UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

**SAMSN1: proteína adaptadora essencial na função de
mastócitos**

Ana Carolina Santana

Ribeirão Preto

2018

ANA CAROLINA SANTANA

SAMSN1: proteína adaptadora essencial na função de mastócitos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração:

Biologia Celular e Molecular

Ana Carolina Santana

Orientadora: Prof. Dra. Maria Célia Jamur

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FICHA CATALOGRÁFICA

Santana, Ana Carolina

SAMSN1: proteína adaptadora essencial na função de mastócitos

Ribeirão Preto, 2018

p. 101; il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Jamur, Maria Célia

1. Mastócitos
2. SAMSN1
3. *Homing*
4. Recrutamento
5. Migração

Santana, Ana Carolina

SAMSN1: proteína adaptadora essencial na função de mastócitos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular. Orientadora: Profa. Dra. Maria Célia Jamur.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*A todas as mulheres brasileiras, negras e pobres que lutam por um lugar de igualdade
na sociedade.*

*Em especial, dedico esta vitória à **mamãe Lourdes**, a mulher mais guerreira que tive a
chance de conhecer.*

AGRADECIMENTOS

“Onde houver ódio, que eu leve o amor. Onde houver ofensa, que eu leve o perdão. Onde houver discórdia, que eu leve a união. Onde houver dúvidas, que eu leve a fé. Onde houver erro, que eu leve a verdade. Onde houver desespero, que eu leve a esperança. Onde houver tristeza, que eu leve a alegria. Onde houver trevas, que eu leve a luz...”
(Trecho da Oração de São Francisco)

Aos **essenciais**, sou eternamente grata:

À **mamãe Lourdes**, que é e será essencial em todas as etapas da minha vida. Você é um exemplo de dedicação, perseverança e fé.

Ao meu noivo **Felipe**, agradeço o amor e companheirismo. Obrigada pelo incentivo e por todos os momentos que já vivemos e vamos viver juntos. **“Home is where our heart is”**.

Ao meu gatinho **Ollie**, pela “fofura” e amor incondicional. Por ser meu companheiro de madrugadas e pelos ronronos nos meus momentos de desespero.

Às minhas **orientadoras**:

À **Profa. Dra. Maria Célia Jamur**, pela oportunidade de conviver e aprender tanto. Me sinto honrada em ser sua orientada. Foi incrível partilhar de ciência e passar algumas horas sentada ao seu lado no microscópio. Muito obrigada!

À **Profa. Dra. Constance Oliver**, pelos ensinamentos, pelas oportunidades e pelo abraço de vó mais gostoso do mundo! Serei eternamente grata a senhora.

Aos docentes da **Banca Examinadora**, agradeço a disponibilidade e atenção dedicada.

Aos queridos **amigos de laboratório**:

Elaine, continuo querendo ser como você quando eu crescer. Você é exemplo de cientista, pessoa e amiga. Agradeço todos os dias por ter você em minha vida.

Júnior, o presente que a vida me concedeu. Que honra conhecer um coração tão lindo! Você e o Henrique são os melhores padrinhos que o Ollinho podia ter tido. Obrigada por tanto, sempre.

Edi, partilhar risadas e cafés com você foi muito especial. Paris com você sempre estará em minha memória.

William, Vanina, Vivian, Valéria, Antonio, Clarissa e Claudia, a nossa caminhada foi linda! O meu trabalho hoje é resultado de tudo o que aprendi com vocês.

“Andar com fé eu vou, que a fé (café) não costuma faia”

Ao **Laboratório de Proteases do Câncer**, aos alunos **Elaine, Márcia, Marina, Manuella, Naira, Bruno, Gabriel, Rodrigo e Márcio** e as técnicas **Mara Silvia Alexandre Costa e Carol Kobori**. Vocês me acolheram com tanto carinho, que me senti em casa quando estava com vocês. Agradeço a disponibilidade de cada um.

Agradeço, em especial, a **Marina, Bruno e Márcio** que participaram diretamente deste trabalho. Agradeço também a **Márcia**, por ser a melhor tia de camundongos que poderia existir neste mundo.

Ao **Laboratório de Biologia Sistêmica e Sintética** por sempre estarem de portas abertas para mim (e meus tubinhos de PCR).

Ao **Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia** pela disponibilidade.

Aos amigos que Ribeirão Preto me presenteou:

***Flávia Mendonça Natividade, Fabio Natividade, Marjorie Pontelli, Lucas Alves, Greicy Pereira, Ronaldo Bragança Júnior, Ítalo Araújo Castro, Estela Pereira, Mara Elisama, Yunan Januário, Julianne Vargas, Andrea Oshima, Mariana Queiroz, Gustavo Tibério, Douglas Elias, Felipe Valer, Carlos Couto e Maiaro Cabral** (in memoriam). Os dias não seriam tão alegres sem vocês. Obrigada pela amizade!*

Aos amigos barretenses de uma vida inteira:

***Beatriz Toledo, Marina Lima, Sayuri Endo e Ricardo Cardoso.** Vocês são minha grande fonte de incentivo. Obrigada por compreenderem a distância (e a loucura!).*

Às queridas amigas de graduação:

***Carina Carraro e Camila Martinelli,** vocês estiveram comigo no começo desta jornada e até hoje colho os frutos da nossa amizade. Obrigada!!*

Agradeço também:

*À técnica **Vani Maria Alves,** pelo auxílio técnico com os experimentos de histologia. Por ser uma fonte de luz, reflexão e sabedoria.*

*À técnica **Elizabete Rosa,** pelo auxílio no microscópio Confocal e por ser tão querida e especial durante estes anos.*

*À técnica **Roberta Ribeiro Costa Rosales,** pelo auxílio nos microscópios Multifóton, Biostation, Scanner de lâminas e por tantos ensinamentos no FIJI. Agradeço tantos momentos juntas!*

*Às técnicas **Maria Dolores Seabra Ferreira (Tuca) e Maria Teresa Picinoto Maglia,** obrigada pela amizade!*

*Ao técnico **Domingos Soares de Souza Filho**, pelo carinho com o biotério.
Obrigada por possibilitar o meu trabalho com animais!*

*À técnica **Claudia Regina Maranghetti Faggion**, por todo o carinho e
preocupação.*

*À secretária do programa de pós-graduação de Biologia Celular e Molecular,
Gabriela Bunhoto Zamonier, por toda ajuda nas questões de prazos, papéis e normas.
Agradeço sua disponibilidade e atenção.*

*“O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de
Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil”.*

*Às agências de fomento **FAPESP, CAPES e FAEPA** pelo auxílio financeiro para
o desenvolvimento deste projeto.*

*Agradeço a todos os professores, técnicos e colegas do **Departamento de Biologia
Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos**.*

*Agradeço ao **Brasil**, pela minha educação.*

“Muda, que quando a gente muda o mundo muda com a gente

A gente muda o mundo na mudança da mente

E quando a mente muda, a gente anda pra frente...”

(Até quando? Gabriel, o Pensador)

“Seja a mudança que você quer ver no mundo. ”

(Mahatma Ghandi)

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMO	II
ABSTRACT	V
INTRODUÇÃO	2
SAMSN1	2
Mastócitos	4
Origem dos Mastócitos	4
Migração celular	5
Homing e Recrutamento de Mastócitos	11
Mastócitos nos tecidos	13
O papel dos mastócitos nos sítios periféricos	15
OBJETIVOS	18
Geral	18
Específicos	18
MATERIAL E MÉTODOS	20
1. Animais	20
2. Extração de DNA genômico e genotipagem	20
3. Obtenção de tecidos	21
4. Obtenção de lavado peritoneal	22
5. Recrutamento de mastócitos <i>in vivo</i>	23
6. Obtenção de células da medula óssea	23
7. Cultivo celular	23
8. Silenciamento de SAMSN1	24
9. Anticorpos e marcadores utilizados	28
10. Microscopia de fluorescência	29
11. Citometria de fluxo	30
12. Avaliação da migração celular	31
13. Ensaio de migração celular em μ -slide Ibidi	32
14. Análise do espalhamento celular	33
15. Ensaio de liberação de β -hexosaminidase	33
16. Análise estatística	34
RESULTADOS	36
1. SAMSN1 é expressa em mastócitos	36
2. Mastócitos RBL-2H3 <i>knockdown</i> para SAMSN1	38

3. Camundongos SAMS ^{N1-}	39
4. A distribuição de mastócitos em tecidos periféricos específicos está alterada em camundongos SAMS ^{N1-}	41
5. O recrutamento de mastócitos para a cavidade peritoneal é reduzido em camundongos SAMS ^{N1-}	42
6. SAMS ^{N1} está envolvida na migração de mastócitos	42
7. A velocidade de migração é menor em mastócitos SAMS ^{N1-}	43
8. A deficiência em SAMS ^{N1} interfere na formação de lamelipódios e filopódios	44
9. A expressão de cortactina é menor em mastócitos SAMS ^{N1-}	45
10. A expressão de vimentina está alterada em mastócitos SAMS ^{N1-}	46
11. A expressão de vinculina e talina não é alterada em mastócitos SAMS ^{N1-}	47
12. A expressão das Rho GTPases Rho, Rac1 e Cdc42 não é alterada em mastócitos SAMS ^{N1-}	48
13. A deficiência em SAMS ^{N1} interfere com espalhamento de mastócitos estimulados via FcεRI	49
14. SAMS ^{N1} não afeta a liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimulados via FcεRI	50
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
APÊNDICE	72
ANEXOS	103

RESUMO

RESUMO

Título: SAMSN1: proteína adaptadora essencial na função de mastócitos

Os mastócitos são células multifuncionais originadas na medula óssea que residem no tecido conjuntivo. O processo de migração celular é crucial para o deslocamento dos mastócitos da medula óssea para os sítios periféricos. A SAMSN1 é membro de uma nova família de proteínas adaptadoras do tipo *scaffold* que contém os domínios SH3 e SAM (*Sterile alpha motif*). O objetivo deste estudo foi investigar o papel de SAMSN1 em mastócitos. O presente trabalho mostra, pela primeira vez, a expressão de SAMSN1 em mastócitos RBL-2H3 e mastócitos derivados da medula óssea (BMMC). A SAMSN1 está presente na superfície celular, no citoplasma, no núcleo e em organelas como complexo de Golgi e grânulos de mastócitos. A função de SAMSN1 em mastócitos foi investigada com o uso de camundongos deficientes em SAMSN1 (SAMSN1⁻) e mastócitos RBL-2H3 *knockdown* para SAMSN1. Os mastócitos RBL-2H3 foram transduzidos com partículas lentivirais que codificam shRNAs para SAMSN1. Os mastócitos RBL-2H3 *knockdown* apresentaram uma redução de 75% nos níveis de RNA mensageiro para SAMSN1 e cerca de 55% de redução nos níveis da proteína. Nos camundongos SAMSN1⁻, o número de mastócitos é menor na pele (50%) e na língua (30%) em comparação com camundongos WT. Por outro lado, o número de mastócitos do lavado peritoneal de camundongos SAMSN1⁻ é similar ao de camundongos WT. No entanto, o recrutamento de mastócitos para a cavidade peritoneal de camundongos SAMSN1⁻, em presença de IL-3 e SCF, é reduzido em 50% em comparação aos camundongos WT. Ainda, a migração de BMMC SAMSN1⁻ em presença de IL-3 é reduzida em 80% e com SCF em 40% quando comparada com BMMC WT. Estes achados foram confirmados com mastócitos RBL-2H3 *knockdown* para SAMSN1. A velocidade média de migração também foi menor para BMMC SAMSN1⁻ em comparação aos BMMC WT. Quando estimulados via FcεRI, os BMMCs SAMSN1⁻ se espalham menos no substrato em comparação com os BMMCs WT. Ainda, durante a migração, poucos filopódios e lamelipódios são observados em BMMC SAMSN1⁻. A expressão de cortactina e vimentina também está diminuída. Porém, a expressão de vinculina, talina, bem como, das GTPases RhoA, Rac1 e Cdc42 foi similar entre BMMC SAMSN1⁻ e BMMC WT. A diminuição do espalhamento celular

de BMMCs SAMS $N1^{-}$ não foi suficiente para reduzir a liberação do mediador pré-formado β -hexosaminidase por estas células. Os resultados da presente investigação mostram que a SAMS $N1$ está envolvida no *homing* e no recrutamento de mastócitos, o que ocorre durante processos alérgicos e inflamatórios. Assim sendo, a SAMS $N1$ pode ser um alvo para novas estratégias terapêuticas a serem usadas nestes processos.

Palavras-chave: mastócitos, SAMS $N1$, *homing*, recrutamento, migração

ABSTRACT

ABSTRACT

SAMSN1: an adaptor protein essential for mast cell function

Mast cells (MCs) are multifunctional cells derived from bone marrow, that reside in connective tissue. Cell migration is essential for MCs to exit the bone marrow and go to peripheral sites. SAMSN1, a member of a novel gene family of putative adaptor and scaffold proteins containing SH3 and SAM (sterile alpha motif) domains, has not previously been reported in MCs. Therefore, the aim of this study was to investigate the role of SAMSN1 in MCs. In the present study, SAMSN1 was detected in RBL-2H3 MCs and bone marrow derived MCs (BMMCs). SAMSN1 was localized at the cell surface, in the cytoplasm and in the nucleus of RBL-2H3 MCs. When RBL-2H3 MCs were stimulated via FcεRI, most of the SAMSN1 was found in the nucleus. SAMSN1 was also localized in the Golgi apparatus and MC granules. In order to investigate the role of SAMSN1 in MCs, SAMSN1 deficient mice (SAMSN1⁻ mice) and SAMSN1 knockdown RBL-2H3 MCs were used. RBL-2H3 MCs were transduced with lentiviral particles encoding shRNAs against SAMSN1. The transduced cells showed an 75% reduction in SAMSN1 mRNA levels and around a 55% reduction in protein levels. The number of MCs at peripheral sites was lower in the SAMSN1⁻ mice. Metachromatic MCs were 50% and 30% lower in the skin and tongue, respectively, in SAMSN1⁻ mice in comparison to WT mice. On the other hand, the number of MCs in the peritoneal cavity in SAMSN1⁻ mice was similar when compared to WT mice. However, after intraperitoneal injection of the chemoattractants Stem Cell Factor (SCF) or Interleukine-3 (IL-3), the recruitment to the peritoneal cavity was approximately 50% less in SAMSN1⁻ mice when compared to WT mice. Transwell migration assays in the presence of the chemoattractants showed that SAMSN1⁻ BMMCs migrate 40% and 80% less than, respectively, in the presence of SCF or IL-3 when compared to WT mice. These results were confirmed in SAMSN1 knockdown RBL-2H3 MCs. Furthermore, SAMSN1⁻ BMMCs showed a reduced velocity of migration and migrated a shorter distance in comparison to WT BMMCs. When stimulated via FcεRI, the SAMSN1⁻ BMMCs spread less than WT BMMCs. Furthermore, few filopodia and lamellipodia were observed in SAMSN1⁻ BMMCs during migration. The expression of cortactin and vimentin was also lower in SAMSN1⁻ BMMCs when

compared to WT BMMCs. However, the expression of vinculin and talin as well as RhoA, Rac1 and Cdc42 GTPases was similar between SAMSN1⁻ BMMCs and WT BMMCs. The reduction in the spread area in SAMSN1⁻ BMMCs was not sufficient to reduce or prevent β -hexosaminidase release after stimulation via Fc ϵ RI. These findings indicate that SAMSN1 plays a role in homing and recruitment of MCs, which occurs during infection or inflammation. Therefore, SAMSN1 may be a target for new therapeutic approaches to the treatment of these processes.

Key words: mast cells, SAMSN1, homing, recruitment, migration

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

SAMSN1

A SAMSN1 foi identificada em um estudo transcricional de genes diferencialmente expressos em células hematopoiéticas normais e malignas. SAMSN1 é amplamente expressa nos tecidos hematopoiéticos e, encontrada em níveis mais baixos, em outros locais como no músculo, coração, cérebro, placenta, pulmão, pâncreas, células endoteliais e mielomas (Claudio *et al*, 2001). A proteína SAMSN1, também denominada SLy2, NASH1 ou HACs1, é membro de uma família de três proteínas adaptadoras da família SLy. As proteínas desta família são caracterizadas pela presença de domínios de interação proteína-proteína e por compartilharem um sinal de localização nuclear bipartido na extremidade amino-terminal. A proteína SAMSN1 recebeu este nome por possuir um domínio SAM (*Sterile Alpha Motif*), um domínio SH3 e um sinal de localização nuclear (Uchida *et al*, 2001; Brandt *et al*, 2010) (Figura 1). Os domínios SAM e SH3 são conhecidos por mediar interações de proteínas nas vias de transdução de sinal através da ligação à proteínas contendo *motifs* ricos em prolina (Pawson, 1995). A presença dos domínios SAM e SH3 em uma proteína é sempre indicativo de funções adaptadoras ou de *scaffold*.

SAMSN1

Figura 1: Esquema da proteína SAMSN1 de camundongo. A proteína SAMSN1 de camundongo possui 372 aminoácidos e é composta por um domínio SAM (laranja), um domínio SH3 (azul) e um sinal de localização nuclear (NLS, em vermelho) amino-terminal.

SAMSN1 foi descrita no núcleo de células COS7 transfectadas com SAMSN1 (rim de macaco) (Uchida *et al*, 2001) e no citoplasma de células COS1 (rim de macaco) transfectadas com SAMSN1 (Claudio *et al*, 2001) e no citoplasma de células KG1a (células de medula óssea humana com leucemia mielóide aguda) e K562 (células de medula óssea humana com leucemia mielóide crônica) também transfectadas com

SAMSN1 (Claudio *et al*, 2001). Em células Jurkat T transfectadas com SAMSN1, a SAMSN1 transita entre o citoplasma e o núcleo (Brandt *et al*, 2010).

A expressão endógena da proteína SAMSN1 é regulada positivamente em linfócitos B ativados com estímulos a interleucina IL-4, anti-imunoglobulina IgM e anti-CD40. A superexpressão de SAMSN1 em linfócitos B esplênicos de camundongo resulta na inibição da proliferação e no aumento na diferenciação destas células, o que sugere que a SAMSN1 tem um papel na diferenciação de linfócitos B em plasmócitos. Estes estudos também mostraram que, embora o desenvolvimento dos linfócitos B derivados da medula óssea e as populações de linfócitos B e T esplênicos fossem normais, estes camundongos apresentavam um aumento na imunidade adaptativa. Ainda, os linfócitos B esplênicos estimulados apresentavam um aumento na proliferação o que indica que a SAMSN1 atua como uma proteína antiproliferativa e imunoinibitória *in vivo* (Zhu *et al*, 2004).

A SAMSN1 também regula a atividade da proteína Lyn, uma proteína tirosino-quinase da família Src (*Rous asian sarcoma tyrosine kinase*), modulando a sua fosforilação (Wang *et al*, 2010). Além disso, a SAMSN1 interage com SAP30 e com HDAC1, formando um complexo ternário multiproteico no núcleo. Assim, a SAMSN1 age como um adaptador molecular neste complexo e aumenta a atividade enzimática de HDAC1, uma histona deacetilase. O mecanismo de como a SAMSN1 aumenta a atividade enzimática de HDAC1 ainda precisa ser investigado (Brandt *et al*, 2010).

Recentemente, foi demonstrado que o camundongo C57BL/KaLwRij é deficiente natural para SAMSN1 (Noll *et al*, 2014). Este camundongo é extensamente utilizado como modelo murino de mieloma múltiplo. A SAMSN1 também não é expressa nos plasmócitos malignos 5TGM1 de camundongo e a superexpressão de SAMSN1 nestas células inibe completamente o desenvolvimento de mieloma múltiplo e reduz a proliferação destes plasmócitos *in vitro*. Estes achados indicam que a SAMSN1 possa funcionar como um supressor tumoral em mieloma múltiplo.

Um papel importante na reorganização do citoesqueleto de actina também foi descrito para SAMSN1 (von Holleben *et al*, 2011). Esta função foi demonstrada através de um estudo utilizando células Hela superexpressando SAMSN1 e SAMSN1 deficiente no domínio SH3 (SAMSN1 Δ SH3). A SAMSN1 induz a formação de ondulações de membrana plasmática, que estão relacionadas com o arranjo do citoesqueleto de actina

(von Holleben *et al*, 2011). Estas ondulações são dependentes de Rac1 (Hall, 1998). Nas células SAMSIN1 Δ SH3, as ondulações de membrana não são detectadas, indicando que a reorganização do citoesqueleto de actina depende do domínio SH3 de SAMSIN1.

Embora a SAMSIN1 já tenha sido descrita em diferentes tipos celulares, esta proteína nunca foi investigada em mastócitos.

Mastócitos

Os mastócitos são células imunes do tecido conjuntivo que desempenham diversas funções. Os mastócitos expressam em sua superfície uma grande variedade de receptores imunes e de adesão, que são fundamentais para o reconhecimento de patógenos invasores e para detectar diferentes estímulos provenientes do microambiente tecidual (Frossi *et al*, 2018; da Silva *et al*, 2014). Assim, os mastócitos desempenham papel na imunidade inata e adquirida, e estão envolvidos em mecanismos de defesa do organismo e participam de reações alérgicas, inflamatórias e na eliminação de parasitas (Wedemeyer & Galli, 2000; da Silva *et al*, 2014). A capacidade dos mastócitos em produzir, estocar e liberar uma variedade de mediadores biológicos se relaciona com a fisiopatologia de reações alérgicas e de processos inflamatórios (Pejler *et al*, 2010; Frossi *et al*, 2018).

Origem dos Mastócitos

Diferentemente das outras progênies de células hematopoiéticas que sofrem maturação na medula óssea e depois são liberadas na corrente sanguínea (Kitamura & Fujita, 1989), os mastócitos se originam na medula óssea a partir de um precursor comprometido com a linhagem de mastócitos (MCcp) e migram como células progenitoras (MCp), através da corrente sanguínea para tecidos periféricos (Jamur *et al*., 2005; Jamur & Oliver, 2010), onde amadurecem e proliferam sob influência de fatores presentes no microambiente tecidual (Figura 2), como SCF (*Stem Cell Factor*), Interleucinas -3, -4, -9 (IL-3, IL-4, IL-9) e *Nerve Growth Factor* (NGF), dentre outros (Weller *et al*, 2005; Weller *et al*., 2011; Collington *et al*, 2011) e adquirem características tecido-específicas (Brown *et al*, 2008).

Figura 2: Origem dos mastócitos. Mastócitos se originam na medula óssea como um precursor comprometido (MCcp) e amadurecem *in situ* em progenitor de mastócitos (MCp). Os MCps deixam a medula óssea e vão, através da corrente sanguínea, para os sítos periféricos. Nos sítios periféricos, recebem estímulo do microambiente tecidual e se tornam mastócitos maduros. Modificado de Jamur & Oliver, 2011.

Migração celular

O processo de migração celular é crucial para que os mastócitos deixem a medula óssea para irem povoar os tecidos periféricos. A migração celular é um processo ubíquo, que ocorre desde organismos unicelulares até organismos multicelulares. A migração celular é um fenômeno biológico central no desenvolvimento e manutenção dos organismos multicelulares e é um processo altamente coordenado e essencial durante o desenvolvimento embrionário, na cicatrização, regeneração tecidual, vascularização de tecidos, inflamação e defesa do organismo (Rottner & Stradal, 2011). Em contrapartida, também contribui para o desenvolvimento de doenças, como na progressão tumoral, com metástases de células cancerosas e em doenças autoimunes (Ridley, 2015). As células podem migrar como uma única célula ou em grupos, de forma coletiva. A migração coletiva corresponde ao movimento coordenado de um grupo de células, que não perdem o contato entre elas (Rørth, 2009). A migração celular coletiva é importante, especialmente, durante o desenvolvimento embrionário e em processos como a organização tecidual, organogênese e na cicatrização de feridas (De Pascalis & Etienne-Manneville, 2017).

A migração celular ocorre em resposta a um quimioatraente ou fator de crescimento presente ao redor da célula, processo chamado de quimiotaxia (Hanna & El-Sibai, 2013). A quimiotaxia é o movimento unidirecional da célula em resposta a um gradiente de quimioatraentes (Figura 3). Os quimioatraentes podem agir de maneiras diferentes dependendo dos tecidos e, combinações de diferentes quimioatraentes podem gerar padrões específicos de migração (Moreau *et al*, 2018). Para que ocorra o processo de quimiotaxia, a célula deve ser exposta à uma concentração gradiente de quimioatraentes, que se ligam a receptores localizados na membrana celular. Com a ligação do quimioatraente ao receptor da célula, uma cascata de sinalização é disparada, o que culmina na reorganização do citoesqueleto, polarização celular e, assim, no movimento celular direcionado (Kamp *et al*, 2016; Luster, 2001).

Figura 3: As células migram em direção a uma concentração de quimioatraente. Os quimioatraentes (1) se ligam ao receptor localizado na membrana plasmática da célula (2). Após a ligação do quimioatraente ao receptor, há a polarização da célula, com consequente formação da protrusão celular na frente da célula, supressão de formação de protrusões na parte traseira da célula e posterior contração do corpo celular (3). Adaptado de http://cslls-text.c.u-tokyo.ac.jp/active/11_04.html

A migração celular é um processo dinâmico, altamente coordenado e requer uma regulação espaço-temporal precisa entre as vias de sinalização bioquímica e mecânica (Tkachenko *et al*, 2011). A migração celular ocorre em ciclos e inclui as etapas (Figura 4): 1) **protrusão** na direção de um estímulo migratório ou polarizador; 2) **adesão** à matriz extracelular; 3) **geração de força** de tração sobre estas adesões e 4) **liberação das adesões** da porção posterior da célula e **contração** do corpo celular (Ridley *et al*, 2003).

Figura 4: Etapas que ocorrem durante a migração celular. A parte superior do esquema demonstra uma célula não polarizada. A parte inferior demonstra uma célula em movimento. Inicialmente, há a formação de protrusões celulares e interações de moléculas de superfície das protrusões com sítios permissivos na matriz subjacente para formar adesões transientes célula-matriz. Assim, há a geração de uma força tração nestas adesões. Por fim, ocorre a contração celular e o movimento anterior acompanhado pelo concomitante descolamento das adesões da extremidade posterior da célula. Modificado de Vorotnikov, 2011.

As protrusões celulares podem ser mediadas por uma variedade de estruturas distintas, incluindo lamelipódios e filopódios (Figura 5), que são formados pela polimerização de actina (Rottner & Stradal, 2011). O lamelipódio é uma fina camada de citoplasma preenchida por filamentos de actina arranjados em um padrão de linhas cruzadas. O comprimento do lamelipódio é variável, mas geralmente não excede 10 μm e a concentração de filamentos de actina mostra um decaimento linear da frente para a traseira da célula (Rottner & Stradal, 2011; Watanabe, 2002; Small, 1995). A lamela é a região imediatamente posterior ao lamelipódio e consiste em feixes contráteis de actina, frequentemente associados a sítios de adesão (Choi *et al*, 2008). Já os filopódios são protrusões em forma de dedos preenchidas de filamentos de actina e sua formação geralmente coincide com a presença do lamelipódio. Embora os filopódios não sejam essenciais para o processo de migração celular, eles funcionam como sensores, explorando o microambiente tecidual e, assim, contribuem para a migração em ambientes 3D (Li *et al*, 2010). A protrusão de lamelipódios ou filopódios está acompanhada pela formação de adesões nascentes abaixo deles, que são rapidamente desmontadas ou evoluem para adesões focais mais maduras. As protrusões celulares são estabilizadas pela

adesão da célula à matriz extracelular ou células adjacentes via receptores transmembrana ligados ao citoesqueleto de actina (Figura 5). Estas adesões servem como sítios de tração para a migração à medida que a célula se move para a frente e, concomitantemente, as adesões são desmontadas na parte traseira da célula, permitindo a célula desaderir e deslizar pela matriz (Ridley *et al*, 2003). A contratilidade celular determina a formação e manutenção dos complexos multiproteicos das adesões focais. As forças são determinantes para interações bioquímicas entre os componentes presentes nas adesões focais e seus *turnovers*.

Figura 5: Representação esquemática de lamelipódio, filopódio e fibras de stress. O lamelipódio é uma projeção citoplasmática formada por filamentos ramificados de actina. O filopódio é uma projeção em forma de dedo formada por um feixe de filamentos paralelos de actina. Já as fibras de stress são formadas por estruturas contráteis de filamentos antiparalelos de actina. Estas estruturas de actina desempenham funções em respostas mecânicas, gerando força para diferentes funções celulares, como a migração celular. Modificado de Letort *et al*, 2015.

Embora diferentes receptores estejam envolvidos no processo de migração celular, a família das integrinas é a maior família de receptores envolvidos na migração celular. As integrinas são receptores heterodiméricos, compostos por subunidades α e β , que se ligam a componentes da matriz extracelular, como fibronectina, colágeno e laminina e também podem se ligar a componentes intracelulares do citoesqueleto (Kinbara *et al*, 2003). Assim, as integrinas se comportam como os “pés” das células em movimento por suportar a adesão à matriz extracelular ou a outras células através da ligação aos

filamentos de actina citoplasmáticos (Ridley *et al*, 2003). Geralmente, as integrinas se localizam na frente da célula em movimento, onde as novas adesões focais se formam.

Conforme descrito acima, o processo de migração celular é cíclico e extremamente regulado. As GTPases são interruptores moleculares que utilizam uma estratégia bioquímica para controlar processos celulares complexos (Etienne-Manneville & Hall, 2002) e são pequenas proteínas ligantes a GTP (*guanosine triphosphate*), que possuem entre 20 e 40 KDa (Hanna & El-Sibai, 2013). As GTPases da família Rho atuam em processos de polimerização, organização e contração do citoesqueleto de actina e na polimerização e estabilização de microtúbulos (Etienne-Manneville & Hall, 2002) e, por isso, são amplamente conhecidas por desempenhar funções na migração celular. Todas as Rho GTPases possuem uma sequência consenso na extremidade amino-terminal que é responsável pela interação específica com GDP (*guanosine diphosphate*) e GTP e pela atividade GTPase que hidroliza GTP em GDP + Pi (fosfato inorgânico). Também possuem uma sequência consenso que levam a modificações pós-traducionais para a localização correta da proteína na célula (Hanna & El-Sibai, 2013), o que é essencial para o desempenho eficiente de suas funções. As Rho GTPases estão inativas quando ligadas a GDP e então ficam sequestradas e mantidas no citoplasma. Quando ligadas a GTP estão no estado ativo e sofrem mudanças conformacionais que favorecem a ligação à efetores *downstream* na cascata de sinalização. A ativação das Rho GTPases é extremamente regulada na célula e são ativadas pelas GEFs (*Guanosine Exchange Factors*) e inativadas pelas GAPs (*GTPase Activating Proteins*), que catalisam a hidrólise de GTP em GDP (Figura 6).

Figura 6: Ativação e inativação das Rho GTPases. As Rho GTPases ciclam entre os estados ativos (ligados a GTP) e inativos (ligados a GDP). As GEFs catalisam a troca de nucleotídeo e medeiam a ativação e as GAPs estimulam a hidrólise do GTP, levando a inativação das Rho GTPases. Modificado de Etienne-Manneville & Hall, 2002.

As Rho GTPases melhores caracterizadas são as proteínas Rho, Rac e Cdc42 e são os membros da família Rho mais conservados entre os eucariotos, sendo encontrados em plantas, fungos e animais (Boureux *et al*, 2007). Estas GTPases contribuem de diversas maneiras na migração celular e, devido a suas diferentes isoformas, o mecanismo de como cada proteína contribui para o processo de migração celular ainda não está totalmente elucidado.

Durante a polarização da célula e formação das protrusões celulares, estágio inicial da migração celular, a GTPase Rac recruta o complexo WAVE, que por sua vez ativa o complexo Arp2/3, promovendo a nucleação e alongação da actina. Cdc42 também é essencial na polarização da célula e no movimento direcionado (Figura 7), através da regulação da formação de lamelipódio e filopódios, ativando efetores *downstream*, como N-WASP e o complexo Arp2/3. Além disso, Cdc42 contribui para a manutenção da atividade de Rac na frente das células em movimento. A inibição ou a ativação global de Cdc42 podem perturbar o movimento direcionado da célula em migração (Ridley *et al*, 2003; Ridley, 2015; Etienne-Manneville & Hall, 2002; Hanna & El-Sibai, 2013).

Figura 7: Rho GTPases nas etapas da migração celular. Cdc42 determina a direção do movimento celular, enquanto que Rac induz a formação de lamelipódios na frente celular. As protrusões são estabilizadas pela formação de novas adesões celulares, controlada por Rac e RhoA. RhoA age na traseira da célula na formação de fibras de stress e na contratilidade de actomiosina, o que culmina na retração celular e no movimento celular. Modificado de Hanna & El-Sibai, 2013.

As protrusões formadas nas células em migração precisam ser estabilizadas e essa estabilização acontece através da adesão da célula à matriz extracelular. A adesão celular ativa Rac e Cdc42. Rac estimula a montagem de pequenas estruturas pontuais conhecidas como complexos focais que se formam logo atrás do lamelipódio da célula (Figura 7). Durante o movimento celular, complexos focais podem ser desmontados ou maturados em complexos maiores e mais estáveis, conhecidos como adesões focais, que são dependentes de Rho (Hoffmann & Schwarz, 2013; Arjonen *et al*, 2011). As adesões focais conferem a força mecânica para a célula contrair seu corpo celular e se deslizar ao longo do substrato. Assim, a migração celular requer um *turnover* dos complexos e adesões regulados por Rac e RhoA. Um aumento na atividade de Rho gera a estabilização das adesões focais à matriz extracelular que culmina na inibição da migração celular (El-Sibai *et al*, 2008).

Os estágios finais da migração celular são a contração do corpo celular e a retração da parte traseira da célula. A Rho estimula, via quinase ROCK, a contração de acto-miosina no corpo celular (Figura 7) através da fosforilação de MLC (*myosin light chain*). A RhoA, uma das isoformas melhores descritas de Rho, ativa ROCK, que por sua vez estimula a quinase LIM, culminando na inibição de cofilina, responsável pela reorganização do citoesqueleto de actina da célula e, assim, leva à inibição da protrusão celular (Hanna & El-Sibai, 2013). A inibição de RhoA pode bloquear a retração celular, através de uma redução da contratilidade de acto-miosina. Assim, é essencial que haja um *crosstalk* entre as GTPases para a regulação de todos os estágios da migração celular.

Homing e Recrutamento de Mastócitos

Como mencionado anteriormente, os MCps migram da medula óssea para os sítios periféricos através da corrente sanguínea (Jamur *et al*, 2010). Nos tecidos alvo os mastócitos amadurecem para, então, poder desempenhar as suas funções. Embora os mastócitos sejam considerados células de longa permanência nos tecidos periféricos, ocorre um reabastecimento contínuo com novas células. Em uma situação de homeostase, o processo de tráfego normal de MCps para os tecidos periféricos é denominado *homing*. O número de mastócitos nos tecidos é regulado pelo balanço de MCps que deixam a medula óssea e a taxa de mastócitos que morrem no tecido periférico (Metcalf *et al*, 1995). O processo de *homing* de mastócitos deve ser estritamente regulado, uma vez que

um número exacerbado destas células no tecido periférico pode ser nocivo (Hallgren & Gurish, 2007). Quando ativados, os mastócitos liberam uma gama de mediadores biológicos que, em excesso, podem provocar um desequilíbrio nas funções fisiológicas dos tecidos. Embora a via que regula o *homing* de mastócitos para os tecidos periféricos ainda não esteja totalmente elucidada, estudos mostraram a importância de alguns receptores e moléculas neste processo.

Estudos demonstraram que a integrina $\alpha 4\beta 7$ e o receptor CXCR2 são essenciais para o *homing* de mastócitos especificamente para o intestino. Os pesquisadores utilizaram camundongos *knockout* para a integrina $\beta 7$ e anticorpos bloqueadores de integrinas $\alpha 4\beta 7$, $\beta 7$, αE e $\beta 1$ (Gurish *et al*, 2001) e camundongos *knockout* para o receptor de quimiocina CXCR2 (J. Pablo Abonia, K. Frank Austen, Barrett J. Rollins, Sunil K. Joshi, Richard A. Flavell, William A. Kuziel, Pandelakis A. Koni, 2005). Além disso, demonstraram que a expressão de CXCL1, CXCL5 e CXCL2, ligantes do receptor CXCR2, são essenciais para a manutenção do número de mastócitos no intestino (Kunii *et al*, 2011). Porém, o *homing* para a cavidade peritoneal depende das integrinas $\alpha M\beta 2$ e $\alpha I\beta 3$ (Rosenkranz *et al*, 1998; Berlanga *et al*, 2005). Por outro lado, o receptor de quimiocina CCR2 e seu ligante CCL2 não atuam no *homing* de mastócitos para o pulmão, mas, em um modelo de alergia, este receptor e seu ligante recrutam MCps para este órgão (Collington *et al*, 2010a). O mesmo ocorre com as integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$ que não participam do *homing* de MCps para o pulmão, mas participam do recrutamento para este órgão (Gurish *et al*, 2001). Estas integrinas e a molécula de adesão VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), que é ligante da integrina $\alpha 4\beta 1$, são importantes para o recrutamento de MCps para o pulmão em processos de inflamação (J. Pablo Abonia, Jenny Hallgren, Tatiana Jones, Tong Shi, Yuhui Xu, Pandelakis Koni, Richard A. Flavell, Joshua A. Boyce, K. Frank Austen & Normal, 2006). A integrina $\alpha 4\beta 7$ também exerce função no recrutamento de MCps para a cavidade peritoneal (de Cássia Campos *et al*, 2014).

O ligante do receptor c-kit, o SCF, é amplamente conhecido como um fator quimioatraente para mastócitos (Okayama & Kawakami, 2006; Galli *et al*, 1993; de Cássia Campos *et al*, 2014). Recentemente, um estudo utilizando animais *Germ-Free* (sem microbiota) demonstrou que estes animais possuem um número menor de mastócitos na pele. Este estudo mostra ainda que a microbiota natural da pele estimula os

queratinócitos a produzirem SCF, que induz a migração de MCps para a pele. Estes resultados indicam que a microbiota da pele é importante para o *homing* de mastócitos para este sítio (Wang *et al*, 2017).

O número de mastócitos nos tecidos pode aumentar em resposta a estímulos, como na inflamação, alergia, asma, reparo tecidual, entre outros processos patológicos (Dahlin & Hallgren, 2015). Este processo que resulta no aumento do tráfego de MCps para um determinado sítio periférico em resposta a um estímulo é denominado recrutamento. Os mecanismos que regulam o recrutamento de MCps, assim como os que atuam no *homing*, ainda não são totalmente conhecidos.

A IL-3 também é amplamente utilizada como quimioatraente de mastócitos. Já foi demonstrado seu papel no recrutamento de MCps para a cavidade peritoneal, pele, baço e intestino (Lantz *et al*, 1998; de Cássia Campos *et al*, 2014). O papel de mediadores lipídicos no recrutamento de MCps também já foi relatado. Após a injeção subcutânea do leucotrieno B4 (LTB4) e da prostaglandina E2 (PGE2) foi observado um aumento do número de mastócitos na pele de camundongos e ratos (Weller *et al*, 2005, 2007; de Cássia Campos *et al*, 2014).

A heterogeneidade encontrada nos tecidos alvo, a serem povoados por mastócitos, determina o tipo de quimioatraente e, conseqüentemente, os receptores a serem expressos na superfície destas células. Portanto, a eficiência do quimioatraente depende do sítio para onde os mastócitos são recrutados (de Cássia Campos *et al*, 2014).

Mastócitos nos tecidos

Os mastócitos são células do tecido conjuntivo com função imune local. Os mastócitos estão distribuídos de forma ubíqua, sobretudo nas regiões subepiteliais e nas proximidades dos vasos sanguíneos, nervos, células musculares lisas, glândulas mucosas e folículos pilosos. A morfologia dos mastócitos varia de acordo com a sua localização. Os mastócitos de lavado peritoneal são arredondados, enquanto que os mastócitos do tecido conjuntivo localizados próximos aos vasos sanguíneos são alongados ou ovoides e os mastócitos da derme são estrelados ou fusiformes (Yong, 1997).

Os mastócitos geralmente são descritos com base na sua localização e nas suas características funcionais, estruturais e bioquímicas (da Silva *et al*, 2014). Em humanos,

os mastócitos são classificados de acordo com as proteases encontradas nos seus grânulos. Os mastócitos T ou *Mast Cell T* (MC_T) estocam triptase (α e β) em seus grânulos. Os mastócitos que estocam quimase e triptase em seus grânulos são classificados como mastócitos CT ou *Mast Cell CT* (MC_{CT}) (Irani *et al*, 1986; Metcalfe, 1997; da Silva *et al*, 2014; Frossi *et al*, 2018). Os MC_{CT} são encontrados na pele, linfonodos e submucosa do estômago e intestino, enquanto que os MC_T são encontrados predominantemente nos pulmões e mucosa intestinal, próximos às células T (Irani *et al*, 1986). A classificação de mastócitos em roedores é diferente. Existem os MMCs (*mucosal mast cells*), que são encontrados na lâmina própria das mucosas e contêm dois tipos de β -quimases (mMCP-1 e mMCP-2) e os CTMCs (*connective tissue mast cells*) que residem nos demais tecidos conjuntivos, como pele e cavidade peritoneal. Os CTMCs contêm nos grânulos duas triptases (mMCP-6 e mMCP-7) e as quimases (mMCP-4 e mMCP-5), além da carboxipeptidase A (Enerbäck *et al*, 1985; Welle, 1997; Metcalfe, 1997; da Silva *et al*, 2014; Frossi *et al*, 2018). Atualmente, esta forma de classificação dos mastócitos é considerada restritiva, uma vez que os mastócitos exibem uma alta plasticidade e heterogeneidade.

A heterogeneidade dos mastócitos é resultado de programas moleculares tecido-específicos, ou seja, os estímulos do próprio microambiente tecidual sinalizam para que as células respondam de maneira eficiente a interações repetidas, como moléculas específicas de um tecido ou agentes infecciosos. Além disso, em condições fisiológicas, o fenótipo dos mastócitos vai se moldando até atingir características específicas de um tecido. Embora as funções dos mastócitos dependam de sua diferenciação terminal nos tecidos, que é determinada por fatores do microambiente, estas também são influenciadas por uma experiência prévia das células, que culminam em mudanças a nível de expressão gênica de moléculas solúveis e ligadas à membrana (Frossi *et al*, 2017). Por fim, a qualidade, a quantidade e a combinação dos estímulos do microambiente local podem influenciar no fenótipo e na maturação dos mastócitos e, consequentemente, na sua função. Estes fatores podem afetar a capacidade dos mastócitos de reconhecer e responder a estímulos de maneira eficiente, tanto em condições de homeostase, como em respostas patológicas (Frossi *et al*, 2018; da Silva *et al*, 2014).

O papel dos mastócitos nos sítios periféricos

A ampla distribuição dos mastócitos nos tecidos facilita o seu desempenho como célula sentinela do sistema imune. Os mastócitos são amplamente conhecidos por apresentarem mecanismos de defesa contra patógenos e helmintos. Os mastócitos também participam em diversos processos biológicos e na manutenção da homeostase (Weller *et al*, 2011). Os mastócitos também estão envolvidos no reparo tecidual, nas reações alérgicas e inflamatórias, na asma e em doenças do sistema nervoso central, do sistema cardiovascular e em diversos tipos de câncer (da Silva *et al*, 2014; Lundequist & Pejler, 2011; Wernersson & Pejler, 2014; de Souza Junior *et al*, 2015).

A função dos mastócitos está relacionada com a liberação de mediadores químicos. Os mastócitos podem ser ativados por meio de diversos estímulos e através de diferentes receptores presentes na superfície celular. O processo de ativação dos mastócitos culmina na liberação e/ou síntese de uma gama de mediadores biologicamente ativos. Esses mediadores pertencem a três classes significativamente distintas: os **mediadores pré-formados**, estocados nos grânulos citoplasmáticos, que são liberados imediatamente após a ativação celular e incluem a histamina, serotonina, proteoglicanas, proteases (como as quimases, triptases e carboxipeptidase A), β -hexosaminidase, algumas citocinas e quimiocinas, dentre outros; os **mediadores neoformados**, derivados de precursores lipídicos presentes na membrana plasmática e em corpos lipídicos, tais como leucotrienos e prostaglandinas; e os **mediadores neossintetizados** que são produzidos após a ativação transcricional e por esse motivo são liberados horas após a ativação celular, como citocinas pró-inflamatórias IL-1, -4, -5, -6, -10 (associadas a resposta Th2), IFN- γ , IL-2, -3, -12, -18 e TNF- α (associadas a resposta Th1) e quimiocinas como CCL5 e CXCL8.

A via de ativação mais comum dos mastócitos ocorre através do receptor de alta afinidade para a imunoglobulina E (Fc ϵ RI). A imunoglobulina E (IgE) se liga ao Fc ϵ RI na superfície dos mastócitos e, quando as IgEs são interligadas por antígenos multivalentes, ocorre o intercruzamento dos Fc ϵ RI que resulta na ativação dos mastócitos. Quando ativados, os mastócitos liberam as três classes de mediadores descritas anteriormente (Pribluda & Metzger, 1992; Rivera & Cordero, 2002; Siraganian, 2003).

A desgranulação, que é o processo de liberação dos mediadores pré-formados, ocorre através da exocitose de seus grânulos secretores e é um processo não citotóxico e não lítico, que permite a regranulação das células (Metcalf, 1997; da Silva *et al*, 2014). Os fatores neoformados e neossintetizados podem ser liberados sem que ocorra a desgranulação dos mastócitos (Grodzki *et al*, 2009) e a regulação da liberação de mediadores neossintetizados depende do tipo de estímulo e do receptor envolvido no processo de ativação (Galli *et al*, 1999; Stinchcombe & Griffiths, 2001; da Silva *et al*, 2014).

A ativação dos mastócitos também pode ocorrer por vias independentes do FcεRI tais como receptores para complemento, *Toll-like receptors* (TLRs), receptores acoplados a proteína G, entre outros (Gilfillan & Tkaczyk, 2006; Gilfillan *et al*, 2009). Os mastócitos podem ainda ser estimulados por SCF, neuropeptídeos, lectinas, compostos básicos (composto 48/80) e drogas, como o methoxychlor (de Almeida Buranello *et al*, 2010; da Silva *et al*, 2014; Yasunaga *et al*, 2015).

A manutenção da homeostasia dos mastócitos nos sítios periféricos é importante para a eficiência das funções realizadas por estas células (Frossi *et al*, 2018). O processo de migração celular é responsável pela manutenção do número adequado de mastócitos nos tecidos periféricos, uma vez que, os seus progenitores se originam da medula óssea. O sucesso de uma resposta imunológica depende da habilidade de células imunes se adaptarem aos sinais externos para poderem realizar com eficiência a sua capacidade migratória e poderem exercer suas funções efetoras em resposta às mudanças do microambiente (Moreau *et al*, 2018). Assim, o conhecimento de mecanismos moleculares envolvidos na migração, no *homing* e no recrutamento de mastócitos é de extrema importância. A elucidação desses processos pode contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de doenças alérgicas e inflamatórias.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Geral:

Investigar o envolvimento de SAMSN1 na função de mastócitos.

Específicos:

- Investigar a expressão de SAMSN1 em mastócitos;
- Determinar a localização subcelular de SAMSN1 em mastócitos;
- Investigar o envolvimento de SAMSN1 nos processos de *homing* e recrutamento de mastócitos;
- Investigar a participação de SAMSN1 no processo de migração de mastócitos;
- Avaliar o papel de SAMSN1 na secreção de mediador pré-formado de mastócitos.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Neste estudo foram utilizados os camundongos C57BL/6J0laHsd (*Wild Type* – WT) e camundongos C57BL/KaLwRijHsd (deficientes em SAMSNI – SAMSNI^{-/-}), adquiridos da empresa Envigo (Huntingdon, Cambridgeshire, Reino Unido). Os animais utilizados foram originados da mesma ninhada. Foram utilizados camundongos machos, com 7-8 semanas de idade. Os animais foram criados no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP/ USP) e receberam ração balanceada para murinos da NUVILAB CR1 (Nuvital Nutrientes, Paraná, Brasil). Os protocolos experimentais e acondicionamento dos animais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP/USP sob o protocolo de número (043/2016).

2. Extração de DNA Genômico e Genotipagem

O genótipo dos animais foi identificado através de reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com o DNA genômico extraído de biópsias da cauda dos camundongos, com idade inferior a 21 dias. As amostras foram incubadas em tampão de lise (10 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8, 0,5% SDS e 0,4 mg/mL proteinase K – Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA) a 55°C, por 16 horas. O DNA genômico das amostras foi precipitado com álcool isopropílico (Labsynth, Diadema, SP), centrifugado a 13300 rpm, por 10 minutos, a temperatura ambiente, e ressuspendido em tampão Tris-EDTA (TE). O PCR foi realizado utilizando Taq Polimerase Master Mix Green 2x (Cellco Biotec, São Carlos, SP) e *primers* (IDT Brasil, Belo Horizonte, MG) como previamente descrito (Noll *et al*, 2014) e esquematizado na Figura 8. Brevemente, 1 µL de DNA genômico foi adicionado a Taq Polimerase Master Mix Green 2x contendo 0,37 µM de *mix* de *primers* (*sense* e *antisense*). Os primers utilizados foram:

DEL.F6 *sense* – 5' TCAGGGGAGTTCCAGACCAT 3';

DEL.F6 *antisense* – 5' TCAGATGCAAGTTTCTGGAATGA 3';

BP.1F *sense* – 5' TCCATAGAGAACATCGACAC 3';

DEL+55kb.F *antisense* – 5' GTCAACGCTGCTGTGTTTGT 3'.

Figura 8: Estratégia de genotipagem dos camundongos. Deleção genômica do gene *Samsn1* em camundongos C57BL/KaLwRijHsd. A região pontilhada na figura representa a região deletada no gene *Samsn1*. Os pares de primers DEL.F6 localizado em uma região do gene deletada no camundongo C57BL/KaLwRijHsd e o par BP.1F/DEL.+55kb.F, que flanqueia a região deletada do gene, foram utilizados na genotipagem. Retângulos pretos representam exons codificantes e os brancos, os não-codificantes. Adaptado de Noll et al, 2014.

As amostras foram aquecidas a 95°C por 2 minutos e a amplificação e o anelamento foram realizados em 35 ciclos (1min-95°C, 1min-55°C e 1min-72°C) em termociclador (Mastercycler® nexus X2, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O tamanho predito do produto de PCR utilizando o par de *primers* F6 foi de 168 pares de bases, enquanto que para o par de *primers* BP1F/DEL.+55kb.F foi de 592 pares de bases. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e *SYBR® Safe DNA gel stain* (1:10000 – Thermo Fisher Scientific). As bandas foram identificadas de acordo com o tamanho dos produtos de PCR analisados.

3. Obtenção de Tecidos

A identificação e caracterização da população de mastócitos de tecidos periféricos foi realizada através da análise histológica de fragmentos de pele e língua obtidos de 5 animais WT e 5 animais SAMS^{N1}⁻, onde estas células são abundantes. Os animais foram sacrificados em câmara com CO₂ e os fragmentos de pele e língua foram coletados e fixados em formaldeído 4% em PBS por 4 horas, desidratados em série crescente de álcoois, diafanizados em xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha) e incluídos em parafina. Cortes histológicos seriados (24 µm de intervalo) com 6 µm de espessura foram obtidos em micrótomo (Leica Manheim, Alemanha). Os cortes foram colhidos em lâminas,

hidratados, diafanizados e corados com azul de toluidina 0,1%, pH 2,8 para a identificação de mastócitos com grânulos metacromáticos, conforme descrito no item 3.1.

3.1 Coloração de Azul de Toluidina

Os cortes de pele e língua foram corados com solução aquosa de azul de toluidina a 0,1%, contendo 1% de ácido acético em 10% de formol, pH 2,8, por 20 minutos. A seguir, os cortes foram desidratados rapidamente em álcoois 80, 90, 95 e 100%, diafanizados em xilol (Merck) e montados em Permount (Thermo Fisher Scientific).

3.2 Análise Microscópica

Os cortes foram observados em microscópio Olympus BX 50 (Olympus Optical Corporation, Tokyo, Japan) e as imagens foram adquiridas com o auxílio de câmara digital SPOT RT3 acoplada e o *Software* Spot versão 4.7 (Diagnostic Instruments, Inc, Sterling Heights, MI). A quantificação dos mastócitos foi realizada, no mínimo, em 50 cortes de cada tecido. A área de cada corte foi determinada utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health – NIH, Bethesda, MD. <http://rs.info.nih.gov/ij/>) e os resultados foram expressos como número de mastócitos metacromáticos por mm² $\pm$ desvio padrão.

4. Obtenção de Lavado Peritoneal

O número de mastócitos de camundongos WT e SAMSN1⁻ também foi analisado no lavado peritoneal colhido destes animais. Para a coleta do lavado peritoneal, os animais foram eutanasiados e, a seguir, 4 mL de PBS estéril (37°C) foram injetados na cavidade peritoneal. O lavado peritoneal foi coletado por laparotomia com auxílio de uma pipeta Pasteur. O lavado peritoneal foi então, centrifugado a 1200 rpm, por 5 minutos e o *pellet* celular foi lavado 3 vezes em PBS, por centrifugação. A seguir o *pellet* foi fixado em paraformaldeído 4% (EM Sciences) em PBS, por 15 minutos a temperatura ambiente e então, coradas com azul de toluidina (0,1%, pH 2,8). As células peritoneais e os mastócitos metacromáticos foram contados em câmara de Neubauer para determinar a porcentagem de mastócitos presentes no lavado peritoneal.

5. Recrutamento de mastócitos *in vivo*

Para investigar o recrutamento de mastócitos para sítios periféricos *in vivo*, camundongos WT e SAMS^{N1-} receberam injeção intraperitoneal com os quimioatraentes *Stem Cell Factor* recombinante (rSCF) ou Interleucina-3 recombinante (rIL-3) (350 ng/Kg animal; Thermo Fisher Scientific). Os quimioatraentes SCF ou IL-3 foram diluídos em 100 µL de PBS contendo 0,1% de BSA. Os animais controle foram injetados somente com o veículo (PBS + 0,1% BSA). Após 6 horas de injeção, os animais foram eutanasiados e o lavado peritoneal foi coletado conforme o item 4.

6. Obtenção de Células da Medula Óssea

A medula óssea foi colhida no canal medular do fêmur, por injeção de PBS contendo 2% de soro albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich), 500 U/mL de DNase (Sigma-Aldrich) e 1000U/ mL de heparina (Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., Rio de Janeiro, RJ). As células foram dissociadas por sucessivas aspirações com pipeta Pasteur e passadas através de filtros Nytex de 25 µm. A seguir, as células foram lavadas aproximadamente 5 vezes por 5 minutos contendo 2% de BSA.

7. Cultivo Celular

A medula óssea de camundongos WT e SAMS^{N1-} foram cultivadas em frascos de 25 cm² em meio Iscove's (Iscove's Modified Dulbecco's Medium – Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich), 1% antibiótico/antimicótico contendo 100U/ mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Gibco – Thermo Fisher Scientific), 2mM glutamina, 0,05 mM de β-mercaptoetanol (Merck), 100 ng/mL de rSCF e 20 ng/mL de rIL-3. As células da medula óssea foram alimentadas a cada 5 dias pela adição de 500 µL de meio contendo os fatores de crescimento rSCF e rIL-3 para a obtenção de mastócitos.

As células da linhagem de mastócitos de rato RBL-2H3 (Basciano *et al*, 1986) também foram cultivadas em meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco – Thermo Fisher Scientific) suplementado com 15% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de antibiótico/antimicótico contendo 100U/ mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B e mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C.

As células HEK 293T, linhagem humana embrionárias de rim, foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de antibiótico/antimicótico contendo 100U/ mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B e mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Estas células foram utilizadas para a produção de partículas lentivirais.

8. Silenciamento de SAMSIN1

O papel da SAMSIN1 foi investigado em mastócitos de rato RBL-2H3 com o uso do RNA de interferência para diminuir os níveis de expressão de SAMSIN1.

8.1. RNA de interferência e o Silenciamento de SAMSIN1

O silenciamento de SAMSIN1 em mastócitos da linhagem RBL-2H3 foi realizado com o uso de *short hairpin* RNAs (shRNAs) contra o gene SAMSIN1. Os mastócitos RBL-2H3 foram transduzidos com o vetor lentiviral (pLKO.1) que contém genes de resistência à ampicilina e puromicina (*Mission shRNA* – Sigma-Aldrich). O clone de camundongo (TRCN0000265284 – sh284) e o clone de humano (TRCN0000133704 – sh704) apresentam sequências de *short hairpin* totalmente complementares ao RNA mensageiro de SAMSIN1 em *Rattus norvegicus*. Como controle negativo foi utilizado o plasmídeo pLKO.1-controle (shCTRL), que consiste no vetor lentiviral sem o inserto de shRNA.

8.1.1 Transformação de bactérias e Maxipreparações de DNA

Os vetores lentivirais contendo as sequências de *short hairpin* (sh284 e sh704) e o vetor controle (shCTRL) foram obtidos em forma de DNA plasmidial (Sigma-Aldrich). Os plasmídeos foram transformados em bactéria (*Escherichia coli* cálcio competentes – cepa DH5α) através de choque térmico. 1 µL de cada plasmídeo foi adicionado aos 100 µL de meio contendo as bactérias cálcio competentes DH5α. As bactérias contendo os plasmídeos foram incubadas por 30 minutos a 4°C e por mais 90 segundos a 42°C e, em seguida, por 60 segundos adicionais a 4°C. 900 µL de meio Luria-Bertani (LB) foram adicionados à solução e esta foi incubada por 1 hora, a 180 rpm e a 37°C. O material contendo bactérias e plasmídeos foram colocados em uma placa de Petri contendo meio LB-ágar com 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas por

16 horas, a 37°C. No dia seguinte, as colônias que cresceram isoladas foram coletadas e inoculadas individualmente em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina e incubadas a 180 rpm e a 37°C por 16 horas. Este pré-inóculo foi adicionado a 250 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubado por mais 16 horas a 37°C. Por fim, foram realizadas as maxipreparações de plasmídeos com o kit *PureYield™ Plasmid Maxiprep System* (Promega Corporation, Madison, WI, USA) segundo as especificações do fabricante. A concentração dos vetores e a sua pureza foram determinadas por espectrometria de UV visível com comprimento de onda 260/280nm.

8.1.2 Produção de Partículas Lentivirais

Partículas lentivirais para cada construção foram produzidas em células HEK 293T através da transfecção dos vetores pLKO.1 (clones: sh284, sh704 e shCTRL) juntamente com *Lentiviral Packing Mix* (vetores de empacotamento lentivirais; Sigma-Aldrich). Células HEK 293T ($4,5 \times 10^5$ células/poço – placa de 6 poços) foram cultivadas em 2,5 mL de DMEM com 10% SFB e sem antibiótico/antimicótico por 24 horas antes da transfecção. Para a transfecção, 3 µL do reagente de transfecção *Fugene HD* (Promega Corporation) foram diluídos em 37 µL de OPTI-MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.), incubados por 5 minutos a temperatura ambiente e, subsequentemente, adicionados a uma solução contendo 500 ng do plasmídeo de shRNA pLKO.1 e 4,6 µL de *Lentiviral Packing Mix* diluídos em 10 µL de OPTI-MEM. Esta solução foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e, por fim, gotejada sobre as células HEK 293T. As células foram, então, incubadas a 37°C, 5% CO₂, por 12-15 horas. O reagente de transfecção foi removido e substituído por 2,5 mL de DMEM suplementado com 15% SFB e 1% de antibiótico/antimicótico. As células HEK 293T foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ por mais 24 horas. O meio, contendo as partículas lentivirais, foi coletado e utilizado, imediatamente, na transdução de células RBL-2H3.

8.1.3 Transdução de células RBL-2H3 por partículas lentivirais

Células da linhagem RBL-2H3 (3×10^5 células/poço – placa de 6 poços) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico/antimicótico e incubadas por 24 horas a 37°C em 5% CO₂. O meio de cultura foi substituído por meio contendo as partículas lentivirais produzidas pelas células HEK 293T. As células foram incubadas a 37°C em 5% CO₂. Após 24 horas, o meio foi

substituído por meio DMEM fresco contendo 1 µg/mL de puromicina para a seleção das células transduzidas.

8.2 Confirmação do Silenciamento de SAMSIN1

A capacidade das partículas lentivirais em reduzir os níveis de RNAm e proteicos de SAMSIN1 em células da linhagem RBL-2H3 foi avaliada após a seleção com antibiótico. Quatro dias após a transdução a confirmação foi realizada por PCR em tempo real (qPCR) e, 5 dias após a transdução, com *Western blot* utilizando o anticorpo anti-SAMSIN1.

8.2.1 Reação de transcriptase reversa

A eficiência do silenciamento de SAMSIN1 em nível transcricional foi avaliada por ensaio de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR). Para determinar o nível de transcritos de SAMSIN1, o RNA total foi extraído de 5×10^6 células da linhagem RBL-2H3, utilizando-se o kit Illustra™ RNAspin Mini Isolation Kit (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, Pensilvânia), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a pureza do RNA total isolado foram avaliadas por espectrometria com comprimento de onda de 260/280 nm e 260/230 nm. Em seguida, 2 µg de RNA total foram usados para a realização da síntese de cDNA, utilizando o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega Co.).

8.2.2 PCR em Tempo Real (RT-qPCR) – Quantificação Relativa

Com o objetivo de realizar a quantificação relativa de transcritos de SAMSIN1 nas células transduzidas com o shRNA (shCTRL, sh284 e sh704) em relação as células não transduzidas (RBL-2H3), o ensaio de PCR em tempo real foi otimizado utilizando o equipamento 7500 Real Time PCR Applied Biosystems (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc.), com o uso do seguinte programa: 50°C por 10 minutos, 95°C por 5 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 30 segundos. Inicialmente, as amplificações por PCR foram realizadas em triplicatas somente com o cDNA das células RBL-2H3 (não transduzidas) preparadas com reagentes padronizados para PCR em tempo real (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc.). *Primers* específicos (Exxtend, Campinas, São Paulo) para os genes SAMSIN1 e GAPDH de *Rattus norvegicus* foram sintetizados e utilizados na reação de

RT-qPCR. O volume da reação foi ajustado para 10 µL e a concentração final dos primers para 0,25 µM para GAPDH e 0,50 µM para SAMSIN1. A eficiência dos *primers* para GAPDH e para SAMSIN1 foram de 102,36% e 101,32%, respectivamente. Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi realizado para cada par de *primers*. O gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno, por ser um gene de expressão constitutiva. As leituras de fluorescência foram realizadas no equipamento “Real Time PCR 7500” e analisadas pelo Sequence Detection Software (SDS) v1.3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc.). O resultado foi expresso em valor de CT (*cycle threshold*), que se refere ao número de ciclos necessários para que o sinal fluorescente possa ser detectado. O CT do gene alvo foi normalizado pelos CTs do gene endógeno. A calibração foi feita com os CTs das células selvagens (RBL-2H3) e os resultados foram obtidos pelo método do $\Delta\Delta CT$. As sequências dos *primers* foram:

SAMSIN1 rato *sense* – 5' TGACTCAATCGAGGTCCGTG 3';

SAMSIN1 rato *antisense* – 5' TCCGATACTGGAGGGTTTCCT 3';

GAPDH rato *sense* – 5' AAGGTCGGTGTGAACGGATTT 3';

GAPDH rato *antisense* – 5' TGAAGGGGTCGTTGATGGCA 3'.

8.2.3 SDS-PAGE e Western blot

Para avaliar os níveis de expressão de SAMSIN1 nas células transduzidas ou não, análises de *Western blot* foram realizadas. As células foram lisadas em 0,5 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Nonidet-P40, 0,5% deoxylato de sódio, 15 µL/mL de coquetel inibidor de protease, Sigma-Aldrich), a 4°C por 20 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 13500 rpm, por 20 minutos, a 4°C. A concentração proteica do lisado foi determinada usando o reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Após a determinação da concentração proteica, 10 µg foram solubilizadas em tampão de amostra. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% e a corrida foi efetuada com voltagem de 120V em tampão de corrida (192 mM de glicina, 25 mM de Tris e 0,1% SDS). As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Bio-Sciences), por 2 horas e 15 minutos com voltagem de 35V. Após a transferência, as proteínas foram coradas por Ponceau Red (Sigma-Aldrich) por 10 minutos. A membrana foi, então, lavada em TBS-Tween (0,05M Tris-HCl, 0,15M NaCl, pH 7,5 e 0,05% Tween-20) e incubada por 1 hora com tampão de bloqueio (4% de BSA ou 5% de leite em TBS-Tween). Após

o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário por 1 hora. Após a incubação, a membrana foi lavada em TBS-Tween e, em seguida, incubada com os anticorpos secundários conjugados com HRP em TBS-Tween, por 30 minutos. Em seguida, a membrana foi lavada 10 vezes com TBS-Tween e revelada usando ECL-kit (Enhanced ChemiLuminescence, GE Healthcare Bio-Sciences). As imagens foram obtidas usando o fotodocumentador Bio-Rad Chemidoc (Bio-Rad Laboratories). A média da densidade óptica da proteína alvo foi determinada usando o *software* FIJI (Chen *et al*, 2012).

9. Anticorpos e Marcadores Utilizados

Anticorpos primários:

- pAb anti-SAMSN1 (coelho; Proteintech Group, Inc., Chicago, IL): usado na diluição final de 1:100 (imunofluorescência) e 1:20000 (Western blot);
- mAb anti-GM130 (camundongo; Clone 35/GM130; BD Transduction Laboratories, San Jose, CA): usado na concentração de 5 µg/mL;
- mAb anti-rato TGN38 (camundongo; Clone 2; BD Transduction Laboratories): usado na concentração de 5 µg/ml;
- mAb anti-rato CD63 (Clone AD1; BD Transduction Laboratories): usado na concentração final de 1:250;
- mAb β -actina (fluido ascítico de camundongo; clone AC-15, Sigma-Aldrich): usado na concentração final de 1:500.000;
- mAb anti- subunidade alfa de Fc ϵ RI conjugado a FITC (camundongo; Clone BC4; gentilmente cedido por Dr. Reuben P. Siraganian): usado na concentração de 15 µg/ml;
- mAb anti-vinculina (fluido ascítico de camundongo; clone hVIN-1, Sigma-Aldrich): usado na concentração final de 1:200;
- pAb anti-talina (camundongo; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA): usado na concentração de 1 µg/mL;
- mAb anti-Rac1 (camundongo; clone 23A8; Abcam Plc, Cambridge, Reino Unido): usado na concentração final de 1:750;
- mAb anti-Cdc42 (camundongo; clone M152; Abcam Plc): usado na concentração final de 1:125;

- mAb anti-cortactina (coelho; clone EP1922Y; Abcam Plc): usado na concentração final de 1:5000;
- mAb anti-RhoA (camundongo; clone 7F1.E5; Cytoskeleton, Denver, CO, USA): usado na concentração final de 1:500;
- mAb anti-vimentina (coelho; Abcam Plc): usado na concentração final de 0,25 µg/mL;
- mAb IgE anti-TNP (fluido ascítico de camundongo; gentilmente cedido por Dr. Reuben P. Siraganian): usado para sensibilizar as células na concentração final de 1:5000.

Anticorpos secundários:

- Fragmento F(ab)₂ de IgG de jumento anti-camundongo conjugado com Alexa-488 ou Alexa-594 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific): utilizado na diluição final de 1:1000;
- Fragmento F(ab)₂ de IgG de jumento anti-coelho conjugado com Alexa-488 ou Alexa-594 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific): utilizado na diluição final de 1:1000;
- IgG de jumento anti-camundongo conjugado com HRP (Horseardish Peroxidase; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA): utilizado na diluição final de 1:20000;
- IgG de jumento anti-coelho conjugado com HRP (Horseardish Peroxidase; Jackson ImmunoResearch Laboratories): utilizado na diluição final de 1:20000;

Marcador:

- Faloidina conjugada com Alexa 488 (Invitrogen Corporation), na concentração final de 1,0 U/mL.

10. Microscopia de Fluorescência

Para analisar a distribuição e a localização da proteína SAMS1, os mastócitos da linhagem RBL-2H3 foram cultivados *overnight* sobre lamínulas de vidro com 13mm de diâmetro colocadas em placas de 24 poços, na concentração de 3×10^4 células/poço, conforme item 7. Após o cultivo, as células foram fixadas em paraformaldeído 2% em PBS, por 20 minutos e posteriormente lavadas duas vezes com PBS e incubadas com 0,1

M de glicina (em PBS), por 10 minutos. Em seguida, as células foram permeabilizadas com 0,01% saponina por 20 minutos e bloqueadas com 1% BSA (em PBS) contendo 5 µg/mL de IgG de jumento, por 45 minutos. Após o bloqueio, as células foram lavadas com PBS e, então, incubadas com anticorpos primários anti-SAMSN1 e com outros anticorpos marcadores de estruturas subcelulares, diluídos em PBS contendo BSA 1%, por 1 hora. Em seguida as células foram lavadas 5 vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário, por 30 minutos. Finalmente, as células foram lavadas 10 vezes em PBS por 5 minutos, passadas rapidamente em água Milli-Q e montadas com Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA). Células incubadas sem o anticorpo primário foram usadas como controle. Todos os controles foram negativos. O material foi analisado em microscópio de fluorescência convencional Olympus BX50 e confocal LSM 780 AxioObserver (Carl Zeiss; Heidelberg, Alemanha). Os estudos de colocalização foram realizados em cortes seriados (*Z axis*), seguidos pelo cálculo dos coeficientes de Manders. Os coeficientes de colocalização tM1/tM2 foram calculados usando o *software* FIJI (Chen *et al*, 2012) e o *Plug-in Colocalization Threshold* desenvolvido por Tony Collins (Wright Cell Imaging Facility, Toronto, Canada). tM1 é a quantidade de pixels (acima do *background*) no canal verde que se sobrepõe aos pixels (acima do background) no canal vermelho. Para a imunomarcação da proteína SAMSN1 foi considerado o canal vermelho e para os marcadores de organelas foi considerado o canal verde.

11. Citometria de Fluxo

Para confirmar se o silenciamento de SAMSN1 não altera a expressão FcεRI na superfície celular dos mastócitos, as células da linhagem RBL-2H3 previamente tratadas ou não com os shRNAs (sh284 e sh704) foram tripsinizadas e transferidas para tubos de 15 mL (1x10⁶ células/tubo) contendo 2 mL de DMEM completo e centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos. As células foram lavadas por centrifugação com PBS e incubadas com 15 µg/mL de mAb BC4 conjugado a FITC, em PBS contendo 1% BSA e 5 µg/mL de IgG de jumento, por 1 hora a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas em PBS por centrifugação e fixadas em paraformaldeído 2% em PBS, por 20 minutos. Por fim, as células foram novamente lavadas em PBS, por centrifugação, e analisadas por citometria de fluxo no Guava EasyCyte Mini System com auxílio do programa *Cytosoft Blue* (Guava Technologies, Inc., Hayward, CA).

12. Avaliação da Migração Celular

12.1 Ensaio de Migração em Transwell®

Para avaliar a migração celular *in vitro* de BMMCs WT ou BMMCs SAMSIN¹ ou em mastócitos RBL-2H3 e mastócitos RBL-2H3 *knockdown* para SAMSIN¹, foi utilizado o sistema de *Transwell*® (Corning Inc, Nova Iorque, Estados Unidos) de 24 poços, que contém filtros de polycarbonato com poros de 8 µm. Para estes experimentos, $1,5 \times 10^5$ células, em 100 µL de meio de cultura de Iscove's completo (para BMMC) ou DMEM sem fenol acrescido de 1% de BSA (para mastócitos RBL-2H3), foram plaqueadas no compartimento superior do *Transwell*®. No compartimento inferior, foram adicionados 350 µL de meio de cultura de Iscove's com soro contendo ou não 1nM de SCF ou 1nM de IL-3 (para BMMC) ou 600 µL de meio DMEM completo contendo ou não 5 ng/mL de CCL3 (PeproTech, Inc). As células foram incubadas por 3 horas, a 37°C e 5% CO₂. Para BMMC, as células que migraram para o compartimento inferior foram removidas e quantificadas em câmara de Neubauer. Para as células RBL-2H3, as células que não migraram e estavam no compartimento superior foram aspiradas e as membranas foram limpas com o auxílio de um cotonete embebido em PBS. A seguir, as membranas foram fixadas em paraformaldeído 2%, em PBS, por 20 minutos. As membranas foram novamente lavadas em PBS, cortadas e montadas em meio Fluoromount-G contendo DAPI (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA). As células que migraram e estavam na face da membrana do *Transwell*® voltada para o meio, contendo ou não CCL3, foram quantificadas com o auxílio do *software* FIJI.

12.1.1. Marcação das células em Membranas de Transwell®

Para a detecção dos filamentos de actina das células em migração foi utilizado a faloidina conjugada a Alexa-488. As membranas do *Transwell*® contendo células que migraram em direção ao meio ou ao quimioatraente SCF foram lavadas em PBS e fixadas com paraformaldeído 2%, em PBS, por 20 minutos, em temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas com 0,3% de Triton X-100 em PBS, a temperatura ambiente, por 10 minutos. As membranas foram, então, lavadas com PBS, com PBS contendo 0,1M de glicina por 10 minutos, e lavadas em PBS. Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 hora com faloidina conjugada a Alexa-488, na concentração final de 1,0 U/mL, diluída em PBS. As membranas foram então, lavadas 5 vezes em PBS, lavadas rapidamente em água Milli-Q e montadas entre lâminas

e lamínulas com Fluoromount G. As células foram analisadas e as imagens adquiridas em microscópio confocal Leica SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). A área celular foi avaliada com o *software* FIJI.

13. Ensaio de migração celular em μ -slide Ibidi

Os BMMCs WT e BMMCs SAMSNI⁻ (4×10^4 células/canal) foram plaqueadas em *Ibidi μ -Slide Chemotaxis^{2D}* cobertos com Corning® Cell-Tak™ (Corning Inc), conforme a Figura 9. O ensaio de migração dos BMMCs WT e SAMSNI⁻ foi realizado durante 36 horas em meio de cultura contendo 1nM de SCF. A velocidade de migração de mastócitos foi avaliada através de experimentos de *time-lapse* utilizando a *Biostation Nikon IMQ* (Nikon Instruments, Tóquio, Japão). As imagens foram capturadas a cada 4 minutos. Após a captura, o trajeto percorrido por cada célula foi traçado individualmente. A velocidade média e o percurso percorrido pelas células foram calculados utilizando o *software* FIJI, através do *Plug-in Manual Tracking* desenvolvido por Fabrice P. Cordelières (Instituto Curie, Orsay, França).

Figura 9: Migração em *Ibidi μ -Slide Chemotaxis^{2D}*. O *Ibidi* permite observar e avaliar as células que estão migrando em direção ao quimioatraente. O *Ibidi* possui dois reservatórios que são separados por um canal estreito perpendicular aos mesmos. O canal e os reservatórios foram, previamente, tratados com *Cell-Tak™*. As células foram plaqueadas no canal e, após as células aderirem, os reservatórios foram preenchidos com meio sem quimioatraente (azul). A seguir, 18 μ L de meio contendo SCF foram adicionados ao reservatório (rosa) e 18 μ L do meio foram retirados do reservatório oposto (azul) para formar um gradiente. As células que migraram em direção ao reservatório contendo o SCF (rosa) foram analisadas em *Biostation Nikon IMQ* e a velocidade de migração foi mensurada.

14. Análise do Espalhamento Celular

BMMC WT e SAMS $N1^{-}$ foram sensibilizados ou não com IgE anti-TNP por 16 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. A seguir, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, por centrifugação, plaqueadas (8×10^4 /poço) em lamínulas de vidro, colocadas em placas de 24 poços, previamente tratadas com *Cell-Tak* e incubadas por 40 minutos a 37°C para a adesão das células. As células aderidas às laminulas foram lavadas gentilmente com PBS e estimuladas com 50 ng/mL de DNP₄₈-HSA (Sigma-Aldrich) por 30 minutos a 37°C. Após o estímulo, as células foram lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído 2% em PBS, por 20 minutos. Logo após, as células foram lavadas em PBS, incubadas em PBS contendo 0,1M de glicina, por 10 minutos e lavadas novamente em PBS. A seguir, as células foram permeabilizadas com 0,3% de Triton X-100, por 10 minutos e lavadas em PBS. As células foram incubadas por 1 hora com faloidina conjugada a Alexa-488, na concentração final de 1,0 U/mL, diluída em PBS e lavadas 5 vezes com PBS. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro com Fluoromount G. As células foram analisadas e as imagens foram adquiridas em microscópio confocal Leica SP5. A área celular foi avaliada utilizando o *software* FIJI.

15. Ensaio de liberação de β -hexosaminidase

Para avaliar a desgranulação dos mastócitos, as células foram submetidas ao ensaio de liberação de β -hexosaminidase. BMMC WT e SAMS $N1^{-}$ (8×10^4 células/poço) e mastócitos RBL-2H3 e mastócitos RBL-2H3 *knockdown* para SAMS $N1$ (3×10^4 células/poço) foram plaqueados em placa de cultivo de 96 poços (Corning Costar, Sigma-Aldrich), previamente tratadas com *Cell-Tak* (para BMMC). Células sensibilizadas ou não com IgE anti-TNP foram mantidas por 16 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A seguir, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas uma vez com 100 μ L de tampão de Tyrode (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 12 mM NaHCO₃; 0,37 mM NaH₂PO₄; 0,1 mM MgCl₂; 1,3 mM CaCl₂ e 10 mM Hepes, pH 7,3) suplementado com 0,1% de BSA e 0,01% de gelatina de suíno (Sigma-Aldrich), e estimuladas via Fc ϵ RI com 50 ng/mL de DNP₄₈-HSA por 45 minutos a 37°C. O estímulo foi preparado no mesmo tampão utilizado para as lavagens (tampão de Tyrode suplementado com 0,1% de BSA e 0,01% de gelatina). As células WT e as mastócitos RBL-2H3 e estimuladas com DNP₄₈-HSA, sem a adição do substrato NAG (p-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Glucosaminide, Sigma-Aldrich), foram utilizadas como controles negativos. Os

sobrenadantes foram transferidos para outros poços da mesma placa. As células aderidas foram solubilizadas em 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) diluído em tampão de lavagem. Para cada 25µL do solubilizado de células e 25µL do sobrenadante, foram adicionados um volume igual, de 8mM do substrato NAG, previamente preparado em tampão citrato-ácido cítrico 0,1 M, pH 4,5. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL da solução de 0,2 M glicina, 0,2 M NaCl, 0,2 M NaOH, pH 10. O teor de β -hexosaminidase foi determinado pela medida do produto da reação a 405 nm utilizando-se o leitor de placas Elisa Power Wave X Plate Reader (Bio-Tek Instrument, Winooski, VT, EUA). O valor total (100%) de atividade de β -hexosaminidase de cada poço foi determinado pela soma das leituras do sobrenadante mais o solubilizado em 1% Triton X-100. O valor total da β -hexosaminidase foi calculado pela soma da atividade de β -hexosaminidase do sobrenadante com a do lisado celular. A porcentagem da atividade β -hexosaminidase liberada foi calculada pela quantidade de β -hexosaminidase no sobrenadante dividida pelo valor total e multiplicado por 100.

16. Análise Estatística

Os dados foram analisados com o *software* GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California). Os resultados obtidos foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão e analisados estatisticamente pela análise de variância ANOVA, seguido dos pós-testes de múltiplas comparações de Tukey ou Dunnett. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. SAMS1 é expressa em mastócitos

A SAMS1 foi detectada em mastócitos da linhagem de rato RBL-2H3 e mastócitos derivados da medula óssea (BMMC) de camundongos (Figura 10).

Figura 10: SAMS1 é expressa em mastócitos. Imunofluorescência de mastócitos RBL-2H3 e BMMC. As células foram marcadas com o anticorpo primário anti-SAMS1 e o anticorpo secundário IgG de cabra anti-coelho conjugado com Alexa-488. Barra: 10µm.

A SAMS1 está presente na superfície celular, no citoplasma e no núcleo dos mastócitos RBL-2H3. A localização de SAMS1 também foi investigada em mastócitos RBL-2H3 após estímulo via FcεRI. Quando os mastócitos RBL-2H3 foram estimulados via FcεRI, a maior parte de SAMS1 foi encontrada no núcleo (Figura 11). Estes dados mostram que a SAMS1 transita entre o núcleo e o citoplasma em mastócitos RBL-2H3.

Figura 11: Distribuição de SAMSIN1 em mastócitos da linhagem RBL-2H3. Mastócitos RBL-2H3 estimulados ou não via $Fc\epsilon RI$ foram permeabilizados e imunomarcados com o anticorpo anti-SAMSIN1 (canal vermelho). Os núcleos foram marcados com DAPI (canal azul). Barra: 10 μm . Dados representativos de três experimentos independentes.

1.1 Localização subcelular de SAMSIN1 em mastócitos RBL-2H3

A SAMSIN1 também foi identificada no complexo de Golgi e nos grânulos de mastócitos RBL-2H3. A SAMSIN1 se colocaliza parcialmente com o marcador de cis-Golgi, GM130 ($tM1 = 0,4526 \pm 0,01628$), com o marcador da rede trans-Golgi, TGN38 ($tM1 = 0,5039 \pm 0,03216$) e com o marcador de grânulos, CD63 ($tM1 = 0,5883 \pm 0,04983$) (Figura 12).

Figura 12: SAMSIN1 se colocaliza com GM130, TGN38 e CD63 em mastócitos RBL-2H3. Dupla marcação de SAMSIN1 com anti-GM130, anti-TGN38 e anti-CD63 em mastócitos RBL-2H3 mostrou uma colocalização parcial com (A) cis-Golgi: GM130, (B) rede trans-Golgi: TGN38 e (C) grânulos de mastócitos: CD63. SAMSIN1: canal vermelho; GM130/TGN38/CD63: canal verde. Barra: 10 µm. (D) O gráfico mostra o coeficiente de colocalização de Manders expresso como a colocalização dos marcadores com SAMSIN1. Dados representativos da média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes.

2. Mastócitos RBL-2H3 *knockdown* para SAMSIN1

Os níveis de expressão de SAMSIN1 foram reduzidos em mastócitos RBL-2H3 para facilitar alguns estudos e confirmar os resultados obtidos com BMMC SAMSIN1⁻. Para reduzir os níveis de expressão de SAMSIN1 (*knockdown*) foi utilizada a técnica de shRNA. Após a transdução dos mastócitos RBL-2H3, o *knockdown* para SAMSIN1 foi confirmado por qPCR e por *Western blot*. A análise quantitativa da expressão do RNA mensageiro (RNAm) de SAMSIN1 nas células transduzidas com shRNA (clones 284 e 704) revelou uma diminuição de cerca de 75% dos níveis de RNAm. A transdução com o shRNA controle (shCTRL) não alterou os níveis de RNAm de SAMSIN1 (Figura 13 A). A capacidade das partículas lentivirais em diminuir os níveis proteicos de SAMSIN1 em mastócitos RBL-2H3 foi analisada por *Western blot* com o anticorpo anti-SAMSIN1. Uma redução de cerca de 55% na expressão de SAMSIN1 (Figura 13 B, C) foi observada. A

expressão de SAMSIN1 nas células transduzidas com shCTRL não foi alterada quando comparadas aos mastócitos RBL-2H3 não transduzidos. Estas células foram utilizadas nos estudos de migração e de liberação de mediadores de mastócitos.

Figura 13: shRNA reduz a expressão de SAMSIN1 em mastócitos RBL-2H3. Mastócitos RBL-2H3 foram transduzidos com partículas lentivirais expressando shRNAs com alvo em SAMSIN1 (clones 284 e 704) ou não alvo (shCTRL). (A) Transcritos de SAMSIN1 foram quantificados utilizando a expressão de GAPDH como controle endógeno. (B) *Western blot* para SAMSIN1 e para β -actina (controle endógeno) foram utilizados. A densidade óptica média das bandas foi determinada. Dados representativos da média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ entre mastócitos RBL-2H3 não transduzidos e mastócitos RBL-2H3 *knockdown* para SAMSIN1 (sh284 e sh704). n. s.: não significativo.

3. Camundongos SAMSIN1⁻

Com o objetivo de ampliar a caracterização da função de SAMSIN1 em mastócitos, camundongos C57BL/KaLwRijHsd (SAMSIN1⁻) e camundongos C57BL/6JolaHsd (WT) também foram utilizados neste estudo.

3.1 Caracterização dos camundongos

3.1.1 Genotipagem

Para a identificação do genótipo foram realizadas reações de PCR com os pares de *primers* DEL.F6 e BP1F/DEL.+55kb.F (Noll et al., 2014) e DNA genômico proveniente dos camundongos. As amostras de camundongos WT só amplificam com o *primer* DEL.F6 e apresentam uma banda de 168 pares de bases. Enquanto que as amostras de camundongos SAMSIN1⁻ amplificam uma banda de 592 pares de bases somente com o par de *primer* BP1F/DEL.+55kb.F. As amostras que apresentaram amplificação em ambos os pares de *primers* (DEL.F6 e BP1F/DEL.+55kb.F) foram oriundas de animais heterozigotos (Figura 14).

Figura 14: Genotipagem de camundongos WT e SAMS1^{-/-}. Biópsias das caudas de camundongos foram coletadas e o DNA genômico foi extraído. O DNA genômico foi utilizado para a realização de PCR com os pares de primers DEL.F6 e BP1F/DEL.55kb.F. O gel de agarose representativo das genotipagens demonstra a amplificação de uma banda somente com o *primer* DEL.F6 nos animais WT e heterozigotos. O par de primer BP1F/DEL.+55kb.F apresenta amplificação nos animais SAMS1^{-/-} e em animais heterozigotos. Het: heterozigotos; C.N.: controle negativo, sem DNA genômico.

3.1.2 Confirmação da deficiência em SAMS1 em BMMC de camundongos C57BL/KaLwRijHsd

Para confirmar a deficiência de SAMS1 em mastócitos, os BMMC de camundongos C57BL/KaLwRijHsd e WT foram lisados e analisados por *Western blot* com o uso de anticorpo anti-SAMS1. O *Western blot* confirma que os BMMC dos camundongos C57BL/KaLwRijHsd não expressam SAMS1 (Figura 15).

Figura 15: BMMC dos camundongos C57BL/KaLwRijHsd não expressam SAMS1. Lisados de BMMC de camundongos WT e camundongos C57BL/KaLwRijHsd foram analisados por *Western blot* com o uso do anticorpo anti-SAMS1. β-actina foi utilizada como controle endógeno. Imagem representativa de três experimentos independentes.

4. A distribuição de mastócitos em tecidos periféricos específicos está alterada em camundongos SAMS^{N1}^{-/-}

Inicialmente, investigamos a distribuição de mastócitos em tecidos de camundongos SAMS^{N1}^{-/-} em comparação com WT. Os resultados mostraram que o número de mastócitos em camundongos SAMS^{N1}^{-/-} é 50% menor na pele (6 mastócitos/mm² ± 0,57) quando comparados aos WT (12 mastócitos/mm² ± 1,52) e 30% menor na língua (14,6 mastócitos/mm² ± 0,67) quando comparados com camundongos WT (20 mastócitos/mm² ± 0,94) (Figura 16). Por outro lado, a porcentagem de mastócitos presentes no lavado peritoneal de camundongos SAMS^{N1}^{-/-} é similar ao observado em camundongos WT (Figura 16). Estes resultados sugerem que SAMS^{N1} está envolvida no *homing* de mastócitos para tecidos periféricos específicos, mas não para a cavidade peritoneal.

Figura 16: Distribuição de mastócitos nos tecidos periféricos. Cortes dos fragmentos de pele (A, B) e língua (D, E) de camundongos WT e SAMS^{N1}^{-/-} foram corados com azul de toluidina, pH 2,8 e os mastócitos metacromáticos (setas) foram quantificados (C, F). Lavados peritoneais de camundongos WT (G) e SAMS^{N1}^{-/-} (H) foram coletados, as células foram coradas com o azul de toluidina, pH 2,8 e quantificadas em câmara de Neubauer. A porcentagem de mastócitos presentes no lavado peritoneal foi determinada (I). Barra: 50 µm para pele e língua e 10 µm para o lavado peritoneal. Dados representativos da média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes. *p<0,05 entre camundongos WT e camundongos SAMS^{N1}^{-/-}.

5. O recrutamento de mastócitos para a cavidade peritoneal é reduzido em camundongos SAMS^{N1}⁻

O número de mastócitos no lavado peritoneal de camundongos SAMS^{N1}⁻ não está diminuído, como ocorre em outros tecidos. Assim sendo, foi de interesse investigar se o recrutamento de mastócitos para a cavidade peritoneal também não é alterado. O recrutamento de mastócitos foi analisado após a injeção intraperitoneal dos quimioatraentes IL-3 e SCF em camundongos SAMS^{N1}⁻ e WT. Os resultados mostram que o recrutamento de mastócitos para cavidade peritoneal é menor em camundongos SAMS^{N1}⁻ em comparação aos camundongos WT. O recrutamento é reduzido em cerca de 50% com o uso de IL-3 e 48% com SCF (Figura 17). Estes resultados mostram que, apesar de não afetar o *homing* de mastócitos para a cavidade peritoneal, a SAMS^{N1} está envolvida no recrutamento de mastócitos, processo que ocorre durante reações alérgicas e inflamatórias.

Figura 17: O recrutamento de mastócitos para a cavidade peritoneal é reduzido em camundongos SAMS^{N1}⁻. Os camundongos foram eutanasiados 6 horas após a injeção intraperitoneal de IL-3, SCF ou veículo (PBS). O lavado peritoneal foi coletado e corado com azul de toluidina 0,1%, pH 2,8. As células do lavado peritoneal foram contadas e a porcentagem de mastócitos peritoneais no lavado foi determinada. Dados representativos da média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ entre camundongos WT e camundongos SAMS^{N1}⁻.

6. SAMS^{N1} está envolvida na migração de mastócitos

A distribuição de mastócitos nos tecidos periféricos e o recrutamento para a cavidade peritoneal são reduzidos em camundongos SAMS^{N1}⁻. O povoamento dos sítios periféricos por mastócitos e o recrutamento dependem do processo de migração celular. Com base nestes achados, foi de interesse investigar a migração de células BMDC SAMS^{N1}⁻ em comparação com WT com o uso de *Transwell*®. Os resultados mostraram que os BMDCs SAMS^{N1}⁻ migram cerca de 40% menos na presença do quimioatraente

SCF e cerca de 80% menos na presença de IL-3 em comparação aos BMMCs WT (Figura 18 A, B). Estes dados mostram que a SAMSIN1 é importante para o processo de migração dos mastócitos. Estes achados foram confirmados com mastócitos RBL-2H3 *knockdown* para SAMSIN1. A migração dos mastócitos RBL-2H3 *knockdown* para SAMSIN1 (sh284 e sh704) é 40% menor em relação à migração de mastócitos RBL-2H3 não transduzidos e transduzidos com o vetor controle (shCTRL), em presença do quimioatraente CCL3. (Figura 18 C).

Figura 18: A deficiência em SAMSIN1 diminui a migração de mastócitos. BMMC WT e SAMSIN1⁻ e mastócitos RBL-2H3 e mastócitos RBL-2H3 *knockdown* para SAMSIN1 foram plaqueados em sistema *Transwell* e incubados na presença ou ausência de quimioatraentes (SQ). Os quimioatraentes utilizados foram: (A) SCF, (B) IL-3 para BMMC e (C) CCL3 para mastócitos RBL-2H3. Dados representativos da média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ entre BMMC WT e SAMSIN1⁻ e entre mastócitos RBL-2H3 não transduzidos e mastócitos RBL-2H3 *knockdown* para SAMSIN1 (sh284 e sh704). n. s.: não significativo.

7. A velocidade de migração é menor em mastócitos SAMSIN1⁻

Como no sistema *Transwell* os BMMC SAMSIN1⁻ migram menos, em relação aos BMMCs WT, a velocidade de migração destas células foi avaliada em *Ibidi μ -Slide Chemotaxis^{2D}* utilizando a *Biostation Nikon IMQ*. Os resultados mostram que a velocidade média de migração dos BMMCs SAMSIN1⁻ é menor em comparação com a dos BMMCs WT (Figura 19 A). Ainda, a distância percorrida, a cada 4 minutos, pelos BMMC SAMSIN1⁻ é menor quando comparada aos BMMC WT (Figura 19 B).

Figura 19: A velocidade média de migração é menor em mastócitos SAMSN1^{-/-}. BMMC SAMSN1^{-/-} e WT foram aderidos em *Ibidi µ-Slide Chemotaxis*^{2D} coberto com *Cell-Tak* e incubados com meio Iscove's contendo 1nM de SCF. As imagens foram capturadas por 36 horas, a cada 4 minutos. O trajeto percorrido por cada célula foi traçado manualmente com o uso do *software* FIJI, através do *Plug-in Manual Tracking*. Foram analisadas, no mínimo, 50 células. (A) A velocidade média foi calculada e demonstrada em µm/minuto. (B) A distância percorrida foi mensurada a cada 4 minutos (*frame*). *p<0,05 entre BMMC WT e SAMSN1^{-/-}.

8. A deficiência em SAMSN1 interfere na formação de lamelipódios e filopódios

Como a deficiência em SAMSN1 diminui a migração de mastócitos, foi de interesse investigar estruturas essenciais envolvidas neste processo, como os lamelipódios e filopódios. Para identificar estas estruturas, membranas de *Transwell*®, contendo BMMC SAMSN1^{-/-} e WT, que migraram na presença ou ausência do quimioatraente SCF, foram analisadas. Para tal, as membranas foram fixadas e incubadas com faloidina conjugada a Alexa-488 para a identificação das células que migraram, através da marcação dos filamentos de actina. Os resultados mostram que em comparação com BMMC WT (Figura 20 A, B), os BMBCs SAMSN1^{-/-} não se espalham e apresentam poucos filopódios e lamelipódios, mesmo na presença de SCF (Figura 20 C, D). Estas diferenças morfológicas são confirmadas pelas medidas da área celular (Figura 20 E). Estes dados podem explicar a taxa de migração reduzida dos mastócitos SAMSN1^{-/-}.

Figura 20: SAMSIN1 é importante para a formação de lamelipódios e filopódios. Imagens representativas de BMMCs que migraram e estão na face da membrana voltada para o meio sem quimioatraentes (A, C) e SCF (B, D). (E) Quantificação da área celular. As células foram marcadas com faloidina conjugada a Alexa-488 e a área celular foi avaliada utilizando o *software* FIJI. Lamelipódios (cabeças de seta) e filopódios (setas). Imagens adquiridas em microscópio confocal (Leica, SP5). Barra: 10 µm. Dados representativos da média ± desvio padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ entre BMMC WT e SAMSIN1⁻.

9. A expressão de cortactina é menor em mastócitos SAMSIN1⁻

Devido ao fato dos mastócitos SAMSIN1⁻ apresentarem um menor espalhamento e formação de lamelipódios e filopódios, foi de interesse investigar a expressão de cortactina. A cortactina é uma proteína citosólica que promove a polimerização e a reorganização do citoesqueleto de actina, sendo considerada uma das principais proteínas reguladoras das protrusões celulares (Cosen-Binker & Kapus, 2006). Os resultados de *Western blot* com anticorpo anti-cortactina mostram que BMMC SAMSIN1⁻ apresentam uma diminuição na expressão total da cortactina em relação aos BMMC WT (Figura 21 A, B). Estes resultados explicam a diminuição de protrusões celulares nos BMMCs SAMSIN1⁻ que resultam na diminuição da migração celular.

Figura 21: A expressão da cortactina é menor em mastócitos SAMS1^{-/-}. (A) *Western blot* de lisados de BMMC WT e SAMS1^{-/-} utilizando anticorpo anti-cortactina. (B) A densidade óptica média das bandas foi determinada. β-actina foi utilizada como controle endógeno. Dados representativos da média ± desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ entre BMMC WT e SAMS1^{-/-}.

10. A expressão de vimentina está alterada em mastócitos SAMS1^{-/-}

Como a SAMS1 está relacionada com a migração celular e com a expressão de proteínas envolvidas neste processo, foi de interesse investigar a expressão de vimentina nestas células. A vimentina é a principal proteína dos filamentos intermediários encontrada em células que migram no organismo adulto, como fibroblastos e leucócitos. A expressão de vimentina foi analisada por *Western blot* nos lisados de BMMC SAMS1^{-/-} e WT, com o uso de anticorpo anti-vimentina. A expressão de vimentina está reduzida nos BMCMs SAMS1^{-/-} em comparação com BMCMs WT (Figura 22 A, B). Estes achados mostram que a SAMS1 é importante para a expressão de mais uma proteína envolvida no processo de migração celular.

Figura 22: A expressão de vimentina está diminuída em mastócitos SAMS1^{-/-} (A) *Western blot* de lisados de BMMC WT e SAMS1^{-/-} utilizando anticorpo anti-vimentina. (B) Gráfico da densidade óptica média das bandas. β-actina foi utilizada como controle endógeno. Dados representativos da média ± desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ entre BMMC WT e SAMS1^{-/-}.

11. A expressão de vinculina e talina não é alterada em mastócitos SAMS1^{-/-}

A vinculina e a talina são proteínas encontradas nas adesões focais (Ziegler *et al*, 2006; Critchley & Gingras, 2008). Estas estruturas são necessárias para a adesão celular que ocorre durante o espalhamento e a migração das células (Vorotnikov, 2011). As alterações encontradas no espalhamento e na migração em BMMC SAMS1^{-/-} nos levaram a investigar as adesões focais destas células através da expressão de vinculina e talina. Os experimentos de *Western blot* não mostraram diferenças na expressão de vinculina e talina entre BMMC SAMS1^{-/-} e BMMC WT (Figura 23 A, B). Embora a SAMS1 seja importante para a etapa de protrusão celular durante o processo de migração, estes achados mostram que a SAMS1 não é importante para a etapa de adesão celular durante a migração.

Figura 23: A expressão de vinculina e talina não é alterada em mastócitos SAMS1⁻. *Western blot* de lisados de BMMC SAMS1⁻ e WT utilizando anticorpo anti-vinculina (A) e anti-talina (B). A densidade óptica média das bandas foi determinada. β-actina foi utilizada como controle endógeno. Dados representativos da média ± desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ BMMC WT e SAMS1⁻; n.s.: não significativo.

12. A expressão das Rho GTPases RhoA, Rac1 e Cdc42 não é alterada em mastócitos SAMS1⁻

As GTPases da família Rho regulam a polimerização de actina e, portanto, são importantes para o processo de migração celular. Assim sendo, foi de interesse investigar a expressão das Rho GTPases RhoA, Rac1 e Cdc42 em BMMC SAMS1⁻ e WT. A análise por *Western blot* mostrou que a expressão de RhoA (Figura 24A), Rac1 (Figura 24 B) e Cdc42 (Figura 24 C) não está alterada em BMMC SAMS1⁻ quando comparadas a BMMC WT. Estes resultados mostram que a expressão das GTPases RhoA, Rac1 e Cdc42 não está alterada em BMMC SAMS1⁻.

Figura 24: A expressão das Rho GTPases não é alterada em mastócitos SAMS1⁻. *Western blot* de lisados de BMMC WT e SAMS1⁻ utilizando anticorpos anti-RhoA (A), anti-Rac1 (B) e anti-Cdc42 (C). A densidade óptica média das bandas foi determinada. β-actina foi utilizada como controle endógeno. Dados representativos da média ± desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ entre BMMC WT e SAMS1⁻; n.s.: não significativo.

13. A deficiência em SAMS1 interfere com espalhamento de mastócitos estimulados via FcεRI

Os resultados mostram que o espalhamento celular é menor em mastócitos SAMS1⁻. O espalhamento e a adesão celular são importantes também para a eficiência do processo de secreção celular (Pfeiffer, 1985; Pfeiffer & Oliver, 1994; Edgar *et al*, 1997). Assim sendo, BMMC SAMS1⁻ foram estimulados ou não via FcεRI, e o espalhamento dos mastócitos foi avaliado em comparação com BMMC WT estimulados ou não via FcεRI (Figura 25). Para tal, as células foram aderidas em lamínulas cobertas com *Cell-Tak*, marcadas com faloidina conjugada a Alexa-488 e a área celular foi medida. Os resultados mostram que após o estímulo via FcεRI, a área dos BMBCs SAMS1⁻ é menor em relação à dos BMBCs WT (Figura 25 B, D). A área dos BMBCs SAMS1⁻ e WT não estimulados permaneceu inalterada (Figura 25 A, C). As medidas da área celular confirmam as diferenças morfológicas apresentadas pelo espalhamento celular (Figura 25 E).

Figura 25: SAMSIN1 é importante para o espalhamento de mastócitos estimulados. Avaliação da área celular de BMMC WT e SAMSIN1⁻ estimulados ou não via FcεRI. (A) BMMC WT não estimulados, (B) BMMC WT estimulados via FcεRI, (C) BMMC SAMSIN1⁻ não estimulados, (D) BMMC SAMSIN1⁻ estimulados via FcεRI. (E) Quantificação da área celular. Os mastócitos foram aderidos em lamínulas cobertas com *Cell-Tak*. As células foram marcadas com faloidina conjugada a Alexa-488 e a área celular foi avaliada utilizando o *software* FIJI. Imagens adquiridas em microscópio confocal (Leica, SP5) Barra: 10 µm. NE: não estimulado; E: estimulado via FcεRI. Dados representativos da média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *p<0,05 entre BMMC WT e SAMSIN1⁻.

14. SAMSIN1 não afeta a liberação de β-hexosaminidase em mastócitos estimulados via FcεRI

Como os BMMCs SAMSIN1⁻ se espalham menos no substrato, foi de interesse investigar a liberação do mediador pré-formado β-hexosaminidase nestas células em comparação com os BMMCs WT. As células foram estimuladas via FcεRI por 45 minutos e, a seguir, a liberação de β-hexosaminidase foi mensurada. Os resultados mostraram que a liberação de β-hexosaminidase foi similar entre BMMC WT e BMMC SAMSIN1⁻ (Figura 26 A). Estes achados foram confirmados em mastócitos RBL-2H3 *knockdown* para SAMSIN1 (sh284 e sh704) (Figura 26 B). Estes dados mostram que a diminuição do espalhamento celular e alterações em algumas proteínas relacionadas com a reorganização do citoesqueleto de actina, observadas em mastócitos BMMC SAMSIN1⁻, não são suficientes para impedir a desgranulação destas células.

Figura 26: A deficiência em SAMS1 não altera a liberação de β -hexosaminidase em mastócitos. (A) Mastócitos WT e SAMS1⁻ foram estimulados (IgE + DNP₄₈-HSA) ou não (meio). (B) Mastócitos RBL-2H3 não transduzidos ou mastócitos *knockdown* para SAMS1 (clones sh284 e sh704) foram estimulados ou não via Fc ϵ RI. Os mastócitos foram sensibilizados com IgE anti-TNP por 16 horas e incubadas com 50ng/mL de DNP₄₈-HSA, por 45 minutos. Dados representativos da média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ entre BMMC WT e SAMS1⁻ e entre mastócitos RBL-2H3 não transduzidos e mastócitos RBL-2H3 *knockdown* para SAMS1 (sh284 e sh704). n. s.: não significativo.

Nossos achados também mostraram que os níveis de expressão de Fc ϵ RI é similar entre mastócitos RBL-2H3 *knockdown* para SAMS1 (sh284 e sh704) e mastócitos RBL-2H3 não transduzidos. As análises foram realizadas por citometria de fluxo utilizando o mAb BC4 que reconhece a subunidade α do Fc ϵ RI (Figura 27 A, B).

Figura 27: A expressão de Fc ϵ RI na superfície de mastócitos RBL-2H3 *knockdown* para SAMS1 não é alterada. Citometria de fluxo de células não permeabilizadas imunomarcadas com o anticorpo monoclonal BC4 conjugado a FITC. (A) Histograma da intensidade de fluorescência. (B) Mediana da Intensidade de Fluorescência. Dados representativos da média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ entre mastócitos RBL-2H3 não transduzidos e mastócitos RBL-2H3 *knockdown* para SAMS1 (sh284 e sh704). n. s.: não significativo.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que a SAMSIN1 é expressa em mastócitos e participa de alguns processos fisiológicos destas células. Apesar da SAMSIN1 ser expressa em células hematopoiéticas (Claudio *et al*, 2001), esta proteína não havia sido detectada em mastócitos. Os nossos achados mostram, pela primeira vez, a expressão de SAMSIN1 em mastócitos de rato RBL-2H3 e em mastócitos derivados da medula óssea de camundongos.

A SAMSIN1 está presente na superfície celular, no citoplasma e no núcleo de mastócitos RBL-2H3 não estimulados. A localização subcelular de SAMSIN1 é controversa, porém os estudos foram realizados com células transfectadas com SAMSIN1. Até o presente, não foi demonstrada a distribuição endógena da SAMSIN1 em nenhum tipo celular. A SAMSIN1 foi descrita no núcleo de células de rim de macaco COS7 transfectadas com SAMSIN1 (Uchida *et al*, 2001). Embora a SAMSIN1 possua um sinal de localização nuclear (Claudio *et al*, 2001), esta proteína também foi encontrada no citoplasma de células de rim de macaco COS1, em células da linhagem KG-1a derivada da medula óssea humana de pacientes com leucemia mielóide aguda e em células da linhagem K-562 derivada da medula óssea humana de pacientes com leucemia mielóide crônica que foram transfectadas com SAMSIN1 (Claudio *et al*, 2001). Estas diferenças na distribuição subcelular de SAMSIN1 podem ser resultantes da transfecção. A localização subcelular de proteínas pode ser alterada quando as células são transfectadas com proteínas fusionadas a *tags* (Cui *et al*, 2016; Margolin, 2012; Johnston *et al*, 2012). Usando células Jurkat transfectadas com SAMSIN1 os pesquisadores mostram que a SAMSIN1 transita entre o citoplasma e o núcleo sendo, portanto, considerada um transportador molecular (Brandt *et al*, 2010). Os nossos resultados com imunomarcção também mostram que a maior parte de SAMSIN1 se transloca do citoplasma para o núcleo, quando os mastócitos RBL-2H3 são estimulados via FcεRI. Os nossos resultados com imunomarcção mostram ainda, que a SAMSIN1 está localizada no complexo de Golgi (face cis-Golgi e rede trans-Golgi) e nos grânulos de mastócitos. Estudos sobre a função de SAMSIN1 ainda são limitados. Para investigar o papel funcional de SAMSIN1 em mastócitos foram utilizados mastócitos de rato RBL-2H3 *knockdown* para SAMSIN1 e camundongos SAMSIN1^{-/-}.

A migração celular é um processo crucial para a função de mastócitos. Os mastócitos se originam na medula óssea e migram para os tecidos periféricos onde amadurecem e exercem as suas funções (Jamur & Oliver, 2011). Nossos dados mostram que mastócitos SAMS $N1^{-}$ migram menos em comparação com mastócitos WT. Estes dados são confirmados por experimentos que mostram que a velocidade de migração e a distância percorrida por estas células são menores quando comparados com as dos mastócitos WT. A migração celular é um processo dinâmico e extremamente regulado, podendo ser visto como um ciclo multipasso, que inclui o espalhamento celular, a formação de adesões estáveis na periferia da célula, a translocação do corpo celular em direção a quimioatraentes, a liberação das adesões e a retração da parte posterior da célula. Os nossos achados mostram que mastócitos SAMS $N1^{-}$ espalham menos no substrato e migram menos que mastócitos WT. Estas células apresentam poucos lamelipódios e filopódios. A polarização e o espalhamento celular envolvem a reorganização do citoesqueleto de actina e, conseqüentemente, a formação de lamelipódios e filopódios (Vorotnikov, 2011). Em células HeLa transfectadas com SAMS $N1$ foi observado que esta proteína desempenha um papel na polarização e no espalhamento destas células (von Holleben *et al*, 2011). A superexpressão de SASH1, proteína da família de SAMNS1, em células HEK293, resulta em um aumento de filamentos de actina e na formação de protrusões nestas células (Martini *et al*, 2011). A cortactina é uma proteína citosólica que promove a formação de filamentos de actina ramificados, regulando a formação de protrusões celulares (Cosen-Binker & Kapus, 2006). Nossos dados demonstram que a expressão de cortactina está diminuída em mastócitos SAMS $N1^{-}$. Isto pode explicar a diminuição na formação de lamelipódios e filopódios nestas células. Os estudos com células HT1080 de fibrosarcoma humano *knockdown* para cortactina também mostram uma redução na formação de lamelipódios (Bryce *et al*, 2005). Estes achados corroboram com os nossos estudos.

Alterações no processo de migração celular também podem ser causadas por diferenças na adesão celular e nos níveis de expressão das proteínas presentes nas adesões focais (Goldmann, 2012). A vinculina é uma proteína citoplasmática de 116 KDa presente nas adesões focais, nas adesões célula-célula e célula-matriz extracelular, que pode modular o espalhamento das células no substrato (Ziegler *et al*, 2006; Goldmann, 2012). A talina é uma proteína citoplasmática de 270 KDa, também presente nas adesões focais, que liga os domínios citoplasmáticos das subunidades β das integrinas aos filamentos de

actina (Critchley & Gingras, 2008). Nossos resultados mostram que a deficiência em SAMSN1 não afeta a expressão de vinculina ou de talina.

A adesão e o espalhamento celular são etapas importantes também no processo de secreção celular (Pfeiffer, 1985; Pfeiffer & Oliver, 1994; Edgar *et al*, 1997). A ativação de mastócitos RBL-2H3 resulta no espalhamento celular e na formação de fibras de stress e adesões focais ricas em vinculina e talina. (Kawasugi *et al*, 1995). Os mastócitos SAMSN1⁻ se espalham menos no substrato, quando ativados via FcεRI, porém a liberação de β-hexosaminidase não é alterada. Isto pode ser explicado pelos níveis de expressão de vinculina e de talina não estarem diminuídos nas adesões focais, o que seria suficiente para não alterar a adesão celular e, conseqüentemente, a desgranulação. Outra proteína envolvida na migração celular é a vimentina. Dados da literatura mostram que a expressão de vimentina está associada com a migração de fibroblastos, células imunes e cancerígenas (Chernoivanenko *et al*, 2012; Mendez *et al*, 2010; Komura *et al*, 2012). Nossos achados mostram que mastócitos SAMSN1⁻ migram menos e apresentam uma diminuição na expressão de vimentina. A vimentina é considerada a principal proteína dos filamentos intermediários, que mantém a forma das células e regulam a arquitetura celular (Chernoivanenko *et al*, 2012). A vimentina também é importante para o processo de transmigração leucocitária, formando estruturas dinâmicas nas células endoteliais e em leucócitos nas zonas de contato entre elas (Ivaska *et al*, 2007).

Os resultados do presente estudo mostram que não ocorre alteração nos níveis de expressão de RhoA, Rac1 e Cdc42 em mastócitos SAMSN1⁻. Entretanto, alterações na atividade destas GTPases podem estar relacionadas com a sua distribuição subcelular (Lawson & Ridley, 2018). Os níveis de atividade da GTPase Rho podem alterar a velocidade de migração celular. A RhoG controla a atividade de Rac1 e, por sua vez, a formação de lamelipódios durante a migração celular (Kato *et al*, 2006). A Rac interage com a proteína lamelipoidina, o que contribui para a regulação da extensão do lamelipódio (Law *et al*, 2013). A proteína Cdc42 desempenha um importante papel na polarização da célula e na persistência da migração celular (Ridley, 2015). Esta proteína também é importante para a extensão de filopódios em células endoteliais durante a angiogênese (Wakayama *et al*, 2015).

A distribuição de mastócitos nos tecidos depende da migração de progenitores de mastócitos da medula óssea para os sítios periféricos (Vicente-Manzanares, 2005;

Hallgren & Gurish, 2007). Os tecidos periféricos são continuamente reabastecidos de mastócitos para manter uma homeostase entre o número de células que morrem e a quantidade de novas células progenitoras que chegam nos tecidos (Metcalf *et al*, 1995). O desequilíbrio no número destas células no tecido pode desencadear um efeito deletério (Hallgren & Gurish, 2007). Os nossos estudos *in vitro* mostram que o processo de migração está diminuído em mastócitos SAMS^{N1}⁻. Assim sendo, foi de interesse investigar a distribuição de mastócitos nos tecidos de camundongos SAMS^{N1}⁻. Os resultados do presente estudo mostram que o número de mastócitos é menor na pele e na língua de camundongos SAMS^{N1}⁻. Isto sugere que a SAMS^{N1} está envolvida no processo de *homing* de mastócitos para estes tecidos. A modulação dos processos de *homing* de mastócitos ainda não é totalmente esclarecida. Diversos estudos utilizando animais *knockout* investigaram vários receptores e moléculas na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos neste processo (Gurish *et al*, 2001; Rosenkranz *et al*, 1998). Estudos demonstraram que integrinas $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ são essenciais para o *homing* de mastócitos para a cavidade peritoneal (Rosenkranz *et al*, 1998; Berlanga *et al*, 2005). A subunidade β_2 de integrina também é importante para o *homing* de mastócitos para a pele (Rosenkranz *et al*, 1998). A integrina $\alpha_4\beta_7$ é funcional no *homing* de mastócitos para o intestino, bem como o receptor de quimiocina CXCR2 (J. Pablo Abonia, K. Frank Austen, Barrett J. Rollins, Sunil K. Joshi, Richard A. Flavell, William A. Kuziel, Pandelakis A. Koni, 2005).

Observamos que não ocorreu alteração no *homing* de mastócitos para a cavidade peritoneal de camundongos SAMS^{N1}⁻. No entanto, os mastócitos podem ser recrutados em resposta a um estímulo externo, como ocorre durante os processos alérgicos e inflamatórios. Assim sendo, investigamos o recrutamento de mastócitos para a cavidade peritoneal, mediada pelos quimioatraentes SCF e IL-3. Nossos resultados mostram que o recrutamento para a cavidade peritoneal induzido pelos quimioatraentes SCF e IL-3 está reduzido em camundongos SAMS^{N1}⁻. Outros pesquisadores já demonstraram que o processo de recrutamento depende da migração de mastócitos em resposta a quimioatraentes (Dahlin & Hallgren, 2015). O recrutamento de progenitores de mastócitos da medula óssea para os tecidos periféricos requer interações adesivas e migração direcionada. A migração direcionada é essencial para a chegada dos progenitores de mastócitos nos tecidos periféricos e inclui os seguintes estágios: o movimento do progenitor de mastócitos da medula óssea para os sinusóides, a migração

dos progenitores de mastócitos através do endotélio, o recrutamento através dos vasos sanguíneos para os tecidos e o deslocamento até a localização final no tecido, onde estas células sofrerão maturação (Collington *et al*, 2011). Integrinas, moléculas de adesão, quimiocinas e seus receptores, bem como citocinas e fatores de crescimento são agentes importantes na migração direcionada de progenitores de mastócitos para locais específicos, tanto em situações fisiológicas como patológicas (Gurish *et al*, 2001; J. Pablo Abonia, K. Frank Austen, Barrett J. Rollins, Sunil K. Joshi, Richard A. Flavell, William A. Kuziel, Pandelakis A. Koni, 2005; Rosenkranz *et al*, 1998; Collington *et al*, 2010b; de Cássia Campos *et al*, 2014).

Pesquisadores que investigam o tráfego de mastócitos para os tecidos acreditam que a migração dos progenitores de mastócitos é controlada de maneira tecido-específica (Collington *et al*, 2011; Frossi *et al*, 2018). Esta especificidade pode ser explicada pelos mastócitos apresentarem diferentes características fenotípicas, devido à sua heterogeneidade (da Silva *et al*, 2014; Frossi *et al*, 2017; Gurish & Boyce, 2006). Estas características são resultados de estímulos do microambiente tecidual em que estão presentes e também pela experiência prévia destas células durante a trajetória entre a saída da medula óssea e a chegada no sítio periférico (Frossi *et al*, 2018).

Estudos adicionais são necessários para explicar o motivo pelo qual a SAMS1 é importante para o recrutamento de mastócitos para a cavidade peritoneal, mas não para o processo de *homing* para este sítio. Entender os mecanismos que controlam a distribuição dos mastócitos nos tecidos é de extrema importância dado ao seu papel nas alergias e nos processos inflamatórios (da Silva *et al*, 2014).

Os nossos resultados mostram que a SAMS1 está envolvida no *homing* e no recrutamento de mastócitos, processos importantes para a manutenção destas células nos sítios periféricos durante processos alérgicos e inflamatórios. Portanto, a SAMS1 pode servir de alvo para novas estratégias terapêuticas relacionadas com a inflamação e com a alergia.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- A SAMSN1 regula o espalhamento celular e modula o processo de migração dos mastócitos;
- A SAMSN1 está envolvida no *homing* e no recrutamento de mastócitos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida Buranello PA, Moulin MRI, Souza DA, Jamur MC, Roque-Barreira MC & Oliver C (2010) The lectin ArtinM induces recruitment of rat mast cells from the bone marrow to the peritoneal cavity. *PLoS One* **5**: e9776
- Arjonen A, Kaukonen R & Ivaska J (2011) Filopodia and adhesion in cancer cell motility. *Cell Adh. Migr.* **5**: 421–430
- Barsumian EL, Isersky C, Petrino MG & Siraganian RP (1981) IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. *Eur. J. Immunol.* **11**: 317–323
- Basciano LK, Berenstein EH, Kmak L & Siraganian RP (1986) Monoclonal antibodies that inhibit IgE binding. *J. Biol. Chem.* **261**: 11823–31
- Berlanga O, Emambokus N & Frampton J (2005) GPIIb (CD41) integrin is expressed on mast cells and influences their adhesion properties. *Exp. Hematol.* **33**: 403–412
- Boureux A, Vignal E, Faure S & Fort P (2007) Evolution of the Rho Family of Ras-Like GTPases in Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 203–216
- Brandt S, Ellwanger K, Beuter-Gunia C, Schuster M, Hausser A, Schmitz I & Beer-Hammer S (2010) SLy2 targets the nuclear SAP30/HDAC1 complex. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**: 1472–1481
- Brown MA, Sayed BA & Christy A (2008) Mast Cells and the Adaptive Immune Response. *J. Clin. Immunol.* **28**: 671–676
- Bryce NS, Clark ES, Leysath JL, Currie JD, Webb DJ & Weaver AM (2005) Cortactin Promotes Cell Motility by Enhancing Lamellipodial Persistence. *Curr. Biol.* **15**: 1276–1285
- de Cássia Campos MR, Toso VD, de Souza DA, Vieira GV, da Silva EZM, Oliver C & Jamur MC (2014) Differential effects of chemoattractants on mast cell recruitment in vivo. *Cell. Immunol.* **289**: 86–90

- Chen Y, Negre N, Li Q, Mieczkowska JO, Slattery M, Liu T, Zhang Y, Kim T-K, He HH, Zieba J, Ruan Y, Bickel PJ, Myers RM, Wold BJ, White KP, Lieb JD & Liu XS (2012) Systematic evaluation of factors influencing ChIP-seq fidelity. *Nat. Methods* **9**: 609–614
- Chernoivanenko IS, Minin AA & Minin AA (2012) Role of Vimentin in Cell Migration. *Embryog. Cancerog.*
- Choi CK, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A & Horwitz AR (2008) Actin and α -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol.* **10**: 1039–1050
- Claudio JO, Zhu YX, Benn SJ, Shukla AH, McGlade CJ, Falcioni N & Stewart AK (2001) HACS1 encodes a novel SH3-SAM adaptor protein differentially expressed in normal and malignant hematopoietic cells. *Oncogene* **20**: 5373–5377
- Collington SJ, Hallgren J, Pease JE, Jones TG, Rollins BJ, Westwick J, Austen KF, Williams TJ, Gurish MF & Weller CL (2010a) The Role of the CCL2/CCR2 Axis in Mouse Mast Cell Migration In Vitro and In Vivo. *J. Immunol.* **184**: 6114–6123
- Collington SJ, Westwick J, Williams TJ & Weller CL (2010b) The function of CCR3 on mouse bone marrow-derived mast cells in vitro. *Immunology* **129**: 115–124
- Collington SJ, Williams TJ & Weller CL (2011) Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues. *Trends Immunol.* **32**: 478–85
- Cosen-Binker LI & Kapus A (2006) Cortactin: The Gray Eminence of the Cytoskeleton. *Physiology* **21**: 352–361
- Critchley DR & Gingras AR (2008) Talin at a glance. *J. Cell Sci.* **121**: 1345–1347
- Cui Y, Gao C, Zhao Q & Jiang L (2016) High-Resolution Imaging of Cellular Proteins Schwartzbach SD Skalli O & Schikorski T (eds) New York, NY: Springer New York
- Dahlin JS & Hallgren J (2015) Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. *Mol. Immunol.* **63**: 9–17
- DD, Metcalfe; Baram D MY (1997) Mast Cells. *Physiol. Rev.* **77**: 1033–79

- Edgar AJ, Davies GR, Anwar MA & Bennett JP (1997) Loss of cell surface microvilli on rat basophilic leukaemia cells precedes secretion and can be mimicked using the calmodulin antagonist trifluoperazine. *Inflamm. Res.* **46**: 354–360
- El-Sibai M, Pertz O, Pang H, Yip S-C, Lorenz M, Symons M, Condeelis JS, Hahn KM & Backer JM (2008) RhoA/ROCK-mediated switching between Cdc42- and Rac1-dependent protrusion in MTLn3 carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **314**: 1540–1552
- Enerbäck L, Kolset SO, Kusche M, Hjerpe a & Lindahl U (1985) Glycosaminoglycans in rat mucosal mast cells. *Biochem. J.* **227**: 661–8
- Etienne-Manneville S & Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629–635
- Frossi B, Mion F, Sibilano R, Danelli L & Pucillo CEM (2018) Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? *Immunol. Rev.* **282**: 35–46
- Frossi B, Mion F, Tripodo C, Colombo MP & Pucillo CE (2017) Rheostatic Functions of Mast Cells in the Control of Innate and Adaptive Immune Responses. *Trends Immunol.* **38**: 648–656
- Galli SJ, Maurer M & Lantz CS (1999) Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 53–9
- Galli SJ, Nakae S & Tsai M (2005) Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **6**: 135–42
- Galli SJ, Tsai M & Wershil BK (1993) The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am. J. Pathol.* **142**: 965–74
- Gilfillan A, Peavy R & Metcalfe D (2009) Amplification mechanisms for the enhancement of antigen-mediated mast cell activation. *Immunol. Res.* **43**: 15–24
- Gilfillan AM & Tkaczyk C (2006) Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 218–30
- Goldmann WH (2012) Mechanotransduction and focal adhesions. *Cell Biol. Int.* **36**: 649–652

- Grodzki ACG, Moon KD, Berenstein EH & Siraganian RP (2009) FcεRI-induced activation by low antigen concentrations results in nuclear signals in the absence of degranulation. *Mol. Immunol.* **46**: 2539–2547
- Gurish MF & Boyce JA (2006) Mast cells: Ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**: 1285–1291
- Gurish MF, Tao H, Abonia JP, Arya A, Friend DS, Parker CM & Austen KF (2001) Intestinal mast cell progenitors require CD49dbeta7 (alpha4beta7 integrin) for tissue-specific homing. *J. Exp. Med.* **194**: 1243–52
- Hall A (1998) Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* (80-.). **279**: 509–514
- Hallgren J & Gurish MF (2007) Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. *Immunol. Rev.* **217**: 8–18
- Hanna S & El-Sibai M (2013) Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cell. Signal.* **25**: 1955–1961
- Hoffmann M & Schwarz US (2013) A kinetic model for RNA-interference of focal adhesions. *BMC Syst. Biol.* **7**: 2
- Holleben M, Gohla A, Janssen K-P, Iritani BM & Beer-Hammer S (2011) Immunoinhibitory Adapter Protein Src Homology Domain 3 Lymphocyte Protein 2 (SLy2) Regulates Actin Dynamics and B Cell Spreading. *J. Biol. Chem.* **286**: 13489–13501
- Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G & Schwartz LB (1986) Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 4464–4468
- Ivaska J, Pallari H, Nevo J & Eriksson JE (2007) Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp. Cell Res.* **313**: 2050–2062
- J. Pablo Abonia, Jenny Hallgren, Tatiana Jones, Tong Shi, Yuhui Xu, Pandelakis Koni, Richard A. Flavell, Joshua A. Boyce, K. Frank Austen and MFG & Normal (2006) Alpha-4 integrins and VCAM-1, but not MAdCAM-1, are essential for recruitment of mast cell progenitors to the inflamed lung. *Blood* **108**: 1588–1594

- J. Pablo Abonia, K. Frank Austen, Barrett J. Rollins, Sunil K. Joshi, Richard A. Flavell, William A. Kuziel, Pandelakis A. Koni and MFG (2005) Constitutive homing of mast cell progenitors to the intestine depends on autologous expression of the chemokine receptor CXCR2. *Blood* **105**: 4308–4313
- Jamur M, Moreno AN, Mello LF, Souza Júnior D, Campos M, Pastor M, Grodzki A, Silva DC & Oliver C (2010) Mast cell repopulation of the peritoneal cavity: contribution of mast cell progenitors versus bone marrow derived committed mast cell precursors. *BMC Immunol.* **11**: 32
- Jamur MC & Oliver C (2011) Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors. *Front. Biosci. (Schol. Ed).* **3**: 1390–406
- Jamur MC (2005a) Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow. *Blood* **105**: 4282–4289
- Jamur MC et al (2005b) Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow. *Blood* **105**: 4282–4289
- Johnston JA, Ward CL & Kopito RR (2012) A Cellular Response to Misfolded Proteins Aggresomes : *Cell* **143**: 1883–1898
- Kamp M, Liu Y & Kortholt A (2016) Function and Regulation of Heterotrimeric G Proteins during Chemotaxis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**: 90
- Katoh et al (2006) Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *J. Cell Sci.* **119**: 56–65
- Kawasugi K, French PW, Penny R & Ludowyke RI (1995) Focal adhesion formation is associated with secretion of allergic mediators. *Cell Motil. Cytoskeleton* **31**: 215–224
- Kinbara K, Goldfinger LE, Hansen M, Chou F-L & Ginsberg MH (2003) Ras GTPases: integrins’ friends or foes? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 767–778
- Kitamura Y & Fujita J (1989) Regulation of Mast Cell Differentiation. **10**: 193–196
- Komura K, Ise H & Akaike T (2012) Dynamic behaviors of vimentin induced by interaction with GlcNAc molecules. *Glycobiology* **22**: 1741–1759

- Kunii J, Takahashi K, Kasakura K, Tsuda M, Nakano K, Hosono A & Kaminogawa S (2011) Commensal bacteria promote migration of mast cells into the intestine. *Immunobiology* **216**: 692–697
- Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC, Nawa Y, Dranoff G & Galli SJ (1998) Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* **392**: 90–93
- Law A-L, Vehlow A, Kotini M, Dodgson L, Soong D, Theveneau E, Bodo C, Taylor E, Navarro C, Perera U, Michael M, Dunn GA, Bennett D, Mayor R & Krause M (2013) Lamellipodin and the Scar/WAVE complex cooperate to promote cell migration in vivo. *J. Cell Biol.* **203**: 673–689
- Lawson CD & Ridley AJ (2018) Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J. Cell Biol.* **217**: 447–457
- Letort G, Ennomani H, Gressin L, Théry M & Blanchoin L (2015) Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton. *F1000Research* **4**: 1–11
- Li A, Dawson JC, Forero-Vargas M, Spence HJ, Yu X, König I, Anderson K & Machesky LM (2010) The Actin-Bundling Protein Fascin Stabilizes Actin in Invadopodia and Potentiates Protrusive Invasion. *Curr. Biol.* **20**: 339–345
- Lundequist A & Pejler G (2011) Biological implications of preformed mast cell mediators. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**: 965–75
- Luster AD (2001) Chemotaxis: Role in Immune Response. In *Encyclopedia of Life Sciences* pp 1–12. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd
- Margolin W (2012) The price of tags in protein localization studies. *J. Bacteriol.* **194**: 6369–6371
- Martini M, Gnann A, Scheikl D, Holzmann B & Janssen K-P (2011) The candidate tumor suppressor SASH1 interacts with the actin cytoskeleton and stimulates cell–matrix adhesion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**: 1630–1640
- Mendez MG, Kojima S-I & Goldman RD (2010) Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* **24**: 1838–1851

- Metcalf DD, Mekori JA & Rottem M (1995) Mast cell ontogeny and apoptosis. *Exp. Dermatol.* **4**: 227–230
- Moreau HD, Piel M, Voituriez R & Lennon-Duménil A-M (2018) Integrating Physical and Molecular Insights on Immune Cell Migration. *Trends Immunol.* **39**: 632–643
- Noll JE, Hewett DR, Williams S a, Vandyke K, Kok C, To LB & Zannettino ACW (2014) SAMS1 is a tumor suppressor gene in multiple myeloma. *Neoplasia* **16**: 572–85
- Okayama Y & Kawakami T (2006) Development, Migration, and Survival of Mast Cells. *Immunol. Res.* **34**: 97–116
- Pascalis C & Etienne-Manneville S (2017) Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Mol. Biol. Cell* **28**: 1833–1846
- Pawson T (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**: 573–80
- Pejler G, Rönnberg E, Waern I & Wernersson S (2010) Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* **115**: 4981–90
- Peng W, Lei Q, Jiang Z & Hu Z (2014) Characterization of Golgi scaffold proteins and their roles in compartmentalizing cell signaling. *J. Mol. Histol.* **45**: 435–445
- Pfeiffer JR (1985) Membrane and cytoskeletal changes associated with IgE-mediated serotonin release from rat basophilic leukemia cells. *J. Cell Biol.* **101**: 2145–2155
- Pfeiffer JR & Oliver JM (1994) Tyrosine kinase-dependent assembly of actin plaques linking Fc epsilon R1 cross-linking to increased cell substrate adhesion in RBL-2H3 tumor mast cells. *J. Immunol.* **152**: 270–9
- Pribluda V & Metzger H (1992) Transmembrane signaling by the high-affinity IgE receptor on membrane preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 11446–11450
- Ridley A, Schwartz M & Burridge K (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science (80-.).* **302**: 1704–1710
- Ridley AJ (2015) Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **36**: 103–112
- Rivera J & Cordero J (2002) Macromolecular protein signaling complexes and mast cell responses: a view of the organization of IgE-dependent mast cell signaling. *Mol. Immunol.* **38**: 1253–1258

- Rørth P (2009) Collective Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**: 407–429
- Rosenkranz a R, Coxon A, Maurer M, Gurish MF, Austen KF, Friend DS, Galli SJ & Mayadas TN (1998) Impaired mast cell development and innate immunity in Mac-1 (CD11b/CD18, CR3)-deficient mice. *J. Immunol.* **161**: 6463–7
- Rottner K & Stradal TE (2011) Actin dynamics and turnover in cell motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**: 569–578
- da Silva EZM, Jamur MC & Oliver C (2014) Mast Cell Function. *J. Histochem. Cytochem.* **62**: 698–738
- Siraganian R (2003) Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Curr. Opin. Immunol.* **15**: 639–646
- Small JV (1995) Actin filament organization in the fish keratocyte lamellipodium. *J. Cell Biol.* **129**: 1275–1286
- de Souza Junior DA, Santana AC, da Silva EZM, Oliver C & Jamur MC (2015) The Role of Mast Cell Specific Chymases and Trypsases in Tumor Angiogenesis. *Biomed Res. Int.* **2015**: 1–13
- Stinchcombe JC & Griffiths GM (2001) Normal and abnormal secretion by haemopoietic cells. *Immunology* **103**: 10–6
- Tkachenko E, Sabouri-Ghomi M, Pertz O, Kim C, Gutierrez E, Machacek M, Groisman A, Danuser G & Ginsberg MH (2011) Protein kinase A governs a RhoA–RhoGDI protrusion–retraction pacemaker in migrating cells. *Nat. Cell Biol.* **13**: 660–667
- Uchida T, Nakao A, Nakano N, Kuramasu A, Saito H, Okumura K & Ogawa H (2001) Identification of Nash1, a Novel Protein Containing a Nuclear Localization Signal, a Sterile α Motif, and an SH3 Domain Preferentially Expressed in Mast Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**: 137–141
- Vicente-Manzanares M (2005) Cell migration at a glance. *J. Cell Sci.* **118**: 4917–4919
- Vorotnikova. V. (2011) Chemotaxis: Movement, direction, control. *Biochem.* **76**: 1528–1555

- Wakayama Y, Fukuhara S, Ando K, Matsuda M & Mochizuki N (2015) Cdc42 Mediates Bmp-Induced Sprouting Angiogenesis through Fmnl3-Driven Assembly of Endothelial Filopodia in Zebrafish. *Dev. Cell* **32**: 109–122
- Wang D, Stewart a K, Zhuang L, Zhu Y, Wang Y, Shi C, Keating A, Slutsky A, Zhang H & Wen X-Y (2010) Enhanced adaptive immunity in mice lacking the immunoinhibitory adaptor Hacs1. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**: 947–56
- Wang Z, Mascarenhas N, Eckmann L, Miyamoto Y, Sun X, Kawakami T & Di Nardo A (2017) Skin microbiome promotes mast cell maturation by triggering stem cell factor production in keratinocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**: 1205–1216.e6
- Watanabe N (2002) Single-Molecule Speckle Analysis of Actin Filament Turnover in Lamellipodia. *Science (80-.).* **295**: 1083–1086
- Wedemeyer J & Galli SJ (2000) Mast cells and basophils in acquired immunity. *Br. Med. Bull.* **56**: 936–55
- 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**: 233–245
- Weller CL, Collington SJ, Brown JK, Miller HRP, Al-Kashi A, Clark P, Jose PJ, Hartnell A & Williams TJ (2005) Leukotriene B4, an activation product of mast cells, is a chemoattractant for their progenitors. *J. Exp. Med.* **201**: 1961–71
- Weller CL, Collington SJ, Hartnell A, Conroy DM, Kaise T, Barker JE, Wilson MS, Taylor GW, Jose PJ & Williams TJ (2007) Chemotactic action of prostaglandin E2 on mouse mast cells acting via the PGE2 receptor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 11712–11717
- Weller CL, Collington SJ, Williams T & Lamb JR (2011) Mast cells in health and disease. *Clin. Sci. (Lond).* **120**: 473–84
- Wernersson S & Pejler G (2014) Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat. Rev. Immunol.* **14**: 478–94

- Yasunaga S, Nishi K, Nishimoto S & Sugahara T (2015) Methoxychlor enhances degranulation of murine mast cells by regulating FcεRI-mediated signal transduction. *J. Immunotoxicol.* **12**: 283–289
- Yong LC (1997) The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. *Exp. Toxicol. Pathol.* **49**: 409–24
- Zhu YX, Benn S, Li ZH, Wei E, Masih-Khan E, Trieu Y, Bali M, McGlade CJ, Claudio JO & Stewart a K (2004) The SH3–SAM Adaptor HACS1 is Up-regulated in B Cell Activation Signaling Cascades. *J. Exp. Med.* **200**: 737–747
- Ziegler WH, Liddington RC & Critchley DR (2006) The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol.* **16**: 453–460

MANUSCRIPT IN PREPARATION

Identification and characterization of SAMSIN1 in mast cells

Ana Carolina Santana¹, Marina Ferreira Cândido¹, Bruno Belmonte Martinelli Gomes¹,
Devandir Antonio de Souza Júnior¹, Constance Oliver¹, and Maria Célia Jamur^{1*}

¹Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents,
Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo,
Ribeirão Preto, SP, Brazil.

*Corresponding Author:

Maria Célia Jamur, PhD

Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents

Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo

Avenida Bandeirantes, 3900

14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

Phone: 55-16-3602-3217

Fax: 55-16-3633-1786

e-mail: mjamur@fmrp.usp.br

Abstract

Mast cells (MCs) are multifunctional immune cells derived from bone marrow, that reside in connective tissue, at the interface between the host and the outside environment. MCs, upon activation, produce and release a large range of biologically active mediators. Therefore, MCs play a role in a wide variety of biological process. MCs can be recruited to peripheral sites by various stimuli, as well as during infection or inflammation. In the present study, the role of SAMSIN1 in MC distribution and recruitment was investigated using SAMSIN1 deficient mice. The number of metachromatic MCs was 50% lower in the skin of SAMSIN1 deficient mice in comparison to wild type (WT) mice. However, the number of metachromatic MCs was not altered in the tongue of SAMSIN1 deficient mice. Since the MC number was altered at specific peripheral site, MC recruitment was also investigated. MC recruitment to the peritoneal cavity was characterized after i.p. injection of the chemoattractant rmIL-3. The number of MC recruited to the peritoneal cavity of SAMSIN1 deficient mice was 65% less when compared to WT mice. SAMSIN1 distribution and function was then studied in RBL-2H3 MCs. In these cells SAMSIN1 was localized at the cell surface, in the cytoplasm and in the nucleus. After FcεRI stimulation, most of the SAMSIN1 was localized in the nucleus of RBL-2H3 MCs. Also, SAMSIN1 was found in the cis-Golgi saccules, the trans-Golgi network and MC granules. After FcεRI stimulation, SAMSIN1 significantly decreased in the cis-Golgi saccules of RBL-2H3 MCs. To better investigate the function of SAMSIN1 in RBL-2H3 MCs, SAMSIN1 was knocked-down in RBL-2H3 MCs. RBL-2H3 MCs were transduced with lentiviral particles encoding shRNAs against SAMSIN1. The transduced cells showed an 75% reduction in SAMSIN1 mRNA levels and around a 55% reduction in protein levels. SAMSIN1 knockdown did not affect the release of β-hexosaminidase after FcεRI stimulation. Also, FcεRI expression was not altered on the surface of SAMSIN1 knockdown RBL-2H3 MCs. The results from this study will contribute to a better understanding of the role of SAMSIN1 in MCs and may provide additional therapeutic approaches to the treatment of allergic and inflammatory processes.

Key Words: mast cells, SAMSIN1, recruitment, SAMSIN1 deficient mice, RBL-2H3 mast cells

Introduction

Mast cells (MCs) are multifunctional immune cells that are localized in connective tissue. They are often associated with blood vessels and nerve endings (Galli et al., 2005; da Silva et al., 2014). MCs are best known for their role in allergy, but they also participate in innate and adaptive immunity, and in host defense against helminthic parasites (Wedemeyer & Galli, 2000). MC function is related to their ability to synthesize and release a variety of biological mediators.

MCs express the high-affinity IgE receptor (FcεRI) on their surface. Activation via FcεRI is the best characterized activation pathway in MCs. MCs are activated via FcεRI when multivalent antigens crosslink antigen-specific IgE bound to the receptor. This results in FcεRI aggregation leading to a signal cascade that results in the release of three distinct classes of mediators: preformed mediators, which are stored in MC cytoplasmic granules (such as β-hexosaminidase, chymases and tryptases); newly formed mediators (such as prostaglandin D2, E2, leukotrienes B4, C4 and Platelet Activating Factor), which are derived from membrane lipids; and newly synthesized mediators (such as IL-1, -3, -4, -6, IFN-γ, TNF-α, CCL5 and CXCL8) which are produced following transcriptional activation. Some MC mediators function as chemoattractants to recruit MCs and other cell types during allergic and infectious processes. The chemoattractants can also participate in MC homing to maintain MC homeostasis in peripheral tissue (Hallgren & Gurish, 2007).

SAMSN1 was first identified in a transcriptional study of differentially expressed genes in normal and malignant hematopoietic cells (Claudio et al., 2001). SAMSN1 is widely expressed in hematopoietic tissues and in low levels in muscle, heart, brain, placenta, lung, pancreas, endothelial cells and myelomas. SAMSN1 is characterized by the presence of SAM and SH3 domains, which suggests that SAMSN1

is probably an adapter or scaffold protein. Furthermore, SAMSN1 has a nuclear localization signal (Claudio *et al*, 2001), indicating that SAMSN1 may be translocated to the nucleus. However, the subcellular localization of SAMSN1 is contradictory. SAMSN1 was described in the nucleus of COS7 cells (Uchida *et al*, 2001) and in cytoplasm of COS1, KG1a, and K562 cells (Claudio *et al*, 2001). Later, it was shown that in Jurkat cells SAMSN1 shuttles between the cytoplasm and the nucleus (Brandt *et al*, 2010). SAMSN1 is a negative regulator of B cell activation and negatively regulates Lyn by modulating its phosphorylation (Wang *et al*, 2010). Additionally, SAMSN1 plays a role in actin cytoskeleton reorganization, promoting Rac1-dependent membrane ruffle formation, cell spreading and cell polarization (von Holleben *et al.*, 2011). Cell spreading is the first step in cell migration, which involves actin cytoskeleton reorganization and lamellipodia and filopodia formation (Vorotnikov, 2011).

In a previous study from our laboratory, we showed that MC recruitment to the skin is diminished in Galectin-3 deficient mice (Gal-3^{-/-} mice). Proteomic analysis showed that bone marrow derived mast cells from Gal-3^{-/-} mice lack SAMSN1. Furthermore, bone marrow derived mast cells from Gal-3^{-/-} mice had a diminished ability to migrate *in vitro* (Toso *et al.*, manuscript in preparation). The release of β -hexosaminidase is also decreased in these mast cells. These studies suggested that SAMSN1 could be involved in MC migration. However, the role of SAMSN1 in MCs has not yet been described. In the present study, the presence and function of SAMSN1 in MCs was characterized. The findings indicate that SAMSN1 is important to MC recruitment to specific sites.

Materials and Methods

Animals and Ethics Statement

C57BL/6J OlaHsd mice (wild type mice) and C57BL/KaLwRijHsd mice (SAMSN1 deficient mice) were purchased from Envigo (Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom). In order to avoid genetic background differences, all the animals used in the experiments were littermates, and were 7-8 weeks-old. Mice were housed in the Animal Research Facilities of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. The research was conducted in accordance with Ethical principles in the use of experimental animals adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation. Experimental protocols were approved by the Commission on Ethics on Animal Experimentation of the Ribeirão Preto Medical School (Protocol number 043/2016).

Genomic DNA Extraction and Genotyping

Biopsies from mouse tail were collected and incubated with lysis buffer (10 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8, 0.5% SDS and 0.4 mg/mL proteinase K – Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA) at 55°C, overnight. Genomic DNA was precipitated with isopropyl alcohol, centrifuged at 13000 rpm for 10 minutes and resuspended in Tris-EDTA buffer. The genomic DNA was used to perform genotyping. PCR was performed using Taq Polimerase Master Mix Green 2x (Cellco Biotec, São Carlos, Brazil) and primers as previously described (Noll *et al*, 2014).

Histology

Animals were sacrificed in a CO₂ chamber and fragments of skin and tongue were collected. The tissues were washed with PBS, fixed in 4% formaldehyde (EM Sciences, Hatfield, PA) in PBS for 4 hours, dehydrated and embedded in paraffin. Serial sections (6 µm) was obtained with 24 µm intervals. Tissue sections were stained with toluidine blue (0.1%, pH 2.8), and mounted on glass slides with Permount (Thermo Fisher Scientific). MCs were counted using an Olympus BX 50 (Olympus Optical Corporation, Tokyo, Japan) microscope equipped with a RT3 Slider 2MP digital camera and Spot Software version 4.7 (Diagnostic Instruments, Inc, Sterling Heights, MI).

Metachromatic MCs were counted in a minimum 50 sections of each tissue from 3 wild type and 3 SAMSN1 deficient mice. The area of each section was then determined using ImageJ software (National Institutes of Health – NIH, Bethesda, MD.

<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and the results were expressed as number of metachromatic MCs per mm² ± SD.

Mast Cell Recruitment

The chemoattractant rmIL-3 (Thermo Fisher Scientific) was injected intraperitoneally (i.p.) at a concentration of 350ng/kg in mice. rmIL-3 was dissolved in PBS containing 0.1% BSA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). For controls, animals were injected only with vehicle (PBS containing 0.1% BSA). Mice were euthanized 6 hours after injection, and the peritoneal lavage was collected by injecting i.p. 4 mL of PBS. The peritoneal lavage was centrifuged at 1000 rpm, for 5 minutes and the cell pellet was washed and fixed with 4% formaldehyde in PBS. The cells were washed in PBS and stained with

toluidine blue (0.1%, pH 2.8). Total cells and metachromatic MCs were counted in a Neubauer camera and the percentage of MCs was then determined.

Cells

The rat mast cell line RBL-2H3 was used in this study (Barsumian et al., 1981). Cells were grown as monolayers in Dulbecco's Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen – Thermo Scientific) supplemented with 15% fetal calf serum (Sigma-Aldrich), and an antibiotic-antimycotic mixture containing 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 0.25 µg/ml amphotericin B (Gibco - Thermo Fisher Scientific) at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂ in air. The HEK293T cell line was used as a packing cell line to produce lentiviral particles and was cultured under the same conditions as the RBL-2H3 MCs.

shRNA Knockdown

Mission® lentiviral shRNA plasmid vectors (pLKO.1) encoding SAMS1 shRNA sequences and a nontargeting shRNA control vector, both also containing a puromycin resistance gene, were purchased from Sigma-Aldrich. The shRNAs employed were designed against the following target sequences: **Clone 284 (sh284)** 5'

CGACTCTATGGACAGTCTTTA 3' and **Clone 704 (sh704)** 5'

GAAAGGAGACATCATAGACAT 3'. shRNA vectors and Mission Lentiviral Packing Mix (Sigma-Aldrich) were co-transfected with FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega Co., Madison, WI) in HEK293T cells to generate lentiviral particles. RBL-2H3 MCs were transduced with control (shCTRL) or SAMS1 lentivirus (sh284 and sh704) overnight. The media containing the virus was replaced with DMEM medium and after 24 hours, puromycin (1 µg/mL; Sigma-Aldrich) was added to select for cells

with shRNA integration. SAMSIN1 knockdown was analysed by real time PCR and Western blot.

Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR)

Total RNA was purified from 5×10^6 cells using the IllustraTM RNAspin Mini Isolation Kit (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA) according to the manufacturer's instructions. 2 μ g of total RNA was reverse-transcribed using the GoScriptTM Reverse Transcription System according to the manufacturer's instructions (Promega Co.) for cDNA synthesis. Gene-specific primers were used for qPCR analysis. Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific) and primers (0.25 μ M for GAPDH and 0.50 μ M for SAMSIN1) (Exxtend, Campinas, Brazil) were used with 2,25 ng of RNA/well of the cDNA product on an ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific). The efficiency of GAPDH and SAMSIN1 primers were 102.36% and 101.32%, respectively. For all RT-PCR analysis, GAPDH mRNA was used to normalize RNA inputs. Primer sequences are as follows:

rat SAMSIN1 forward (5' TGACTCAATCGAGGTCCGTG 3');

rat SAMSIN1 reverse (5' TCCGATACTGGAGGGTTTCCT 3');

rat GAPDH forward (5' AAGGTCGGTGTGAACGGATTT 3');

rat GAPDH reverse (5' TGAAGGGGTCGTTGATGGCA 3').

Antibodies

The following primary antibodies were used: rabbit pAb anti-SAMSN1 1:100 (immunofluorescence), 1:20.000 (Western blot; Proteintech Group, Inc., Chicago, IL), mouse mAb anti-GM130 (5 µg/ml; Clone 35/GM130; BD Transduction Laboratories, San Jose, CA), mouse mAb anti-Rat-TGN38 (5 µg/ml; Clone 2; BD Transduction Laboratories), mouse mAb anti-rat CD63 (1:250; Clone AD1; BD Transduction Laboratories), mouse mAb β -actin (1:500.000; clone AC-15, ascites fluid, Sigma Aldrich), mouse mAb anti-Fc ϵ RI alpha subunit conjugated to FITC (15 µg/ml; Clone BC4; provided by Dr. Reuben Siraganian). The following secondary antibodies were used for immunofluorescence donkey anti-mouse IgG F(ab)'2-Alexa 594 and donkey anti-rabbit IgG F(ab)'2-Alexa 488 or 594 (1:1000; Invitrogen - Thermo Fisher Scientific). The following secondary antibodies were used for immunoblotting: Donkey anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) and donkey anti-rabbit IgG conjugated to HRP (1:10.000; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA). Mouse IgE anti-TNP ascites fluid was used to sensitize cells before Fc ϵ RI stimulation (1:5000; generously provided by Dr. Reuben Siraganian).

Fluorescence Microscopy

Cells were plated (4×10^4 cells/cover slip) and cultured overnight on 13-mm round coverslips. The cells were rinsed in PBS, fixed for 20 min with 2% paraformaldehyde (EM Sciences, Hatfield, PA) in PBS, and permeabilized (TritonX-100 0.3% in PBs for 10 minutes). Next, cells were incubated for 45 min at room temperature in PBS containing 1% BSA (Sigma-Aldrich) and 5 µg/ml normal donkey-IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). After that, cells were then labelled with primary

antibodies diluted in PBS containing 1% BSA for 1 h at room temperature. After incubation, cells were rinsed five times in PBS and incubated for 30 min at room temperature with the secondary antibodies diluted in PBS. Cells were then rinsed in PBS and mounted with Fluoromount-G (EM Sciences). Cells incubated without primary antibody were used as controls. All controls were negative. Samples were analysed using a LSM 780 AxioObserver (Carl Zeiss; Heidelberg, Germany). Colocalization studies were performed using Z-series followed by quantitation of Manders' Colocalization coefficients tM1/tM2 using ImageJ software (National Institutes of Health – NIH), with Colocalization Threshold Plug-in. tM1 is the quantity of above-background pixels in the green channel that overlap above-background pixels in the red channel. Immunostaining of SAMS1 was considered the red channel and the organelle marker was considered the green channel. The organelle markers were GM130 for cis-Golgi, TGN38 for the trans Golgi network, and CD63 for MC granules. A minimum of 5 images was analyzed for each colocalization assay.

Flow Cytometry

To evaluate FcεRI surface expression, non-permeabilized cells were incubated at 4°C for 1 h with mAb BC4-FITC in PBS containing 1% BSA and 5 µg/ml normal donkey IgG, washed in PBS and then fixed for 20 min with 2% paraformaldehyde (EM Sciences) before being analysed with a Guava EasyCyte Mini System using *Cytosoft Blue* software (Guava Technologies, Inc., Hayward, CA).

SDS-Page and Immunoblotting

Whole cell lysates were obtained by incubation of cells with lysis buffer (50 mM Tris-

HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Nonidet-P40, 0.5% sodium deoxycholate, 15 μ L/mL cocktail protease inhibitor, Sigma Aldrich). Lysates were mixed with sample buffer and proteins were separated electrophoretically on 10% polyacrylamide gels and electrotransferred to Hybond nitrocellulose membranes (GE Healthcare Bio-Sciences). After transfer, the membranes were blocked for 1 h at RT in TTBS (0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH 7.5, and 0.05% Tween 20) containing 4% BSA or 5% non-fat milk and probed 1h at RT with individual primary antibodies, washed in TTBS and incubated with the appropriate secondary antibody conjugated to HRP for 30 min at RT, washed and developed using chemiluminescence (ECL - GE Healthcare Bio-Sciences). The images were obtained using a Bio-Rad ChemiDoc imager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The mean optical density of the target protein was determined using ImageJ software (NIH).

β -Hexosamidase release assay

RBL-2H3 MCs degranulation was measured by the release of β -hexosaminidase upon Fc ϵ RI stimulation. Cells were plated (3×10^4 cells/well) in a 96 well tissue culture plate (Costar- Corning Incorporated, Corning, NY), sensitized or not with 1:5000 dilution of IgE anti-TNP ascites fluid in the culture medium and incubated for 16 h followed or not by stimulation with 50ng/mL of DNP₄₈-HSA (Sigma-Aldrich) for 45 min. β -hexosaminidase release was determined as previously described (Jamur et al., 2005). β -hexosaminidase activity was quantified in the supernatants and cell lysates by spectrophotometric analysis of hydrolysis of 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma-Aldrich). β -hexosaminidase release was calculated as the

percentage of β -hexosaminidase activity measured in the supernatants relative to the total amount of β -hexosaminidase activity measured in the supernatant and cell pellet.

Statistics

Data were analysed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

Results were expressed as means $\pm$ SD. Differences between groups were assessed by

One-way ANOVA followed by Tukey's test. A p-value $p < 0.05$ was considered

statistically significant.

Results

SAMSN1 and MC distribution *in vivo*

Since there are normally high numbers of MCs in skin and tongue, MC distribution was examined in these tissues from SAMSN1 deficient and WT mice. Pieces of skin and tongue were taken from WT and SAMSN1 deficient mice, processed for histology and stained with toluidine blue. The number of metachromatic MCs was 50% lower in the skin of SAMSN1 deficient mice ($6 \text{ MCs} \pm 0.57$) when compared to WT mice ($12 \text{ MCs} \pm 1.52$) (Figure 1A-C). In contrast, there was no significant difference in the number of metachromatic MCs in the tongue of SAMSN1 deficient mice ($13.67 \text{ MCs} \pm 0.33$) when compared to WT mice ($16.67 \text{ MCs} \pm 2.40$) (Figure 1D-F).

Recruitment of MCs to the peritoneal cavity

Because of the lower numbers of MCs in the skin, it was of interest to see if there were differences in MC recruitment between WT and SAMSN1 deficient mice. In order to further investigate the participation of SAMSN1 in MC recruitment, mice were injected intraperitoneally with a MC chemoattractant, rmIL-3. MC recruitment to peritoneal cavity induced by IL-3 was 65% less in SAMSN1 deficient mice than in WT mice (Figure 2). These results suggest that SAMSN1 is involved in the recruitment of MCs to specific sites such as skin and the peritoneal cavity.

SAMSN1 is present in RBL-2H3 MCs

To further study the role of SAMSN1 in MCs the mast cell line RBL-2H3 was immunostained with anti-SAMSN1 (Figure 3). SAMSN1 was present at the cell surface,

in the cytoplasm and in the nucleus of resting RBL-2H3 MCs. When RBL-2H3 MCs are stimulated via FcεRI, most of SAMSN1 was found in the nucleus.

SAMSN1 colocalizes with the cis-Golgi saccules, the trans Golgi network and cytoplasmic granules

The subcellular distribution of SAMSN1 was investigated by immunostaining RBL-2H3 MCs for SAMSN1 and for the cis-Golgi saccules (GM130), the trans Golgi network (TGN38) and MCs granules (CD63). SAMSN1 partially colocalizes with GM130 ($tM1 = 0,4526 \pm 0,01628$, Figs. 4A, G), TGN38 ($tM1 = 0,5039 \pm 0,03216$, Figure 4B, G) and CD63 ($tM1 = 0,5883 \pm 0,04983$, Figure 2C, G) in non-stimulated RBL-2H3 MCs. The colocalization of SAMSN1 with GM130 decreases after RBL-2H3 MC0073 stimulation via FcεRI ($tM1 = 0,05126 \pm 0,009784$, Figure 4D, G). In contrast, the colocalization of SAMSN1 with TGN38 and CD63 seems to increase in stimulated RBL-2H3 MCs, but there is no statistical difference ($tM1 = 0,5917 \pm 0,03992$ and $tM1 = 0,7246 \pm 0,04592$, respectively, Figure 4E-G).

SAMSN1 knockdown in RLB-2H3 MCs

In order to study the role of SAMSN1 in MCs, SAMSN1 was knocked-down in RBL-2H3 MCs using shRNA. Quantitative RT-PCR showed a decrease of approximately 75% in SAMSN1 mRNA expression compared to non-transduced cells (Figure 5A). Western blot analysis showed that SAMSN1 knockdown reduced SAMSN1 protein expression (Figure 5B, C) by 55%. The SAMSN1 knockdown RBL-2H3 MCs were used to further characterize SAMSN1 in MCs.

SAMSN1 and MC degranulation

Since SAMSN1 may be involved in signal transduction following RBL-2H3 cell activation via FcεRI, it was of interest to investigate if SAMSN1 is related to MC degranulation. β-hexosaminidase release was analyzed 45 minutes after FcεRI stimulation in RBL-2H3 MCs and SAMSN1 knockdown (sh284 and sh704). The β-hexosaminidase release was not affected by SAMSN1 knockdown (sh284 and sh704) (Figure 6).

FcεRI expression

Due to the fact that SAMSN1 knockdown did not affect degranulation, changes in FcεRI expression on the surface of SAMSN1 knockdown MCs were examined using mAb BC4-FITC which recognizes the α subunit of FcεRI. Flow cytometry analysis of RBL-2H3 MCs and SAMSN1 knockdown MCs showed that expression of FcεRI is not altered in SAMSN1 knockdown RBL-2H3 MCs (Figure 7).

Discussion

The present study, for the first time, showed that SAMSN1 is present in MCs and it may participate in the physiological functioning of MCs. MC number was diminished in the skin of SAMSN1 deficient mice. Furthermore, recruitment of MCs to the peritoneal cavity was reduced in SAMSN1 deficient mice. Additionally, SAMSN1 is present in RBL-2H3 MCs and is translocated to the nucleus following stimulation via FcεRI activation.

The increase of MC number in tissues depends on MC migration to specific sites in response to a chemoattractant (Hallgren & Gurish, 2007). In SAMS1 transfected HeLa cells, SAMS1 plays a role in cell polarization and cell spreading (von Holleben *et al*, 2011). Cell polarization and spreading involve actin cytoskeleton reorganization and lamellipodia and filopodia formation which precedes cell migration (Vorotnikov, 2011).

Cell migration is a fundamental process that controls cell homing and cell recruitment during inflammation and infection (Vicente-Manzanares, 2005). Therefore, we investigated the role of SAMS1 in MC recruitment in SAMS1 deficient mice. MC recruitment to peritoneal cavity induced by IL-3 is impaired in SAMS1 deficient mice. Therefore, SAMS1 may play a role in MC recruitment to peritoneal cavity. The regulation of MC distribution and MC recruitment are of importance since an increase in MC number can have deleterious effect on tissue (Hallgren & Gurish, 2007). The mechanisms by which SAMS1 affects MC homing to the skin and recruitment to peritoneal cavity need to be elucidated.

RBL-2H3 mast cell line was used to facilitate the studies of SAMS1 distribution and function in MCs. SAMS1 is present in cell surface, cytoplasm and nucleus of RBL-2H3 MCs. The nuclear localization of SAMS1 was expected since this protein has a nuclear localization signal (Claudio *et al*, 2001). We also detected SAMS1 in cis-Golgi saccules, Trans-Golgi Network and in MC granules. Scaffold proteins such as SAMS1 generally show highly specific subcellular localization, such as in Golgi apparatus. The Golgi apparatus is considered an important signaling platform for numerous signaling cascades that originate at plasma membrane (Peng *et al*, 2014). In the Golgi apparatus, scaffold proteins recruit proteins to a specific location, organize these proteins into complexes, allowing interactions between the

proteins and signaling. Although, protein interactions with SAMSIN1 have not been previously described in MCs, the presence of SAMSIN1 in cis-Golgi and Trans-Golgi Network suggest a role of SAMSIN1 in MC signaling.

In order to better understand the role of SAMSIN1 in MCs, RBL-2H3 MCs were knocked-down for SAMSIN1. MC function is related to a variety of mediators release by MCs via FcεRI (da Silva *et al*, 2014; Lundequist & Pejler, 2011). Data from B cells showed that SAMSIN1 negatively regulates in Lyn activity (Wang *et al*, 2010). Lyn is one of the first proteins to be activated in the signaling cascade after FcεRI stimulation. However, our results showed that SAMSIN1 knockdown does not affect β-hexosaminidase release after activation via FcεRI and did not change the degree of phosphorylation in RBL-2H3 MCs following FcεRI activation (data not shown). Also, FcεRI expression is not altered in SAMSIN1 knockdown RBL-2H3 MCs in comparison to RBL-2H3 MCs, suggesting that SAMSIN1 is not involved in preformed mediator release.

The results from this study will contribute to understand the role of SAMSIN1 in MCs and may provide additional therapeutic approaches to the treatment of allergic and inflammatory processes.

Acknowledgements

The authors thank Roberta Costa Rosales for assistance with the confocal microscopy, Tânia Paula Aquino Defina for assistance in Real Time PCR, Vani Maria Alves for assistance with histology, and Domingos Soares de Souza Filho for assistance in the animal facility, all from the Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic

Bioagents, FMRPUSP, Ribeirão Preto, SP. Financial support was obtained from CAPES, FAEPA, CNPq and São Paulo Research Foundation (FAPESP).

References

- Barsumian, E. L., Isersky, C., Petrino, M. G., & Siraganian, R. P. (1981). IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. *European Journal of Immunology*, 11(4), 317–323.
- Brandt, S., Ellwanger, K., Beuter-Gunia, C., Schuster, M., Hausser, A., Schmitz, I., & Beer-Hammer, S. (2010). SLy2 targets the nuclear SAP30/HDAC1 complex. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(9), 1472–1481.
- Claudio, J. O., Zhu, Y. X., Benn, S. J., Shukla, A. H., McGlade, C. J., Falcioni, N., & Stewart, A. K. (2001). HAC1 encodes a novel SH3-SAM adaptor protein differentially expressed in normal and malignant hematopoietic cells. *Oncogene*, 20(38), 5373–5377.
- da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C., & Oliver, C. (2014). *Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*.
- Galli, S. J., Nakae, S., & Tsai, M. (2005). Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 6(2), 135–42.
- Hallgren, J., & Gurish, M. F. (2007). Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. *Immunological Reviews*, 217(1), 8–18.
- Jamur, M. C. (2005). Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow. *Blood*, 105(11), 4282–4289.
- Lundequist, A., & Pejler, G. (2011). Biological implications of preformed mast cell mediators. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 68(6), 965–75.
- Noll, J. E., Hewett, D. R., Williams, S. a, Vandyke, K., Kok, C., To, L. B., & Zannettino, A. C. W. (2014). SAMS1 is a tumor suppressor gene in multiple myeloma. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 16(7), 572–85.

- Peng, W., Lei, Q., Jiang, Z., & Hu, Z. (2014). Characterization of Golgi scaffold proteins and their roles in compartmentalizing cell signaling. *Journal of Molecular Histology*, 45(4), 435–445.
- Uchida, T., Nakao, A., Nakano, N., Kuramasu, A., Saito, H., Okumura, K., & Ogawa, H. (2001). Identification of Nash1, a Novel Protein Containing a Nuclear Localization Signal, a Sterile α Motif, and an SH3 Domain Preferentially Expressed in Mast Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288(1), 137–141.
- Vicente-Manzanares, M. (2005). Cell migration at a glance. *Journal of Cell Science*, 118(21), 4917–4919.
- von Holleben, M., Gohla, A., Janssen, K.-P., Iritani, B. M., & Beer-Hammer, S. (2011). Immunoinhibitory Adapter Protein Src Homology Domain 3 Lymphocyte Protein 2 (SLy2) Regulates Actin Dynamics and B Cell Spreading. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13489–13501. 18
- Vorotnikov, a. V. (2011). Chemotaxis: Movement, direction, control. *Biochemistry (Moscow)*, 76(13), 1528–1555.
- Wang, D., Stewart, a K., Zhuang, L., Zhu, Y., Wang, Y., Shi, C., Wen, X.-Y. (2010). Enhanced adaptive immunity in mice lacking the immunoinhibitory adaptor Hacs1. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(3), 947–56.
- Wedemeyer, J., & Galli, S. J. (2000). Mast cells and basophils in acquired immunity. *British Medical Bulletin*, 56(4), 936–55.

Figure Legends

Figure 1: Mast cell distribution in skin and tongue from WT mice and SAMSN1

deficient mice. Pieces of skin (A-B) and tongue (D-E) from WT and SAMSN1

deficient mice were processed for histology and stained for toluidine blue.

Metachromatic MCs (arrows) in skin (C) and tongue (F) were quantified. Data are expressed as the mean $\pm$ SD of three independent experiments.

Figure 2: Mast cell recruitment to peritoneal cavity is reduced in SAMSN1

deficient mice. Mice were euthanized 6 hours after i.p. injection of rmIL-3 or PBS. The peritoneal lavage was collected and stained with toluidine blue. Peritoneal MCs were counted and the percentage MCs in the lavage was determined. Data are expressed as the mean of two independent experiments.

Figure 3: Subcellular localization of SAMSN1 in RBL-2H3 MCs.

Permeabilized RBL-2H3 MCs were labelled with anti-SAMSN1 (red channel) and DAPI (blue channel). Scale bar = 10 μ m. Data is representation of three independent experiments.

Figure 4: SAMSN1 colocalizes with CD63, TGN38 and GM130 in RBL-2H3 MCs.

Double labeling of SAMSN1 with anti-GM130, anti-TGN38, anti-CD63 in non-stimulated RBL-2H3 MCs showed a partial colocalization with the (A) cis-Golgi saccules: GM130, (B) the trans Golgi network: TGN38, and (C) MC granules: CD63. In stimulated RBL-2H3 MCs, colocalization of SAMSN1 with the cis-Golgi saccules was significantly decreased (D). The degree of colocalization with the TGN (E) and

secretory granules was similar. (F). SAMSIN1, red channel; GM130/TGN38/CD63, green channel. Scale bar = 10 μ m. (G) The graph shows Manders' colocalization coefficient values expressed as markers colocalization with SAMSIN1. Data is expressed as the mean $\pm$ SD of three independent experiments.

Figure 5: shRNA decreased SAMSIN1 expression in RBL-2H3 MCs. RBL-2H3 MCs were transduced with lentiviral particles expressing shRNAs targeting SAMSIN1 (clones 284 and 704) or non-targeting (shCTRL). (A) SAMSIN1 transcripts were quantified, using GAPDH expression as an internal control. RBL-2H3 MCs transduced with SAMSIN1 shRNAs had an 75% reduction in SAMSIN1 mRNA expression when compared to non-transduced cells. (B) Cell lysates were immunoblotted for SAMSIN1 and β -actin and the mean optical density of the bands was determined. SAMSIN1 protein expression decreased 55% in comparison to non-transduced cells. Data is expressed as the mean $\pm$ SD of three independent experiments. * P <0.05 between non-transduced cells and SAMSIN1 shRNAs transduced cells.

Figure 6: SAMSIN1 knockdown does not affect the release of β -hexosaminidase after Fc ϵ RI stimulation in RBL-2H3 MCs. Non-transduced and transduced RBL-2H3 MCs were sensitized with IgE anti-DNP for 16h and stimulated or not with DNP₄₈-HSA (50 ng/ml) for 45 min. (A) SAMSIN1 knockdown RBL-2H3 MCs (sh284 and 704) release the same amount of β -hexosaminidase after Fc ϵ RI stimulation when compared with non-transduced RBL-2H3 MCs and transduced with non-targeting shRNA (shCTRL). Data is expressed as the mean $\pm$ SD of three independent experiments.

Figure 7: SAMSN1 knockdown does not alter the surface expression of FcεRI on RBL-2H3 MCs. By FACS analysis, FcεRI surface expression was unaltered in SAMSN1 knockdown RBL-2H3 MCs. (A) Fluorescence intensity histogram. (B) Median Fluorescence Intensity of non-permeabilized cells immunostained with mAb BC4 conjugated to FITC. Data is expressed as the mean $\pm$ SD of three independent experiments.

Figures

Figure 1:

Figure 2:

Figure 3:

Figure 4:

Figure 5:

Figure 6:

Figure 7: