

CZESŁAW S. CIERNIEWSKI

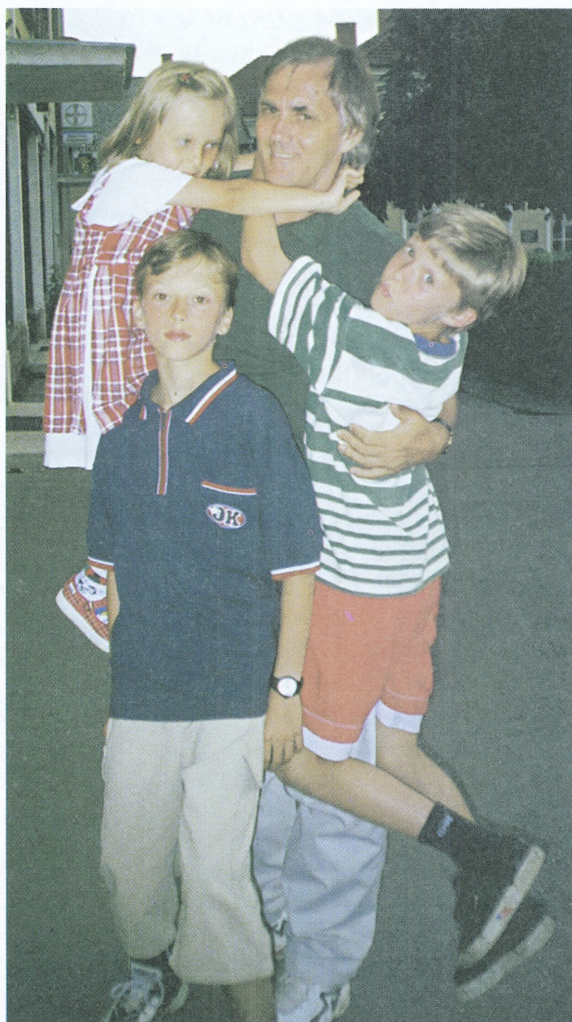
Zakład Biofizyki

Akademia Medyczna w Łodzi

Lindleya 3, 90-131 Łódź

RECEPTOR TCR ORAZ BIAŁKA WSPÓLDZIAŁAJĄCE PODCZAS AKTYWACJI LIMFOCYTÓW T

Rozwój immunologii, tak jak innych dziedzin nauk biologicznych, następował skokowo, a szczególnie dynamicznie w ciągu ostatnich



Autor jest profesorem w Akademii Medycznej oraz w Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN w Łodzi. Jest też międzynarodowym szkolarem Howard Hughes Medical Institute, a także członkiem korespondentem Polskiej Akademii Nauk. Naukowo zajmuje się badaniem białek, które biorą udział w fibrynolizie

dwudziestu lat. Zapoczątkowany został w latach 50. fundamentalnym odkryciem, które polegało na wykazaniu, najpierw, że limfocyt jest główną komórką odpowiedzi immunologicznej, a następnie stwierdzeniu, że istnieją co najmniej dwa typy limfocytów, limfocyty T i B, które pełnią odmienne funkcje. Okazało się bowiem, że pod wpływem antygeny limfocyt B, najczęściej przy udziale limfocytu T, może wytwarzać przeciwciała i w ten sposób bierze udział głównie w odpowiedzi humoralnej. Limfocyt T natomiast, w obecności antygeny, ulega uczuleniu i angażuje się w odpowiedź typu komórkowego. Kolejnym fundamentalnym odkryciem było stwierdzenie, w latach 60., udziału w początkowych etapach odpowiedzi immunologicznej, również komórek innych niż limfocyty. Początkowo nie znając ich funkcji, określono je jako komórki pomocnicze (ang. accessory). Późniejsze obserwacje pozwoliły zidentyfikować makrofagi jako niezbędne komórki dodatkowe podczas wytwarzania przeciwciał, z którymi limfocyty muszą współpracować podczas pierwszych etapów odpowiedzi immunologicznej. Wykryto również inne komórki, nie będące limfocytami, które podobnie jak makrofagi wspomagają rozpoznanie antygeny przez układ immunologiczny, dlatego określa się je jako „komórki prezentujące antygen” (ang. antigen presenting cells). Wyjaśnienie mechanizmów, które leżą u podstaw prezentacji i rozpoznania

i hemostazie oraz mechanizmów molekularnych kontrolujących adhezję i migrację komórek. Odbył liczne staże zagraniczne w wielu ośrodkach naukowych, z których najbardziej sobie ceni te w Scripps Research Institute w La Jolla (staż podoktorski), Temple University w Filadelfii (wspólne granty) oraz Cleveland Clinic Foundation (wspólne granty naukowe). W życiu prywatnym — jest żonaty, ma czworo wspaniałych dzieci i, jeśli czas na to pozwala, stara się regularnie biegać, pływać i grać w tenisa.

antygeny było jednym z głównych celów badań w ciągu ostatnich dwudziestu lat współczesnej immunologii. Przez wiele lat trudno było zrozumieć, jakie jest podłoże niezwyklej specyficzności odpowiedzi immunologicznej na patogeny, które w zdrowym organizmie bezbłędnie rozpoznawane są przez elementy systemu odporności. Powoli staje się to możliwe dzięki zastosowaniu w badaniach tego systemu nowoczesnej metodologii, pozwalającej śledzić losy pojedynczych cząsteczek nie tylko *in vitro*, ale również *in vivo*. Dzięki temu, nasz pogląd na temat rozpoznania cząsteczkowego, które leży u podstaw odpowiedzi immunologicznej, ewoluował z prymitywnego pojęcia specyficzności reakcji, czasami obrazowo przedstawianej jako dopasowanie typu „klucz-zamek”, do bardzo skomplikowanego mechanizmu, który uwzględnia oddziaływanie dziesiątek lub nawet setek różnorodnych cząsteczek. Przy czym, zarówno ta podstawowa reakcja, podczas której antygen jest prezentowany limfocytom T, jak i ciągi reakcji zachodzących we wnętrzu limfocytów po ich aktywacji, są pod kontrolą licznych pętli dodatniego i ujemnego sprzężenia zwrotnego.

Wiele odkryć dokonanych w ciągu ostatnich lat na poziomie molekularnym, często dotyczących pozornie odległych dziedzin, przyczyniło się do pełniejszego opisu zarówno mechanizmu przygotowania i prezentacji, jak i sposobu, w jaki limfocyty rozpoznają antygen. Warto tu wspomnieć niektóre z tych odkryć, na przykład

opisanie budowy antygenów transplantacyjnych oraz ich funkcji; wyjaśnienie struktury receptorów limfocytów T i antygenów różnicowania tych komórek; poznanie cząstek adhezyjnych, które umożliwiają przyleganie limfocytów i komórek pomocniczych; opisanie mediatorów uwalnianych przez makrofagi, a także przemian, które one kontrolują; czy w końcu przesłedzenie metabolizmu antygenów przez makrofagi. Przełomowym odkryciem dla rozwikłania zawilości mechanizmów odpowiedzialnych za przesyłanie odpowiednich sygnałów do wnętrza komórki przez receptor TCR, miało opisanie nowej klasy transbłonowych białek adaptorowych. Ich przedstawicielami w limfocytach są białka LAT, TRIM i SIT. Są one powiązane z receptorem TCR i stanowią rusztowanie dla różnorodnych cząsteczek sygnałowych i efektorowych.

Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie niezwyklej złożoności maszynierii, która decyduje o tym, iż każdy z niezliczonej liczby immunogenów po wtargnięciu do organizmu jest swoiście rozpoznany i może indukować specyficzną dla siebie odpowiedź limfocytów T. Bliższa analiza opisanych mechanizmów uświadamia, jak bardzo zatarła się granica między poszczególnymi dziedzinami nauk biologicznych, a co więcej wskazuje na to, iż mimo olbrzymiej złożoności różnorodnych procesów biologicznych, molekularne podłoże ich regulacji jest bardzo podobne.

MECHANIZMY PREZENTACJI ANTYGENU

Większość reakcji, które prowadzą do pojawienia się odporności nabytej, zachodzi na powierzchni przylegających do siebie dwóch typów komórek, to jest z jednej strony limfocytów T, a z drugiej, komórek prezentujących antygen. Wśród tych ostatnich najbardziej sprawnie działają komórki dendryczne. W tkankach peryferyjnych, niedojrzałe komórki dendryczne niezwykle specyficznym wychwytywają antygeny, a następnie przetwarzają je proteolitycznie do krótkich peptydów. Towarzyszy temu dynamiczny wzrost ekspresji, na ich powierzchni, kompleksu antygeny zgodności tkankowej typu II (MHC II). W miarę jak wędrują do lokalnych węzłów chłonnych, komórki te ulegają różnicowaniu i tracą umiejętność wychwytywania antygenów. Nabywają natomiast zdolności aktywowania limfocytów T, która pojawia się w efekcie podwyższenia ich właściwości adhezyjnych, a także znacznego wydłużenia okresu półtrwania cząsteczek MHC II na powierzchni ich błony komórkowej (CELLA i współaut. 1997).

Cząsteczki głównych kompleksów antygeny zgodności tkankowej typu I i II (MHC I i II) są wysoce polimorficzne, to znaczy występują w wielu formach różniących się często podstawieniem pojedynczych lub kilku reszt aminokwasowych w określonych pozycjach łańcucha polipeptydowego. Poszczególne formy MHC I i II mają odmienną strukturę przestrzenną zwłaszcza miejsc, poprzez które przyłączają różnorodne peptydy powstałe po rozkładzie antygeny. Dzięki temu mogą one specyficznym rozpoznawać rozmaite ligandy peptydowe i w ten sposób spełniają swoją podstawową funkcję, która polega na ochronie organizmu przed infekcją różnymi patogenami. Poznanie struktury przestrzennej kilku mysich cząsteczek MHC I i MHC II, po ich uprzedniej krystalizacji, pozwoliło zweryfikować molekularny mechanizm rozpoznania cząsteczkowego, a także wyjaśnić w jaki sposób ich polimorfizm określa unikatowe, pod względem kształtu, miejsca zakotwiczenia dla ligandów peptydowych. Ostatnie badania wy-

kazały, że polimorfizm cząsteczek MHC odpowiedzialny jest prawdopodobnie, poza selekcją peptydów powstałych po rozkładzie antygeny, również za inne funkcje tego białka. Okazało się bowiem, że cząsteczki MHC w różnym stopniu oddziałują z grupą białek jeszcze przedtem, zanim przyłączony zostanie do nich ligand peptydowy w retikulum endoplazmatycznym. Wśród tych białek znajduje się 2 mikroglobulina, kalneksyna, kalretikulina, Erp57, a także TAP-tapasy, przy czym powinowactwo tego oddziaływania zmienia się w różnych fazach odpowiedzi immunologicznej. I tak na przykład, białka te z różną mocą wiążą się z poszczególnymi formami polimorficznymi MHC, zarówno podczas przetwarzania antygeny, jak i w czasie jego prezentacji. Wszystkie te oddziaływania mają niezwykle istotny wpływ na stopień obładowania poszczególnych cząsteczek MHC ligandami peptydowymi. Co więcej, decydują o zdolności wiązania peptydów przez MHC w poszczególnych obszarach endoplazmatycznego retikulum, to jest o tym, czy peptyd przyłączony jest w błonie plazmatycznej, czy też w endosomach.

Ostatnio opisano również inne białka, które oprócz kompleksów MHC mogą brać udział w prezentacji antygenów. Są dowody na to, iż na przykład białka CD1 wspomagają system MHC II podczas prezentacji antygenów zwłaszcza tych, które pochodzą z mikroorganizmów. Budowa przestrzenna mysich cząsteczek CD1d1 ujawniła ich wielkie podobieństwo do obu typów białek MHC. Podstawowa różnica między CD1d1 oraz MHC sprowadza się do tego, iż te pierwsze mają znacznie głębszą szczelinę wiążącą ligand peptydowy oraz zawierają w jej pobliżu dwie głębokie kieszenie hydrofobowe. Idealnie pasują one do bakteryjnych glikolipidów, które już wykrywano w powiązaniu z CD1. Również szlak przemian cząsteczek CD1 jest podobny do tego, który jest typowy dla kompleksów MHC. I tak na przykład, CD1b jak i MHC II przechodzą fazę lizosomalną. W przypadku CD1, na tym etapie przyłączony zostaje glikolipid. W odróżnieniu od CD1b oraz MHC II, CD1c transportowany jest bezpośrednio do błony komórkowej, a antygen wiąże się z nim w endosomach.

AKTYWACJA LIMFOCYTÓW T

W wyniku prezentacji antygeny, receptory limfocytów T (TCR) inicjują kaskadę sygnalizacji komórkowej i w efekcie zapoczątkowują odpowiedź immunologiczną. Przez wiele lat trudno było zrozumieć w jaki sposób słabe oddziaływania między kompleksem białek MHC oraz receptorem TCR mogą prowadzić do lawinowej sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Dopiero badania ostatnich lat przybliżyły nam mechanizm tych przemian (VALITUTTI i LANZAVECCHIA 1997). Wszystkie obserwacje wskazują na to, że pojedyncza cząsteczka MHC może wchodzić w oddziaływania z wieloma receptorami TCR, dzięki czemu ma miejsce akumulacja zaktywowanych cząsteczek sygnalnych po stronie wewnętrznej błony komórkowej. W momencie przekroczenia pewnego progu sygnał przekazywany jest dalej do kilku szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Aktywacja limfocytów T uzewnętrznia się w różny sposób i ulega nasileniu w miarę upływu czasu. Poszczególne fazy aktywacji limfocytów, wynikające z oddziaływania receptora TCR z kompleksem MHC, charakteryzują się różną kinetyką i prawdopodobnie wywoływane są odmiennymi sygnałami. I tak na przykład, uwalnianie cytotoksycznych zawartości granul ma miejsce już po kilku minutach działania na receptor niewielkich ilości antygeny. Znacznie silniejszych sygnałów wymaga proliferacja, która zachodzi po kilku go-

dzinach, wymaga dużych dawek antygeny oraz zaangażowania znacznie większej liczby receptorów TCR. Po takim czasie w limfocytach następuje odblokowanie i aktywacja wielu genów, a także synteza *de novo* licznych białek, w tym cytokin — niezwykle ważnych dla odpowiedzi immunologicznej. Przykłady powyższe dowodzą, iż wielkość dawki antygeny określa charakter odpowiedzi immunologicznej zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym. Wszystko wskazuje na to, że poszczególne fazy reakcji limfocytów na antygeny wynikają z aktywacji różnych zestawów cząsteczek sygnalnych, z których każda charakteryzuje się określonym progiem pobudliwości. Przemawiają za tym wyniki doświadczeń, których celem było prześledzenie szlaków sygnalizacji indukowanych przez serię analogów liganda peptydowego. Każdy z analogów reagował z tą samą formą polimorficzną MHC, a następnie aktywował ten sam receptor TCR. Okazało się, że wywołane reakcje diametralnie różniły się w obrębie limfocytu, to jest poszczególne analogi indukowały odpowiedź mieszczącą się w zakresie od aktywacji odpowiedzi immunologicznej, aż do immunotolerancji (HEMMER i współaut. 1998).

Obserwacje mikroskopowe (ang. time-elapseed microscopy) ujawniły, że oddziaływania limfocytów T z komórkami prezentującymi antygen są niezwykle dynamiczne. Limfocyty

przemieszczają się po powierzchni komórek prezentujących antygen, skacząc z jednego miejsca na drugie. Oznacza to, że w tej fazie aktywacji limfocytów ma również miejsce odwracalne oddziaływanie receptorów adhezyjnych z odpowiednimi błonowymi ligandami białkowymi. Kryją się za tym także dynamiczne zmiany w cytoszkieletcie komórkowym, z którym receptory adhezyjne są powiązane funkcjonalnie. W przypadku limfocytów T, oddziaływania te angażowały receptor integrynowy LFA-1, który należy do rodziny 2. Według terminologii integrynowej określany on jest jako L2, ale wśród immunologów ta pierwsza nazwa jest bardziej popularna (ang. leucocyte function-associated molecule 1). Jego swoistym ligandem jest białko błony komórki prezentującej antygen nazywane ICAM-1 (ang. intercellular adhesion molecule 1), które też pełni funkcję kontrreceptora. Oddziaływania obu białek umożliwiają odwracalne przyleganie limfocyta T do powierzchni komórki prezentującej antygen.

Oddziaływanie to jest niezwykle precyzyjnie kontrolowane na drodze kilku mechanizmów. Jeden z nich uwzględnia zmianę ekspresji obu białek na powierzchni komórek. Dotyczy to zwłaszcza ICAM-1, którego ekspresja zależy od stopnia aktywacji komórek. Drugi z mechanizmów kontroluje ich powinowactwo oddziaływania zmieniające się w miarę aktywacji komórek. I tak, receptor LFA-1 może występować w dwóch stanach, to jest jako uśpiony receptor, który nie rozpoznaje swojego liganda oraz w postaci aktywnej. W tej ostatniej charakteryzuje się wysokim powinowactwem wiązania w stosunku do ICAM-1. To przejście do postaci aktywnej wymaga najpierw aktywacji limfocytów T, a następnie w efekcie sygnalizacji przepływającej od wnętrza komórki poprzez błonę na zewnątrz (sygnalizacja „inside-out”) zachodzi aktywacja receptora LFA-1. Aktywacja zachodzi dzięki zmianom konformacyjnym receptora, które odsłaniają miejsca rozpoznające ICAM-1.

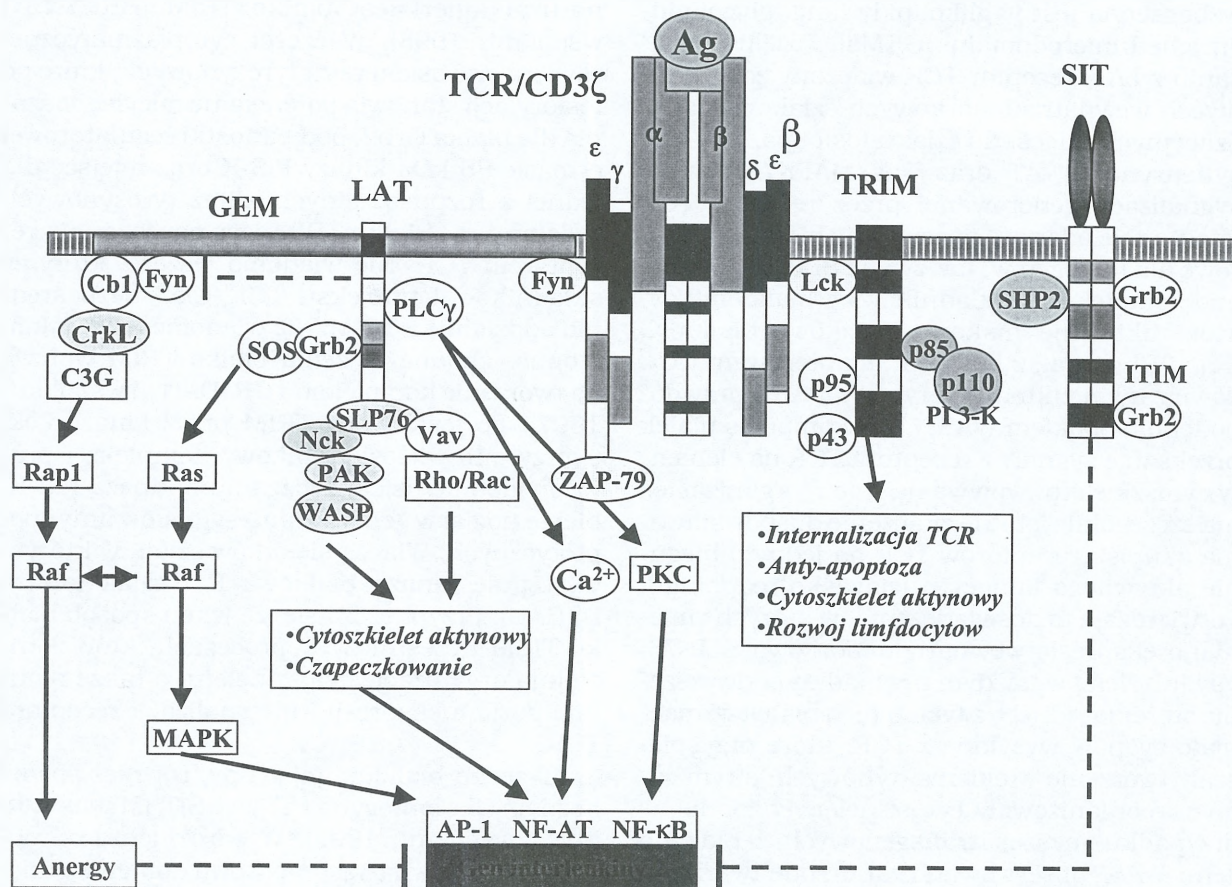
BIAŁKA ADAPTOROWE POWIĄZANE Z RECEPTOREM TCR

Coraz więcej wiemy na temat podstaw molekularnych sygnalizacji generowanej przez receptor TCR, dzięki którym zachodzi aktywacja integryny LFA-1. I tak, ostatnio zidentyfikowano białko zwane cytohezyzna 1, które występuje w powiązaniu z integrynami 2 i prawdopodobnie indukuje ich aktywację (NAGEL i współaut. 1998). Podobne właściwości do cytohezyzny 1 ma kinaza 3-fosfoinozytoli (PI3-K). Ze względu na to, że aktywujące działanie tej kinazy ulega zahamowaniu pod wpływem fragmentu peptydowego, który zawiera domenę PH (ang. pleckstrin homology domain) cytohezyzny 1 można przypuszczać, że PI3-K tworzy kompleks z domeną PH cytohezyzny 1. W ten sposób zmienia charakter oddziaływania tego białka z receptorem LFA-1 i reguluje jego przejście ze stanu nieaktywnego w aktywny.

Do niedawna trudno było wyjaśnić w jaki sposób receptor TCR generuje sygnały, które aktywują kinazę PI3-K oraz fosfolipazę C. Nieznane były mechanizmy odpowiedzialne za translokację obu enzymów do obszarów leżących w pobliżu cytoplazmatycznej domeny receptora TCR. Dopiero wykrycie nowej klasy białek adaptorowych umożliwiło wyjaśnienie i zrozumienie tego mechanizmu. Rola białek adaptorowych w sygnalizacji komórkowej polega na umożliwieniu tworzenia kompleksów dwu- i więcej cząsteczkowych i to między białkami, które w normalnych warunkach mają do siebie niewielkie powinowactwo wiązania. Nowa gru-

pa białek adaptorowych charakteryzuje się tym, że zawierają one typowy dla białek transbłonowych segment utworzony z 18–27 hydrofobowych reszt aminokwasowych, niewielki fragment wychodzący na zewnątrz komórki zwykle utworzony z 4 do 18 aminokwasów oraz duży ogon cytoplazmatyczny, który skierowany jest do wnętrza komórki. Domena cytoplazmatyczna posiada wielokrotne motywy aminokwasowe z resztą tyrozyny, które po fosforylacji specyficznym rozpoznawane są przez różne białka systemu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, w tym wewnątrzkomórkowe kinazy i fosfatazy białkowe, rozpuszczalne białka adaptorowe, a także niektóre białka efektorowe (Ryc. 1). W ten sposób odwracalna fosforylacja i defosforylacja cytoplazmatycznej domeny tych białek decyduje o trwałości i składzie wielo-cząsteczkowych kompleksów skupionych wokół cytoplazmatycznych domen receptora TCR.

Do tej pory opisano trzy białka z tej rodziny, to jest LAT, TRIM i SIT. Białko LAT (ang. linker of activation of T cells) jak do tej pory znaleziono w limfocytach T, komórkach NK i płytkach (ZHANG i współaut. 1998). Pod wpływem sygnałów przesłanych z receptora TCR, ulega ono bardzo szybkiej fosforylacji (prawdopodobnie pod wpływem kinazy ZAP-70). W takiej postaci przyłączają się do niego inne białka adaptorowe: Grb2 i SLP-76, a także Grap, fosfolipaza C, protonkogen *c-Cbl* i podjednostka regulatorowa PI3-K o masie 85 kDa. Co więcej okazało się, że



Ryc. 1. Udział białek adaptorowych w przesyłaniu sygnałów generowanych przez receptor TCR.

Białko LAT po ufosforylowaniu za pomocą kinazy ZAP-70, wiąże się z całą grupą wewnątrzkomórkowych cząsteczek adaptorowych oraz efektorowych. Dokładny mechanizm, za pomocą którego LAT indukuje aktywację fosfolipazy C γ oraz szlaku białek Ras nie jest jeszcze poznany. Wydaje się jednak, że w tym celu współdziała ono z innym białkiem adaptorowym SLP-76. Również nieznanym jest mechanizm hamowania przez LAT fosforylacji białka Cb1. Wiadomo, że LAT w celu pełnienia swojej regulatorowej funkcji musi być zakotwiczony w regionie błony wzbogaconej przez glikolipidy (GEMs). W tym celu, jego dwie reszty cysteinowe ulegają modyfikacji polegającej na przyłączeniu kwasu palmitynowego. Dopiero wtedy następuje fosforylacja białka LAT. Dimeryczna cząsteczka białka TRIM jest powiązana z receptorem TCR, ale molekularny mechanizm tego oddziaływania nie jest jeszcze wyjaśniony. Białko TRIM, po fosforylacji przez kinazę Lck, tworzy kompleks z podjednostką regulatorową kinazy PI3-K o masie 85 kDa oraz z dwoma innymi białkami o masie odpowiednio 45 i 95 kDa, których funkcja nie jest jeszcze wyjaśniona. Białko TRIM jest powiązane ze szlakami sygnalizacyjnymi, które regulują apoptozę, organizację cytoszkieletu aktywnego, organizację kompleksu i ekspresję TCR/CD3, a także rozwój limfocytów T. SIT jest dimerem, zawierającym długie zewnątrzkomórkowe łańcuchy cukrowe, które mogą oddziaływać z jakimiś zewnątrzkomórkowymi ligandami. SIT może być wielokrotnie fosforylowany przez kinazy z rodziny Src, prawdopodobnie przez Syk w regionie, który określanie jest jako ITIM. Wtedy oddziałuje z SHP2. W wyniku podwyższenia ekspresji białka SIT w komórkach Jurkat zahamowano indukcję genu interleukiny 2, która wywoływana jest przez receptor TCR. Nie wiadomo jeszcze w jaki sposób to zachodzi, ale przypuszcza się, że zahamowanie tego szlaku przez SIT następuje gdzieś powyżej aktywacji fosfolipazy C i może wynikać z przyłączenia hamująco działającego czynnika do ufosforylowanego motywu YASV. Oprócz SHP2, po fosforylacji reszt tyrozynowych obecnych w dwóch motywach typu YxN białka SIT, do miejsc tych wiążą się również dwie cząsteczki białka Grb2. W przedstawionym schemacie użyto następujących skrótów: DAG — diacyloglicerol; GEM — obszary błony wzbogacone w glikolipidy — IL-2, interleukina 2; Ins(1,4,6)P3 — trifosfoinozytol; ITIM, — tyw białka SIT, który hamuje TCR i zawiera tyrozyny; LAT — białko adaptorowe, które przesyła sygnały z TCR; PI3-K — kinaza 3-fosfoinozytolu; PKC — białkowa kinaza C; PLC — fosfolipaza C; PtdIns(4,5)P2, difosfoinozytol; PTK — białkowa kinaza tyrozynowa; SIT — transbłonowe białko adaptorowe oddziałujące z SHP2 — TCR, receptor limfocytów T; TRIM —białko adaptorowe oddziałujące z RTC; SHP2 — tyrozynowa fosfataza białek.

fosforylacja białka LAT wymaga jego uprzedniego zakotwiczenia w specjalnym obszarze dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej, która wzbogacona jest w glikolipidy (ang. glycolipid-enriched microdomains GEMs). Dzięki powiązaniu z LAT, receptor TCR włączony zostaje do dwóch wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych, to jest do szlaku fosfolipaza C/kalcyneuryna/NF-AT oraz Ras/MAPK/AP1. Dla sygnalizacji generowanej przez receptor TCR istotną rolę odgrywa specyficzne białko adaptorowe dla limfocytów, tak zwane SLP-76. Tworzy ono kompleks trójskładnikowy z białkiem Vav, które aktywuje niskocząsteczkowe białka G (Rac i Rho) oraz z białkiem adaptorowym Nck, powiązanim z kinazą serynową PAK i prawdopodobnie białkiem WASP. Ten kompleks białek przekazuje sygnały z receptora TCR na elementy cytoszkieletu, wpływa na jego reorganizację i ma szczególnie istotne znaczenie dla powstawania skupisk receptorów TCR na jednym biegunie aktywnego limfocyta (zjawisko „capping”). Potwierdzają to doświadczenia, w których zmieniano ekspresję wewnątrzkomórkową SLP-76, Vav lub Nck i w każdym przypadku podwyższenie stężenia jednego z tych trzech białek wzmacniało sygnały wysyłane z TCR, które przyspieszały tworzenie włókien aktynowych, a tym samym reorganizowały cytoszkielet. Podobnie, w przypadku myszek transgenowych z blokadą genu WASP obserwowano zaburzone tworzenie w limfocytach skupisk receptorów, a także zahamowaną proliferację (SNAPPER i współaut. 1998). Przypuszcza się też, że LAT we współpracy z SLP-76 aktywuje białko Ras i w ten sposób uruchamia szlak prowadzący poprzez kinazę Raf do aktywacji kinaz MAPK i w końcu do indukcji czynnika transkrypcyjnego AP-1. Pośrednio, na sygnały wysyłane przez receptor TCR ma także wpływ szlak skupiający się wokół białka adaptorowego Cbl. Intensywnie ufosforylowane, przy udziale kinazy Fyn w anergicznym limfocytach T, umożliwia ono utworzenie trójskładnikowego kompleksu, w skład którego wchodzi białko adaptorowe CrkL oraz C3G. To ostatnie, na drodze wymiany GDP i GTP, aktywuje białko Rap1. Otóż aktywne białko Rap1, dzięki uczynnieniu kinazy Raf, pośrednio blokuje aktywację szlaku Ras. W ten sposób tłumaczy się, na przykład, zahamowanie indukcji genu interleukiny 2 w anergicznym limfocytach T. Oznacza to, że białko LAT bierze udział nie tylko w przekazywaniu aktywujących sygnałów z receptora TCR, ale także generuje sygnały hamujące wykorzystując szlak związany z białkiem Cbl. Stanowi więc element zarówno dodatniej, jak i ujemnej pętli sprzężenia zwrotnego.

Kolejnym transbłonowym białkiem adaptorowym powiązanim z receptorem TCR specyficznym dla limfocytów T i komórek NK (ang. natural killer) jest białko TRIM (BRUYNS i współaut. 1998). W części cytoplazmatycznej zawiera ono osiem reszt tyrozynowych, które po fosforylacji stanowią potencjalne miejsca wiązania dla białka Grb2, podjednostki regulatorowej o masie 85 kDa kinazy PI3-K oraz miejsce dla jednej z rozpuszczalnych kinaz tyrozynowych rodziny Src. Białko TRIM jest powiązane z receptorem TCR. Nie wiadomo jeszcze, który ze składników kompleksu TCR/CD3 bezpośrednio oddziałuje z TRIM. Nie wiadomo też w jakim stopniu zmiana stężenia białka TRIM wpływa na tworzenie kompleksu TCR (DATTA i współaut. 1997). Po fosforylacji TRIM przez kinazę Lck, tworzy ono wieloskładnikowy kompleks i prawdopodobnie dzięki związaniu z kinazą PI3-K, bierze udział w generowaniu sygnałów antyapoptycznych. Włącza się ono w szlak, w którym występuje kinaza białkowa B (szlak kinaza B/BAD). Przypuszcza się, że w ten sposób białko TRIM uczestniczy w procesach, które kontrolują organizację cytoszkieletu, a także reguluje poziom ekspresji i internalizacji receptora TCR.

Trzecim białkiem tej grupy, również specyficznym dla limfocytów T, jest SIT (MARIE-CARDINE i współaut. 1999). W odróżnieniu od poprzednich, zewnątrzkomórkowa domena białka SIT, chociaż zbudowana tylko z 18 reszt aminokwasowych, jest bardzo duża, bo zawiera wielocukier sterujący na zewnątrz komórki. Może to sugerować, iż białko SIT reaguje z jakimś, bliżej nieokreślonym jeszcze, ligandem zewnątrzkomórkowym. W cytoplazmatycznej domenie białka SIT znajduje się pięć tyrozyn, które mogą być fosforylowane przez kinazy Src i Syk. W efekcie tego wiążą się z nimi białka Grb2, kinaza Src oraz białko inhibitorowe ITIM (ang. immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif). Białko SIT hamuje aktywację NF-AT na drodze mechanizmu, który w szlaku sygnalizacyjnym zlokalizowany jest powyżej fosfolipazy C. Oznacza to, że białko SIT tworzy pętlę ujemnego sprzężenia zwrotnego i hamuje odpowiedź receptora TCR podczas aktywacji limfocytów T. Nie do końca znany jeszcze jest mechanizm tego działania. Wydaje się, że dla regulatorowej funkcji białka SIT duże znaczenie ma jego motyw YASV, zwłaszcza podczas hamowania wywołanej przez receptor TCR indukcji genu *IL-2*.

Ostatnie obserwacje wskazują na to, że aktywacja receptora TCR analogami tego samego liganda peptydowego, wpływa na skład fosforylowanych białek limfocytów. Trudno się więc powstrzymać od spekulacji, iż stopień, jak i

miejsce fosforylacji białek adaptorowych może zmieniać się w zależności od tego, jakie peptydy i z jakim powinowactwem oddziałują z receptorem TCR. Oczywiście końcowy charakter odpowiedzi immunologicznej jest w znacznym stopniu uzależniony również od sygnałów generowanych przez cytokiny, zwłaszcza te reagujące z receptorami należącymi do rodziny receptorów czynnika martwiczego (TNF). Jednym z

nich jest białko CD27, które współdziała z białkiem TRAF-2 (ang. TNF-receptor-associated factor 2). Dzięki temu oddziaływaniu, sygnały generowane przez CD27 docierają do kinazy JNK i włączają się w szlak antyapoptotyczny. Omówienie szczegółowe roli cytokin w formowaniu odpowiedzi immunologicznej stanowi jednak zupełnie odrębne zagadnienie.

UWAGI KOŃCOWE

Odkrycie i charakterystyka białek adaptorowych LAT, TRIM I SIT pozwoliło wyjaśnić, w jaki sposób wewnątrzkomórkowe cząsteczki efektorowe, takie jak PLC, SLP-76, Vav, Cbl oraz SHP2, przemieszczają się i grupują w pobliżu aktywnego receptora TCR. Poza elementami kompleksu TCR/CD3, które zawierają motyw ITAM oraz innymi receptorami limfocytów biorących udział w generowaniu sygnałów przesyłanych do wnętrza komórek, białka LAT, TRIM i SIT dostarczają razem aż 22 potencjalnych miejsc oddziaływania dla innych białek sygnałowych. Zawierają one motywy z tyrozyną podatną na fosforylację (6 w LAT, 6 w TRIM oraz 10 w SIT). Tak więc, mogą one przyłączyć wiele cząsteczek posiadających domenę SH2 i stanowią rusztowanie dla różnorodnych kompleksów wielocząsteczkowych, których skład może zależeć od stopnia aktywacji receptora TCR.

Ostatnie lata dostarczyły mnóstwo informacji na temat odporności organizmu na działanie czynników patogennych i wiadomo jak wiele zmiennych określa naturę swoistej odpowiedzi immunologicznej. Coraz bliżej jesteśmy poznania całościowego obrazu oddziaływań cząsteczkowych i komórkowych, które decydują o losie antygenowo specyficznych limfocytów T. Wyjaśnienie mechanizmów kontrolujących odpowiedź immunologiczną, zwłaszcza tych, które uruchamiają system odpornościowy organizmu, może mieć olbrzymie znaczenie terapeutyczne. Wiedza na ten temat może umożliwić opracowanie różnych sposobów manipulowania odpowiedzią immunologiczną tak, aby wycisnąć ją w stanach zagrożonych autoimmunizacją, a podwyższać wówczas, gdy organizm narażony jest na patogeny zewnętrzne lub komórki neoplastyczne.

LITERATURA

- BRUYN E., MARIE-CARDINE A., KIRCHGESSNER H., SAGOLLA K., SHEVCHENKO A., MANN M., AUTSCHBACH F., BENSUSSAN A., MEUER S., SCHRAVEN B., 1998. *J. Exp. Med.* 188, 561-575.
- CELLA M., ENGERING A., PINET V., PIETERS J., LANZAVECCHIA A., 1997. *Nature* 388, 782, 787.
- DATTA S. R., DUDECK H., TAO X., MASTERS S., FU H., GOTOH Y., GREENBERG M. E., 1997. *Cell* 91, 231-241.
- HEMMER B., STEFANOVA I., VEGELLI M., GERMAIN R. N., MARTIN R., 1998. *J. Immunol.* 160, 5807-5814.
- MARIE-CARDINE A., KIRCHGESSNER H., BRUYN E., SHEVCHENKO A., MANN M., AUTSCHBACH F., RATNOFSKY S., MEUER S., SCHRAVEN B. 1999. *J. Exp. Med.* 189, 1181-1194.
- NAGEL W., ZEITELMANN L., SCHILCHER P., GEIGER C., KOLANUS W., 1998. *J. Biol. Chem.* 273, 14853-14861.
- SNAPPER S. B., ROSEN F. S., MIZOGUCHI E., COHEN P., KHAN W., LIU C. H., HAGEMANN T. L., KWAN S. P., FERRINI R., DAVIDSON L., BHAN A. K., ALT F. W., 1998. *Immunity* 9, 81-91.
- VALITUTTI S., LANZAVECCHIA A., 1997. *Immunol. Today* 18, 299-304.
- ZHANG W., SLOAN-LANCASTER J., KITCHEN J., TRIBLE R. P., SAMELSON L., 1998. *Cell* 92, 83-92.