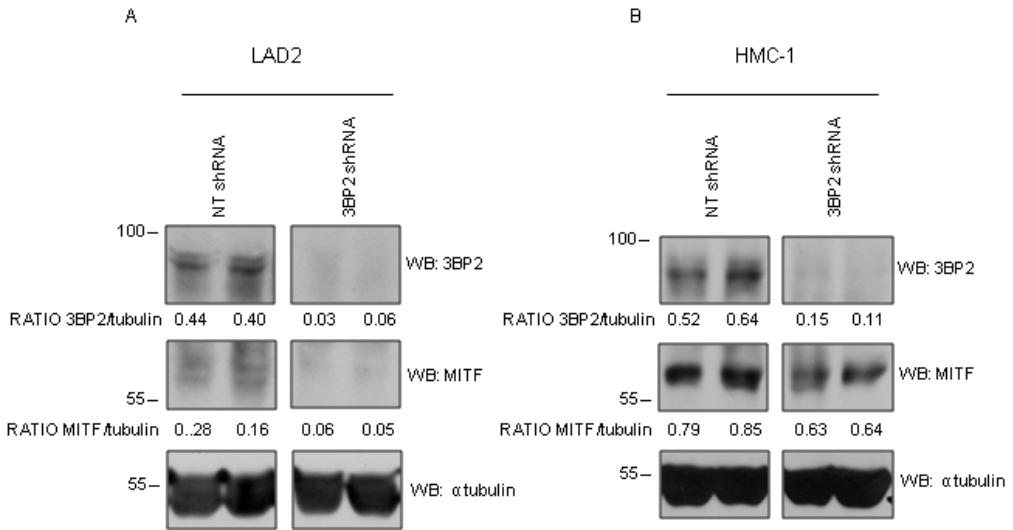


**Figure 4. Silencing of 3BP2 results in decreased KIT mRNA.**

KIT expression was analyzed in NT (non target) shRNA and 3BP2 shRNA transduced CD34<sup>+</sup>-derived huMCs and LAD2 cells using PE-conjugated KIT antibody by FACS (black line). Isotype control is grey line (A). Total KIT protein levels in whole cell lysates of CD34<sup>+</sup>-derived 3BP2 and NT shRNA transduced huMCs and LAD2 cells was determined by western blot. Quantitation of band intensity was performed by densitometry. Data are representative of 3 experiments (B). Real time PCR was performed in CD34<sup>+</sup>-derived huMCs from 3BP2 and NT

shRNA transduced cells using c-kit as a probe (C). Data are the mean of 3 independent experiments from 3 different donors. Significant differences (\*\* $p < 0.0001$ ) were found between 3BP2 shRNA and control-transduced shRNA huMCs.

FIGURE 5



**Figure 5. MITF expression decreases after 3BP2 silencing in mast cells.**

MITF expression was evaluated after 3BP2 silencing in LAD2 cells (A) and HMC-1 (B). Western blots of whole cell lysates were performed with anti-3BP2, anti-MITF and anti- $\alpha$ -tubulin. Data is representative of three independent experiments. Quantitation of band intensity was performed by densitometry.

FIGURE 6

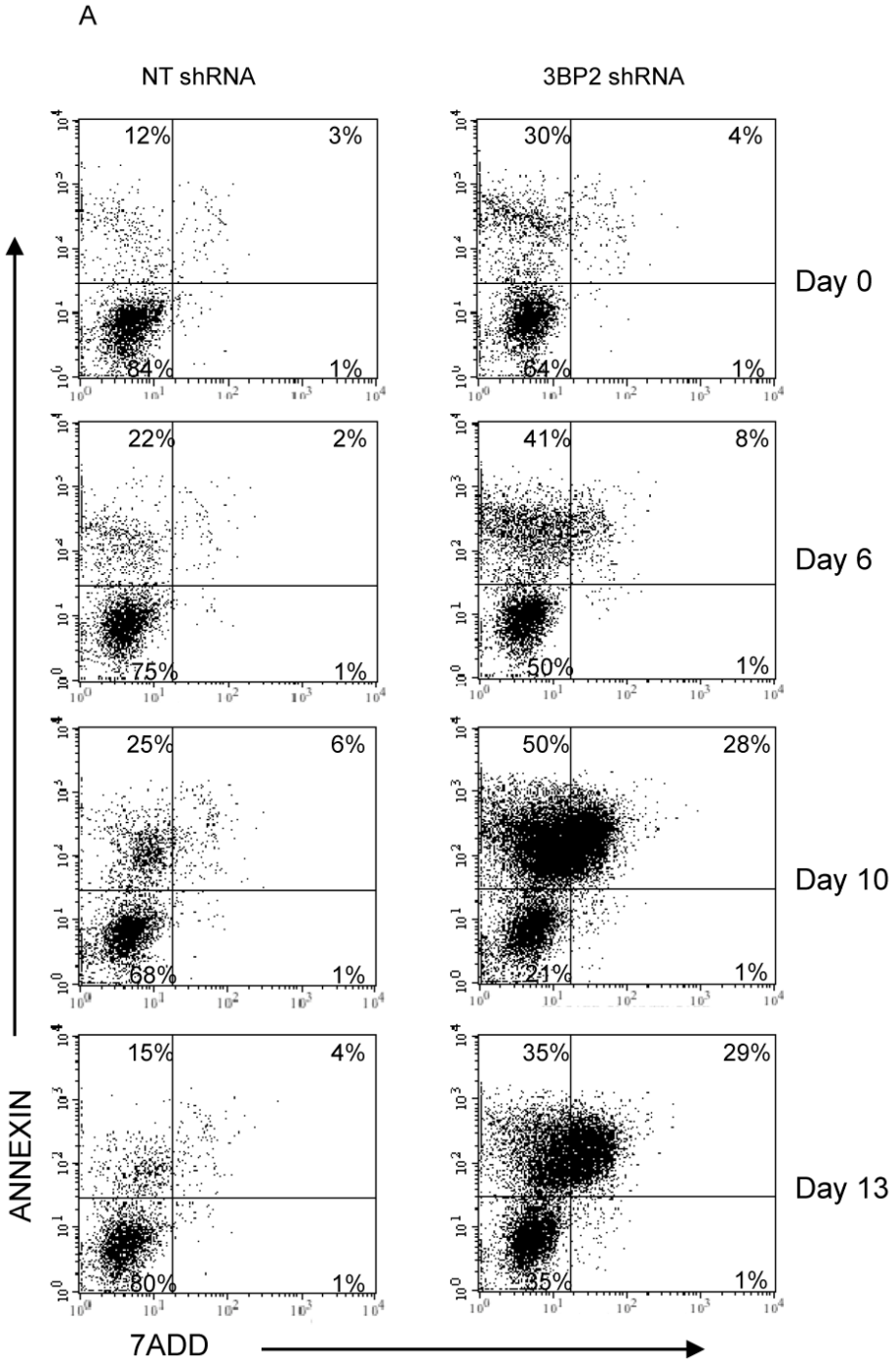
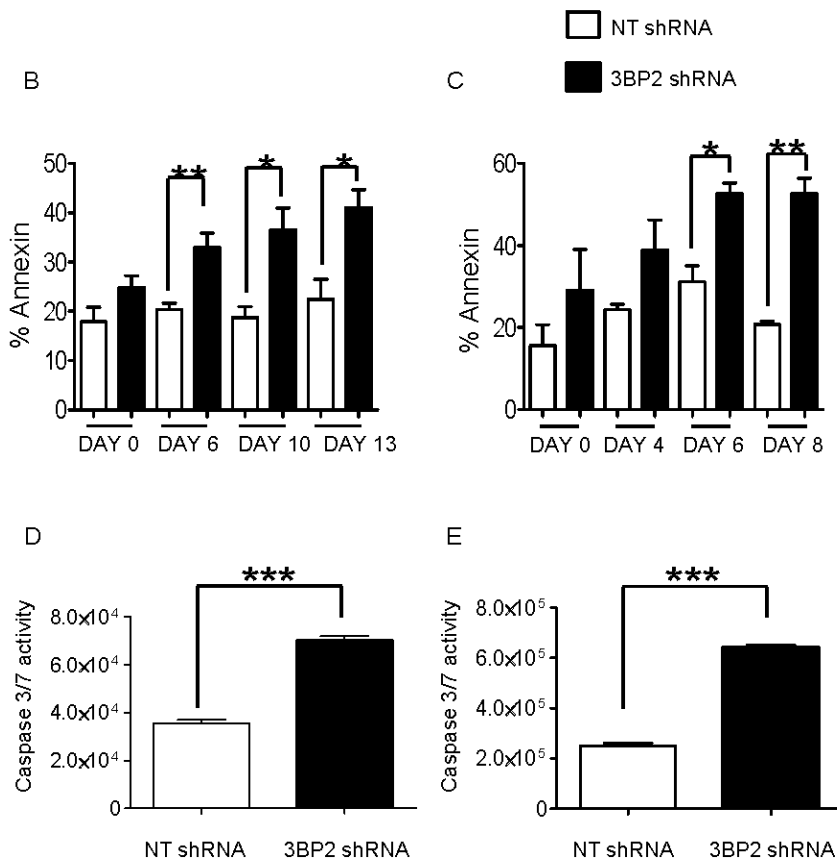


FIGURE 6



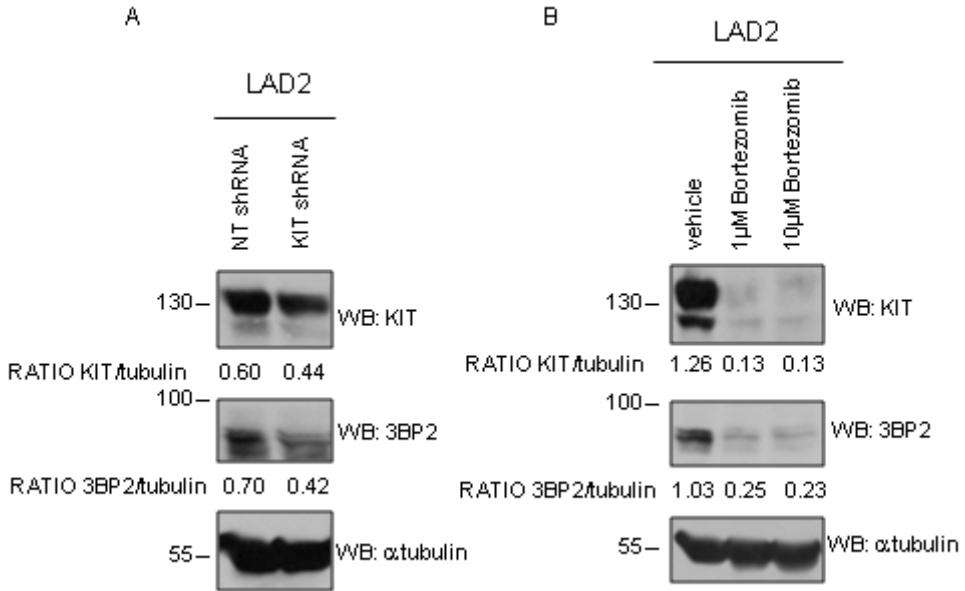
**Figure 6. 3BP2 silencing increases mast cell apoptosis and caspase 3/7 activity.**

Left panel is a dot blot representative experiment of 7ADD and Annexin V staining of 3BP2 silenced LAD2 following the manufacturer's suggested protocol. Apoptotic cells were gated from the Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>-</sup> cells (A). Right panel, bars represent the mean of apoptotic cells from 3 independent experiments from NT (non target) shRNA and 3BP2 shRNA transduced LAD2 cells (B) and CD34<sup>+</sup>-derived huMCs

(C). Statistical significance (\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.001$ ) is relative to NT shRNA. 3BP2 silenced versus control shRNA results are expressed as caspase 3/7 activity. 3BP2 silencing increases caspase 3/7 activity in LAD2 (D) and HMC-1 cells (E). Data show the mean of 3 independent experiments. Statistical significance (\*\*\*)  $p < 0.0001$ ) is relative to NT shRNA.



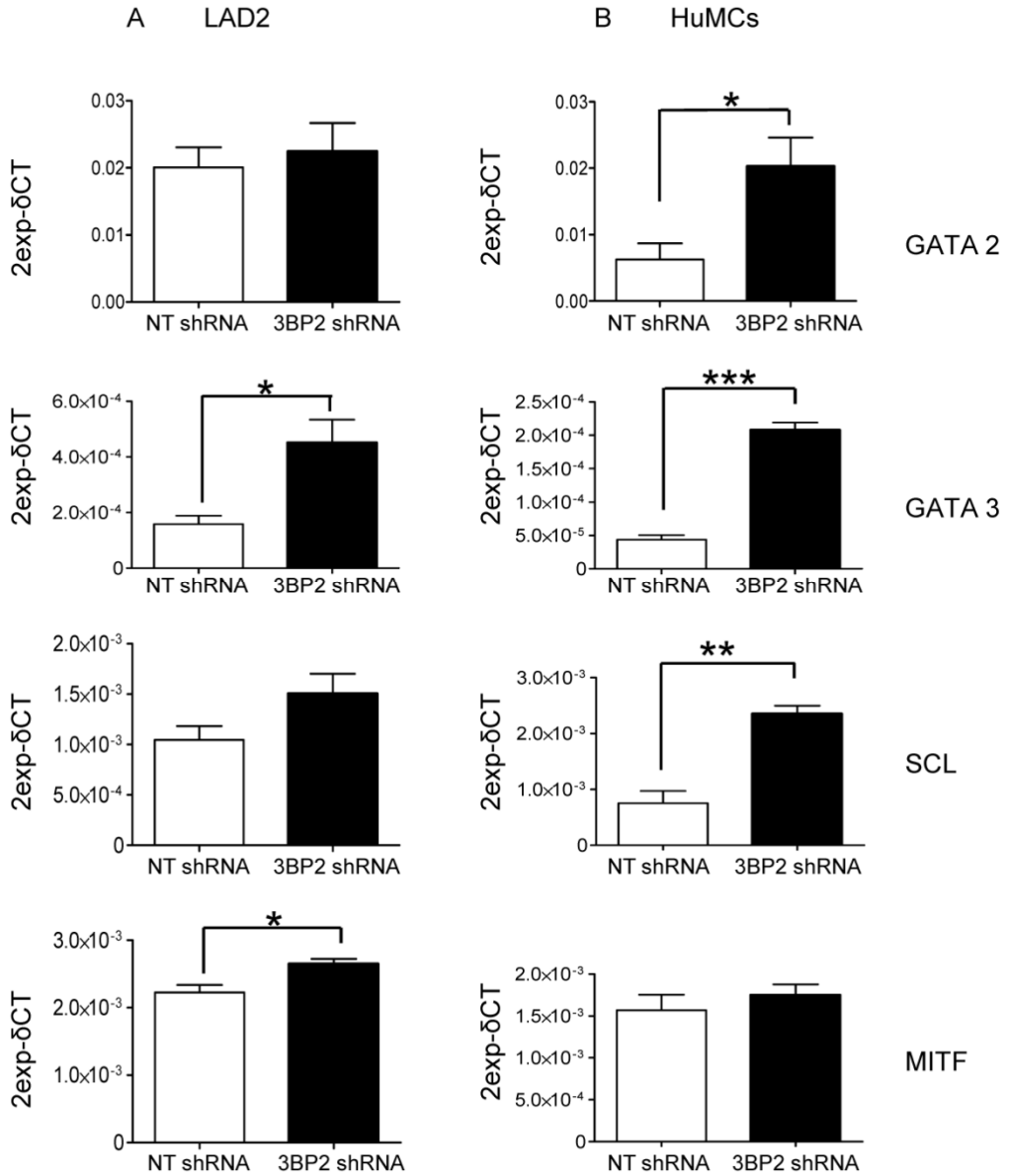
FIGURE 7



**Figure 7. A decrease in KIT expression leads to reduced 3BP2 expression in mast cells.**

KIT and 3BP2 expression were analyzed by western blot in NT (non target) shRNA and KIT shRNA transduced LAD2 (A) and in parental LAD2 after bortezomib treatment (B).  $\alpha$ Tubulin was used as loading control. Densitometric quantitation of band intensity is shown.

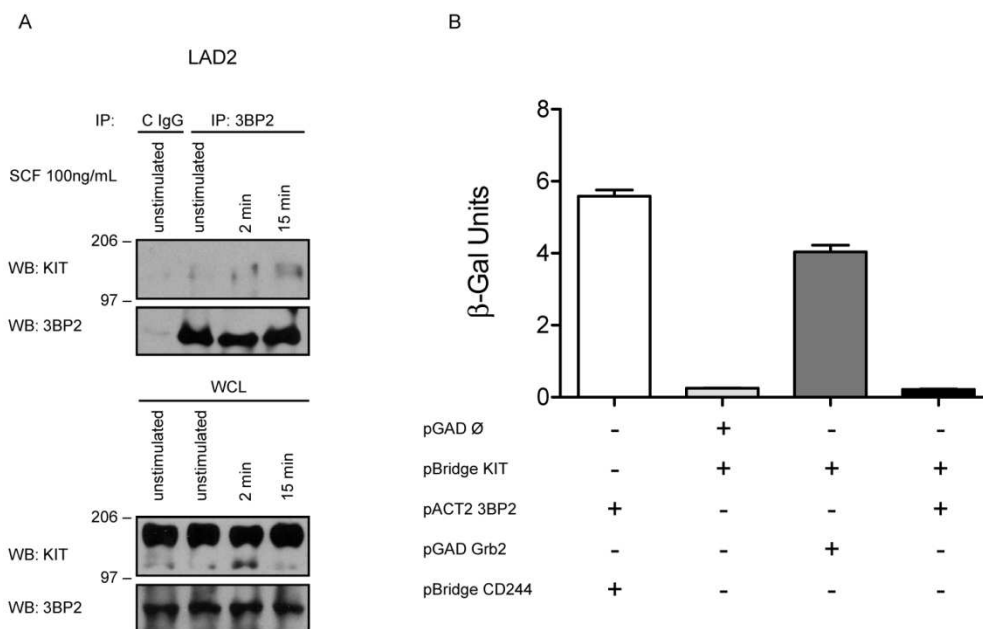
## SUPPLEMENTAL FIGURE 1



**Supplemental Figure 1. Analysis of GATA3, GATA2, SCL and MITF transcription factors expression after 3BP2 silencing**

NT shRNA and 3BP2 shRNA transduced CD34+ peripheral blood-derived huMCs and LAD2 cells were analyzed for various transcription factors expression by real time PCR. 3BP2 silencing does not decrease any of them, conversely the levels of GATA3, SCL and MITF are enhanced significantly. The results are the mean of triplicates. Statistical significance (\*p< 0.005, \*\*p< 0.001, \*\*\*p<0.0001) is relative to NT shRNA.

## SUPPLEMENTAL FIGURE 2



### Supplemental Figure 2. 3BP2 coimmunoprecipitates with KIT in LAD2 cells after SCF stimulation but 3BP2 does not bind KIT directly using a yeast system approach.

3BP2 immunoprecipitation from LAD2 cells stimulated or not with 100 ng/ml SCF was assayed at the indicated times. Immunoprecipitation with an isotype control (IC) was also loaded. Membranes bearing the resolved proteins were probed with anti-KIT and anti-3BP2. Total KIT and 3BP2 levels in whole cell lysates (WCL) are shown in the bottom panels (A).

KIT was cloned in pBridge in the presence of Fyn. We use Grb2 and CD244 as positive controls for KIT and 3BP2 respectively. Yeast were cotransfected with KIT-pBridge and empty pGAD as a negative control or Grb2-pGAD or 3BP2-pACT2.  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) assay was conducted (B). Results are the mean of triplicates.

### 3. La molècula adaptadora 3BP2 regula l'expressió i la funció de KIT oncogènic en tumors gastrointestinal.

La molècula adaptadora 3BP2 s'expressa preferentment en cèl·lules del sistema immune i regula positivament la funció de cèl·lules T, B, NK i mastòcits . Recentment hem demostrat que 3BP2 pot regular l'expressió del receptor KIT, així com la seva senyalització en mastòcits humans. Les mutacions de KIT representen la base patològica de diverses malalties, entre elles els tumors de cèl·lules de l'estroma gastrointestinal (GIST). La majoria dels GIST presenten mutacions en KIT (85%) o en el receptor PDGFR $\alpha$  (5%) que comporten un increment de l'activitat cinasa d'ambdós receptors. L' Imatinib, un inhibidor de les cinases KIT i PDGFR $\alpha$ , és el tractament clínic preferent, però el fet de l'aparició de resistències al fàrmac, crea la necessitat d'identificar noves estratègies terapèutiques. En el present treball es mostra que 3BP2 s'expressa en línies cel·lulars procedents de pacients amb GIST sensibles i resistent a la droga i analitzem el paper d'aquest adaptador en la regulació de l'expressió de KIT oncogènic i les conseqüències funcionals del silenciament de 3BP2 utilitzant lentivirus. Els nostres resultats mostren que la reducció de l'expressió de 3BP2 induïx un decrement de l'expressió del KIT oncogènic tant en línies de pacients de GIST sensibles com resistent a l'Imatinib. A més, el silenciament del 3BP2 està associat a una inhibició de la via de senyalització de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)/AKT, una inhibició de la migració cel·lular i una reducció de la viabilitat cel·lular. Curiosament, el silenciament de 3BP2 també redueix l'expressió de PDGFR $\alpha$ . Per altre part, 3BP2 coprecipita amb els receptors KIT i PDGFR $\alpha$  indicant que la molècula pot ser mediador de la senyalització d'ambdós receptors. Aquests nous resultats destaquen la importància del 3BP2 en la regulació de l'expressió i senyalització d'aquests dos receptors oncogènics, mostrant un paper com a possible diana terapèutica en GIST, especialment rellevant en els casos de pacients que han adquirit resistència als inhibidors de l'activitat cinasa d'aquests receptors

**The adaptor molecule 3BP2 regulates oncogenic KIT receptor expression and function in gastrointestinal stromal tumors**

Ainsua-Enrich E et al.

Manuscript in preparation

## ABSTRACT

3BP2 adaptor molecule is expressed preferentially in immune system cells and regulates positively the function of T, B, NK and mast cells. Recently we have shown that 3BP2 can regulate KIT receptor expression as well as signalling in human mast cells. KIT mutations lead to cell dysregulations which are the pathological basis for several diseases, among them gastrointestinal stromal tumors (GIST). Most GISTS contain oncogenic gain-of-function of KIT (85%) or PDGFR $\alpha$  receptor (5%) which is accompanied by strong expression of the protein products of these oncogenes. The KIT/ PDGFR $\alpha$  kinase inhibitor, Imatinib, is the preferential treatment however the development of clinical resistance makes a need to identify novel therapeutic strategies. In the present work we show that 3BP2 is also expressed in Imatinib- sensitive and resistant cell lines from GIST patients. Next we pursued to analyze the role of this adaptor in mutated KIT expression using the silencing technology based in lentivirus. The silencing of 3BP2 leads to a downregulation of oncogenic KIT expression in Imatinib-sensitive and resistant cell lines from GIST patients. Furthermore silencing of 3BP2 is associated with inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signalling pathway, impairment of cell migration and reduction of cell viability. Moreover 3BP2 interacts with KIT and PDGFR $\alpha$  in GIST cell lines. Interestingly, silencing of 3BP2 also reduce PDGFR $\alpha$  expression. These novel findings highlight the importance of 3BP2 in the regulation of the two oncogenics receptors expression and signalling indicating a role as a potential target in GIST, including those cases containing mutations that confer resistance to the KIT/ PDGFR $\alpha$  kinase inhibitors.

## INTRODUCTION

KIT encoded by the c-kit gene (mapped to chromosome 4q12) belongs to the type III receptor tyrosine kinase family and is structurally similar to platelet-derived growth factor receptor (PDGFRs), colony-stimulating factor-1 receptor , and fms-

like tyrosine kinase 3 (FLT-3) (Yarden, Kuang et al. 1987; Rosnet, Marchetto et al. 1991).

KIT consist of an extracellular domain (EC) with 5 immunoglobulin-like loops, a transmembrane region and a cytoplasmic domain with juxtamembrane (JM) region and a split tyrosine kinase (TK) domain. The latter is divided into an adenosine triphosphate (ATP) binding region (TK1) and a phosphotransferase region (TK2) by a hydrophilic kinase insert (KIT) (Lennartsson and Ronnstrand 2012).

KIT ligand is the stem cell factor. Ligand binding to the EC induces dimerization of the receptor and TK activation. This leads to a phosphorylation cascade and activation of signal transduction pathways inducing Ras/MAP kinase, Rac/Rho-JNK, PI3K/AKT and SFK/STAT signalling networks. Signaling by KIT plays an important role in erythropoiesis, lymphopoiesis, mast cell development and function, megakaryopoiesis, gametogenesis and melanogenesis (Lennartsson and Ronnstrand 2012).

KIT is expressed in more than 95% of gastrointestinal stromal tumors (GIST), including tumors with wild-type KIT and most PDGFR $\alpha$  mutant GISTs. GIST arise from transformed progenitor cells committed to differentiation along the interstitial cell of Cajal lineage and are the most common mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract (Fletcher, Berman et al. 2002). GIST are heterogeneous histologically, including spindle cell (70%), epitheloid cell (20%) and mixed types (10%) (Corless, Fletcher et al. 2004). KIT mutation in GIST does not cause KIT expression but modifies KIT function (Miettinen and Lasota 2006). About 65-85% of GIST have KIT mutations (Rubin, Singer et al. 2001; Heinrich, Corless et al. 2003; Miettinen, Sobin et al. 2005). Based on the location, these mutations could be divided into 2 categories: mutations of the receptor regulatory domain (EC and JM) and mutations of the enzymatic domain (TK1 and TK2) (Longley, Reguera et al. 2001). Most involve the JM domain (exon 11) and consist mostly of deletions or point mutations. Mutations in the JM domain affects KIT's autoregulatory function and promote spontaneous kinase activation (Chan, Ilangumaran et al. 2003). Exon



9 (EC domain) mutations are the second most common mutations followed by exon 13 (TK1 domain) and exon 17 (TK2 domain) mutations.

In approximately 10% of GISTs, no c-kit mutations are found even when the whole coding region is examined. Interestingly, PDGFR $\alpha$  gain of mutations function are found in an about half of the GIST lacking c-kit mutations (Heinrich, Corless et al. 2003; Hirota, Ohashi et al. 2003). A majority of PDGFR $\alpha$  mutations affect the TK2 domain (exon 18). These mutations change the activation loop, which regulates the ATP-binding pocket and leads to kinase activation (Rubin, Heinrich et al. 2007). Activated PDGFR $\alpha$  activates the same signalling pathways that KIT activates, leading to GIST. Imatinib mesylate, a small molecule TK inhibitor, is approved for first treatment of metastatic and unresectable GISTs. It works by binding to the ATP binding sites of KIT, PDGFR $\alpha$  and bcr-abl fusion product, consequently inhibiting their activity (Lyseng-Williamson and Jarvis 2001). During Imatinib treatment, resistance often develops as a result of secondary mutations, primarily in the kinase domains of KIT or PDGFR $\alpha$  (Chen, Trent et al. 2004; Tamborini, Bonadiman et al. 2004; McLean, Gana-Weisz et al. 2005). Sunitinib malate, a oral multitargeted inhibitor of KIT, PDGFR, vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) is approved for treatment of Imatinib-resistant GISTs. Although a clinical benefit of sunitinib treatment was observed in all major mutant types, the primary response rate was significant higher for KIT exon 9 mutants. The inhibitory effect of sunitinib was not substantially affected by KIT mutations in TK1 whereas GISTs with KIT-TK2 mutations were resistant to sunitinib treatment (Bayraktar, Bayraktar et al. 2010). Thus, it becomes a need introducing novel therapeutic options for Imatinib-and sunitib-resistant GISTs.

The adaptor molecule 3BP2 has been recently shown to regulate expression and signalling of KIT receptor in human mast cells (Ainsua-Enrich, E et al. manuscript submitted). SH3-binding protein 2 (3BP2) is a cytoplasmic adapter originally identified as a protein interacting with the SH3 domain of Abl PTK (Ren, Mayer et al. 1993). Human 3BP2 is a 561-aa protein containing an N-terminal pleckstrin homology (PH) domain, an SH3-binding proline-rich region, and a C-terminal SH2

domain. 3BP2 is preferentially expressed in hematopoietic tissues having an important role regulating adaptative and innate immune responses. A positive regulatory role of 3BP2 in T and B cell receptor, NK and mast cells functionality has been established (Deckert, Tartare-Deckert et al. 1998; Jevremovic, Billadeau et al. 2001; Foucault, Le Bras et al. 2005; Ainsua-Enrich, Alvarez-Errico et al. 2012). Moreover, in 3BP2-deficient mice optimal B cell activation and thymus-independent humoral responses are impaired (de la Fuente, Kumar et al. 2006; Chen, Dimitriou et al. 2007).

In this paper we report that 3BP2 is expressed in cell lines from Imatinib sensitive and resistant GIST patients (GIST 882 and 48 respectively). Silencing of 3BP2 affected mutated KIT expression in both cell lines. Our findings show that 3BP2 regulates KIT expression, cell survival, viability and cell migration. Furthermore 3BP2 also regulates PDGFR $\alpha$  expression and coprecipitates with both oncogenic receptors indicating that forms part of their signalosome complex. In fact the silencing of 3BP2 clearly reduced Akt phosphorylation among others KIT and PDGFR alfa signaling mediators. Our data suggest a novel role of 3BP2 in GIST survival and further evaluation as a therapeutic target in GIST may be considered including those with resistance to KIT kinase inhibitors such as Imatinib.

## MATERIAL AND METHODS

### *Antibodies*

Mouse anti-3BP2 C5, anti-phospho AKT 1/2/3 (Ser 473)-R and mouse anti-KIT (clone Ab81) were purchased from Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA). Anti-p PLC $\gamma$ , anti-p-ERK Thr202/Tyr204, anti-PDGFR $\alpha$  and MITF were purchased from Cell Signaling (Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA). Anti- $\beta$ -actin peroxidase monoclonal (clon AC-15) and anti- $\alpha$ -tubulin (clon DM1A) were purchased from Sigma (Sigma, St. Louis, MO, USA).

## *Cell culture*

The human GIST cell line GIST 882 (Kindly provided by Dr. S. Bauer/ Dr. Fletcher) was derived from an untreated metastatic GIST with a primary Imatinib-sensitive mutation in Kit exon 13 (K642E; (Lux, Rubin et al. 2000) and maintained in RPMI 1640 (Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS, Biosera Europe, Boussens, France), 1% L-glutamine, 50 units/ml penicillin and streptomycin (Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland). The GIST 48 cell line was derived from an Imatinib-resistant GIST. GIST 48 has a homozygous KIT exon 11 mutation (V560D) and a heterozygous KIT exon 17 mutation (D820A). GIST 48 was maintained in Ham's F-10 supplemented with 15% FBS (Biosera Europe), 1% L-glutamine, 50 units/ml penicillin and streptomycin (Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland), 30 mg/ml bovine pituitary extract and 0,5% MITO+ Serum Extender (Biosciences Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). GIST48B is a subline of GIST48 which, despite retaining the activating *KIT* mutation in all cells, expresses KIT transcript and protein at essentially undetectable levels (Muhlenberg, Zhang et al. 2009).

## *ShRNA silencing by lentiviral infection*

Lentiviral particles to silence the 3BP2 gene expression were generated using Mission® shRNA technology according to manufacturer's instructions (Sigma, St. Louis, MO, USA). The 3BP2 21 shRNA sequence was: 5'CCG GGC GAA GTG GAA AGG TTG TTC ACT CGA GTG AAC AAC CTT TCC ACT TCG CTT TTT G 3', the 3BP2 19 shRNA sequence was 5' CCG GCT CTA ACA AAG TGA GGA ACT ACT CGA GTA GTT CCT CAC TTT GTT AGA GTT TTT G 3', the 3BP2 17 shRNA sequence was: 5' CCG GGC ACC CAA TTA TGC AAG CAT TCT CGA GAA TGC TTG CAT AAT TGG GTG CTT TTT G 3'. Sequence 19 and 21 recognize not overlapping sequences within the 3BP2 SH2 domain. 3BP2 shRNA number 17 recognizes a sequence in the 3' UTR region in 3BP2 transcript. Non-target shRNA was used as a control. Virus preparations were done by transfection of 293LTV (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) cells and harvesting of supernatant

3 days post transfection as described (Furumoto, Brooks et al. 2006). GIST cells were infected and puromycin selection was carried out after 3 days infection. Experiments were performed two weeks after infection.

#### *Cell immunoprecipitation and immunoblotting*

For immunoprecipitation experiments, cells were washed twice with ice-cold PBS and solubilized in lysis buffer 2x (2% Triton X-100, 200mM NaF, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride), 2mM sodium pyrophosphate, 100 mM Tris, pH 7.4, 300 mM NaCl, 40mM octyl-β-glucoside, and 4% protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemical, IN, USA) ). Cell lysates were pre-cleared by centrifugation, and the resulting lysate was first incubated with the indicated primary antibodies and, subsequently with protein A sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden). After rotation for 3 h at 4°C, the beads were washed three times with lysis buffer and the immunoprecipitated proteins were eluted by heat treatment at 100°C for 5 min with 3 fold concentrated sampling buffer. The immunoprecipitates and total cell lysates were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes PVDF (Millipore, Bedford, MA, USA). Blots were probed with the indicated antibodies. In all blots, proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

#### *Cell Viability and detection of apoptosis and Caspase-3 and -7 Activities*

Cell viability was determined by trypan blue exclusion counting viable cells in a New Bauer counting chamber. Caspase activity was assayed using the Caspases-Glo® 3/7 Assay (Promega, San Luis Obispo, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

#### *Wound-healing assay*

The GIST cells 48 and 48B ( $1 \times 10^6$ ) were seeded in a 6-well plate cultured with appropriate media. Pipette tips (200 μl) were used to scratch three parallel vertical

lines in each well subsequent to 12 h of culture. The wells were washed with PBS then the medium was changed to fresh media. Scratch lines were observed under a microscope and scratch distances were measured, with images captured at 0, 12 and 24 h after scratching.

#### *Statistical data analysis.*

All results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of the mean (SD). Student's t-test was used to determine significant differences (p value) between two experimental groups after determination of normal distribution of the sample and variance analysis.

## **RESULTS**

### **3BP2 is expressed in Imatinib sensitive and Imatinib resistant GIST cell lines**

3BP2 expression was evaluated in two GIST cell lines (GIST 882 and GIST 48) that express KIT oncoprotein, and therefore referred to as KIT positive and in GIST 48 B that lack KIT expression and it was established from KIT positive GIST 48 after 17-AAG drug pressure which resulted in nearly undetectable KIT transcript and protein. As shown in Figure 1 all the cell line tested expressed 3BP2 in similar fashion.

### **3BP2 regulates KIT oncoprotein expression**

To analyze 3BP2 role in Imatinib-sensitive and resistant GISTs, 3BP2 gene expression was stably silenced by lentivirus-mediated shRNA in GIST882, GIST 48 cell lines. Various 3BP2 shRNA sequences were analyzed. All of them show at a different extent a reduction in 3BP2. This decrease was accompanied by a diminished KIT expression (Figure 2). All experimental results were corroborated by at least three separate infections of the various GIST cell lines.

### **3BP2 regulates PDGFR $\alpha$ expression in GIST cell lines**

The GIST 48B cell line is derived from GIST 48 and it was used as a negative control for KIT expression. Surprisingly when we analyzed the levels of PDGFR $\alpha$  expression in all cell lines, the PDGFR $\alpha$  expression was increased in GIST 48B vs GIST 48 (data not shown). Interestingly 3BP2 silencing down regulates PDGFR $\alpha$  expression GIST 48B (Figure 3) suggesting that 3BP2 is a common partner for KIT and PDGFR $\alpha$  receptors.

### **3BP2 coprecipitates with KIT and PDGFR $\alpha$**

Since 3BP2 silencing has an effect in KIT and PDGFR $\alpha$  receptor expression we further analyzed whether 3BP2 can be a mediator in these receptors signaling being part of their signalosome. For that purpose we immunoprecipitate 3BP2 in GIST 882, which express KIT and PDGFR $\alpha$  receptors in reasonable amount, with and specific antibody and we look for coprecipitation of these receptors by western blot. Our results show that 3BP2 coprecipitates in the same complex with KIT and PDGFR $\alpha$  (Figure 4)

### **Effects of 3BP2 silencing in KIT signaling**

Further we analyze the effect of 3BP2 silencing in the ability of KIT signaling evaluating the phosphorylation of PLC gamma, AKT and mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) among other signaling intermediates that have been shown to be KIT dependent in GISTs (Duensing, Medeiros et al. 2004; Bauer, Duensing et al. 2007). 3BP2 silencing in 882 GIST cells as carried out using various 3BP2 shRNA sequences. In all sequences we found a reduction in PLC gamma phosphorylation (Figure 5), consistent with the positive role of this adaptor in PLC gamma activation in mast and NK cells reported previously by our group (Saborit-Villarroya, Martinez-Barriocanal et al. 2008; Ainsua-Enrich, Alvarez-Errico et al. 2012). AKT phosphorylation, a surrogate marker of PI3K activation, is reduced as well in all the silencing sequences chequed but ERK1/2 phosphorylation was only clearly downregulated when the 3BP2 shRNA 19 was used (Figure 5). This

shRNA sequence leads to the major decrease of 3BP2 and KIT expression (Figure 2).

### **Effects of 3BP2 on GIST cell viability and apoptosis**

It is well known that KIT promotes cell survival through PI3K binding. Since 3BP2 silencing reduces KIT expression and PI3K activation (measured by AKT phosphorylation) we next investigate cell viability as well as apoptosis of control and 3BP2 shRNA infected cells. After one week of silencing cells infected with 3BP2 shRNA lentivirus shows an increase of cell death measured by trypan blue exclusion (Figure 6A). Moreover, a shape transformation is also observed. 3BP2 shRNA infected cells turns in a round shape.

Apoptosis was assayed measuring the caspase 3/7 activity as described in material and methods section. The lost in cell viability was concomitant to an increase in caspase 3/7 activity (Figure 6B)

### **Imatinib resistant GIST cell migration is impaired after 3BP2 silencing**

To explore the effect of 3BP2 silencing in the ability of cells to migrate we performed a wound-healing assay. 3BP2 silenced GIST 48 cells exhibited a significant decrease in migration, since the scratches in 3BP2 silenced cells wells were wider than in the control infected cells after 24 h of culture (Fig.7A). Surprisingly, GIST 48B, where KIT has been selectively ablated, exhibit a migration rates similar to the GIST 48, however 3BP2 silencing has same effect over the migration ability of those cells being significant after 24 hours as well (Figure 7B). These results indicate that 3BP2 is important for Imatinib resistant GIST cells to migrate.

### **3BP2 silencing reduces MITF expression leading to KIT reduction in GIST**

We have reported recently that 3BP2 silencing downregulates the basic helix-loop-helix transcription factor microphthalmia associated transcription factor (MITF)

expression on mast cells (Ainsua-Enrich, E. et al. submitted manuscript). MITF binds to a CACCTG motif in the c-Kit promoter and it has been proved an important regulator of c-Kit expression in mast cells (Lee, Brandal et al. 2011). Next, we assayed whether 3BP2 silencing leads to decrease in MITF expression in GIST cells. As we show in Figure 8, MITF is reduced after 3BP2 silencing suggesting the involvement of this transcription factor in the regulatory mechanism where 3BP2 expression is critical.

## DISCUSSION

Although GISTs can be successfully treated with Imatinib mesylate, new therapeutic options are needed because complete responses are rare and more than 80% of the patients develop resistance to the drug over time (Demetri, von Mehren et al. 2002; Verweij, Casali et al. 2004; Blanke, Demetri et al. 2008). Based on our previous finding that the adaptor 3BP2 was able to regulate KIT expression on mast cells (Ainsua- Enrich, E, submitted manuscript) we explore the ability of this protein to regulate oncogenic KIT expression in gastrointestinal tumor cells. First we evaluate the 3BP2 expression levels in Imatinib sensitive and resistant cells lines derived from GIST patients. We found that 3BP2 is very well expressed in both kinds of cell lines. Silencing of 3BP2 has a proapoptotic effect on Imatinib-sensitive GIST 882 cell line and Imatinib-resistant GIST 48 cell line. Notably, all the shRNA sequences checked have similar effects related to the silencing degree. The 3BP2 silencing-induced GIST apoptosis was concomitant to the downregulation of *KIT* oncogene protein levels.

Our current study supports the hypothesis that KIT downregulation by 3BP2 silencing can induce apoptosis. Our finding that 3BP2 silencing of GIST cells resulted in significant downregulation of KIT protein, accompanied by loss of KIT tyrosine phosphorylation, lends important support to this notion. It is known that loss of the KIT protein has a strong apoptotic effect in GIST cells as seen after



knocking down KIT with siRNA or treatment with HSP90 inhibitors (Bauer, Yu et al. 2006; Liu, Tseng et al. 2007). It is therefore likely that downregulation of KIT contributes substantially to the effect of 3BP2 silencing on GIST cells. However the decrease in AKT phosphorylation, a surrogate marker to determine PI3K activation status, is higher when 3BP2 is downregulated. As we reported, previously, 3BP2 overexpression can enhance AKT phosphorylation possibly through binding to p85 subunit of PI3K (Saborit-Villarroya, Martinez-Barriocanal et al. 2008). Thus, the 3BP2 reduction by itself may also account to the decrease of cell survival.

Our data show that 3BP2 levels decrease leads to a reduction on MITF expression and consequently KIT downregulation. Our hypothesis is that 3BP2 is an important mediator of cell survival and a regulator of KIT expression at protein and mRNA level through the control of Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) expression. It has been shown that bortezomib causes a transcriptional downregulation of KIT (Bauer, Parry et al. 2010). However the mechanisms by which bortezomib downregulates *KIT* oncogene transcription are incompletely understood. Recently, it has been reported that MITF expression is as well reduced after bortezomib treatment in mast cells (Lee, Brandal et al. 2011). In fact there is an inverse regulation between MITF and KIT through selective miRNA expression. MiR-539 and miR-381 have been shown to be down-regulated by KIT signaling and they repressed MITF expression through conserved miRNA binding sites in the MITF 3'-untranslated region in mast cells (Lee, Brandal et al. 2011). Interestingly, bortezomib also induces 3BP2 downregulation as we have shown previously in mast cells (Ainsua-Enrich, E et al. manuscript in preparation). It is likely that 3BP2 may act also regulating miRNA expression levels. We are currently testing whether 3BP2 is involved in the regulation of these miRNAs which could also result in the downregulation of KIT protein in GIST cells.

Moreover, 3BP2 silencing leads a downregulation of PDGFR $\alpha$  receptor suggesting that additionally 3BP2 can act through this other receptor. Interestingly,

3BP2 can coprecipitate with KIT and PDGFR $\alpha$  receptors suggesting that the adaptor is a common mediator in both receptor signaling pathways.

Because most Imatinib-resistant GISTs develop secondary mutations within the *KIT* or *PDGFRA* kinase domains, novel therapeutic approaches that do not directly target these kinases are particularly important. The example of HSP90 inhibitors, or bortezomib which likewise lead to loss of KIT oncoprotein expression in GIST, supports this notion (Bauer, Yu et al. 2006; Bauer, Parry et al. 2010).

In that respect, our results that 3BP2 silencing is effective against GIST cells harboring various resistance mutations seem especially promising.

Migration assays comparing shRNA control cells and 3BP2 shRNA cells show significant differences in Imatinib resistant GIST cells. Thus, 3BP2 silencing not only affects cell survival but also the cells ability to migrate. Interestingly, GIST 48B which lacks KIT expression, migrates similar to GIST48 cells. At this respect our hypothesis is that 48B cells upregulates PDGFR $\alpha$  expression and this phenomenon compensates the lack of KIT allowing cells to migrate. Importantly, 3BP2 silencing can inhibit this mechanism showing a reduction in cell migration. In fact, we have shown that 3BP2 silencing also leads to PDGFR $\alpha$  decrease expression.

Altogether these data show the 3BP2 critical function promoting cell migration through KIT and PDGFR $\alpha$  receptors.

In summary, we have shown that 3BP2 induces apoptosis and impairs migration in Imatinib-sensitive as well as Imatinib-resistant GIST cells. We identified 3BP2 as a mediator of KIT and PDGFR $\alpha$  signaling and expression of both receptors in GIST cells. Our results provide compelling information of a new selective target for GIST treatment in cases where resistances occurred.

## FOOTNOTES

This work was supported by grant PI120032 from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministry of Economy and Competitiveness, Spain. Mi. Spain. E. A-E is supported by a FPI fellowship both from Ministerio de Ciencia e Innovación.

## REFERENCES

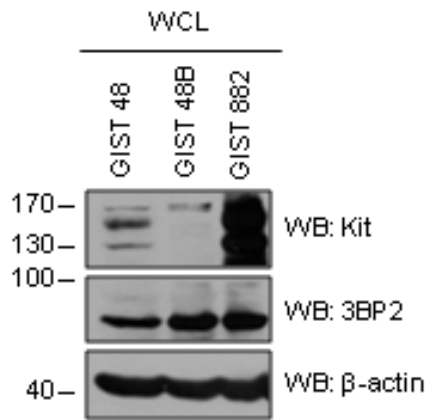
1. Yarden, Y., et al., *Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand*. EMBO J, 1987. **6**(11): p. 3341-51.
2. Rosnet, O., et al., *Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family*. Oncogene, 1991. **6**(9): p. 1641-50.
3. Lennartsson, J. and L. Ronnstrand, *Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications*. Physiol Rev, 2012. **92**(4): p. 1619-49.
4. Fletcher, C.D., et al., *Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach*. Hum Pathol, 2002. **33**(5): p. 459-65.
5. Corless, C.L., J.A. Fletcher, and M.C. Heinrich, *Biology of gastrointestinal stromal tumors*. J Clin Oncol, 2004. **22**(18): p. 3813-25.
6. Miettinen, M. and J. Lasota, *Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites*. Semin Diagn Pathol, 2006. **23**(2): p. 70-83.
7. Miettinen, M., L.H. Sobin, and J. Lasota, *Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(1): p. 52-68.
8. Rubin, B.P., et al., *KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors*. Cancer Res, 2001. **61**(22): p. 8118-21.
9. Heinrich, M.C., et al., *Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor*. J Clin Oncol, 2003. **21**(23): p. 4342-9.
10. Longley, B.J., M.J. Reguera, and Y. Ma, *Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy*. Leuk Res, 2001. **25**(7): p. 571-6.

11. Chan, P.M., et al., *Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(9): p. 3067-78.
12. Hirota, S., et al., *Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors*. Gastroenterology, 2003. **125**(3): p. 660-7.
13. Rubin, B.P., M.C. Heinrich, and C.L. Corless, *Gastrointestinal stromal tumour*. Lancet, 2007. **369**(9574): p. 1731-41.
14. Lyseng-Williamson, K. and B. Jarvis, *Imatinib*. Drugs, 2001. **61**(12): p. 1765-74; discussion 1775-6.
15. Chen, L.L., et al., *A missense mutation in KIT kinase domain 1 correlates with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 5913-9.
16. McLean, S.R., et al., *Imatinib binding and cKIT inhibition is abrogated by the cKIT kinase domain I missense mutation Val654Ala*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(12): p. 2008-15.
17. Tamborini, E., et al., *A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient*. Gastroenterology, 2004. **127**(1): p. 294-9.
18. Bayraktar, U.D., S. Bayraktar, and C.M. Rocha-Lima, *Molecular basis and management of gastrointestinal stromal tumors*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(22): p. 2726-34.
19. Ren, R., et al., *Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site*. Science, 1993. **259**(5098): p. 1157-61.
20. Ainsua-Enrich, E., et al., *The adaptor 3BP2 is required for early and late events in FcepsilonRI signaling in human mast cells*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2727-34.
21. Deckert, M., et al., *Adaptor function for the Syk kinases-interacting protein 3BP2 in IL-2 gene activation*. Immunity, 1998. **9**(5): p. 595-605.

22. Foucault, I., et al., *The adaptor protein 3BP2 associates with VAV guanine nucleotide exchange factors to regulate NFAT activation by the B-cell antigen receptor*. Blood, 2005. **105**(3): p. 1106-13.
23. Jevremovic, D., et al., *Regulation of NK cell-mediated cytotoxicity by the adaptor protein 3BP2*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7219-28.
24. Chen, G., et al., *The 3BP2 adapter protein is required for optimal B-cell activation and thymus-independent type 2 humoral response*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(8): p. 3109-22.
25. de la Fuente, M.A., et al., *3BP2 deficiency impairs the response of B cells, but not T cells, to antigen receptor ligation*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(14): p. 5214-25.
26. Lux, M.L., et al., *KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors*. Am J Pathol, 2000. **156**(3): p. 791-5.
27. Muhlenberg, T., et al., *Inhibitors of deacetylases suppress oncogenic KIT signaling, acetylate HSP90, and induce apoptosis in gastrointestinal stromal tumors*. Cancer Res, 2009. **69**(17): p. 6941-50.
28. Furumoto, Y., et al., *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, 2006. **176**(9): p. 5167-71.
29. Duensing, A., et al., *Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs)*. Oncogene, 2004. **23**(22): p. 3999-4006.
30. Bauer, S., et al., *KIT oncogenic signaling mechanisms in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor: PI3-kinase/AKT is a crucial survival pathway*. Oncogene, 2007. **26**(54): p. 7560-8.
31. Saborit-Villarroya, I., et al., *The adaptor 3BP2 activates CD244-mediated cytotoxicity in PKC- and SAP-dependent mechanisms*. Mol Immunol, 2008. **45**(12): p. 3446-53.

32. Lee, Y.N., et al., *KIT signaling regulates MITF expression through miRNAs in normal and malignant mast cell proliferation*. *Blood*, 2011. **117**(13): p. 3629-40.
33. Demetri, G.D., et al., *Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(7): p. 472-80.
34. Verweij, J., et al., *Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial*. *Lancet*, 2004. **364**(9440): p. 1127-34.
35. Blanke, C.D., et al., *Long-term results from a randomized phase II trial of standard- versus higher-dose imatinib mesylate for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing KIT*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(4): p. 620-5.
36. Liu, Y., et al., *Histone H2AX is a mediator of gastrointestinal stromal tumor cell apoptosis following treatment with imatinib mesylate*. *Cancer Res*, 2007. **67**(6): p. 2685-92.
37. Bauer, S., et al., *Heat shock protein 90 inhibition in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor*. *Cancer Res*, 2006. **66**(18): p. 9153-61.
38. Bauer, S., et al., *Proapoptotic activity of bortezomib in gastrointestinal stromal tumor cells*. *Cancer Res*, 2010. **70**(1): p. 150-9.

FIGURE 1

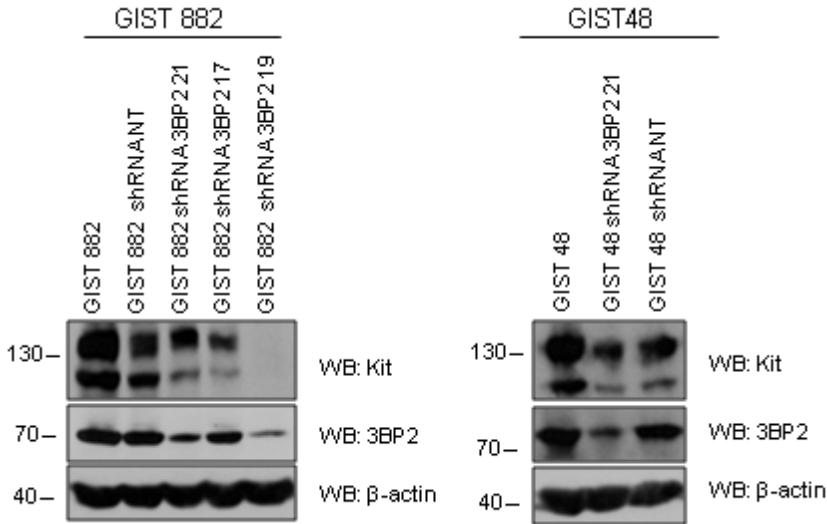


**Figure 1. Expression of 3BP2 in GIST cell lines**

Anti-3BP2 western blot analysis was performed on GIST 882, GIST 48 and GIST 48B whole cell lysates. Membrane was reprobed with anti- KIT and anti-β-actin to check loading levels per lane.



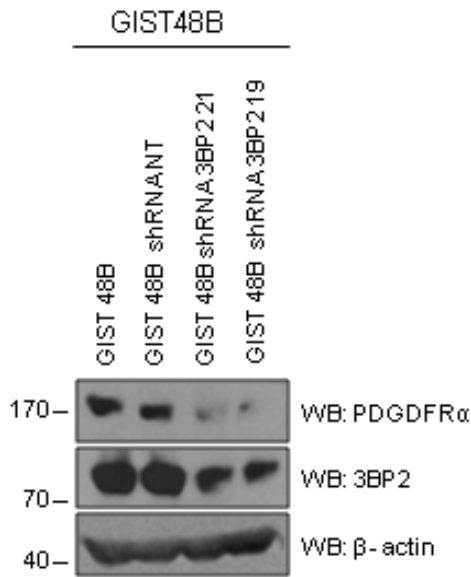
FIGURE 2



**Figure 2. Silencing of 3BP2 and KIT expression in GIST 882 and 48**

3BP2 expression was analyzed in GIST 882 cells by western blot following treatment of the cells with control (NT shRNA) and 3 different 3BP2-targeting shRNAs. The sequence corresponding to shRNA clone 21 was chosen for further assays in GIST 48. Membrane was reprobed with anti- KIT and anti-β-actin to check loading levels per lane.

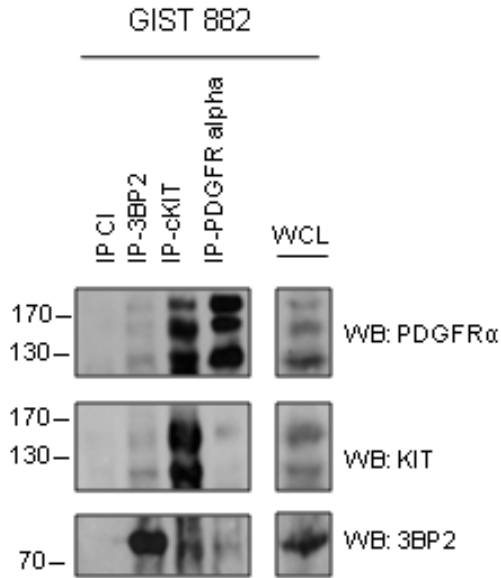
FIGURE 3



**Figura 3. PDGFRalfa expression after 3BP2 silencing.**

3BP2 expression was analyzed in GIST 48B cells by western blot following treatment of the cells with control (NT shRNA) and 2 different 3BP2-targetting shRNAs. Membrane was reprobred with anti- KIT (not signal detectable), anti-PDGFR $\alpha$  and anti- $\beta$ -actin to check loading levels per lane.

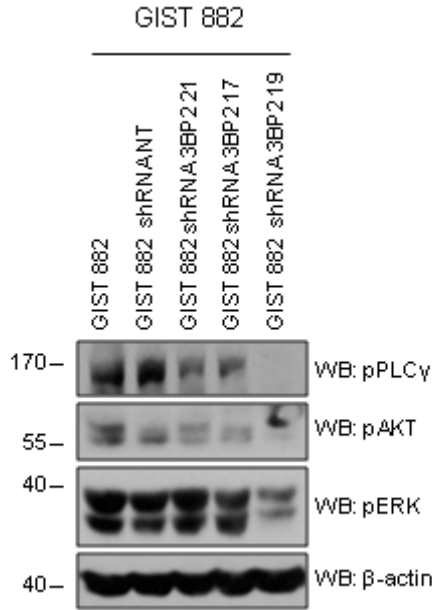
FIGURE 4



**Figure 4. Co-ip 3BP2-KIT and 3BP2 PDGFRalfa 882**

GIST 882 cells were lysed and immunoprecipitated with anti-3BP2, anti-KIT and anti-PDGFR $\alpha$  mAb as described in material and methods. Membranes were blotted with anti-3BP2, anti-KIT and anti-PDGFR $\alpha$  mAb. Immunoprecipitation with an isotype control (IC) was also loaded. Whole cell lysates were also analyzed.

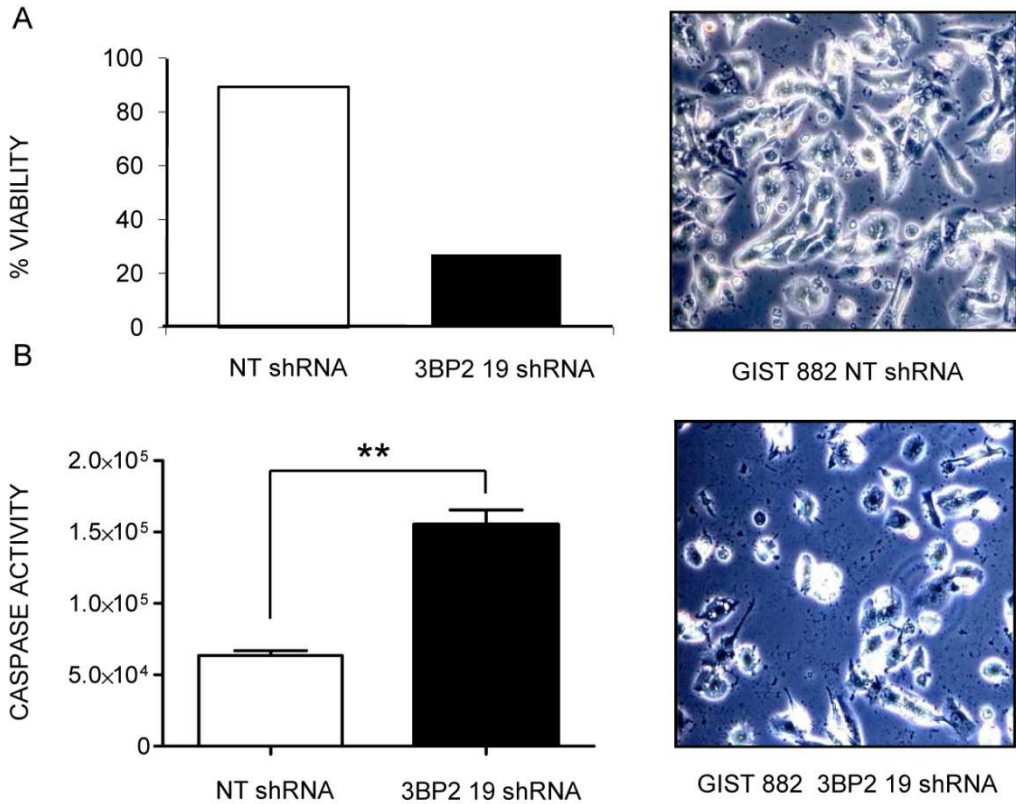
FIGURE 5



**Figure 5. KIT signaling after 3BP2 silencing: PLC gamma, AKT and ERK1/2 phosphorylation were affected.**

Parental, control (NT) and 3BP2 shRNA infected GIST 882 cells were lysed and total cell lysates were analyzed for PLC gamma, Akt -as a surrogate marker for PI3K activation- and ERK1/2 phosphorylation status. Membranes were reprobbed with  $\beta$ -actin to check loading levels per lane.

FIGURE 6

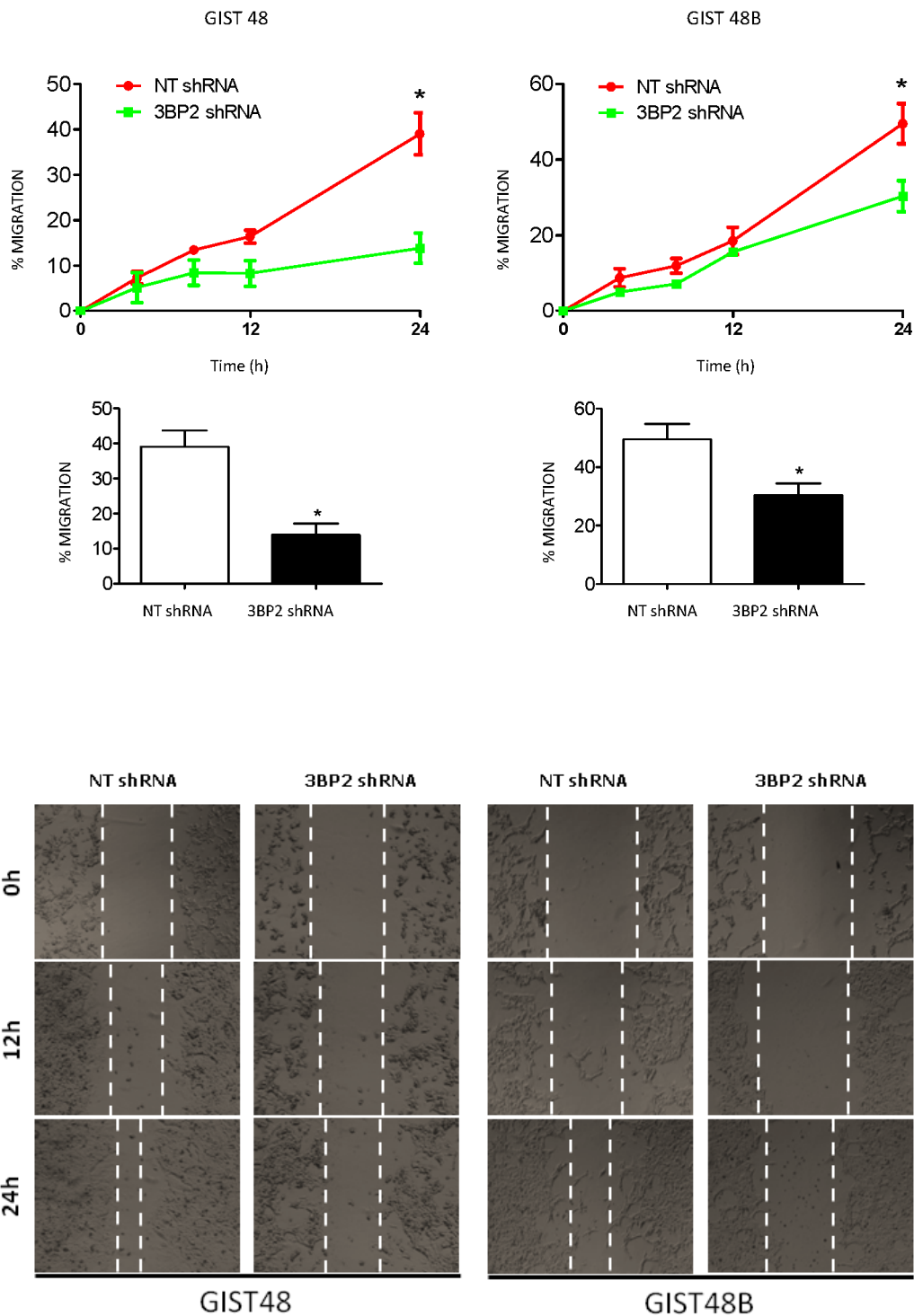


**Figure 6. Cell viability is decreased after 3BP2 silencing in GIST 882. And cell apoptosis, measuring caspase 3/7, is increased after 3BP2 silencing in GIST 882.**

Trypan exclusion was performed in Control (NT) and 3BP2 silenced GIST 882 selected by puromycin cells after 2 weeks of infection. Cell counting was performed with a new Bauer counting chamber. The viability (20% alive cells) was severely reduced in 3BP2 silencing cells compared to Control (NT) cells (90% alive cells). Images were taken using a Leika microscope (20x) (A).  $1 \times 10^5$  GIST882 cells were seeded in 96-well plate. Following day, Caspase 3/7 activity

was measured using the Caspases-Glo® 3/7 Assay, following the manufacturers instruction. 3BP2 knockdown versus control shRNA results are expressed as caspase 3/7 activity. Data represent the mean of 3 independent experiments. Statistical significance (\*\*p < 0.0001) is relative to NT shRNA (B).

FIGURE 7

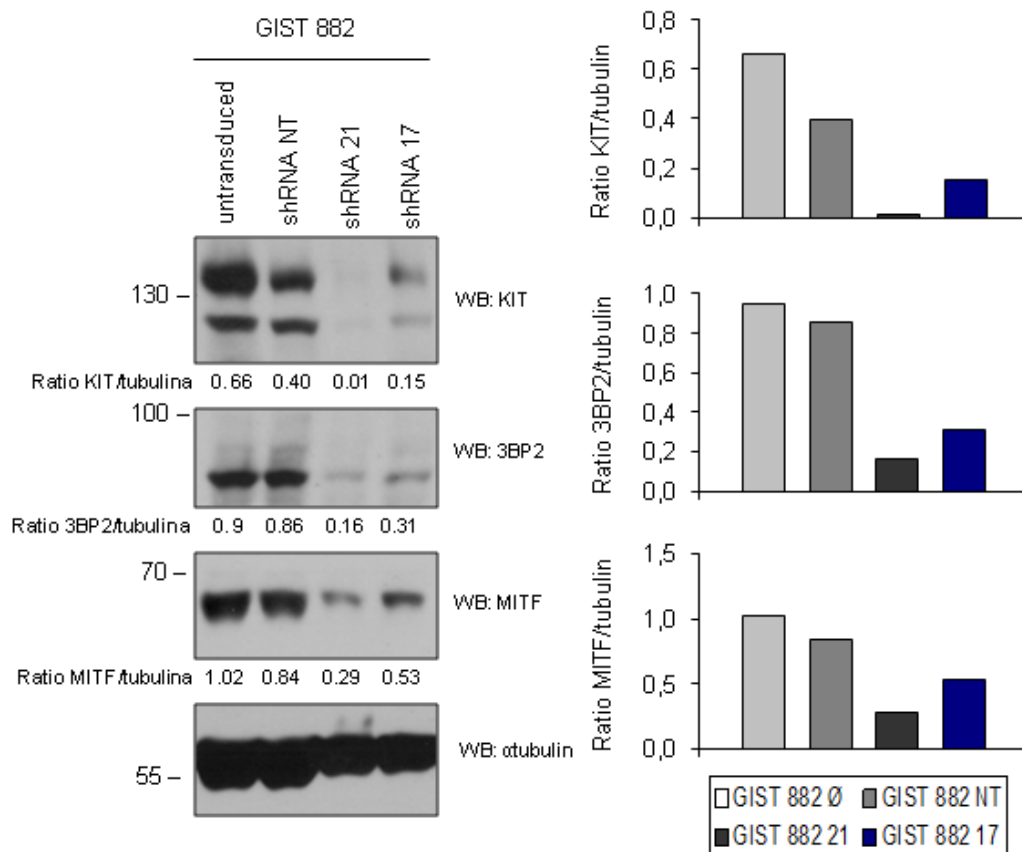


## **Figure 7. Migration is impaired after 3BP2 silencing in GIST48 and GIST48B cells**

NT shRNA and 3BP2 shRNA infected GIST 48 and GIST 48B cells were seeded in 6 well/plate and a wound healing assays were carried out as described in material and methods section. 3BP2 infected cells show a significant reduction in migration after 24 hours. Data represent the mean of 3 independent experiments. Statistical significance (\* $p < 0.005$ ) is relative to NT shRNA.



FIGURE 8



**Figure 8. MITF is reduced after 3BP2 silencing in GIST 882 cells**

Specific antibodies recognizing KIT, 3BP2 and MITF were used to immunoprobe for these proteins in GIST 882 lysates of untransduced, NT shRNA and 3BP2 shRNA- transduced cells. Anti-Tubulin western blot was done to check loading levels per lane.

The band intensity quantitation was performed by densitometry. Densitometric analysis and protein/tubulin ratio for each molecule is represented in the bar charts at right side.

# V. DISCUSSIÓ



Els mastòcits són les principals cèl·lules efectores en les reaccions inflamatòries relacionades amb hipersensibilitat i al·lèrgia. Però més enllà del seu paper en patologies inflamatòries, els mastòcits tenen un paper fisiològic rellevant en la immunitat innata i adaptativa, en el reclutament de limfòcits, la quimiotaxi, la protecció front infeccions parasitàries, entre d'altres. La resposta del mastòcit dependrà del balanç entre els receptors activadors i inhibidors de la superfície cel·lular, així com dels esdeveniments moleculars intracel·lulars positius i negatius que involucren cinases i fosfatases, i d'altres mediadors de proteïnes i lípids amb funcions adaptadores. 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 que resultarà en l'alliberació de mediadors preformats i la síntesis de novo de citocines i eicosanoids.

En el primer estudi realitzat en aquesta tesi mostrem per primera vegada l'expressió de la molècula adaptadora 3BP2 en mastòcits humans i la seva funció en la senyalització a través del receptor FcεRI. Anteriorment s'havia reportat que la sobreexpressió del domini SH2 del 3BP2 en la línia cel·lular de mastòcit de rata RBL-2H3 inhibia la desgranulació mediada pel receptor FcεRI (Sada, Miah et al. 2002).

La proteïna 3BP2 es fosforila després de l'estimulació del receptor FcεRI. A més 3BP2 coprecipita amb la src cinasa Lyn, això significa que aquest adaptador està implicat en l'organització dels esdeveniments primerencs de la senyalització del mastòcit a través d'aquest receptor. Lyn es troba constitutivament associat a la subunitat beta del receptor FcεRI, i és activat, amb l'agregació del receptor amb l'antigen (Siraganian 2003). Després de l'estimulació, 3BP2 és reclutat cap a la membrana plasmàtica, presumiblement pel seu domini PH. Un cop 3BP2 està

pròxim a la membrana podria interactuar a través del seu domini ric en prolines amb el domini SH3 de Lyn, afavorint la fosforilació de 3BP2 per aquesta cinasa. Aquesta hipòtesi ve corroborada pels experiments duts a terme amb cèl·lules COS-7 que mostren que 3BP2 interacciona i és substrat de Lyn. A més, la fosforilació de la tirosina Y446 del 3BP2 per unir-se al domini SH2 de Lyn i incrementar així l'autofosforilació de Lyn (Maeno, Sada et al. 2003). Els nostres resultats mostren que 3BP2 pot unir a Syk després de l'activació a través de FcεRI en mastòcits humans. 3BP2 i Syk fosforilat es troben translocats a la membrana a on colocalitzen després de l'agregació del receptor. D'acord amb això, 3BP2, via el domini SH2, s'ha vist que interacciona amb Syk fosforilat després de la unió de l'antigen al receptor en cèl·lules B (Foucault, Le Bras et al. 2005). Syk també s'uneix a les tirosines fosforilades dels motius ITAMs de la cadena gamma del FcεRI a través del domini SH2 (Siraganian 2003) i és essencial en la resposta mediada pel FcεRI (Costello, Turner et al. 1996).

3BP2 és desfosforilada ràpidament a partir dels dos minuts següents a l'activació. Aquesta desfosforilació podria ser mediada per la fosfatasa SHP-1 que s'ha descrit que s'uneix amb la Tyr 566 al domini SH2 de 3BP2, en cèl·lules T (Yu, Maoui et al. 2006).

Com ja hem referit, les primeres etapes de la senyalització mediada pel FcεRI, després de l'activació de Lyn, condueixen al reclutament de molècules com la proteïna adaptadora LAT, i enzims com PLCgamma que regula l'alliberament de calci intracel·lular i activa la PKC (Siraganian 2003; Gilfillan and Tkaczyk 2006). Les nostres dades mostren que 3BP2 pot unir PLCgamma quan l'adaptador està fosforilat. De fet, en cèl·lula B s'ha descrit que Syk pot induir la fosforilació de la tirosina Y183 en 3BP2 (Shukla, Hatani et al. 2009) unint-se a PLCgamma1 i estabilitzant la interacció de l'enzim amb LAT contribuint a una òptima fosforilació d'aquestes molècules (Shukla, Hatani et al. 2009).

El paper de 3BP2 probablement constitueix una amplificació del mecanisme promogut per l'eix d'activació integrat pels senyals de la via Lyn-Syk-LAT-PLCgamma a través de l'estabilització d'aquest complex. Les evidències

experimentals són que la reducció de l'expressió de 3BP2 no bloqueja completament la senyalització corrent avall però sí que representa una reducció de la fosforilació de la tirosina Y352 de Syk en els 5 minuts després de l'activació, observant-se també una reducció de la fosforilació de la tirosina Y191 de LAT i de la tirosina Y738 de PLCgamma1.

S'han desenvolupat inhibidors farmacològics de la activitat catalítica de Syk amb potencial terapèutic, no obstant això, la inhibició de la seva activitat catalítica podria comportar conseqüències indesitjades al trobar-se distribuït en diferents tipus cel·lulars. Però inhibint les interaccions de Syk amb les molècules associades en la senyalització corrent avall, tot i mantenir la seva activitat cinasa, es reduiria la resposta cel·lular i podria ser útil com estratègia terapèutica (Riccaboni, Bianchi et al. 2010)

Per aquesta raó, 3BP2 que uneix Syk, pot constituir un interessant candidat per intervenir el senyals mediat per Syk. A més de participar en els esdeveniments de senyalització primerenca.

Com s'ha mostrat, al disminuir la fosforilació de PLC $\gamma$  observem una disminució del flux de calci, fet que porta a una disminució de la desgranulació en el mastòcit. Concretament en l'asma però extensible a diverses patologies on el mastòcit està implicat, l'alliberació dels precursors preformats contribueixen als símptomes observats en aquestes patologies (Bradding 2003), reduint l'expressió de 3BP2 afavoriria una disminució de la desgranulació contribuiria a una menor severitat de les patologies millorant les condicions dels malalts.

3BP2 afecta també altres molècules a la part més distal de la senyalització. Això explica la reducció de producció de citocines que observem al silenciar la expressió de 3BP2. Els nostres resultats mostren que les MAPKs ERK1/2 i p38 estan menys activades. Per una òptima activació de les MAPKs és necessària la participació de LAT, fet evidenciat en el mastòcits de ratolí deficientes en LAT (Saitoh, Arudchandran et al. 2000; Saitoh, Odom et al. 2003). Així, una deficient fosforilació de LAT en les cèl·lules on el 3BP2 es troba silenciada podria explicar els efectes en les respostes a llarg termini del Fc $\epsilon$ RI, incloent MAPKs i l'activitat de

factors de transcripció. Això està d'acord amb dades publicades en cèl·lules B on 3BP2 contribueix a l'activació de factors de transcripció com NFAT mediades pel BCR formant un complex amb l'enzim PLCgamma2 i Vav1 (Shukla, Hatani et al. 2009).

Pel que fa a la síntesi de citocines, 3BP2, regula la producció de GM-CSF, després de l'activació del FcεRI. La transcripció de GM-CSF és dependent del factor de transcripció NFAT (Johnson, Bert et al. 2004).

En els dos models murins genoannulats de 3BP2 apareixen contradiccions sobre 3BP2 en la viabilitat cel·lular i l'activació de Syk, PLCgamma2 i les MAPKs en cèl·lula B. No obstant queda clar que la proliferació de cèl·lules B i la senyal del BCR estan danyades, mentre que s'observa un desenvolupament i proliferació normal de cèl·lules T, una normal secreció de citocines i una correcte senyalització a través del TCR (de la Fuente, Kumar et al. 2006; Chen, Dimitriou et al. 2007). Aquests resultats suggereixen que 3BP2 és crític pel BCR, i resposta humoral però no per la senyalització a través del TCR. De fet, s'ha suggerit la presència en cèl·lules T murines d'una molècula amb funció similar al 3BP2 per explicar la manca de fenotip patològic d'aquestes cèl·lules quan el 3BP2 és deficient. La presència d'un homòleg al 3BP2 seria coherent amb els estudis de la seqüència nativa del 3BP2 realitzats a tres famílies de les 15 estudiades amb Querubisme, malaltia que és deguda a la mutació de 3BP2, que li confereix un guany de funció (Ueki, Tiziani et al. 2001).

El Querubisme implica una inflamació crònica no infecciosa de l'os, que es produeix en absència d'una resposta immune adaptativa. El Querubisme en ratolins mostra un augment de la resposta immune innata amb l'activació de M-CSF (factor estimador de colònies de macròfags) i RANK (receptor activador de NFκB a través del seu lligand (RANKL) produint l'activació dels osteoclast. També es dona una elevada alliberació de TNFα per part dels macròfags característica de la malaltia. Tot i que els macròfags jugarien un paper rellevant en la patologia no podem excloure la participació dels mastòcits en el procés inflamatori subjacent a la malaltia.

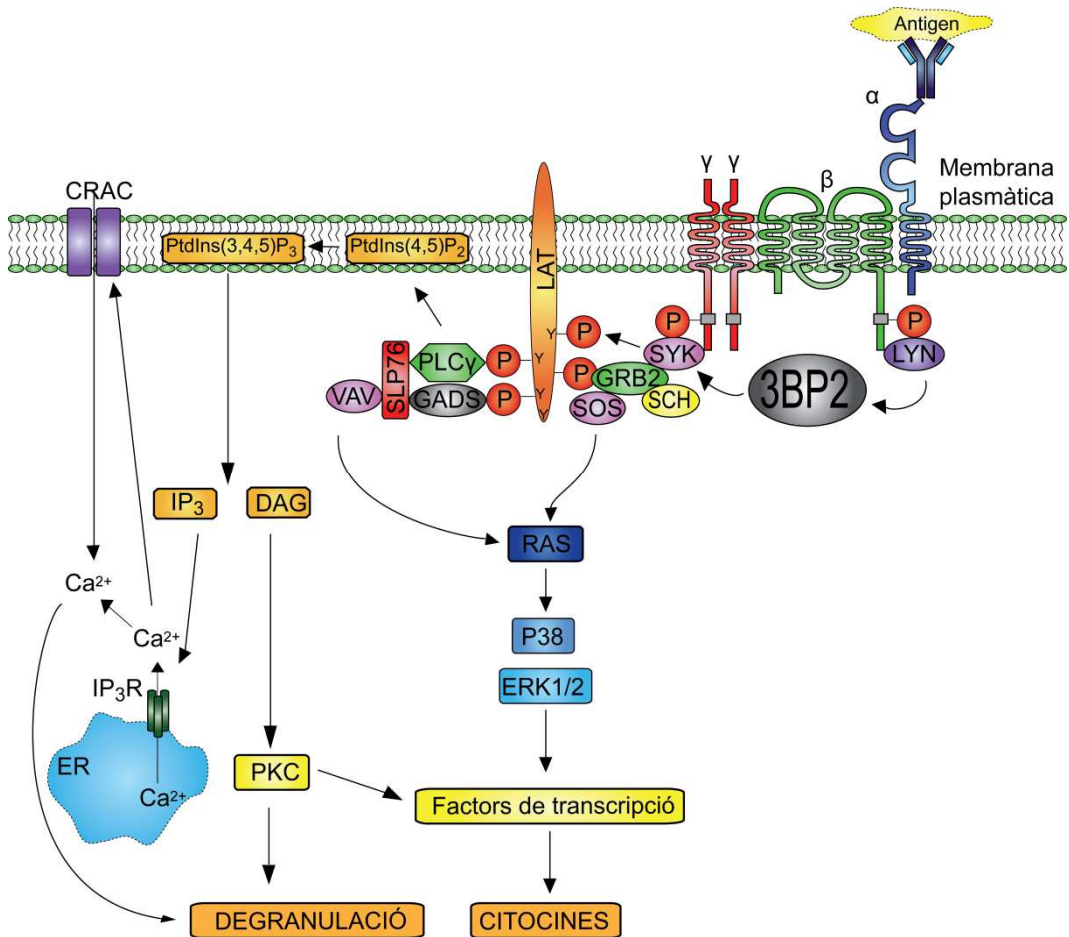
Recentment, s'ha demostrat que mutacions en 3BP2 responsables del Querubisme, impedeixen la interacció entre 3BP2 i les Tankyrases, ( poli (ADP - ribosa) polimerasa). Donat que les Tankyrases intervienen en la degradació de 3BP2 en condicions fisiològiques normals aquestes mutacions resulten en elevats nivell de 3BP2. Això causa una major estabilitat de la proteïna, donant lloc a un hiperactiu Src, Syk, i Vav en els osteoclasts (Ueki, Tiziani et al. 2001). Contràriament, s'havia publicat que la sobreexpressió de mutants de 3BP2 en el Querubisme suprimien l'activació de Vav i MAPKs, atenuant l'activació mediada per FcεRI en cèl·lules RBL-2H3 (Miah, Hatani et al. 2004). Aquestes dades obtingudes de mutants de la proteïna transfectades en cèl·lules de rata posant de manifest la importància d'interpretar les dades en el context fisiològic més apropiat.

En conclusió, en aquest primer estudi presentem evidències de l'expressió i el paper rellevant que té el 3BP2 en l'activació dels mastòcits humans. Aquesta funció esta relacionada amb el seu paper com a molècula adaptadora, tan per la transducció de les respostes dels senyals primerencs com la desgranulació, com pels senyals tardans com la producció i alliberació de citocines.

Augmentant el nostre coneixement sobre les funcions del 3BP2, serà crucial per entendre el seu paper en la senyalització mediada pel FcεRI, que pot obrir noves vies de recerca, per buscar nous tractament de malalties on trobem implicació dels mastòcits.



## Model se localització i senyalització de la proteïna adaptadora 3BP2 en la senyalització mediada pel receptor FcεRI



**Fig 1. Model d'ubicació i senyalització de la proteïna adaptadora en la senyalització mediada pel FcεRI.** Adaptat de Gilfillan i Tkaczyk, 2006. 3BP2 es fosforila en els primers moments després de l'estimulació del receptor FcεRI, a conseqüència de l'activació del 3BP2 es localitza a la part més proximal de la membrana ajudant a amplificar el senyal corrent avall.

En el segon estudi d'aquesta tesi mostrem per primera vegada que 3BP2 és un adaptador important per la supervivència dels mastòcits, actuant com un mediador de la senyalització i expressió del receptor KIT.

Després de la interacció amb el seu lligand (SCF) KIT inicia una cascada de senyalització que és important pel creixement, desenvolupament i supervivència del mastòcit (Okayama and Kawakami 2006). Els nostres resultats mostren que 3BP2 coprecipita amb KIT després de la seva estimulació amb SCF. La seva interacció pot ser deguda a la unió directe del domini SH2 de 3BP2 amb tirosines fosforilades de KIT. Dins del gran nombre de tirosines fosforilades que consta KIT, hi ha tres tirosines que podrien ser les candidates a unir-se al domini SH2 del 3BP2, que són Y553, Y730, Y823, ja que segueixen el motiu consensus d'unió s 3BP2 Y-E/M/V-N/V/I-X. Una altre possibilitat és que la unió sigui indirecte a través d'altres molècules. L'anàlisi mutacional no va abolir la interacció entre ambdues molècules, indicant lque la interacció no era directe. Aspecte que va confirmar la tècnica del triple híbrid, per tant altres molècules com PLCgamma, Grab2, Src kinases o PI3K que s'uneixen tant a KIT com 3BP2, podrien intervenir en aquesta interacció (Deckert, Tartare-Deckert et al. 1998; Jevremovic, Billadeau et al. 2001; Saborit-Villarroya, Martinez-Barriocanal et al. 2008).

El silenciament de 3BP2 comporta una disminució de la fosforilació de mediadors de la cascada del receptor KIT además d'una disminució de l'expressió d'aquest.

Existeixen varies possibilitat de com 3BP2 pot estar regulant l'expressió de KIT, una d'elles seria estabilitzant l'expressió de KIT, competint amb altres molècules com c-Cbl. C-Cbl que s'uneix a KIT per les tirosines Y568, Y570 i Y936, regula la expressió de KIT a través de la degradació al proteosoma (Masson, Heiss et al. 2006). Encara que descartem una competència directe que pogués desplaçar la interacció entre c-Cbl i KIT, la desestabilització d'aquesta interacció, per motius estèrics, podria ser un possible mecanisme. Per tant en absència de 3BP2, la interacció entre KIT i c-Cbl es podria veure incrementada, promovent la seva degradació. Això podria explicar, la marcada reducció de l'expressió de KIT observada en mastòcits silenciats per 3BP2. Per explorar aquesta hipòtesi es

varen tractar amb diferents inhibidors del proteosoma (ALLN i MG132) cèl·lules silenciades pel 3BP2 versus cèl·lules control, observant contràriament al que hipotetitzàvem, una reducció de l'expressió de KIT en ambdós casos i molt més pronunciada en les cèl·lules silenciades. Aquests resultats concorden amb els observats en les línies cel·lulars de tumors gastrointestinals (GIST), on el tractament amb Bortezomib, un inhibidor de la maquinaria del proteosoma, inhibeix l'expressió de KIT mutat afavorint l'apoptosi cel·lular (Bauer, Parry et al. 2010). Això és consistent, amb els nostres resultats obtinguts de mastòcits tractats amb Bortezomib, que mostren una reducció de l'expressió de 3BP2, donant èmfasis a l'estreta regulació de 3BP2 i la molècula KIT.

L'altre possibilitat de com 3BP2 regula l'expressió de KIT seria a nivell transcripcional. Els nostres resultats mostren una disminució del mRNA de KIT després del silenciament de 3BP2. Quan analitzem per qPCR diferents factors de transcripció relacionats amb l'expressió de KIT, com GATA-2, GATA-3, SCL i MITF, observem que els nivells d'aquests factors incrementen en les cèl·lules silenciades per 3BP2. Aquesta dada es podria explicar per un efecte compensatori cel·lular per intentar cobrir la falta d'expressió de KIT, però no explicaria la disminució dels nivells de mRNA ni de proteïna de KIT. En el cas de MITF, trobem que el silenciament de 3BP2, condueix a una reducció de MITF a nivell de proteïna. Els ratolins deficients en MITF mostren una absència de mastòcits (Shahlaee, Brandal et al. 2007). El fenotip que observen en els mastòcits tan in vivo com in vitro, és molt similar al observat en ratolins deficients en KIT o SCF. En aquest context, els nostres resultats suggereixen que 3BP2 és un important regulador post-traducciona l de l'eix KIT-MITF. Curiosament, resultats recents mostren també una regulació inversa, en la qual la senyalització de KIT regula l'expressió de MITF a través de microRNAs (miR-539 i miR-381) (Lee, Brandal et al. 2011). La funció, dels quals, és impedir la traducció a proteïna de MITF mitjançant la unió dels miRNAs en la regió 3'-UTR de MITF en mastòcits (Lee, Brandal et al. 2011).

Les nostres dades de silenciament i ús d'un dominant negatiu pel 3BP2 (domini SH2) també mostren aquesta regulació bidireccional entre KIT i 3BP2. Així, el silenciament d'una molècula afectaria l'expressió de l'altre. En el cas del dominant negatiu l'afectació de la via de senyalització de KIT ens alteraria els nivells endògens de 3BP2. Seria interessant mesurar si les diferències en els nivells de microRNAs poden explicar aquesta regulació recíproca.

El silenciament de 3BP2 en mastòcits humans derivats de progenitors CD34+ i de la línia cel·lular humana LAD2, produeix una disminució del senyal de PI3K i ERK1/2 i una inducció de l'apoptosi, mesurada per annexina.

L'augment de l'apoptosi en les cèl·lules silenciades en 3BP2 està correlacionat amb un increment de l'activitat de les caspases 3/7. Aquests resultats sostenen fortament el paper important que té el 3BP2 en la regulació de KIT i funcions d'aquest receptor en la proliferació, diferenciació i supervivència dels mastòcits.

La desregulació de les funcions de KIT (a través de mutacions que confereixen un guany de funció) dóna lloc a certes patologies com mastocitosis sistèmiques i leucèmies. En humans, la mutació de KIT D816V es troba molt present en aquestes patologies, i està associada a una desregulació del creixement cel·lular i acumulació de mastòcits en teixits (Furitsu, Tsujimura et al. 1993; Metcalfe 2008). Els nostres resultats en els quals el 3BP2 pot regular l'expressió de KIT oncogènica en HMC-1 són de particular interès ja que les substitucions en la posició D816 afecten a la conformació de la cinasa fent-la resistent a l'imatinib. (Frost, Ferreo et al. 2002). Els nostres resultats mostren un increment de l'apoptosi en el silenciament de 3BP2 en mastòcits humans on KIT és oncogènica i aquest està correlacionat amb l'augment de l'activitat de les caspases 3/7. Després del silenciament de 3BP2 observem una reducció de l'expressió de MITF. Per tant, la nostra hipòtesis és que la disminució de l'expressió de MITF al silenciar 3BP2 condueix a la posterior reducció de l'expressió de KIT. Aquest és la primera vegada que es vincula l'expressió de MITF amb 3BP2.

MITF és essencial pel desenvolupament i funció dels osteoclasts (Hershey and Fisher 2004) i 3BP2 coordina l'homeostasi d'ossos regulant les funcions cel·lulars

dels osteoclast i osteoblast (Levaot, Simoncic et al. 2011). El Querubisme (Ueki, Tiziani et al. 2001), com ja hem dit, és una malaltia autosòmica dominant caracteritzada per una excessiva degradació dels ossos de la mandíbula superior i inferior, seguida de l'aparició de bosses cístiques plenes d'una massa tissular fibrosa. En el context, del metabolisme ossi, 3BP2 regula les respostes dels monòcits del moll de l'os activant la diferenciació dels macròfags i osteoclast a través dels senyals de M-CSF i RANKL i la cascada de senyalització promoguda per aquests receptors, ERK i Syk respectivament (Ueki, Lin et al. 2007). D'acord amb això en la línia cel·lular RAW264.7 han observat que 3BP2 és un regulador clau per la diferenciació del osteoclast mediat per RANK, a través de l'activació de Src i NFATc1 (GuezGuez, Prod'homme et al. 2010). Curiosament, MITF que es troba en la part més distal de les vies de senyalització de RANK i M-CSF, és crític en la proliferació, diferenciació i funció dels osteoclast (Weilbaecher, Motyckova et al. 2001; Mansky, Sankar et al. 2002). En conjunt aquestes dades suggereixen un vincle no descrit entre MITF i 3BP2 en els osteoclast, que mereixeria el seu estudi.

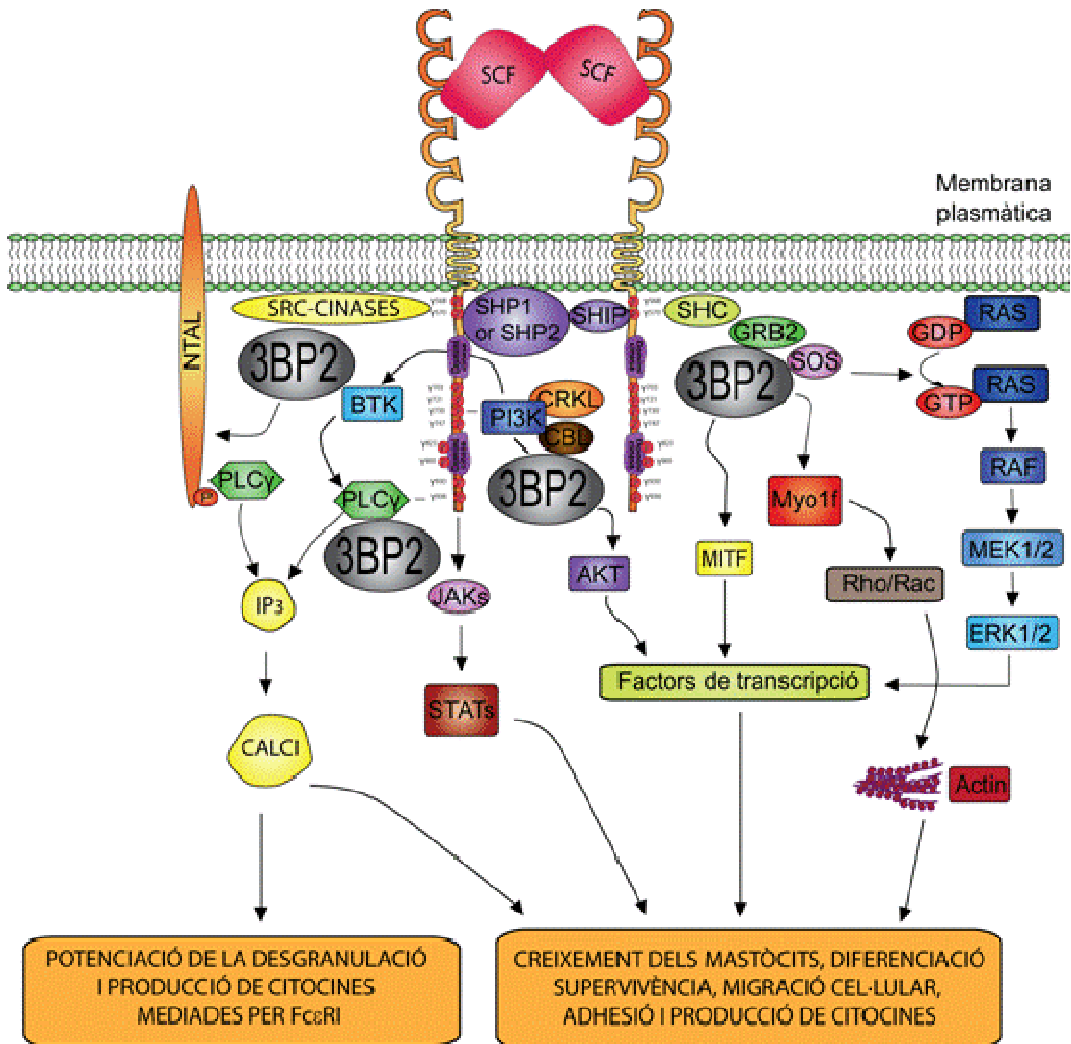
Com ja hem comentat, KIT, és un receptor que està involucrat amb diferenciació, supervivència i també, en adhesió, migració i reorganització del citoesquelet d'actina (Ronnstrand 2004; Okayama and Kawakami 2006). També se sap que 3BP2 és una proteïna important per la migració cel·lular en neutròfils (Chen, Dimitriou et al. 2012). En estudis que hem portat a terme, per buscar nous lligands de 3BP2, hem caracteritzat una nova interacció entre 3BP2 i Myo1f (Annex). Se sap que Myo1f és important per la motilitat dels neutròfils, de fet la seva absència afecta l'expressió de la integrina  $\beta 2$ , comportant l'adhesió del neutrofil a l'endoteli independent d'estímul. El ratolí genoanul·lat de Myo1f és sensible a la infecció de *Listeria monocitogenes* per manca de motilitat dels neutròfils al lloc d'infecció (Kim, Mehal et al. 2006). Hem observat que Myo1f s'expressa en mastòcits, per tant seria interessant especular que la migració dels mastòcits podria venir regulada per l'activació de KIT, on intervindria 3BP2 reclutant Myo1f.

En la literatura s'han reportat altres casos de proteïnes adaptadores que regulen l'expressió i funció de certs receptors de membrana i el seu silenciament inhibeix

la seva expressió en la superfície de la cèl·lula, com és el cas de la proteïna adaptadora transmembrana TRIM (TCR-interacting molecule) de 30 kDa, s'expressa en cèl·lules T i NK que s'uneix i co-localitza amb el coreceptor CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) en els compartiments intracel·lular TGN (trans Golgi network). El silenciament de l'expressió de TRIM a través de shRNAs inhibeixen l'expressió de CTLA-4 en la superfície, mentre que l'expressió de TCR no es veu afectada. A més, el silenciament de TRIM redueix notablement la presència de vesícules proximals que porten CTLA-4 a TGN. Aquesta pèrdua de formació vesicular de CTLA-4 s'observa en cèl·lules T primàries i be acompanyat d'un increment de producció de IL-2 mediada pel TCR (Valk, Leung et al. 2006).

En conclusió, en aquest segon estudi presentem noves evidències que demostren que 3BP2 és una molècula important en la regulació dels mastòcits a través de KIT. Incrementar el coneixement de 3BP2 en la regulació de l'expressió i senyalització de KIT pot obrir noves perspectives d'investigació per la recerca de nous tractament en malalties derivades de mutacions de KIT.

**Model de localització i senyalització de la proteïna adaptadora 3BP2 en la senyalització mediada pel receptor KIT**



DISCUSSIÓ

**Fig 2. Model de ubicació i senyalització de la proteïna adaptadora en la senyalització mediada pel KIT. Adaptat de Gilfillan i Tkaczyk, 2006.** 3BP2 es fosforila en els primers moments després de l'estimulació del receptor KIT, a conseqüència de l'activació del 3BP2 es localitza a la part més proximal de la membrana ajudant a amplificar el senyal corrent avall.

En el tercer estudi d'aquesta tesi mostrem per primera vegada que 3BP2 s'expressa en cèl·lules de l'estromal gastrointestinal de pacients amb tumors deguts a l'activitat oncogènica de KIT (GIST). Aproximadament un 10% d'aquest tumors són deguts a l'activitat de PDGFRalfa, un receptor quinasa de la mateixa família de KIT. Els nostres resultats mostren que 3BP2 regula l'expressió d'ambdós receptors així com la supervivència cel·lular.

El tractament d'elecció pel GIST és actualment l'imatinib mesilat, un inhibidor de l'activitat cinasa del receptor KIT. Un cert nombre de pacients tractat amb aquest inhibidor, a la llarga desenvolupen resistències (Demetri, von Mehren et al. 2002) per tant noves opcions terapèutiques són necessàries per la cura d'aquesta patologia.

Basant-nos en els nostres resultats previs que l'adaptador 3BP2 era capaç de regular la expressió de KIT en mastòcits (Ainsua-enrich E, submitted manuscript), en el tercer estudi explorem la habilitat d'aquesta proteïna per a regular la expressió del receptor KIT ontogènic en cèl·lules tumorals gastrointestinals.

Primer vàrem avaluar l'expressió de 3BP2 en línies cel·lulars sensibles i resistents al Imatinib (GIST 882 i GIST 48 respectivament), derivades de pacients amb GIST trobant que 3BP2 està ben expressat en ambdues línies.

Els nostres resultats mostren que el silenciament de 3BP2 té un efecte proapoptòtic en ambdues línies cel·lular. Totes les seqüències de shRNA comprovades per silenciar el 3BP2 tenen efectes similars en relació al grau de silenciament. L'apoptosis de GIST, observada en el càlcul de viabilitat i també en l'increment de l'activitat de les caspases 3/7, induïda pel silenciament de 3BP2 era concomitant a la reducció dels nivells proteics de KIT oncogènic.

Els resultats obtinguts aquest estudi recolza l'hipòtesi que el silenciament de 3BP2 pot induir apoptosi. El descobriment de que el silenciament de 3BP2 en cèl·lules GIST resulta en una reducció significativa de KIT aporta un important suport a aquesta teoria.



Se sap que la pèrdua a nivell proteic de KIT té un fort efecte apoptòtic en cèl·lules GIST, com ja s'ha vist després del silenciament de KIT amb shRNA o després del tractament amb inhibidors de hsp90 i bortezomib (Verweij, Casali et al. 2004; Blanke, Demetri et al. 2008; Bauer, Parry et al. 2010). Per tant, és probable que la reducció de KIT contribueixi substancialment al efecte del silenciament de 3BP2 en cèl·lules GIST.

En el silenciament de 3BP2 trobem una disminució de la fosforilació d'AKT, marcador que determina l'estat d'activació de la PI3K i una disminució de la supervivència cel·lular. El nostre grup havia observat prèviament que la sobreexpressió de 3BP2 augmenta la fosforilació d'AKT, possiblement mitjançant la unió a la subunitat p85 de PI3K (Saborit-Villarroya, Martinez-Barriocanal et al. 2008).

Tenint en compte que l'expressió de 3BP2 incrementa l'estat de fosforilació d'AKT, això explicaria que la disminució d'aquesta afecti, doncs, també a la supervivència cel·lular.

Les nostres dades mostren que nivells disminuïts de 3BP2 condueixen a una reducció de l'expressió de MITF i consegüentment a una disminució de l'expressió de KIT. La nostra hipòtesis és que 3BP2 és un mediador important per a la supervivència cel·lular i un regulador de l'expressió de KIT a nivell proteic i de mRNA mitjançant el control de l'expressió de MITF. S'ha vist que el Bortezomib causa una disminució de la transcripció de KIT però els mecanismes, mitjançant els quals regula la transcripció de KIT oncogènica no estan del tot establerts (Bauer, Parry et al. 2010). Recentment s'ha reportat que l'expressió de MITF també es véu reduïda després del tractament amb Bortezomib en mastòcits (Lee, Brandal et al. 2011). De fet hi ha una regulació inversa entre MITF i KIT mitjançant l'expressió selectiva de miRNAs. S'ha vist que la senyalització de KIT bloqueja l'expressió de miR-539 i miR-381. Curiosament, el Bortezomib també induïx una reducció de l'expressió de 3BP2 en mastòcits (Ainsua-enrich E, submitted manuscript). Així, doncs, és probable que els efectes observats del Bortezomib sobre KIT es deguin almenys en part a la baixada dels nivells d'expressió de

3BP2. És interessant també especular que 3BP2 pugui també regular els nivells de miRNAs que afecten a l'expressió de MITF. Actualment estem mirant si 3BP2 està involucrat en la regulació dels nivells d'expressió d'aquests miRNAs en GIST, fet que explicaria la disminució de la proteïna KIT en aquestes cèl·lules.

A més, el silenciament de 3BP2 condueix a una disminució de l'expressió de PDGFR $\alpha$  suggerint que 3BP2 també pot actuar a través d'aquest altre receptor. També observem que, 3BP2 pot coprecipitar amb KIT i amb PDGFR $\alpha$  suggerint que l'adaptador és un mediador comú en les vies de senyalització d'ambdós receptors. Amb l'anterior estudi hem mostrat que la interacció amb el receptor KIT és indirecte, PDGFR $\alpha$  al ser un receptor molt similar tan amb l'estructura com en les vies de senyalització a KIT, podríem suposar que la seva interacció amb 3BP2 també seria indirecte, però és un aspecte que s'ha de profundir.

A causa que, la majoria del GIST resistents a Imatinib desenvolupen mutacions secundàries en els dominis cinasa de KIT i PDGFR $\alpha$ , noves aproximacions terapèutiques, que no actuïn directament sobre aquests dominis cinasa, són particularment importants. Els exemples dels inhibidors de hsp90 o el Bortezomib que comporten a una pèrdua de l'expressió de KIT oncogènic en GIST, recolzen aquesta idea (Bauer, Yu et al. 2006; Bauer, Parry et al. 2010).

Respecte això, els nostres resultats de que el silenciament de 3BP2 és efectiu en cèl·lules GIST resistents a l'Imatinib, semblen especialment prometedors.

Els experiments de migració mostren una reducció significativa de migració comparant cèl·lules silenciades pel 3BP2 i cèl·lules control en pacients resistents a l'Imatinib. Així, el silenciament de 3BP2 no només afecta a la supervivència cel·lular sinó també a l'habilitat cel·lular a migrar. Interessantment, les cèl·lules GIST 48B que manquen de l'expressió de KIT, migren de manera similar a les cèl·lules GIST 48. Respecte a això, la nostra hipòtesis és que, les cèl·lules GIST48B al tenir augmentada l'expressió de PDGFR $\alpha$  compensen la falta de KIT permetent la migració cel·lular (Jimenez, Portela et al. 2000; Kim 2014).

De manera important, el silenciament de 3BP2 pot inhibir aquest mecanisme presentant una reducció en la migració cel·lular. De fet, hem demostrat que el silenciament de 3BP2 també condueix a una disminució de l'expressió de PDGFR $\alpha$ .

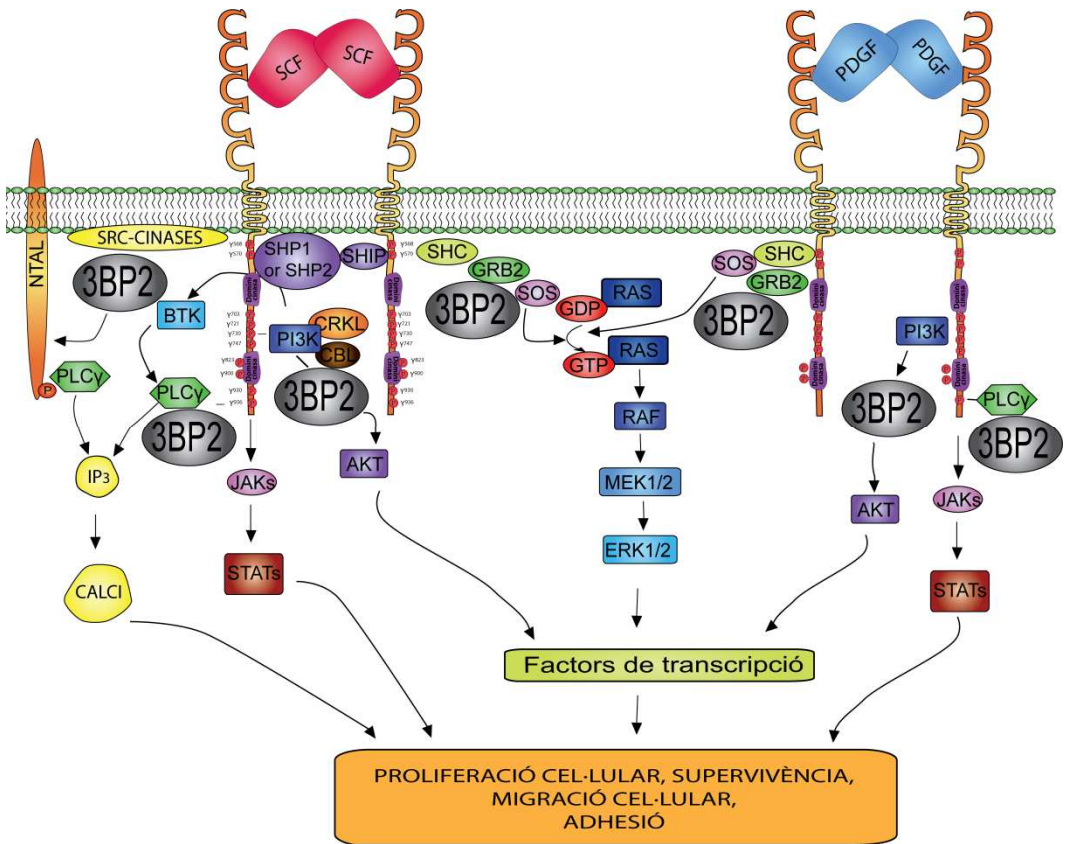
En conjunt, tots aquests resultats mostren la funció crítica de 3BP2 promovent la migració cel·lular a través dels receptors KIT i PDGFR $\alpha$ .

Respecte a la migració, s'hauria de veure si Myo1f s'expressa en aquest tipus cel·lular comportant-se de forma similar a la hipòtesis feta en els mastòcits, en la qual senyals a través del receptor KIT, farien que 3BP2 reclutes Myo1f per portar a la migració de les cèl·lules.

En resum, demostrem que el silenciament de 3BP2 induïx l'apoptosis i impedeix la migració en cèl·lules GIST sensibles i residents a l'Imatinib. Així, identifiquem 3BP2 com un mediador de la senyalització i expressió dels dos receptors, KIT i PDGFR $\alpha$ , en cèl·lules GIST.

Els nostres resultats a més aporten informació d'una possible nova diana terapèutica pel tractament dels GIST en els casos que han adquirit resistència als tractaments establerts.

**Model de localització i senyalització de la proteïna adaptadora 3BP2 en la senyalització mediada pel receptor KIT i pel receptor PDGFR alpha**



**Fig 2. Model de ubicació i senyalització de la proteïna adaptadora en la senyalització mediada pel KIT i PDGFRα. Adaptat de Gilfillan i Tkaczyk, 2006.** 3BP2 es fosforila en els primers moments després de l'estimulació del receptor KIT i PDGFRα i es localitza a la part més proximal de la membrana ajudant a amplificar el senyal corrent avall.

DISCUSSIÓ



## VI. CONCLUSIONS



La proteïna 3BP2 s'expressa en mastòcits i té una funció essencial en la seva fisiologia a través del receptor d'alta afinitat per la IgE (FcεRI). Aquesta funció està relacionada amb el seu paper com a molècula adaptadora, tant per la transducció dels senyals primerencs com la desgranulació, i dels senyals tardans com la producció i alliberació de citocines.

El 3BP2 és una molècula important en la regulació dels mastòcits a través del receptor KIT regulant l'expressió d'aquest receptor a través del control dels nivells del factor de transcripció MITF. Aquest fet és extensible al KIT mutat en diverses patologies com les mastocitosis, model HMC1, i els tumors de les cèl·lules de l'estroma gastrointestinal, cèl·lules de pacients amb GIST.

La supervivència mastocitària ve controlada pel nivells d'expressió de 3BP2. La senyalització mediada per 3BP2 regula els nivells de fosforilació d'AKT, marcador de la activitat de la PI3K que condiciona la viabilitat cel·lular.

La supervivència i migració de cèl·lules de pacients amb GIST on el receptor KIT i PDGFRα és oncogènica ve determinada de forma significativa per la presència de la molècula 3BP2.

La unió de 3BP2 a Myo1f pot ser clau en determinar l'habilitat de la molècula adaptadora en promoure la migració en diferents tipus cel·lulars entre ells els mastòcits.





## VII. BIBLIOGRAFIA



- Abe, T., M. Swieter, et al. (1990). "Mast cell heterogeneity: two-dimensional gel electrophoretic analyses of rat peritoneal and intestinal mucosal mast cells." Eur J Immunol **20**(9): 1941-1947.
- Abraham, S. N. and R. Malaviya (1997). "Mast cells in infection and immunity." Infect Immun **65**(9): 3501-3508.
- Abraham, S. N. and A. L. St John (2010). "Mast cell-orchestrated immunity to pathogens." Nat Rev Immunol **10**(6): 440-452.
- Abramson, J., G. Rozenblum, et al. (2003). "Dok protein family members are involved in signaling mediated by the type 1 Fcepsilon receptor." Eur J Immunol **33**(1): 85-91.
- Agis, H., W. Fureder, et al. (1996). "Comparative immunophenotypic analysis of human mast cells, blood basophils and monocytes." Immunology **87**(4): 535-543.
- Ainsua-Enrich, E., D. Alvarez-Errico, et al. (2012). "The adaptor 3BP2 is required for early and late events in FcepsilonRI signaling in human mast cells." J Immunol **189**(6): 2727-2734.
- Al-Muhsen, S. Z., G. Shablovsky, et al. (2004). "The expression of stem cell factor and c-kit receptor in human asthmatic airways." Clin Exp Allergy **34**(6): 911-916.
- Ali, K., A. Bilancio, et al. (2004). "Essential role for the p110delta phosphoinositide 3-kinase in the allergic response." Nature **431**(7011): 1007-1011.
- Ali, K., M. Camps, et al. (2008). "Isoform-specific functions of phosphoinositide 3-kinases: p110 delta but not p110 gamma promotes optimal allergic responses in vivo." J Immunol **180**(4): 2538-2544.

- Alvarez-Errico, D., E. Lessmann, et al. (2009). "Adapters in the organization of mast cell signaling." Immunol Rev **232**(1): 195-217.
- Alvarez-Errico, D., I. Oliver-Vila, et al. (2011). "CD84 negatively regulates IgE high-affinity receptor signaling in human mast cells." J Immunol **187**(11): 5577-5586.
- Amin, K., C. Janson, et al. (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**(10): 1241-1247.
- Arias-Palomo, E., M. A. Recuero-Checa, et al. (2007). "3D structure of Syk kinase determined by single-particle electron microscopy." Biochim Biophys Acta **1774**(12): 1493-1499.
- Asai, K., J. Kitaura, et al. (2001). "Regulation of mast cell survival by IgE." Immunity **14**(6): 791-800.
- Ashman, L. K. and R. Griffith (2013). "Therapeutic targeting of c-KIT in cancer." Expert Opin Investig Drugs **22**(1): 103-115.
- Bachelet, I., A. Munitz, et al. (2005). "The inhibitory receptor IRp60 (CD300a) is expressed and functional on human mast cells." J Immunol **175**(12): 7989-7995.
- Badertscher, K., M. Bronnimann, et al. (2005). "Mast cell chymase is increased in chronic atopic dermatitis but not in psoriasis." Arch Dermatol Res **296**(10): 503-506.
- Baraniuk, J. N. (1997). "Pathogenesis of allergic rhinitis." J Allergy Clin Immunol **99**(2): S763-772.
- Bauer, S., A. Duensing, et al. (2007). "KIT oncogenic signaling mechanisms in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor: PI3-kinase/AKT is a crucial survival pathway." Oncogene **26**(54): 7560-7568.

- Bauer, S., J. A. Parry, et al. (2010). "Proapoptotic activity of bortezomib in gastrointestinal stromal tumor cells." Cancer Res **70**(1): 150-159.
- Bauer, S., L. K. Yu, et al. (2006). "Heat shock protein 90 inhibition in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor." Cancer Res **66**(18): 9153-9161.
- Baumruker, T. and E. E. Prieschl (2000). "The role of sphingosine kinase in the signaling initiated at the high-affinity receptor for IgE (FcεRI) in mast cells." Int Arch Allergy Immunol **122**(2): 85-90.
- Bayraktar, U. D., S. Bayraktar, et al. (2010). "Molecular basis and management of gastrointestinal stromal tumors." World J Gastroenterol **16**(22): 2726-2734.
- Begueret, H., P. Berger, et al. (2007). "Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma." Thorax **62**(1): 8-15.
- Bell, C. A., J. A. Tynan, et al. (2000). "Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the Neu receptor tyrosine kinase." Mol Biol Cell **11**(10): 3589-3599.
- Bement, W. M., T. Hasson, et al. (1994). "Identification and overlapping expression of multiple unconventional myosin genes in vertebrate cell types." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(24): 11767.
- Bischoff, S. and S. E. Crowe (2005). "Gastrointestinal food allergy: new insights into pathophysiology and clinical perspectives." Gastroenterology **128**(4): 1089-1113.
- 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**(2): 93-104.
- Blank, U. and J. Rivera (2004). "The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis." Trends Immunol **25**(5): 266-273.

- Blanke, C. D., G. D. Demetri, et al. (2008). "Long-term results from a randomized phase II trial of standard- versus higher-dose imatinib mesylate for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing KIT." J Clin Oncol **26**(4): 620-625.
- Blume-Jensen, P., R. Janknecht, et al. (1998). "The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136." Curr Biol **8**(13): 779-782.
- Boyle, W. J., W. S. Simonet, et al. (2003). "Osteoclast differentiation and activation." Nature **423**(6937): 337-342.
- Bradding, P. (2003). "The role of the mast cell in asthma: a reassessment." Curr Opin Allergy Clin Immunol **3**(1): 45-50.
- Bradding, P., A. F. Walls, et al. (2006). "The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma." J Allergy Clin Immunol **117**(6): 1277-1284.
- Brdicka, T., M. Imrich, et al. (2002). "Non-T cell activation linker (NTAL): a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling." J Exp Med **196**(12): 1617-1626.
- Brightling, C. E., A. J. Ammit, et al. (2005). "The CXCL10/CXCR3 axis mediates human lung mast cell migration to asthmatic airway smooth muscle." Am J Respir Crit Care Med **171**(10): 1103-1108.
- Brightling, C. E. and P. Bradding (2005). "The re-emergence of the mast cell as a pivotal cell in asthma pathogenesis." Curr Allergy Asthma Rep **5**(2): 130-135.
- Brightling, C. E., P. Bradding, et al. (2002). "Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma." N Engl J Med **346**(22): 1699-1705.
- Brizzi, M. F., P. Dentelli, et al. (1999). "STAT protein recruitment and activation in c-Kit deletion mutants." J Biol Chem **274**(24): 16965-16972.

- Brizzi, M. F., M. G. Zini, et al. (1994). "Convergence of signaling by interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and mast cell growth factor on JAK2 tyrosine kinase." J Biol Chem **269**(50): 31680-31684.
- Broudy, V. C. (1997). "Stem cell factor and hematopoiesis." Blood **90**(4): 1345-1364.
- Broudy, V. C., N. L. Kovach, et al. (1994). "Human umbilical vein endothelial cells display high-affinity c-kit receptors and produce a soluble form of the c-kit receptor." Blood **83**(8): 2145-2152.
- Broudy, V. C., N. L. Lin, et al. (1998). "Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer." Blood **91**(3): 898-906.
- Brown, J. M., T. M. Wilson, et al. (2008). "The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy." Clin Exp Allergy **38**(1): 4-18.
- Bruhns, P., S. Fremont, et al. (2005). "Regulation of allergy by Fc receptors." Curr Opin Immunol **17**(6): 662-669.
- Burke, S. M., T. B. Issekutz, et al. (2008). "Human mast cell activation with virus-associated stimuli leads to the selective chemotaxis of natural killer cells by a CXCL8-dependent mechanism." Blood **111**(12): 5467-5476.
- Burwen, S. J. (1982). "Recycling of mast cells following degranulation in vitro: an ultrastructural study." Tissue Cell **14**(1): 125-134.
- Butterfield, J. H., D. Weiler, et al. (1988). "Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia." Leuk Res **12**(4): 345-355.
- Cantoni, C., C. Bottino, et al. (1999). "Molecular and functional characterization of IRp60, a member of the immunoglobulin superfamily that functions as an inhibitory receptor in human NK cells." Eur J Immunol **29**(10): 3148-3159.



- Cantrell, D. A. (2001). "Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways." J Cell Sci **114**(Pt 8): 1439-1445.
- Corless, C. L., J. A. Fletcher, et al. (2004). "Biology of gastrointestinal stromal tumors." J Clin Oncol **22**(18): 3813-3825.
- Costello, P. S., M. Turner, et al. (1996). "Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells." Oncogene **13**(12): 2595-2605.
- Crivellato, E., C. A. Beltrami, et al. (2004). "The mast cell: an active participant or an innocent bystander?" Histol Histopathol **19**(1): 259-270.
- Crosier, P. S., S. T. Ricciardi, et al. (1993). "Expression of isoforms of the human receptor tyrosine kinase c-kit in leukemic cell lines and acute myeloid leukemia." Blood **82**(4): 1151-1158.
- Chabot, B., D. A. Stephenson, et al. (1988). "The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus." Nature **335**(6185): 88-89.
- Chan, P. M., S. Ilangumaran, et al. (2003). "Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region." Mol Cell Biol **23**(9): 3067-3078.
- Chen, G., I. Dimitriou, et al. (2012). "The 3BP2 adapter protein is required for chemoattractant-mediated neutrophil activation." J Immunol **189**(5): 2138-2150.
- Chen, G., I. D. Dimitriou, et al. (2007). "The 3BP2 adapter protein is required for optimal B-cell activation and thymus-independent type 2 humoral response." Mol Cell Biol **27**(8): 3109-3122.

- Chen, L. L., J. C. Trent, et al. (2004). "A missense mutation in KIT kinase domain 1 correlates with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors." Cancer Res **64**(17): 5913-5919.
- Chen, T., B. Repetto, et al. (1996). "Interaction of phosphorylated FcepsilonRIgamma immunoglobulin receptor tyrosine activation motif-based peptides with dual and single SH2 domains of p72syk. Assessment of binding parameters and real time binding kinetics." J Biol Chem **271**(41): 25308-25315.
- Cherwinski, H. M., C. A. Murphy, et al. (2005). "The CD200 receptor is a novel and potent regulator of murine and human mast cell function." J Immunol **174**(3): 1348-1356.
- Choi, O. H., J. H. Kim, et al. (1996). "Calcium mobilization via sphingosine kinase in signalling by the Fc epsilon RI antigen receptor." Nature **380**(6575): 634-636.
- Chong, H. and K. L. Guan (2003). "Regulation of Raf through phosphorylation and N terminus-C terminus interaction." J Biol Chem **278**(38): 36269-36276.
- Chong, Z. Z. and K. Maiese (2007). "The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury." Histol Histopathol **22**(11): 1251-1267.
- Chow, L. Q. and S. G. Eckhardt (2007). "Sunitinib: from rational design to clinical efficacy." J Clin Oncol **25**(7): 884-896.
- Church, M. K. and F. Levi-Schaffer (1997). "The human mast cell." J Allergy Clin Immunol **99**(2): 155-160.
- d'Auriol, L., M. G. Mattei, et al. (1988). "Localization of the human c-kit protooncogene on the q11-q12 region of chromosome 4." Hum Genet **78**(4): 374-376.

- Daeron, M., S. Jaeger, et al. (2008). "Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future." Immunol Rev **224**: 11-43.
- Damsgaard, T. E., A. B. Olesen, et al. (1997). "Mast cells and atopic dermatitis. Stereological quantification of mast cells in atopic dermatitis and normal human skin." Arch Dermatol Res **289**(5): 256-260.
- Datta, S. R., H. Dudek, et al. (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell **91**(2): 231-241.
- de la Fuente, M. A., L. Kumar, et al. (2006). "3BP2 deficiency impairs the response of B cells, but not T cells, to antigen receptor ligation." Mol Cell Biol **26**(14): 5214-5225.
- Deberry, C., S. Mou, et al. (1997). "Stat1 associates with c-kit and is activated in response to stem cell factor." Biochem J **327** ( Pt 1): 73-80.
- Deckert, M. and R. Rottapel (2006). "The adapter 3BP2: how it plugs into leukocyte signaling." Adv Exp Med Biol **584**: 107-114.
- Deckert, M., S. Tartare-Deckert, et al. (1996). "Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product." Immunity **5**(6): 591-604.
- Deckert, M., S. Tartare-Deckert, et al. (1998). "Adaptor function for the Syk kinases-interacting protein 3BP2 in IL-2 gene activation." Immunity **9**(5): 595-605.
- Demetri, G. D., M. von Mehren, et al. (2002). "Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors." N Engl J Med **347**(7): 472-480.
- Denburg, J. A. (1992). "Basophil and mast cell lineages in vitro and in vivo." Blood **79**(4): 846-860.

- Donnadieu, E., M. H. Jouvin, et al. (2003). "Competing functions encoded in the allergy-associated F(c)epsilonRIbeta gene." Immunity **18**(5): 665-674.
- Duensing, A., F. Medeiros, et al. (2004). "Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs)." Oncogene **23**(22): 3999-4006.
- Echtenacher, B., D. N. Mannel, et al. (1996). "Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis." Nature **381**(6577): 75-77.
- Eiseman, E. and J. B. Bolen (1992). "Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases." Nature **355**(6355): 78-80.
- El-Hillal, O., T. Kurosaki, et al. (1997). "syk kinase activation by a src kinase-initiated activation loop phosphorylation chain reaction." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1919-1924.
- Faccio, R., S. L. Teitelbaum, et al. (2005). "Vav3 regulates osteoclast function and bone mass." Nat Med **11**(3): 284-290.
- Facchetti, F., J. K. Chan, et al. (1999). "Linker for activation of T cells (LAT), a novel immunohistochemical marker for T cells, NK cells, mast cells, and megakaryocytes: evaluation in normal and pathological conditions." Am J Pathol **154**(4): 1037-1046.
- Felli, N., L. Fontana, et al. (2005). "MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 18081-18086.
- Fiebiger, E., D. Tortorella, et al. (2005). "Cotranslational endoplasmic reticulum assembly of FcepsilonRI controls the formation of functional IgE-binding receptors." J Exp Med **201**(2): 267-277.

- Field, K. A., D. Holowka, et al. (1999). "Structural aspects of the association of FcepsilonRI with detergent-resistant membranes." J Biol Chem **274**(3): 1753-1758.
- Fischer, B., M. Marinov, et al. (2007). "Targeting receptor tyrosine kinase signalling in small cell lung cancer (SCLC): what have we learned so far?" Cancer Treat Rev **33**(4): 391-406.
- Fischer, M., I. T. Harvima, et al. (2006). "Mast cell CD30 ligand is upregulated in cutaneous inflammation and mediates degranulation-independent chemokine secretion." J Clin Invest **116**(10): 2748-2756.
- Fletcher, C. D., J. J. Berman, et al. (2002). "Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach." Hum Pathol **33**(5): 459-465.
- Foster, B., L. B. Schwartz, et al. (2002). "Characterization of mast-cell tryptase-expressing peripheral blood cells as basophils." J Allergy Clin Immunol **109**(2): 287-293.
- Foucault, I., S. Le Bras, et al. (2005). "The adaptor protein 3BP2 associates with VAV guanine nucleotide exchange factors to regulate NFAT activation by the B-cell antigen receptor." Blood **105**(3): 1106-1113.
- Foucault, I., Y. C. Liu, et al. (2003). "The chaperone protein 14-3-3 interacts with 3BP2/SH3BP2 and regulates its adapter function." J Biol Chem **278**(9): 7146-7153.
- Freeland, H. S., U. Pipkorn, et al. (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**(3): 634-642.
- Frost, M. J., P. T. Ferrao, et al. (2002). "Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the

kinase domain mutant D816VKit is resistant." Mol Cancer Ther **1**(12): 1115-1124.

Furitsu, T., T. Tsujimura, et al. (1993). "Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product." J Clin Invest **92**(4): 1736-1744.

Furumoto, Y., S. Brooks, et al. (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**(9): 5167-5171.

Furumoto, Y., S. Nunomura, et al. (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**(47): 49177-49187.

Galli, S. J., M. Grimaldeston, et al. (2008). "Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity." Nat Rev Immunol **8**(6): 478-486.

Galli, S. J., J. Kalesnikoff, et al. (2005). "Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances." Annu Rev Immunol **23**: 749-786.

Galli, S. J., M. Maurer, et al. (1999). "Mast cells as sentinels of innate immunity." Curr Opin Immunol **11**(1): 53-59.

Galli, S. J., S. Nakae, et al. (2005). "Mast cells in the development of adaptive immune responses." Nat Immunol **6**(2): 135-142.

- Gao, X. N., J. Lin, et al. (2011). "MicroRNA-193b regulates c-Kit proto-oncogene and represses cell proliferation in acute myeloid leukemia." Leuk Res **35**(9): 1226-1232.
- Garcia-Montero, A. C., M. Jara-Acevedo, et al. (2006). "KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients." Blood **108**(7): 2366-2372.
- Geissler, E. N., M. A. Ryan, et al. (1988). "The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene." Cell **55**(1): 185-192.
- Gelfand, E. W. (2004). "Inflammatory mediators in allergic rhinitis." J Allergy Clin Immunol **114**(5 Suppl): S135-138.
- Genovese, A., C. Stellato, et al. (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**(3): 192-198.
- Ghildyal, N., H. P. McNeil, et al. (1992). "Transcriptional regulation of the mucosal mast cell-specific protease gene, MMCP-2, by interleukin 10 and interleukin 3." J Biol Chem **267**(12): 8473-8477.
- Gibbs, B. F., V. Sabato, et al. (2012). "Expressions and inhibitory functions of CD300a receptors on purified human basophils." Exp Dermatol **21**(11): 884-886.
- Gilfillan, A. M. and M. A. Beaven (2011). "Regulation of mast cell responses in health and disease." Crit Rev Immunol **31**(6): 475-529.
- Gilfillan, A. M. and J. Rivera (2009). "The tyrosine kinase network regulating mast cell activation." Immunol Rev **228**(1): 149-169.
- Gilfillan, A. M. and C. Tkaczyk (2006). "Integrated signalling pathways for mast-cell activation." Nat Rev Immunol **6**(3): 218-230.

- Gommerman, J. L., D. Sittaro, et al. (2000). "Differential stimulation of c-Kit mutants by membrane-bound and soluble Steel Factor correlates with leukemic potential." Blood **96**(12): 3734-3742.
- Gonzalez-Espinosa, C., S. Odom, et al. (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**(11): 1453-1465.
- Gotlib, J., A. Pardanani, et al. (2013). "International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) & European Competence Network on Mastocytosis (ECNM) consensus response criteria in advanced systemic mastocytosis." Blood **121**(13): 2393-2401.
- Gounni, A. S., B. Lamkhioed, et al. (2001). "Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma." FASEB J **15**(6): 940-949.
- Groneberg, D. A., C. Bester, et al. (2005). "Mast cells and vasculature in atopic dermatitis--potential stimulus of neoangiogenesis." Allergy **60**(1): 90-97.
- Gu, H., K. Saito, et al. (2001). "Essential role for Gab2 in the allergic response." Nature **412**(6843): 186-190.
- Guettler, S., J. LaRose, et al. (2011). "Structural basis and sequence rules for substrate recognition by Tankyrase explain the basis for cherubism disease." Cell **147**(6): 1340-1354.
- GuezGuez, A., V. Prod'homme, et al. (2010). "3BP2 adapter protein is required for receptor activator of NFkappaB ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells." J Biol Chem **285**(27): 20952-20963.
- Gurish, M. F. and K. F. Austen (2001). "The diverse roles of mast cells." J Exp Med **194**(1): F1-5.



- Hart, P. H., M. A. Grimbaldston, et al. (1998). "Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice." J Exp Med **187**(12): 2045-2053.
- Hasegawa, S., R. Pawankar, et al. (1999). "Functional expression of the high affinity receptor for IgE (FcepsilonRI) in human platelets and its' intracellular expression in human megakaryocytes." Blood **93**(8): 2543-2551.
- Hasson, T., J. F. Skowron, et al. (1996). "Mapping of unconventional myosins in mouse and human." Genomics **36**(3): 431-439.
- Hata, T., T. Aikoh, et al. (1998). "Mycosis fungoides with involvement of the oral mucosa." Int J Oral Maxillofac Surg **27**(2): 127-128.
- Hatani, T. and K. Sada (2008). "Adaptor protein 3BP2 and cherubism." Curr Med Chem **15**(6): 549-554.
- Heinrich, M. C., C. D. Blanke, et al. (2002). "Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies." J Clin Oncol **20**(6): 1692-1703.
- Heinrich, M. C., C. L. Corless, et al. (2003). "Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor." J Clin Oncol **21**(23): 4342-4349.
- Heinrich, M. C., D. J. Griffith, et al. (2000). "Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor." Blood **96**(3): 925-932.
- Heissig, B., Z. Werb, et al. (2003). "Role of c-kit/Kit ligand signaling in regulating vasculogenesis." Thromb Haemost **90**(4): 570-576.
- Hemmings, B. A. (1997). "PH domains--a universal membrane adapter." Science **275**(5308): 1899.

- Hershey, C. L. and D. E. Fisher (2004). "Mitf and Tfe3: members of a b-HLH-ZIP transcription factor family essential for osteoclast development and function." Bone **34**(4): 689-696.
- Hida, T., R. Ueda, et al. (1994). "Ectopic expression of c-kit in small-cell lung cancer." Int J Cancer Suppl **8**: 108-109.
- Hirota, S., K. Isozaki, et al. (1998). "Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors." Science **279**(5350): 577-580.
- Hirota, S., A. Ohashi, et al. (2003). "Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors." Gastroenterology **125**(3): 660-667.
- Horny, H. P., K. Sotlar, et al. (2007). "Mastocytosis: state of the art." Pathobiology **74**(2): 121-132.
- Huang, R., M. Abrink, et al. (1993). "Expression of a mast cell tryptase in the human monocytic cell lines U-937 and Mono Mac 6." Scand J Immunol **38**(4): 359-367.
- Huang, S., D. Jean, et al. (1998). "Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis." EMBO J **17**(15): 4358-4369.
- Hundley, T. R., A. M. Gilfillan, et al. (2004). "Kit and FcepsilonRI mediate unique and convergent signals for release of inflammatory mediators from human mast cells." Blood **104**(8): 2410-2417.
- Igoucheva, O. and V. Alexeev (2009). "MicroRNA-dependent regulation of cKit in cutaneous melanoma." Biochem Biophys Res Commun **379**(3): 790-794.
- Iwaki, S., J. Spicka, et al. (2008). "Kit- and Fc epsilonRI-induced differential phosphorylation of the transmembrane adaptor molecule

NTAL/LAB/LAT2 allows flexibility in its scaffolding function in mast cells." Cell Signal **20**(1): 195-205.

Iwaki, S., C. Tkaczyk, et al. (2005). "Roles of adaptor molecules in mast cell activation." Chem Immunol Allergy **87**: 43-58.

Iwaki, S., C. Tkaczyk, et al. (2005). "Btk plays a crucial role in the amplification of Fc epsilonRI-mediated mast cell activation by kit." J Biol Chem **280**(48): 40261-40270.

Janssen, E. and W. Zhang (2003). "Adaptor proteins in lymphocyte activation." Curr Opin Immunol **15**(3): 269-276.

Janssen, E., M. Zhu, et al. (2004). "Linker for activation of B cells: a functional equivalent of a mutant linker for activation of T cells deficient in phospholipase C-gamma1 binding." J Immunol **172**(11): 6810-6819.

Janssen, E., M. Zhu, et al. (2003). "LAB: a new membrane-associated adaptor molecule in B cell activation." Nat Immunol **4**(2): 117-123.

Jascur, T., J. Gilman, et al. (1997). "Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in NFAT activation in T cells." J Biol Chem **272**(22): 14483-14488.

Jensen, B. M., C. Akin, et al. (2008). "Pharmacological targeting of the KIT growth factor receptor: a therapeutic consideration for mast cell disorders." Br J Pharmacol **154**(8): 1572-1582.

Jevremovic, D., D. D. Billadeau, et al. (2001). "Regulation of NK cell-mediated cytotoxicity by the adaptor protein 3BP2." J Immunol **166**(12): 7219-7228.

Jimenez, C., R. A. Portela, et al. (2000). "Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration." J Cell Biol **151**(2): 249-262.

- Joensuu, H. (2012). "Adjuvant treatment of GIST: patient selection and treatment strategies." Nat Rev Clin Oncol **9**(6): 351-358.
- Johnson, B. V., A. G. Bert, et al. (2004). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhancer activation requires cooperation between NFAT and AP-1 elements and is associated with extensive nucleosome reorganization." Mol Cell Biol **24**(18): 7914-7930.
- Jolly, P. S., M. Bektas, et al. (2004). "Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis." J Exp Med **199**(7): 959-970.
- Kalesnikoff, J., N. Baur, et al. (2002). "SHIP negatively regulates IgE + antigen-induced IL-6 production in mast cells by inhibiting NF-kappa B activity." J Immunol **168**(9): 4737-4746.
- Kalesnikoff, J. and S. J. Galli (2008). "New developments in mast cell biology." Nat Immunol **9**(11): 1215-1223.
- Kalesnikoff, J., M. Huber, et al. (2001). "Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival." Immunity **14**(6): 801-811.
- Kalesnikoff, J., V. Lam, et al. (2002). "SHIP represses mast cell activation and reveals that IgE alone triggers signaling pathways which enhance normal mast cell survival." Mol Immunol **38**(16-18): 1201-1206.
- Kambayashi, T., M. Okumura, et al. (2010). "Independent and cooperative roles of adaptor molecules in proximal signaling during FcepsilonRI-mediated mast cell activation." Mol Cell Biol **30**(17): 4188-4196.
- Katz, H. R. (2002). "Inhibitory receptors and allergy." Curr Opin Immunol **14**(6): 698-704.

- Kawabori, S., N. Kanai, et al. (1995). "Proliferative activity of mast cells in allergic nasal mucosa." Clin Exp Allergy **25**(2): 173-178.
- Kawakami, Y., J. Kitaura, et al. (2000). "Redundant and opposing functions of two tyrosine kinases, Btk and Lyn, in mast cell activation." J Immunol **165**(3): 1210-1219.
- Kerr, I. M., A. P. Costa-Pereira, et al. (2003). "Of JAKs, STATs, blind watchmakers, jeeps and trains." FEBS Lett **546**(1): 1-5.
- Keshet, E., S. D. Lyman, et al. (1991). "Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development." EMBO J **10**(9): 2425-2435.
- Kettner, A., V. Pivniouk, et al. (2003). "Structural requirements of SLP-76 in signaling via the high-affinity immunoglobulin E receptor (Fc epsilon RI) in mast cells." Mol Cell Biol **23**(7): 2395-2406.
- Kim, H. J. (2014). "The Physiologic Roles of the Subepithelial Platelet-derived Growth Factor Receptor alpha-positive Cells in the Colon (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2013;304:G823-G834)." J Neurogastroenterol Motil **20**(1): 127-128.
- Kim, M. S., M. Radinger, et al. (2008). "The multiple roles of phosphoinositide 3-kinase in mast cell biology." Trends Immunol **29**(10): 493-501.
- Kim, S. V., W. Z. Mehal, et al. (2006). "Modulation of cell adhesion and motility in the immune system by Myo1f." Science **314**(5796): 136-139.
- Kim, Y. S., H. M. Ko, et al. (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**(4): 1107-1115.

- Kimura, Y., N. Jones, et al. (2004). "Targeted mutations of the juxtamembrane tyrosines in the Kit receptor tyrosine kinase selectively affect multiple cell lineages." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6015-6020.
- Kinet, J. P. (1999). "The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology." Annu Rev Immunol **17**: 931-972.
- Kitaura, J., K. Asai, et al. (2000). "Akt-dependent cytokine production in mast cells." J Exp Med **192**(5): 729-740.
- Kitayama, H., Y. Kanakura, et al. (1995). "Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines." Blood **85**(3): 790-798.
- Klippel, A., J. A. Escobedo, et al. (1994). "The interaction of small domains between the subunits of phosphatidylinositol 3-kinase determines enzyme activity." Mol Cell Biol **14**(4): 2675-2685.
- Koelz, M., J. Lense, et al. (2011). "Down-regulation of miR-221 and miR-222 correlates with pronounced Kit expression in gastrointestinal stromal tumors." Int J Oncol **38**(2): 503-511.
- Koike, T., T. Mizutani, et al. (1993). "SCF/c-kit receptor-mediated arachidonic acid liberation in rat mast cells. Involvement of PLD activation associated tyrosine phosphorylation." Biochem Biophys Res Commun **197**(3): 1570-1577.
- Kojima, S., N. Yamamoto, et al. (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**(4): 2719-2722.

- Kovarova, M. and J. Rivera (2004). "A molecular understanding of mast cell activation and the promise of anti-allergic therapeutics." Curr Med Chem **11**(15): 2083-2091.
- Kovarova, M., P. Tolar, et al. (2001). "Structure-function analysis of Lyn kinase association with lipid rafts and initiation of early signaling events after Fcepsilon receptor I aggregation." Mol Cell Biol **21**(24): 8318-8328.
- Kovarova, M., C. A. Wassif, et al. (2006). "Cholesterol deficiency in a mouse model of Smith-Lemli-Opitz syndrome reveals increased mast cell responsiveness." J Exp Med **203**(5): 1161-1171.
- Kraft, S. and J. P. Kinet (2007). "New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition." Nat Rev Immunol **7**(5): 365-378.
- Krendel, M., E. K. Osterweil, et al. (2007). "Myosin 1E interacts with synaptojanin-1 and dynamin and is involved in endocytosis." FEBS Lett **581**(4): 644-650.
- Krosl, G., G. He, et al. (1998). "Transcription factor SCL is required for c-kit expression and c-Kit function in hemopoietic cells." J Exp Med **188**(3): 439-450.
- Krystal, G. W., C. S. DeBerry, et al. (1998). "Lck associates with and is activated by Kit in a small cell lung cancer cell line: inhibition of SCF-mediated growth by the Src family kinase inhibitor PP1." Cancer Res **58**(20): 4660-4666.
- Kuehn, H. S. and A. M. Gilfillan (2007). "G protein-coupled receptors and the modification of FcepsilonRI-mediated mast cell activation." Immunol Lett **113**(2): 59-69.

- Kuehn, H. S., M. Radinger, et al. (2010). "Btk-dependent Rac activation and actin rearrangement following FcepsilonRI aggregation promotes enhanced chemotactic responses of mast cells." J Cell Sci **123**(Pt 15): 2576-2585.
- Laffargue, M., R. Calvez, et al. (2002). "Phosphoinositide 3-kinase gamma is an essential amplifier of mast cell function." Immunity **16**(3): 441-451.
- Lawley, W., H. Hird, et al. (2005). "Detection of an activating c-kit mutation by real-time PCR in patients with anaphylaxis." Mutat Res **572**(1-2): 1-13.
- Lebduska, P., J. Korb, et al. (2007). "Topography of signaling molecules as detected by electron microscopy on plasma membrane sheets isolated from non-adherent mast cells." J Immunol Methods **328**(1-2): 139-151.
- Lee, Y. N., S. Brandal, et al. (2011). "KIT signaling regulates MITF expression through miRNAs in normal and malignant mast cell proliferation." Blood **117**(13): 3629-3640.
- Lemay, S., D. Davidson, et al. (2000). "Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling." Mol Cell Biol **20**(8): 2743-2754.
- Lemmon, M. A., D. Pinchasi, et al. (1997). "Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor." J Biol Chem **272**(10): 6311-6317.
- Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **141**(7): 1117-1134.
- Lennartsson, J., P. Blume-Jensen, et al. (1999). "Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction." Oncogene **18**(40): 5546-5553.
- Lennartsson, J., T. Jelacic, et al. (2005). "Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit." Stem Cells **23**(1): 16-43.



- Lennartsson, J. and L. Ronnstrand (2012). "Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications." Physiol Rev **92**(4): 1619-1649.
- Letourneur, O., S. Sechi, et al. (1995). "Glycosylation of human truncated Fc epsilon RI alpha chain is necessary for efficient folding in the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **270**(14): 8249-8256.
- Leung, D. Y., M. Boguniewicz, et al. (2004). "New insights into atopic dermatitis." J Clin Invest **113**(5): 651-657.
- Leung, W. H. and S. Bolland (2007). "The inositol 5'-phosphatase SHIP-2 negatively regulates IgE-induced mast cell degranulation and cytokine production." J Immunol **179**(1): 95-102.
- Lev, S., J. M. Blechman, et al. (1994). "Steel factor and c-kit protooncogene: genetic lessons in signal transduction." Crit Rev Oncog **5**(2-3): 141-168.
- Lev, S., D. Givol, et al. (1992). "Interkinase domain of kit contains the binding site for phosphatidylinositol 3' kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(2): 678-682.
- Levaot, N., P. D. Simoncic, et al. (2011). "3BP2-deficient mice are osteoporotic with impaired osteoblast and osteoclast functions." J Clin Invest **121**(8): 3244-3257.
- Levaot, N., O. Voytyuk, et al. (2011). "Loss of Tankyrase-mediated destruction of 3BP2 is the underlying pathogenic mechanism of cherubism." Cell **147**(6): 1324-1339.
- Levitzki, A. and E. Mishani (2006). "Tyrophostins and other tyrosine kinase inhibitors." Annu Rev Biochem **75**: 93-109.
- Li, B., S. Boast, et al. (2000). "Mice deficient in Abl are osteoporotic and have defects in osteoblast maturation." Nat Genet **24**(3): 304-308.

- Li, M., N. Naqvi, et al. (2008). "c-kit is required for cardiomyocyte terminal differentiation." Circ Res **102**(6): 677-685.
- Lin, T., N. Tang, et al. (2005). "Biochemical and motile properties of Myo1b splice isoforms." J Biol Chem **280**(50): 41562-41567.
- Lindsey, J. Y., K. Ganguly, et al. (2011). "c-Kit is essential for alveolar maintenance and protection from emphysema-like disease in mice." Am J Respir Crit Care Med **183**(12): 1644-1652.
- Linnekin, D. (1999). "Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells." Int J Biochem Cell Biol **31**(10): 1053-1074.
- Linnekin, D., C. S. DeBerry, et al. (1997). "Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells." J Biol Chem **272**(43): 27450-27455.
- Liu, S. K., N. Fang, et al. (1999). "The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors." Curr Biol **9**(2): 67-75.
- Liu, Y., M. Tseng, et al. (2007). "Histone H2AX is a mediator of gastrointestinal stromal tumor cell apoptosis following treatment with imatinib mesylate." Cancer Res **67**(6): 2685-2692.
- Longley, B. J., Jr., D. D. Metcalfe, et al. (1999). "Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1609-1614.
- Longley, B. J., M. J. Reguera, et al. (2001). "Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy." Leuk Res **25**(7): 571-576.

- Loveland, K. L. and S. Schlatt (1997). "Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts." J Endocrinol **153**(3): 337-344.
- Lu, L. F., E. F. Lind, et al. (2006). "Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance." Nature **442**(7106): 997-1002.
- Lux, M. L., B. P. Rubin, et al. (2000). "KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors." Am J Pathol **156**(3): 791-795.
- Lyseng-Williamson, K. and B. Jarvis (2001). "Imatinib." Drugs **61**(12): 1765-1774; discussion 1775-1766.
- Mackenzie, M. A., S. A. Jordan, et al. (1997). "Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo." Dev Biol **192**(1): 99-107.
- Maddens, S., A. Charruyer, et al. (2002). "Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect." Blood **100**(4): 1294-1301.
- Maeda, K., C. Nishiyama, et al. (2010). "GATA2 and Sp1 positively regulate the c-kit promoter in mast cells." J Immunol **185**(7): 4252-4260.
- Maeno, K., K. Sada, et al. (2003). "Adaptor protein 3BP2 is a potential ligand of Src homology 2 and 3 domains of Lyn protein-tyrosine kinase." J Biol Chem **278**(27): 24912-24920.
- Malaviya, R., T. Ikeda, et al. (1996). "Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha." Nature **381**(6577): 77-80.
- Manetz, T. S., C. Gonzalez-Espinosa, et al. (2001). "Vav1 regulates phospholipase cgamma activation and calcium responses in mast cells." Mol Cell Biol **21**(11): 3763-3774.

- Mansky, K. C., U. Sankar, et al. (2002). "Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling." J Biol Chem **277**(13): 11077-11083.
- Mao, D., H. Epple, et al. (2006). "PLCgamma2 regulates osteoclastogenesis via its interaction with ITAM proteins and GAB2." J Clin Invest **116**(11): 2869-2879.
- Marone, G., M. Bova, et al. (2004). "The human heart as a shock organ in anaphylaxis." Novartis Found Symp **257**: 133-149; discussion 149-160, 276-185.
- Marshall, J. S. and D. M. Jawdat (2004). "Mast cells in innate immunity." J Allergy Clin Immunol **114**(1): 21-27.
- Martin, M., J. M. Del Valle, et al. (2005). "Identification of Grb2 as a novel binding partner of the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein binding receptor CD229." J Immunol **174**(10): 5977-5986.
- Masson, K., E. Heiss, et al. (2006). "Direct binding of Cbl to Tyr568 and Tyr936 of the stem cell factor receptor/c-Kit is required for ligand-induced ubiquitination, internalization and degradation." Biochem J **399**(1): 59-67.
- Mathes, C., A. Fleig, et al. (1998). "Calcium release-activated calcium current (ICRAC) is a direct target for sphingosine." J Biol Chem **273**(39): 25020-25030.
- Matsuda, H., N. Watanabe, et al. (1990). "Necessity of IgE antibodies and mast cells for manifestation of resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* ticks in mice." J Immunol **144**(1): 259-262.
- Maurer, M., B. Echtenacher, et al. (1998). "The c-kit ligand, stem cell factor, can enhance innate immunity through effects on mast cells." J Exp Med **188**(12): 2343-2348.

- Maurer, M., S. Lopez Kostka, et al. (2006). "Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections." FASEB J **20**(14): 2460-2467.
- Maurer, M., J. Wedemeyer, et al. (2004). "Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity." Nature **432**(7016): 512-516.
- McConnell, R. E. and M. J. Tyska (2010). "Leveraging the membrane - cytoskeleton interface with myosin-1." Trends Cell Biol **20**(7): 418-426.
- McLean, S. R., M. Gana-Weisz, et al. (2005). "Imatinib binding and cKIT inhibition is abrogated by the cKIT kinase domain I missense mutation Val654Ala." Mol Cancer Ther **4**(12): 2008-2015.
- Meade, C. J., L. Worrall, et al. (2002). "Induction of interleukin 8 release from the HMC-1 mast cell line: synergy between stem cell factor and activators of the adenosine A(2b) receptor." Biochem Pharmacol **64**(2): 317-325.
- Mekori, Y. A. (2004). "The mastocyte: the "other" inflammatory cell in immunopathogenesis." J Allergy Clin Immunol **114**(1): 52-57.
- Mekori, Y. A. and D. D. Metcalfe (2000). "Mast cells in innate immunity." Immunol Rev **173**: 131-140.
- Mekori, Y. A., C. K. Oh, et al. (1995). "The role of c-Kit and its ligand, stem cell factor, in mast cell apoptosis." Int Arch Allergy Immunol **107**(1-3): 136-138.
- Melendez, A. J. and A. K. Khaw (2002). "Dichotomy of Ca<sup>2+</sup> signals triggered by different phospholipid pathways in antigen stimulation of human mast cells." J Biol Chem **277**(19): 17255-17262.
- Meng, W., S. Sawasdikosol, et al. (1999). "Structure of the amino-terminal domain of Cbl complexed to its binding site on ZAP-70 kinase." Nature **398**(6722): 84-90.

- Metcalfe, D. D. (2008). "Mast cells and mastocytosis." Blood **112**(4): 946-956.
- Metcalfe, D. D., D. Baram, et al. (1997). "Mast cells." Physiol Rev **77**(4): 1033-1079.
- Metz, M., M. A. Grimbaldston, et al. (2007). "Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation." Immunol Rev **217**: 304-328.
- Metz, M., A. M. Piliponsky, et al. (2006). "Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms." Science **313**(5786): 526-530.
- Miah, S. M., T. Hatani, et al. (2004). "Point mutations of 3BP2 identified in human-inherited disease cherubism result in the loss of function." Genes Cells **9**(11): 993-1004.
- Miettinen, M. and J. Lasota (2006). "Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites." Semin Diagn Pathol **23**(2): 70-83.
- Miettinen, M., L. H. Sobin, et al. (2005). "Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up." Am J Surg Pathol **29**(1): 52-68.
- Mol, C. D., D. R. Dougan, et al. (2004). "Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase." J Biol Chem **279**(30): 31655-31663.
- Mol, C. D., K. B. Lim, et al. (2003). "Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation." J Biol Chem **278**(34): 31461-31464.
- Molfetta, R., G. Peruzzi, et al. (2007). "Negative signals from FcepsilonRI engagement attenuate mast cell functions." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **55**(4): 219-229.

- Moller, C., J. Alfredsson, et al. (2005). "Stem cell factor promotes mast cell survival via inactivation of FOXO3a-mediated transcriptional induction and MEK-regulated phosphorylation of the proapoptotic protein Bim." Blood **106**(4): 1330-1336.
- Montrucchio, G., G. Alloatti, et al. (2000). "Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology." Physiol Rev **80**(4): 1669-1699.
- Moon, T. C., M. Murakami, et al. (1998). "Regulation of cyclooxygenase-2 and endogenous cytokine expression by bacterial lipopolysaccharide that acts in synergy with c-kit ligand and Fc epsilon receptor I crosslinking in cultured mast cells." Cell Immunol **185**(2): 146-152.
- Moore, K. J. (1995). "Insight into the microphthalmia gene." Trends Genet **11**(11): 442-448.
- Muhlenberg, T., Y. Zhang, et al. (2009). "Inhibitors of deacetylases suppress oncogenic KIT signaling, acetylate HSP90, and induce apoptosis in gastrointestinal stromal tumors." Cancer Res **69**(17): 6941-6950.
- Munugalavadla, V., E. C. Sims, et al. (2007). "Genetic and pharmacologic evidence implicating the p85 alpha, but not p85 beta, regulatory subunit of PI3K and Rac2 GTPase in regulating oncogenic KIT-induced transformation in acute myeloid leukemia and systemic mastocytosis." Blood **110**(5): 1612-1620.
- Nadler, M. J., S. A. Matthews, et al. (2000). "Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function." Adv Immunol **76**: 325-355.
- Nakae, S., L. H. Ho, et al. (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**(1): 48-55.

- Nakahashi-Oda, C., S. Tahara-Hanaoka, et al. (2012). "Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor." J Exp Med **209**(8): 1493-1503.
- Nakajima, T., K. Matsumoto, et al. (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**(4): 1127-1134.
- Ning, Z. Q., J. Li, et al. (2001). "STAT3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit induced tumorigenicity." Oncogene **20**(33): 4528-4536.
- Nishida, K., L. Wang, et al. (2002). "Requirement of Gab2 for mast cell development and KitL/c-Kit signaling." Blood **99**(5): 1866-1869.
- Oates, J., G. King, et al. (2010). "Strong oligomerization behavior of PDGFbeta receptor transmembrane domain and its regulation by the juxtamembrane regions." Biochim Biophys Acta **1798**(3): 605-615.
- Ogawa, M., Y. Matsuzaki, et al. (1991). "Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells." J Exp Med **174**(1): 63-71.
- Okada, S., H. Nakauchi, et al. (1991). "Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule." Blood **78**(7): 1706-1712.
- Okayama, Y. and T. Kawakami (2006). "Development, migration, and survival of mast cells." Immunol Res **34**(2): 97-115.
- Olivera, A. and J. Rivera (2005). "Sphingolipids and the balancing of immune cell function: lessons from the mast cell." J Immunol **174**(3): 1153-1158.
- Olivera, A., N. Urtz, et al. (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**(5): 2515-2525.

On, M., J. M. Billingsley, et al. (2004). "Molecular dissection of the FcRbeta signaling amplifier." J Biol Chem **279**(44): 45782-45790.

Ono, S. J. and M. B. Abelson (2005). "Allergic conjunctivitis: update on pathophysiology and prospects for future treatment." J Allergy Clin Immunol **115**(1): 118-122.

Oosterhuis, J. W. and L. H. Looijenga (2005). "Testicular germ-cell tumours in a broader perspective." Nat Rev Cancer **5**(3): 210-222.

Opdecamp, K., A. Nakayama, et al. (1997). "Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor." Development **124**(12): 2377-2386.

Oskeritzian, C. A., W. Zhao, et al. (2005). "Surface CD88 functionally distinguishes the MCTC from the MCT type of human lung mast cell." J Allergy Clin Immunol **115**(6): 1162-1168.

Oya, K., J. Wang, et al. (2003). "Appearance of the LAT protein at an early stage of B-cell development and its possible role." Immunology **109**(3): 351-359.

Ozawa, T., K. Nakata, et al. (2007). "Negative autoregulation of Src homology region 2-domain-containing phosphatase-1 in rat basophilic leukemia-2H3 cells." Int Immunol **19**(9): 1049-1061.

Paolini, R., M. H. Jouvin, et al. (1991). "Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engagement and disengagement." Nature **353**(6347): 855-858.

Parekh, A. B. and R. Penner (1997). "Store depletion and calcium influx." Physiol Rev **77**(4): 901-930.

- Park, G. H., H. K. Plummer, 3rd, et al. (1998). "Selective Sp1 binding is critical for maximal activity of the human c-kit promoter." Blood **92**(11): 4138-4149.
- Parravicini, V., M. Gadina, et al. (2002). "Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation." Nat Immunol **3**(8): 741-748.
- Paschka, P., G. Marcucci, et al. (2006). "Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study." J Clin Oncol **24**(24): 3904-3911.
- Pasquier, B., P. Launay, et al. (2005). "Identification of Fc $\alpha$ RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcR $\gamma$  ITAM." Immunity **22**(1): 31-42.
- Patnaik, M. M., A. Tefferi, et al. (2007). "Kit: molecule of interest for the diagnosis and treatment of mastocytosis and other neoplastic disorders." Curr Cancer Drug Targets **7**(5): 492-503.
- Pawson, T. (1994). "SH2 and SH3 domains in signal transduction." Adv Cancer Res **64**: 87-110.
- Peinelt, C., M. Vig, et al. (2006). "Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1)." Nat Cell Biol **8**(7): 771-773.
- Piliponsky, A. M., C. C. Chen, et al. (2008). "Neurotensin increases mortality and mast cells reduce neurotensin levels in a mouse model of sepsis." Nat Med **14**(4): 392-398.
- Plo, I., D. Lautier, et al. (2001). "Kit signaling and negative regulation of daunorubicin-induced apoptosis: role of phospholipase C $\gamma$ ." Oncogene **20**(46): 6752-6763.
- Prakriya, M., S. Feske, et al. (2006). "Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel." Nature **443**(7108): 230-233.

- Preneen, H., J. Cools, et al. (2006). "Efficacy of the kinase inhibitor SU11248 against gastrointestinal stromal tumor mutants refractory to imatinib mesylate." Clin Cancer Res **12**(8): 2622-2627.
- Pribluda, V. S., C. Pribluda, et al. (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**(23): 11246-11250.
- Price, D. J., B. Rivnay, et al. (1997). "Direct association of Csk homologous kinase (CHK) with the diphosphorylated site Tyr568/570 of the activated c-KIT in megakaryocytes." J Biol Chem **272**(9): 5915-5920.
- Proud, D., G. S. Bailey, et al. (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**(6): 1098-1110.
- Prussin, C. and D. D. Metcalfe (2006). "5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils." J Allergy Clin Immunol **117**(2 Suppl Mini-Primer): S450-456.
- Qu, X., K. Kawauchi-Kamata, et al. (2005). "Tyrosine phosphorylation of adaptor protein 3BP2 induces T cell receptor-mediated activation of transcription factor." Biochemistry **44**(10): 3891-3898.
- Radinger, M., B. M. Jensen, et al. (2010). "Generation, isolation, and maintenance of human mast cells and mast cell lines derived from peripheral blood or cord blood." Curr Protoc Immunol **Chapter 7**: Unit 7 37.
- Rao, N., A. K. Ghosh, et al. (2001). "The non-receptor tyrosine kinase Syk is a target of Cbl-mediated ubiquitylation upon B-cell receptor stimulation." EMBO J **20**(24): 7085-7095.

- Ratajczak, M. Z., D. Perrotti, et al. (1998). "Myb and ets proteins are candidate regulators of c-kit expression in human hematopoietic cells." Blood **91**(6): 1934-1946.
- Ray, P., N. Krishnamoorthy, et al. (2010). "Signaling of c-kit in dendritic cells influences adaptive immunity." Ann N Y Acad Sci **1183**: 104-122.
- Reinhard, C., B. Meyer, et al. (2005). "Genomewide linkage analysis identifies novel genetic Loci for lung function in mice." Am J Respir Crit Care Med **171**(8): 880-888.
- Reith, A. D., C. Ellis, et al. (1991). "Signal transduction by normal isoforms and W mutant variants of the Kit receptor tyrosine kinase." EMBO J **10**(9): 2451-2459.
- Ren, R., B. J. Mayer, et al. (1993). "Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site." Science **259**(5098): 1157-1161.
- Repetto, B., G. Bandara, et al. (1996). "Functional contributions of the FcepsilonRIalpha and FcepsilonRIgamma subunit domains in FcepsilonRI-mediated signaling in mast cells." J Immunol **156**(12): 4876-4883.
- Reuter, S., A. Heinz, et al. (2008). "Mast cell-derived tumour necrosis factor is essential for allergic airway disease." Eur Respir J **31**(4): 773-782.
- Riccaboni, M., I. Bianchi, et al. (2010). "Spleen tyrosine kinases: biology, therapeutic targets and drugs." Drug Discov Today **15**(13-14): 517-530.
- Rivera, J. (2002). "Molecular adapters in Fc(epsilon)RI signaling and the allergic response." Curr Opin Immunol **14**(6): 688-693.
- Rivera, J. (2005). "NTAL/LAB and LAT: a balancing act in mast-cell activation and function." Trends Immunol **26**(3): 119-122.

- Rivera, J., J. R. Cordero, et al. (2002). "Macromolecular protein signaling complexes and mast cell responses: a view of the organization of IgE-dependent mast cell signaling." Mol Immunol **38**(16-18): 1253-1258.
- Rivera, J., N. A. Fierro, et al. (2008). "New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE." Adv Immunol **98**: 85-120.
- Rivera, J. and A. M. Gilfillan (2006). "Molecular regulation of mast cell activation." J Allergy Clin Immunol **117**(6): 1214-1225; quiz 1226.
- Ronnstrand, L. (2004). "Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit." Cell Mol Life Sci **61**(19-20): 2535-2548.
- Rosnet, O., S. Marchetto, et al. (1991). "Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family." Oncogene **6**(9): 1641-1650.
- Rossman, K. L., C. J. Der, et al. (2005). "GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(2): 167-180.
- Roth, K., W. M. Chen, et al. (2008). "Positive and negative regulatory mechanisms in high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **56**(6): 385-399.
- Rubin, B. P., M. C. Heinrich, et al. (2007). "Gastrointestinal stromal tumour." Lancet **369**(9574): 1731-1741.
- Rubin, B. P., S. Singer, et al. (2001). "KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors." Cancer Res **61**(22): 8118-8121.
- Russell, E. S. (1979). "Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists." Adv Genet **20**: 357-459.

- Ryan, J. J., H. Huang, et al. (1997). "Stem cell factor activates STAT-5 DNA binding in IL-3-derived bone marrow mast cells." Exp Hematol **25**(4): 357-362.
- Saborit-Villarroya, I., J. M. Del Valle, et al. (2005). "The adaptor protein 3BP2 binds human CD244 and links this receptor to Vav signaling, ERK activation, and NK cell killing." J Immunol **175**(7): 4226-4235.
- Saborit-Villarroya, I., A. Martinez-Barriocanal, et al. (2008). "The adaptor 3BP2 activates CD244-mediated cytotoxicity in PKC- and SAP-dependent mechanisms." Mol Immunol **45**(12): 3446-3453.
- Sada, K., S. M. Miah, et al. (2002). "Regulation of FcepsilonRI-mediated degranulation by an adaptor protein 3BP2 in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells." Blood **100**(6): 2138-2144.
- Sada, K., J. Zhang, et al. (2000). "Point mutation of a tyrosine in the linker region of Syk results in a gain of function." J Immunol **164**(1): 338-344.
- Sada, K., J. Zhang, et al. (2001). "SH2 domain-mediated targeting, but not localization, of Syk in the plasma membrane is critical for FcepsilonRI signaling." Blood **97**(5): 1352-1359.
- Saitoh, S., R. Arudchandran, et al. (2000). "LAT is essential for Fc(epsilon)RI-mediated mast cell activation." Immunity **12**(5): 525-535.
- Saitoh, S., S. Odom, et al. (2003). "The four distal tyrosines are required for LAT-dependent signaling in FcepsilonRI-mediated mast cell activation." J Exp Med **198**(5): 831-843.
- Sayed, B. A., A. Christy, et al. (2008). "The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance." Annu Rev Immunol **26**: 705-739.

- Sayos, J., M. Martin, et al. (2001). "Cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP." Blood **97**(12): 3867-3874.
- Scott, G., J. Ewing, et al. (1994). "Stem cell factor regulates human melanocyte-matrix interactions." Pigment Cell Res **7**(1): 44-51.
- Scheinfeld, N. (2006). "A comprehensive review of imatinib mesylate (Gleevec) for dermatological diseases." J Drugs Dermatol **5**(2): 117-122.
- Schneider, L. A., S. M. Schlenner, et al. (2007). "Molecular mechanism of mast cell mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin." J Exp Med **204**(11): 2629-2639.
- Schwartz, L. B. (2004). "Effector cells of anaphylaxis: mast cells and basophils." Novartis Found Symp **257**: 65-74; discussion 74-69, 98-100, 276-185.
- Schwartz, L. B., J. W. Yunginger, et al. (1989). "Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis." J Clin Invest **83**(5): 1551-1555.
- Sekido, Y., Y. Obata, et al. (1991). "Preferential expression of c-kit protooncogene transcripts in small cell lung cancer." Cancer Res **51**(9): 2416-2419.
- Serve, H., Y. C. Hsu, et al. (1994). "Tyrosine residue 719 of the c-kit receptor is essential for binding of the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for c-kit-associated PI 3-kinase activity in COS-1 cells." J Biol Chem **269**(8): 6026-6030.
- Shahlaee, A. H., S. Brandal, et al. (2007). "Distinct and shared transcriptomes are regulated by microphthalmia-associated transcription factor isoforms in mast cells." J Immunol **178**(1): 378-388.

- Shukla, U., T. Hatani, et al. (2009). "Tyrosine phosphorylation of 3BP2 regulates B cell receptor-mediated activation of NFAT." J Biol Chem **284**(49): 33719-33728.
- Silverman, M. A., J. Shoag, et al. (2006). "Disruption of SLP-76 interaction with Gads inhibits dynamic clustering of SLP-76 and FcepsilonRI signaling in mast cells." Mol Cell Biol **26**(5): 1826-1838.
- Siraganian, R. P. (2003). "Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor." Curr Opin Immunol **15**(6): 639-646.
- Smrz, D., G. Bandara, et al. (2013). "Prevention of F-actin assembly switches the response to SCF from chemotaxis to degranulation in human mast cells." Eur J Immunol **43**(7): 1873-1882.
- Soriano, P., C. Montgomery, et al. (1991). "Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice." Cell **64**(4): 693-702.
- Steinhoff, M., U. Neisius, et al. (2003). "Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin." J Neurosci **23**(15): 6176-6180.
- Stephens, L., K. Anderson, et al. (1998). "Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B." Science **279**(5351): 710-714.
- Stoffler, H. E. and M. Bahler (1998). "The ATPase activity of Myr3, a rat myosin I, is allosterically inhibited by its own tail domain and by Ca<sup>2+</sup> binding to its light chain calmodulin." J Biol Chem **273**(23): 14605-14611.
- Sun, J., M. Pedersen, et al. (2008). "Gab2 is involved in differential phosphoinositide 3-kinase signaling by two splice forms of c-Kit." J Biol Chem **283**(41): 27444-27451.



- Sun, L., J. Lee, et al. (2004). "Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury." J Clin Invest **113**(9): 1364-1374.
- Taghon, T., M. A. Yui, et al. (2007). "Mast cell lineage diversion of T lineage precursors by the essential T cell transcription factor GATA-3." Nat Immunol **8**(8): 845-855.
- Takai, T., M. Li, et al. (1994). "FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects." Cell **76**(3): 519-529.
- Takayanagi, H. (2007). "The role of NFAT in osteoclast formation." Ann N Y Acad Sci **1116**: 227-237.
- Taki, T., M. Akiyama, et al. (2005). "The MYO1F, unconventional myosin type 1F, gene is fused to MLL in infant acute monocytic leukemia with a complex translocation involving chromosomes 7, 11, 19 and 22." Oncogene **24**(33): 5191-5197.
- Tamborini, E., L. Bonadiman, et al. (2004). "A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient." Gastroenterology **127**(1): 294-299.
- Tamir, I., J. C. Stolpa, et al. (2000). "The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory Fc gamma RIIB signals in B cells." Immunity **12**(3): 347-358.
- Tanaka, S., M. Amling, et al. (1996). "c-Cbl is downstream of c-Src in a signalling pathway necessary for bone resorption." Nature **383**(6600): 528-531.
- Teitelbaum, S. L. and F. P. Ross (2003). "Genetic regulation of osteoclast development and function." Nat Rev Genet **4**(8): 638-649.

- Thakurdas, S. M., E. Melicoff, et al. (2007). "The mast cell-restricted tryptase mMCP-6 has a critical immunoprotective role in bacterial infections." J Biol Chem **282**(29): 20809-20815.
- Thommes, K., J. Lennartsson, et al. (1999). "Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit/stem cell factor receptor." Biochem J **341** ( Pt 1): 211-216.
- Tkaczyk, C., M. A. Beaven, et al. (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**(48): 48474-48484.
- Tkaczyk, C., V. Horejsi, et al. (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**(1): 207-214.
- Tkaczyk, C., D. D. Metcalfe, et al. (2002). "Determination of protein phosphorylation in Fc epsilon RI-activated human mast cells by immunoblot analysis requires protein extraction under denaturing conditions." J Immunol Methods **268**(2): 239-243.
- Toru, H., M. Eguchi, et al. (1998). "Interleukin-4 promotes the development of tryptase and chymase double-positive human mast cells accompanied by cell maturation." Blood **91**(1): 187-195.
- Trieselmann, N. Z., J. Soboloff, et al. (2003). "Mast cells stimulated by membrane-bound, but not soluble, steel factor are dependent on phospholipase C activation." Cell Mol Life Sci **60**(4): 759-766.

- Tsujimura, T., E. Morii, et al. (1996). "Involvement of transcription factor encoded by the mi locus in the expression of c-kit receptor tyrosine kinase in cultured mast cells of mice." Blood **88**(4): 1225-1233.
- Tumova, M., A. Koffer, et al. (2010). "The transmembrane adaptor protein NTAL signals to mast cell cytoskeleton via the small GTPase Rho." Eur J Immunol **40**(11): 3235-3245.
- Turner, H. and D. A. Cantrell (1997). "Distinct Ras effector pathways are involved in Fc epsilon R1 regulation of the transcriptional activity of Elk-1 and NFAT in mast cells." J Exp Med **185**(1): 43-53.
- Ueki, Y., C. Y. Lin, et al. (2007). "Increased myeloid cell responses to M-CSF and RANKL cause bone loss and inflammation in SH3BP2 "cherubism" mice." Cell **128**(1): 71-83.
- Ueki, Y., V. Tiziani, et al. (2001). "Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism." Nat Genet **28**(2): 125-126.
- Urtz, N., A. Olivera, et al. (2004). "Early activation of sphingosine kinase in mast cells and recruitment to FcepsilonRI are mediated by its interaction with Lyn kinase." Mol Cell Biol **24**(19): 8765-8777.
- Valk, E., R. Leung, et al. (2006). "T cell receptor-interacting molecule acts as a chaperone to modulate surface expression of the CTLA-4 coreceptor." Immunity **25**(5): 807-821.
- van der Geer, P. and T. Pawson (1995). "The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction." Trends Biochem Sci **20**(7): 277-280.
- Vanhaesebroeck, B. and D. R. Alessi (2000). "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." Biochem J **346 Pt 3**: 561-576.

- Verstovsek, S. (2013). "Advanced systemic mastocytosis: the impact of KIT mutations in diagnosis, treatment, and progression." Eur J Haematol **90**(2): 89-98.
- Verweij, J., P. G. Casali, et al. (2004). "Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial." Lancet **364**(9440): 1127-1134.
- Vig, M., A. Beck, et al. (2006). "CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel." Curr Biol **16**(20): 2073-2079.
- Vig, M., C. Peinelt, et al. (2006). "CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry." Science **312**(5777): 1220-1223.
- Vliagoftis, H. and A. D. Befus (2005). "Mast cells at mucosal frontiers." Curr Mol Med **5**(6): 573-589.
- Vliagoftis, H. and A. D. Befus (2005). "Rapidly changing perspectives about mast cells at mucosal surfaces." Immunol Rev **206**: 190-203.
- Volna, P., P. Lebduska, et al. (2004). "Negative regulation of mast cell signaling and function by the adaptor LAB/NTAL." J Exp Med **200**(8): 1001-1013.
- Vonakis, B. M., H. Haleem-Smith, et al. (2001). "Interaction between the unphosphorylated receptor with high affinity for IgE and Lyn kinase." J Biol Chem **276**(2): 1041-1050.
- Wehrle-Haller, B. (2003). "The role of Kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis." Pigment Cell Res **16**(3): 287-296.
- Weilbaecher, K. N., G. Motyckova, et al. (2001). "Linkage of M-CSF signaling to Mitf, TFE3, and the osteoclast defect in Mitf(mi/mi) mice." Mol Cell **8**(4): 749-758.

- Weiler, S. R., S. Mou, et al. (1996). "JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor." Blood **87**(9): 3688-3693.
- Welle, M. (1997). "Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase." J Leukoc Biol **61**(3): 233-245.
- Witte, O. N. (1990). "Steel locus defines new multipotent growth factor." Cell **63**(1): 5-6.
- Wu, J. N. and G. A. Koretzky (2004). "The SLP-76 family of adapter proteins." Semin Immunol **16**(6): 379-393.
- Wu, X., A. C. Myers, et al. (2006). "Localization of nerve growth factor and its receptors in the human nasal mucosa." J Allergy Clin Immunol **118**(2): 428-433.
- Xie, Z. H., I. Ambudkar, et al. (2002). "The adapter molecule Gab2 regulates Fc epsilon RI-mediated signal transduction in mast cells." J Immunol **168**(9): 4682-4691.
- Yamamoto, K., A. Tojo, et al. (1993). "Characterization of the promoter region of the human c-kit proto-oncogene." Jpn J Cancer Res **84**(11): 1136-1144.
- Yamashita, T., S. Y. Mao, et al. (1994). "Aggregation of the high-affinity IgE receptor and enhanced activity of p53/56lyn protein-tyrosine kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 11251-11255.
- Yamashita, T., R. Suzuki, et al. (2008). "Differential dephosphorylation of the FcRgamma immunoreceptor tyrosine-based activation motif tyrosines with dissimilar potential for activating Syk." J Biol Chem **283**(42): 28584-28594.
- Yang, Q. and K. L. Guan (2007). "Expanding mTOR signaling." Cell Res **17**(8): 666-681.

- Yarden, Y., W. J. Kuang, et al. (1987). "Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand." EMBO J **6**(11): 3341-3351.
- Yeromin, A. V., S. L. Zhang, et al. (2006). "Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai." Nature **443**(7108): 226-229.
- Young, R. M., D. Holowka, et al. (2003). "A lipid raft environment enhances Lyn kinase activity by protecting the active site tyrosine from dephosphorylation." J Biol Chem **278**(23): 20746-20752.
- Yu, M., C. A. Lowell, et al. (2006). "Scaffolding adapter Grb2-associated binder 2 requires Syk to transmit signals from FcepsilonRI." J Immunol **176**(4): 2421-2429.
- Yu, M., J. Luo, et al. (2006). "The scaffolding adapter Gab2, via Shp-2, regulates kit-evoked mast cell proliferation by activating the Rac/JNK pathway." J Biol Chem **281**(39): 28615-28626.
- Yu, Z., M. Maoui, et al. (2006). "SHP-1 dephosphorylates 3BP2 and potentially downregulates 3BP2-mediated T cell antigen receptor signaling." FEBS J **273**(10): 2195-2205.
- Yuzawa, S., Y. Opatowsky, et al. (2007). "Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor." Cell **130**(2): 323-334.
- Zakaria, S., T. S. Gomez, et al. (2004). "Differential regulation of TCR-mediated gene transcription by Vav family members." J Exp Med **199**(3): 429-434.
- Zhang, J., E. Berenstein, et al. (2002). "Phosphorylation of Tyr342 in the linker region of Syk is critical for Fc epsilon RI signaling in mast cells." Mol Cell Biol **22**(23): 8144-8154.

- Zhang, J., E. H. Berenstein, et al. (1996). "Transfection of Syk protein tyrosine kinase reconstitutes high affinity IgE receptor-mediated degranulation in a Syk-negative variant of rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells." J Exp Med **184**(1): 71-79.
- Zhang, J., T. Kimura, et al. (1998). "Mutations in the activation loop tyrosines of protein tyrosine kinase Syk abrogate intracellular signaling but not kinase activity." J Immunol **161**(8): 4366-4374.
- Zhang, Z., R. Zhang, et al. (2000). "Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 7732-7737.
- Zheng, W. and R. A. Flavell (1997). "The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells." Cell **89**(4): 587-596.
- Zhu, M., Y. Liu, et al. (2004). "Positive and negative regulation of FcepsilonRI-mediated signaling by the adaptor protein LAB/NTAL." J Exp Med **200**(8): 991-1000.
- Zhu, M., S. Shen, et al. (2005). "Cutting Edge: Localization of linker for activation of T cells to lipid rafts is not essential in T cell activation and development." J Immunol **174**(1): 31-35.
- Zhu, W. M., W. F. Dong, et al. (1994). "Alternate splicing creates two forms of the human kit protein." Leuk Lymphoma **12**(5-6): 441-447.

# VIII. ANNEX





# 1. IDENTIFICACIÓ DE LLIGANDS DEL 3BP2

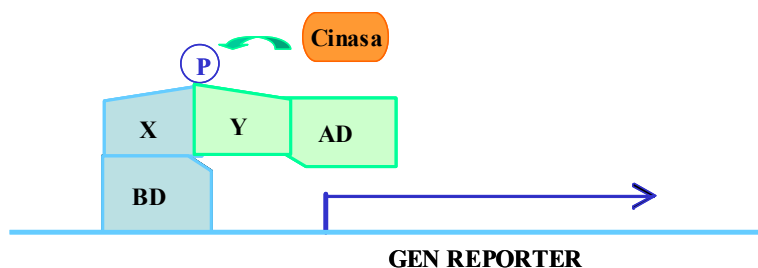
## 1.1 Fonaments de la Tècnica del Triple Híbrid

Per poder identificar nous lligands de 3BP2 utilitzem la tècnica del triple híbrid. Es tracta d'un sistema que permet detectar interaccions directes proteiques in vivo en llevats, mitjançant la proteïna reguladora Gal 4. Aquesta proteïna està formada per dues subunitats; una d'unió al DNA (BD) i una d'activació (AD) de la transcripció.

En els sistema del doble híbrid, un vector codifica per la proteïna (X) en pauta de lectura amb el BD del Gal 4 (en el nostre cas vector pBridge) i un altre vector transcriu una altre proteïna (Y) fusionada amb l'AD del Gal 4 (vector pGAD). Si ambdues proteïnes X i Y estan interaccionant les subunitats del Gal 4 quedaran prou pròximes com per activar la transcripció dels gens reporters. El BD reconeix seqüències consens UAS a 5' (seqüències activadores pròximes) i l'AD activa la RNA polimerasa III per tal que transcrigui els gens reporters.

Aquest sistema es pot utilitzar per cribar una llibreria, per detectar interaccions directes entre proteïnes no conegudes amb una proteïna coneguda. També és útil per testar possibles interaccions directes entre dues proteïnes conegudes.

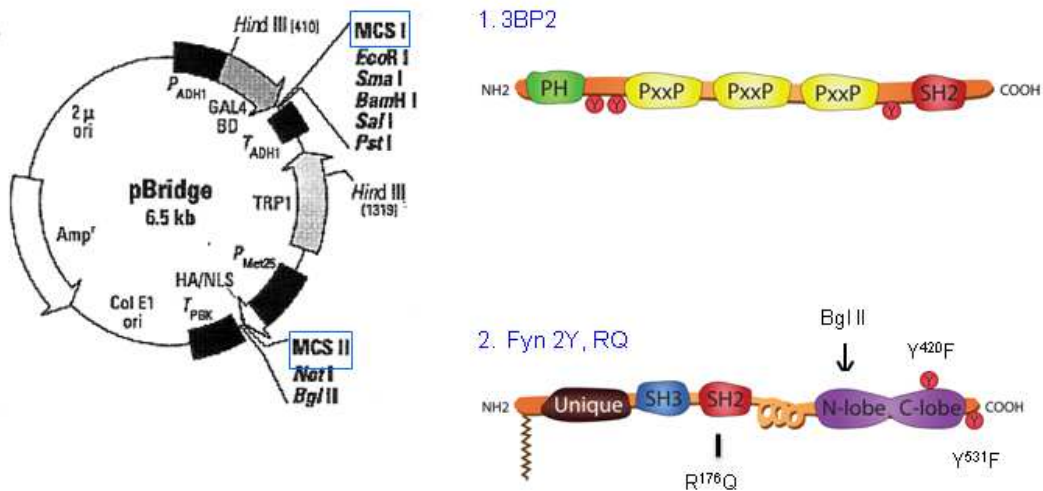
El sistema del triple híbrid, permet la incorporació d'un tercer element, en el nostre cas el plàsmid que conté el BD permet el clonatge d'una cinasa, així es podran determinar interaccions dependents de fosforilació (figura 1).



**Figura 1. Diagrama esquemàtic del sistema del triple híbrid.** El clonatge de la cinasa permet detectar interaccions dependents de fosforilació entre la proteïna X i Y que en el sistema del doble híbrid no es detectarien, ja que en aquest cas no hi hauria l'activitat cinasa. Quan ambdues proteïnes interaccionen els dominis BD i AD estan prou pròxims com per activar el gen reporter.

El plàsmid pBridge és un vector bicistrònic que ens permet el clonatge de dues molècules; en un primer MCS (lloc múltiple de clonatge) es va clonar la proteïna adaptadora 3BP2 en el laboratori, en l'altre MCS es troba la cinasa Fyn (Sayos, Martin et al. 2001). L'expressió d'aquesta ve controlada per un promotor reprimible en metionina per tant en un medi deficient en aquest aminoàcid el gen de la cinasa es transcriurà. L'activitat completa de la cinasa Fyn és tòxica pel llevat, ja que hi hauria una hiperfosforilació; la mutació de les tirosines reguladores 420 i 531 a fenilalanines permet una atenuació de l'activitat cinasa. Per altra banda la mutació de l'arginina 176 per una glutamina en el domini SH2 de Fyn, evitarà que la cinasa s'uneixi a les tirosines que acaba de fosforilar; això evitaria detectar interaccions amb les altres proteïnes (figura 2). També es pot treballar amb Fyn catalíticament inactiu, si es tracta el vector pBridge amb BgIII, es relliga i es purifica.

A més, el vector pBridge presenta el gen per l'aminoàcid triptòfan la qual cosa permetrà a la cèl·lula transfectada créixer en un medi deficient en aquest aminoàcid.

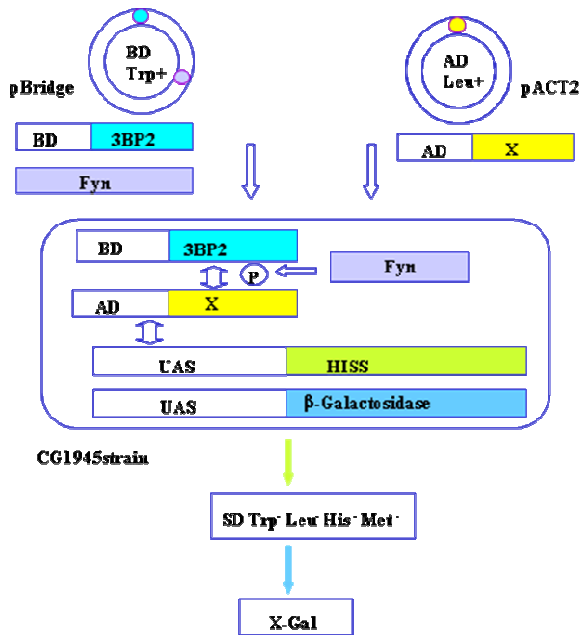


**Figura 2. Característiques del vector pBridge.** Aquest vector presenta dos punts de clonatge múltiple MCS I amb la proteïna 3BP2 i el MCS II amb Fyn. També es mostra l'estructura de Fyn modificada corresponentment.

L'altre plàsmid, pACT2, té un únic punt de clonatge on hi ha insertat fragments de la llibreria o proteïnes ja conegudes fusionades amb l'AD del Gal 4. Aquest plàsmid també permet créixer en un medi deficient per la leucina. També es poden utilitzar altres plàsmids com pGAD.

La soca de llevat usada és la CG1945 (*Sacharomices cerevisiae*), que pot créixer en un medi lliure de metionina i així activar la cinasa Fyn. Permet dos sistemes de cribatge mitjançant els dos gens reporters que té. El gen HISS que transcriu per la histidina és activable pel Gal 4, tot i que té certa activitat basal constitutiva que es pot bloquejar amb el 3-AT. Per altra banda, el gen LacZ, que només és activable pel Gal 4, codifica per l'enzim  $\beta$ -galactosidasa. La construcció 3BP2-BD en pBridge es va transformar en el la soca de llevat CG1945 i es va seleccionar en una placa de  $-Trp/-Met$ . Els llevats que van créixer, es van cotransformar amb la llibreria de cDNA provinent del moll de l'ós de Clontech (La llibreria està clonada en plàsmids pACT2 amb un total de  $3.5 \times 10^6$  clons independents). Si el 3BP2 interacciona amb alguna proteïna X de la llibreria en presència de Fyn, s'activaran

els dos gens reporters de  $\beta$ -galactosidasa i d'histidina (HISS). Aquesta interacció es selecciona en primera instància, per la capacitat que té de créixer el clon en un medi  $-Trp/-Leu/-His/-Met$  en presència de 3-AT. Seguidament es fa assaig enzimàtic on es determina l'activitat de la  $\beta$ -galactosidasa fent ús dels substrat X-gal (determinació qualitativa) o ONPG (determinació quantitativa) donant lloc a un producte colorat (blau o groc respectivament) que es determina amb l'espectrofotometre a OD450.



**Figura 3. Representació esquemàtica del sistema del triple híbrid en llevats.** La proteïna 3BP2 en presència de Fyn actiu (clonats en pBridge) interacciona directament amb la proteïna X de la llibreria (clonada en pACT2). Aquesta interacció permet l'activació dels dos gens reporters HISS (selecció nutricional) i  $\beta$ -galactosidasa (selecció enzimàtica)

## 1.2 Resultats obtinguts amb la cribatge del triple híbrid amb una llibreria de moll d'os.

Mitjançant aquest sistema del triple híbrid utilitzant la cinasa Fyn i l'ús d'una llibreria d'expressió de cDNA de medul·la òssia humana, s'han identificat dos clons positius, que mitjançant el BLAST es van identificar com:

EL clon 18a, corresponent al domini SH2 de la proteïna Vav.



5'CATGACTTCCAGATGTTCTCCTTTGAGGAGACCACATCCTGCAAGGCCTGTCAGATGCTGCTT  
 AGAGGTACCTTCTATCAGGGCTACCGCTGCCATCGGTGCCGGGCATCTGCACACAAGGAGTGT  
 CTGGGGAGGGTCCCTCCATGTGGCCGACATGGGCAAGATTTCCAGGAACTATGAAGAAGGAC  
 AAACTACATCGCAGGGCTCAGGACAAAAAGAGGAATGAGCTGGGTCTGCCCAAGATGGAGGTG  
 TTTCAGGAATACTACGGGCTTCTCCACCCCCTGGAGCCATTGGACCCTTTCTACGGCTCAACC  
 CTGGAGACATTGTGGAGCTCACGAAGGCTGAGGCTGAACAGAACTGGTGGGAGGGCAGAAATA  
 CATCTACTAATGAAATTGGCTGGTTTCTTGTAAACAGGGTGAAGCCCTATGTCCATGGCCCTCCT  
 CAGGACCTGTCTGTTTCTCTGGTACGCAGGCCCATGGAGCGGGCAGGGGCAGAGAGCAT  
 CCTGGCCAACCGCTCGGACGGGACTTTCTTGGTGCGGCAGAGGGTGAAGGATGCAGCAGAA  
 TTTGCCATCAGCATTAAATATAAACGTGAGGTCAAGCACATTAATAATCATGACCAGCAGAGGAC  
 TGTACCCGGATCACAGAGAAAAAGCTTTTCCGGGGCTTATGGAGCTGGTGGAGTTTACCAG  
 CAGAACTCTCTACAGGATTGCTTTC 3'

El clon 4a, corresponent al domini SH3 de la proteïna Myo1f.

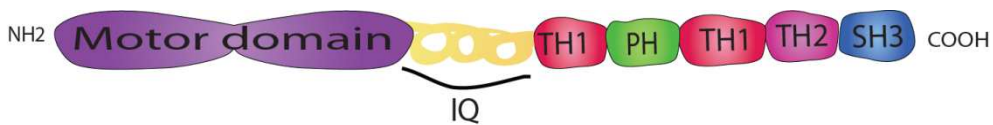


5'GCAGTGCTCAAGGTTGGCGGTCCGACCCTCACGGTCAGCGTGGGCGATGGGCTGCCCAAGA  
 GCTCCAAGCCTACGCGGAAGGGAATGGCCAAGGGAAAACCTCGGAGGTCGTCCCAAGCCCCT  
 ACCCGGGCGGCCCTGCGCCCCCAGAGGCATGGATCGCAATGGGGTGGCCCCCTCTGCCAG  
 AGGGGGCCCCCTGCCCTGGAGATCATGTCTGGAGGGGGCACCCACAGGCCTCCCCGGGGC  
 CCTCCGTCCACATCCCTGGGAGCCAGCAGACGACCCCGGGCACGTCCGCCCTCAGAGCACAA  
 CACAGAATTCCTCAACGTGCCTGACCAGGGCATGGCCGGCATGCAGAGGAAGCGCAGCGTGG  
 GGCAACGGCCAGTGCCTGGTGTGGGCCGACCCAAGCCCCAGCCTCGGACACATGGTCCCAGG  
 TGCCGGGCCCTATAACCAGTACGTGGGCCAAGATGTGGACGAGCTGAGCTTCAACGTGAACGAG  
 GTCATTGAGATCCTCATGGAAGATCCCTCGGGCTGGTGAAGGGCCGGCTTACGGCCAGGA  
 GGGCCTTTTCCAGGAACTACGTGGAGAAGATCTGAGCTGGGCCCTGGGATACTGCCTTCTC  
 TTTCCCGCCCTATCTGCCTGCCGGCCTGGTGGGGAGCCAGGCCCTGCCAATGAGAGCCTCG  
 TTTACCTGGGCTGCAATAGCCTAAAAGTCCAGTCCTTTGGCCTCCAGTCCTGCCAGGCCCTGG

GTCACCAGGTCAGTCTGCTGCAGCCCCGCCCTGGGCCCTGGTCTTCCTCCAaCATCACACCTGC  
TGCCCATCTCCATTCTGTGTGTGTCAAAGGGGGACTAACAGCAGAAA 3'

Myo1f és una miosina de cadena llarga de classe I, aquesta proteïna s'expressa majoritàriament en el sistema immune com teixits limfoides, cèl·lules Natural Killer (NK), macròfags, neutròfils i cèl·lules dendrítiques (Kim, Mehal et al. 2006). El gen Myo1f es troba en el cromosoma 19 ( 19p13.3 - p13.2 ) (Hasson, Skowron et al. 1996). El cDNA d'aquesta proteïna es va identificar per primera vegada en l'espècie porcina i en línies cel·lulars humanes per Bement W. al 1994 (Bement, Hasson et al. 1994).

Les miosines són proteïnes petites motores que es caracteritzen per tenir la capacitat d'unir-se simultàniament als filaments d'actina i a les membranes cel·lulars. Donada la seva capacitat per generar força mecànica, i la seva alta prevalença en molts tipus de cèl·lules, aquestes molècules estan en bona posició per dur a terme diverses funcions biològiques importants en la interfase de la membrana i el citoesquelet d'actina com l'endocitosi, exocitosi, l'alliberament de vesícules extracel·lulars, i la regulació de la tensió entre la membrana i el citoesquelet (McConnell and Tyska 2010).



**Figura 4. Esquema de l'estructura del Myo1f.** Representació gràfica de l'arquitectura del Myo1f indicant els dominis estructurals. Basat en el model de McConnell i Tyska, 2010.

Tots les miosines de tipus 1 comparteixen una disposició estructural comú, amb un domini globular N-terminal del motor (lila), és la responsable del unió a l'actina i la hidròlisi d'ATP, que està connectat a una cua d'unió a la membrana (vermell) per una regió de coll -  $\alpha$  helicoïdal (groc) que s'hi uneix entre 1-6 cadenes lleugeres de calmodulina (CaM). Entre les diferents classes de miosina 1, el

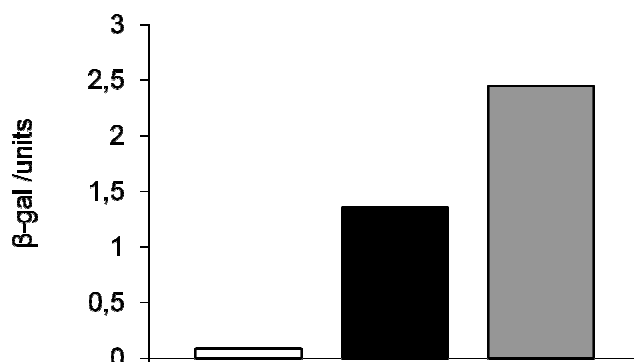
domini més variable és la regió del coll, amb diferents còpies de motius IQ (els motius d'unió a calmodulina-IQ són unitats bàsiques d'uns 23 aminoàcids, que segueixen generalment una seqüència consensuada que conté la següent seqüència: [FILV] Qxxx [RK] Gxxx [RK] XX [FILVWY] (Lin, Tang et al. 2005). I també l'existència o no de dominis addicionals que podrien intervenir interaccions amb l'actina independents d'ATP (TH2/GPA) (Stoffler and Bahler 1998) i dirigir la unió a altres proteïnes (SH3) (Krendel, Osterweil et al. 2007).

Amb l'obtenció del ratolí genoanul·lat s'ha observat que la deficiència d'aquesta molècula provoca una major adhesió cel·lular, disminució de la motilitat resultat d'una adhesió més forta als lligands de  $\beta$ 2-integrina i un augment en la susceptibilitat a la infecció amb *listeria monocitogenes* (Kim, Mehal et al. 2006).

La leucèmia monocítica aguda infantil (AmoL) presenta varies translocacions on estan involucrats els cromosomes 7, 11, 19 i 22. S'ha identificat que el gen MLL present en el cromosoma 11 es fusiona amb el gen del Myo1f present al cromosoma 19. En aquesta proteïna de fusió conté gairebé tota la proteïna Myo1f, excepte part de la cua COOH-terminal (Taki, Akiyama et al. 2005).

Per comprovar que hi ha interacció entre 3BP2 i Myo1f vam repetir el triple híbrid, transformant els llevats amb els plàsmids Myo1f pACT2 (clon trobat de la llibreria) i 3BP2 pBridge, utilitzant com a control positiu Vav (clon trobat de la llibreria) i com a control negatiu el vector pACT2 buit. Vam portar a terme un assaig semiquantitatiu d'activitat  $\beta$ -galactosidasa, on es va detectar activitat  $\beta$ -galactosidasa en les transformacions 3BP2-Myo1f i 3BP2-Vav però no en els control negatiu amb el vector buit (figura 5).



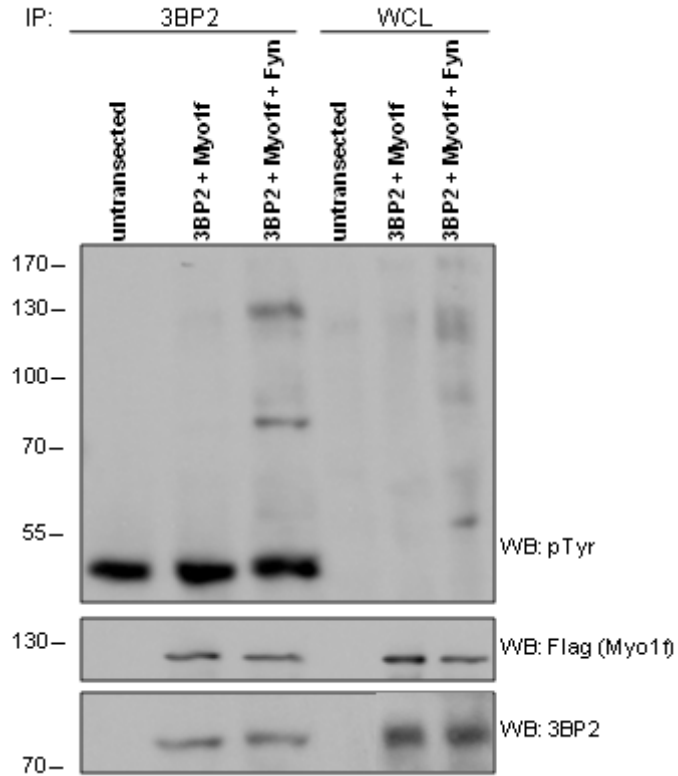


pACT2∅	+	-	-
pBridge 3BP2	+	+	+
pACT2Myo1f	-	+	-
pACT2VAV	-	-	+

**Figura 5. Myo1f and Vav interaccionen amb 3BP2 en llevats.** Procedim a fer la tècnica del triple híbrid utilitzant les seqüències de Myo1f i Vav clonades en pACT2, 3BP2 clonat en pBridge i el vector pACT2 buit, fem transfeccions en llevat, i realitzem un assaig semiquantitatiu d'activitat de  $\beta$ -galactosidasa.

La interacció Vav-3BP2 ja havia estat reportada anteriorment amb la tècnica del doble híbrid amb el sistema de LexA i en cèl·lules COS transfectades (Foucault, Le Bras et al. 2005) i també en cèl·lules YT transfectades (Saborit-Villarroya, Del Valle et al. 2005).

Per tal de corroborar la interacció novell de 3BP2 y Myo1f en cèl·lules de mamífer i donada la inexistència de bons anticossos per reconèixer la proteïna endògena en el següent estudi, es va comprar la proteïna clonada en un plàsmid on hi incorporava una tag (Flag). Després de transfectar les cèl·lules 3BP2, Myo1f i Fyn, les cultivem i, procedim a immunoprecipitar els llisats obtinguts amb l'anticòs anti-3BP2 (Figura 6).

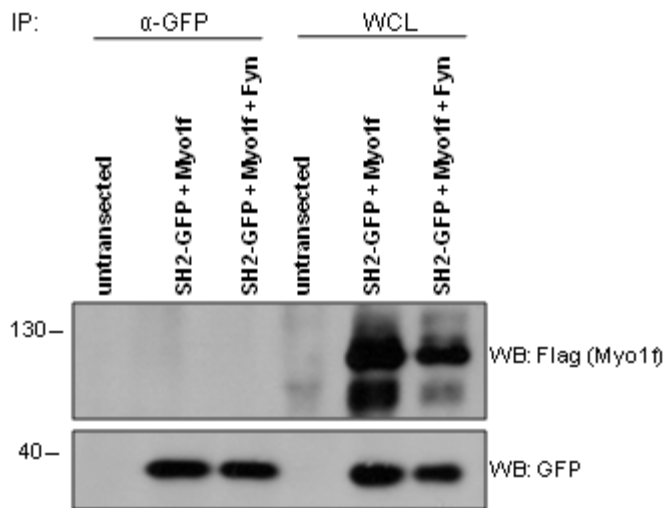


**Figura 6. Interacció del 3BP2 amb Myo1f en cèl·lules COS transfectades.** Cèl·lules COS han estat transfectades pel sistema d'amaxa amb diferents plàsmids (en la primera transfecció hi ha els plàsmids 3BP2 i Myo1f i en la segona a part de 3BP2 i Myo1f afegim Fyn). 24h després de la transfecció, les cèl·lules es van llisar i immunoprecipitar amb l'anticòs anti-3BP2. Posteriorment, es va córrer un gel SDS-PAGE al 8% i transferir a una membrana de PVDF, que es va incubar amb diferents anticossos: anti-tirosines fosforilades, anti-3BP2 i anti-Flag (per detectar el Myo1f).

Després de la incubació amb l'anticòs anti-tirosines fosforilades, apareixen dues bandes, això indica que dues proteïnes han precipitat amb el 3BP2. Després de la incubació amb els anticossos 3BP2 i Flag confirmem que les bandes que apareixen immunoprecipitades corresponen a Myo1f (120kDa) i 3BP2 (80kDa).

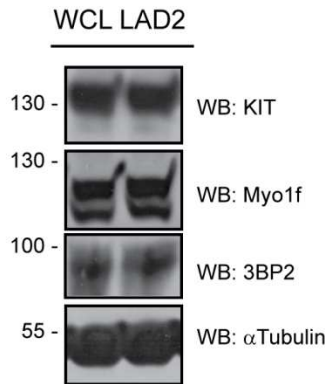
Que apareguin tan 3BP2 com Myo1f en les dues transfeccions indica que, tan en condicions d'absència o presència de Fyn, 3BP2 i Myo1f coprecipiten, és a dir, que la seva unió és independent de fosforilació.

Fent ús de les construccions SH2 del 3BP2 clonada en el vector GFP i el vector GFP buit com a control varem transfectar cèl·lules COS, lliar i immunoprecipitar amb el anti-GFP seguint el protocol mencionat a dalt. Els nostres resultats mostren que el domini SH2 de 3BP2 no està involucrat en la interacció d'ambdues proteïnes (Figura 7).



**Figura 7. La interacció del 3BP2 amb Myo1f no és a través del domini SH2.** Cèl·lules COS han estat transfectades pel sistema d'amaxa amb diferents plàsmids (en la primera transfecció hi ha els plàsmids SH2(3BP2)EGFP i Myo1f i en la segona, a part de SH2(3BP2)EGFP i Myo1f afegim Fyn). 24h després de la transfecció, les cèl·lules es van lliar i immunoprecipitar amb l'anticòs anti-GFP. Posteriorment, es va córrer un gel SDS-PAGE al 8% i transferir a una membrana de PVDF, que es va incubar amb diferents anticossos: anti-GFP i anti-Flag (per detectar el Myo1f).

Se sap que Myo1f s'expressa majoritàriament en el sistema immune, però no s'ha comprovat si en mastòcits també s'expressa, per aquesta raó fem un llisat de cèl·lules LAD2 i mirem si Myo1f es expressat.



**Figura 8. Expressió de Myo1f en cèl·lules LAD2.** Llisem les cèl·lules i incubem amb diferents anticossos: anti-KIT, anti-3BP2, anti-Myo1f i anti- $\alpha$ Tubulina.

En resum, hem trobat que l'adaptador citoplasmàtic 3BP2 s'associa a la proteïna Myo1f. Creiem que aquesta interacció pot tenir un paper clau en la modulació de l'adhesió cel·lular i la motilitat en cèl·lules del sistema immune. El patró d'expressió del gen Myo1f, s'ha observat en els òrgans i components del sistema immune més importants com són teixits limfoides, cèl·lules NK, macròfags, cèl·lules dendrítiques, neutròfils (Kim, Mehal et al. 2006). S'ha demostrat que les cèl·lules dels ratolins deficientes en Myo1f presenten un augment anormal de l'adhesió i una reducció de la motilitat, degut a l'exposició permanent i desregulada de les integrines, concretament la  $\beta$ 2 a la superfície, fent que s'adhereixi i no permeti la motilitat dels neutròfil. In vivo, els ratolins deficientes en Myo1f mostren una major susceptibilitat a les infeccions i una alteració de la resposta dels neutròfils. La proteïna 3BP2 gestiona la diferenciació i activació de cèl·lules B, activació de cèl·lules T, la citotoxicitat causada per cèl·lules NK, també se sap que 3BP2 és una proteïna important per la migració cel·lular en neutròfils (Chen, Dimitriou et al. 2012). La interacció entre el Myo1f i 3BP2, podria atorga a 3BP2 un paper clau en la via de la motilitat de cèl·lules del sistema immune.

S'ha vist que KIT és un receptor implicat en la migració cel·lular (Okayama, Kawakami, 2006), 3BP2 s'ha reportat que en neutròfils és important per la migració cel·lular (Chen, Dimitriou et al. 2012), també en neutròfils, se sap que Myo1f és important per la motilitat (Kim, Mehal et al. 2006) i que hem mostrat que s'expressa en mastòcits, per tant podríem hipotetitzar que la migració de mastòcits podria venir regulada per l'activació de KIT, on intervindria 3BP2 que reclutaria Myo1f.

