

SYNAPSA IMMUNOLOGICZNA I AKTYWACJA KOMÓREK T

THE IMMUNOLOGICAL SYNAPSE AND T CELL ACTIVATION

Justyna MEISSNER¹, Monika BONIK², Michał MAJKOWSKI¹, Renata
GROCHOWALSKA², Beata MACHNICKA²

¹ Pracownia Cytobiochemii, Uniwersytet Wrocławski

² Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski

Streszczenie: Aktywacja limfocytów T w wyniku prezentacji antygeny na receptorze komórki T jest decydującym etapem w rozwoju odpowiedzi immunologicznej w czasie infekcji i w stanach zapalnych. Kontakt ten jest dynamicznym procesem prowadzącym do powstania synapsy immunologicznej. W ostatnim czasie wraz z intensywnym rozwojem technik mikroskopowych pojawiło się wiele danych na temat dynamiki formowania synapsy immunologicznej, interakcji białek w przestrzeni synaptycznej i aktywacji komórek T. W pracy przedstawiono nowe dane na temat budowy i funkcji synapsy immunologicznej powstającej podczas aktywacji komórek T.

Słowa kluczowe: synapsa immunologiczna, aktywacja limfocytów

Summary: Activation of T lymphocytes by antigen presentation to T cell receptor is a critical step in the development of the immune response upon infection and inflammation. This contact is a dynamic process leading to the formation of the immunological synapse. Recently, with the intensive development of microscopic techniques, shows many data on the dynamics of the immunological synapse formation, the protein interaction in the synaptic space and T cell activation. The paper presents new data on the structure and function of immunological synapse occurs upon activation of T cells.

Key words: immunological synapse, activation of lymphocytes

WSTĘP

W ostatniej dekadzie badanie synaps immunologicznych (IS) stało się obszarem szczególnego zainteresowania naukowców. Zadziwiający pozostaje fakt, iż nadal tak wiele jest w nich do poznania i wciąż pojawiają się nowe kontrowersje na temat ich budowy i funkcji. Po raz pierwszy termin synapsa immunologiczna

zastosował M. A. Norcross w 1984 roku. Kupfer w 1998 jako pierwszy pokazał, że białka powierzchni kontaktowej pomiędzy limfocytami T a komórkami APC ulegają selekcyjnemu przemieszczeniu. Zasadniczo funkcje synaps możemy podzielić na dwie kategorie: uczestniczą w swoistej odpowiedzi immunologicznej, w której limfocyty T odbierają informacje oraz pełnią funkcje efektorowe, w których limfocyty T wysyłają informacje [7].

FORMOWANIE SYNAPSY IMMUNOLOGICZNEJ

Synapsy immunologiczne formowane są przez cytotoksyczne limfocyty T ($CD8^+$) lub mniejsze pomocnicze limfocyty T ($CD4^+$) oddziałujące z komórkami prezentującymi antygen (APC), czyli limfocytami B, makrofagami lub komórkami dendrytycznymi. Taki kontakt międzykomórkowy utrzymuje się przynajmniej przez sześć godzin i wymaga ciągłego zaangażowania receptorów limfocytów T (TCR). Czas trwania i stabilność synaps jest różna, na przykład limfocyty $CD4^+$ z limfocytami B i komórkami dendrytycznymi tworzą kontakt, który utrzymuje się dłużej i jest znacznie stabilniejszy [23]. W trakcie tworzenia tego specyficznego kontaktu międzykomórkowego, następuje szereg zmian kształtu komórki, reorganizacja organelli komórkowych w jej wnętrzu oraz istotna reorganizacja białek w błonie plazmatycznej w obszarze kontaktu. Dotychczas dobrze poznano dynamikę powierzchni komórek T i białek sygnałowych w przestrzeni synaptycznej, a znacznie mniej wiadomo o zmianach zachodzących wewnątrz komórki, zwłaszcza podczas tworzenia synaps między $CD4^+$ i APC [11].

Według Ueda [23] można wyróżnić, cztery fazy powstawania IS.

Podczas poszukiwania antygeny znajdującego się na powierzchni komórki APC (faza 0) cysterny aparatu Golgiego limfocytów zlokalizowane są w bliskim sąsiedztwie centrioli na jednym z biegunów komórki T. Centrum organizacji mikrotubul (MTOC) jest umiejscowione pomiędzy centriolami lub pomiędzy centriolami a jądrem komórki.

W czasie pierwszych 30 minut (faza 1) komórki T kontaktują się z APC tylko za pomocą bogatych w aktynę, wysoce dynamicznych pseudopodiów, które wnikają bardzo głęboko do wnętrza APC niemal dotykając błony jądrowej. Prawdopodobnie w limfocytach $CD8^+$ tworzących IS, pseudopodia stanowią element mechanizmu cytotoksyczności. Podczas pierwszego kontaktu komórki T z APC pseudopodia pięciokrotnie zwiększają swoją powierzchnię pozwalając na interakcję większej liczby TCR z nowymi ligandami głównego układu zgodności tkankowej MHC klasy II (pMHC). O ich ogromnej istotności w tworzeniu synapsy świadczy również fakt, że wysunięcie pseudopodiów wymaga od komórki T dużego nakładu energii [1].

Po 40-60 minutach wzajemnego kontaktu komórki zaczynają wchodzić w kolejną fazę (faza 2), w czasie której zmienia się aktywność błony komórki. W najbliższym sąsiedztwie błony komórkowej znajdują się liczne endosomy.

MTOC przemieszcza się do rejonu pomiędzy centriolami i błoną plazmatyczną, a mikrotubule prawdopodobnie stanowią rusztowanie dla organelli, pęcherzyków i błony jądrowej obecnych w rejonie IS. Aparat Golgiego komórek T skupia się w okolicach jądra komórkowego. Mitochondria sąsiadują z retikulum endoplazmatycznym, co odgrywa istotną rolę w regulacji cytoplazmatycznego poziomu Ca^{2+} [23].

Faza trzecia, trwająca od jednej do dwóch godzin, określana jest fazą stabilnej i dojrzałej IS. Błona komórkowa jest bardzo napięta, a powierzchnia kontaktu międzykomórkowego przyjmuje płaski kształt. Centriole zbliżają się do błony plazmatycznej na odległość 100-200 nm i utrzymują się w tym obszarze przez dwie lub więcej godzin. Pomiedzy błoną a centriolami znajduje się tylko centrum organizacji mikrotubul. Mitochondria są rozproszone w cytoplazmie i nie koncentrują się w rejonie IS. W tej fazie wyraźnie zmniejsza się aktywność błony, o czym może świadczyć brak struktur błonowych wokół centrioli [23].

Po 4 godzinach (faza 4) komórki rozpoczynają separację. Ten etap wiąże się z maksymalnym poziomem sekrecji cytokin. Dochodzi do intensywnego wzrostu aparatu Golgiego, który przemieszcza się w kierunku błony komórkowej i otacza centriole powodując ich separację od błony. Centriole otoczone są także endosomami i zaczynają wędrować w kierunku jądra komórki. W porównaniu do wcześniejszych faz znacznie zmniejsza się liczba mikrotubul, co sugeruje spadek lub całkowite zablokowanie ich nukleacji. Błona pozostaje napięta, a powierzchnia kontaktu płaska i gładka. Po 6 godzinach zazwyczaj dochodzi do separacji komórek i wznowienia ich migracji [23].

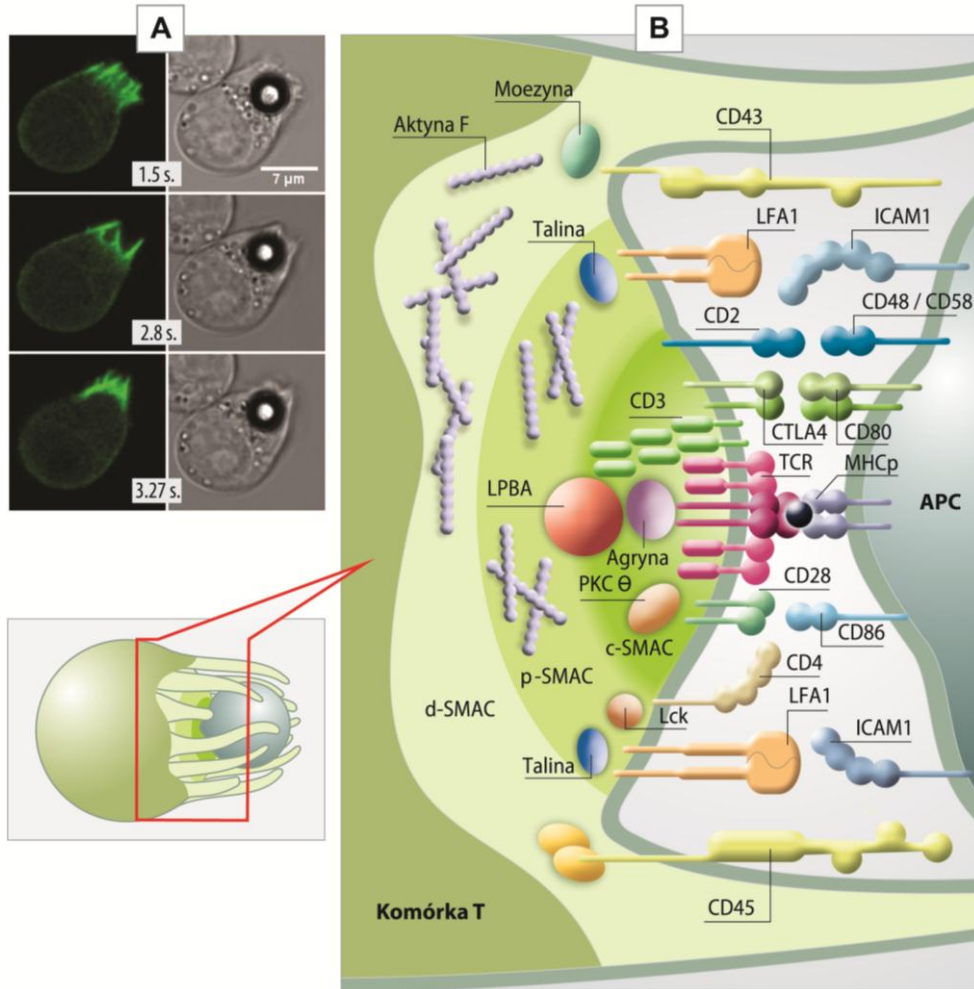
ETAPY REARANŻACJI BIAŁEK W SYNAPSIE IMMUNOLOGICZNEJ

W budowie synapsy immunologicznej powierzchnię kontaktu dzielimy na trzy klasterzy aktywacyjne: centralny - supramolekularny (cSMAC ang. Central Supramolecular Activation Cluster), obwodowy (pSMAC ang. Perypherial Supramolecular Activation Cluster) i dystalny (dSMAC- ang. Distal Supramolecular Activation Cluster) (ryc. 1) [25].

Przebywające w ciągłym ruchu limfocyty w momencie rozpoznania antygeny rozpoczynają formowanie stabilnego kontaktu z APC. Rozpoznanie antygeny inicjuje zmiany kształtu komórki T następujące w trzech kolejnych etapach: rozprzestrzenianiu (0-2 min), kurczeniu (2-10 min) i formowaniu dojrzałej synapsy (10 min). Gdy komórka T przyłącza dwuwarstwę lipidową komórki prezentującej antygen wówczas receptor komórki T (TCR) i białko CD28 tworzą mikroklasterzy „TCR-CD28” [25]. W nieaktywnych limfocytach, TCR jest uformowany z oligomerów, czyli nanoklasterów. Kilka minut po rozpoznaniu antygeny białka pMHC w błonie APC, TCR rozpoczyna formowanie większych oligomerów, zwanych mikroklasterami. Rekrutują one także kinazy (Lck i ZAP70, PKC θ)

i białka adaptorowe (LAT, SLP76). Pierwszym krokiem niezbędnym dla spowolnienia migracji komórek jest wiązanie antygeny 1 związanego z czynnością limfocytów - LFA-1 z ICAM-1 obecnym w błonie APC i powstanie powierzchni adhezyjnej. Co ciekawe, LFA-1 także tworzy mikrodomeny, mniej stabilne niż mikroklastery TCR, umożliwiające przemieszczanie się tych białek z dSMAC do centralnej części IS [6,12]. Po pierwszym przyłączeniu komórka T kontynuuje rozszerzanie tworząc w strefie obwodowej nowe mikroklastery. TCR indukuje również fosforylację tyrozyny oraz napływ jonów wapnia do komórki. Efektem tych procesów jest zapoczątkowanie aktywacji limfocyta T. CD28 przyłącza białkową kinazę C θ (PKC θ) w mikroklasterze TCR. Sygnały emitowane przez mikroklastery TCR sprzyjają polimeryzacji cytoszkieletu aktynowego, który tworzy pierścień rozprzestrzeniający się w błonie komórki T w miejscach kontaktu z APC [25].

Po osiągnięciu maksymalnego rozszerzenia, synapsa immunologiczna rozpoczyna etap kurczenia, który zaczyna się ściskaniem peryferyjnego pierścienia aktyny. Mikroklastery przemieszczają się dośrodkowo i łączą się z innymi tworząc duże agregaty receptorowe [25]. Podczas tej wędrówki uwalniają kinazy i białka adaptorowe. Efektem tego jest kumulacja mikroklasterów w centrum synapsy najwyraźniej niezwiązanych z białkami sygnałowymi. Nowe mikroklastery sygnalizacyjne „TCR-CD28” są stale tworzone w peryferyjnej części synapsy i migrują do jej centrum. Klasterzy mogą wspierać pobór PKC θ do błony i utrzymywać zarówno sygnalizację poprzez TCR oraz kształt synapsy immunologicznej [1]. Wynikiem tych procesów jest uformowanie klasycznego wzoru „oka byka” (bull’s-eye) dojrzałej synapsy, w centrum której powstaje cSMAC [6]. Już po ok. 10 minutach jest on trwale uformowany i podzielony na dwa regiony różniące się gęstością białka CD3. Region z dużą jego gęstością jest pojedynczą obręczą klastera, a drugi region charakteryzujący się małą gęstością CD3 i zawierający również białko CD28 położony jest bardziej zewnątrz. cSMAC pozbawiony jest aktyny F. Na zewnątrz cSMAC znajduje się pierścień integryn (pSMAC), który jest otoczony kolejnym pierścieniem (dSMAC) białek błonowych, takich jak CD43 i CD45 z dużymi domenami zewnątrzkomórkowymi. Fosfataza tyrozynowa CD45 we wczesnym etapie aktywacji limfocyta przyłącza się do cSMAC, gdzie aktywuje Lck poprzez defosforylację, przez co następnie przemieszcza się do dSMAC. Podobnie CD43 przemieszcza się z cSMAC do dSMAC tuż po połączeniu się TCR z pMHC, gdyż może hamować interakcje białek przekaźnikowych. TCR może zostać wchłonięty z pSMAC i innych obszarów zewnętrznych w procesie endocytozy zależnej lub niezależnej od klatryny, które towarzyszą trogocytocie fragmentów błony APC zawierającej pMHC [1].



RYCINA 1.

A. Rozmieszczenie aktyny w aktywowanych komórkach Jurkat. Rearanżacja szkieletu aktynowego i tworzenie licznych lamelipodiów jest niezbędna do stabilizacji synapsy immunologicznej. Komórki Jurkat transfekowane były plazmidem Life Act Ruby kodującym aktynę, a następnie po 24 godzinach aktywowane przy użyciu kulek Dynabeads (Invitrogen). Lokalizacja aktyny w żywych, aktywowanych komórkach Jurkat była wizualizowana w mikroskopie konfokalnym

B. Schemat budowy synapsy immunologicznej (IS) i oddziaływań białkowych w przestrzeni synaptycznej. W budowie synapsy immunologicznej powierzchnię kontaktu dzielimy na trzy klaster aktywacyjne: centralny- cSMAC, obwodowy -pSMAC i dystalny- dSMAC. Rozmieszczenie receptorów i cząstek adhezyjnych w poszczególnych klastrach synapsy immunologicznej uwarunkowane jest ich funkcją jak i wielkością domen zewnętrznych. W cSMAC, receptor komórek T (TCR) i kompleks CD3 oddziałuje z peptydem MHC, natomiast CD28 lub antygen 4 cytotoksycznego limfocyta T (CTLA-4) wiąże się z CD80/86. Oddziaływania w pSMAC pomiędzy cząstkami adhezyjnymi znajdującymi się na powierzchni obu komórek (LFA-1 - ICAM-1 oraz CD2 - CD58(LFA-3)/CD48) odpowiadają za powstanie i stabilizację IS, jak również za uruchomienie

szlaków przekazywania sygnałów aktywacji poprzez TCR. Pierścień dystalny (dSMAC) bogaty jest w białka CD45 i CD43 oraz aktyne F. LBPA- kwas lizobifosfatydylowy, moesyna – ang. moesin, białko błonowe organizujące kolce wydłużające (membrane organising extension spike protein), agryna – ang. agrin, proteoglikan macierzy pozakomórkowej

FIGURE 1.

A. Distribution of actin in activated Jurkat cells. Actin skeletal rearrangement and formation of numerous lamellipodia are necessary to stabilize the immunological synapse. Jurkat cells were transfected with the Life Act Ruby plasmid encoding actin and then after 24 hours were activated using Dynabeads (Invitrogen). Location of actin in living activated Jurkat cells were visualized in a confocal microscope

B. Structure of the immunological synapse (IS) and protein interactions in synaptic space. The contact area of the immunological synapse is divided into three activation clusters: central-cSMAC, peripheral-pSMAC and distal-dSMAC. Distribution of receptors and adhesion molecules in different clusters of the immunological synapse is subject to their function and size of the external domains. In the cSMAC, T cell receptor (TCR) and CD3 complex interact with the MHC-peptide and CD28 or cytotoxic T lymphocyte 4 antigen (CTLA-4) binds to CD80/86. Interactions in the pSMAC between adhesion molecules located on the surface of both cells (LFA-1 - ICAM-1 and CD2 - CD58 (LFA-3) / CD48) are responsible for the formation and stabilization of the IS, as well as start-up signal transduction pathways activated by TCR. Distal ring (dSMAC) is rich in proteins CD45 and CD43, and F-actin. LBPA – lysobisphosphatidic acid, moesin - membrane organising extension spike protein, agrin - extracellular matrix proteoglycan

INTERAKCJE BIAŁKOWE W PRZESTRZENI SYNAPTYCZNEJ

Rozmieszczenie receptorów i cząsteczek adhezyjnych oraz ligandów w przestrzeni synaptycznej uwarunkowane jest ich funkcją oraz wielkością (ryc.1) [5]. W centralnej, położonej najbliżej APC, części synapsy immunologicznej, TCR i kompleks CD3 oddziałuje z peptydem MHC, natomiast CD28 lub antygen 4 cytotoksycznego limfocyty T (CTLA-4) wiąże się z CD80/86. Część ta odpowiada za rozpoznanie antygeny, a następnie za aktywację limfocyty. Natomiast obwodowa część synapsy immunologicznej (pSMAC) składa się z cząsteczek związanych z organizacją szkieletu komórkowego i cząstek adhezyjnych strukturalnie wspierających jej architekturę. Oddziaływania pomiędzy cząstkami adhezyjnymi znajdującymi się na powierzchni obu komórek (LFA-1 - ICAM-1 oraz CD2 - CD58(LFA-3)/CD48) odpowiadają za powstanie i stabilizację IS, jak również za uruchomienie szlaków przekazywania sygnałów aktywacji poprzez TCR [22]. Zwiększona zdolność do adhezji jest rezultatem grupowania LFA-1 i jego przejścia w stan wysokiego powinowactwa. Te zmiany pozwalają LFA-1 formować silne powiązania pomiędzy komórką T i APC. Krytycznym regulatorem zdolności do adhezji LFA-1 i formowania synapsy są białka szkieletowe - talina i winkulina [24]. Kolejny pierścień to obszar dystalny, uważany za strefę aktywnego ruchu białek błony komórkowej. Region ten bogaty jest w białka o długich zewnątrzkomórkowych domenach takich jak białka CD45 i CD43 mogące uniemożliwić przekazywanie sygnału [25].

Polaryzacja aktyny w IS (pSMAC i dSMAC) poprzedzana jest naborem taliny i aktywacją LFA-1 [19,22]. Rearanżacja szkieletu aktynowego jest niezbędna do stabilizacji synapsy [2]. Obniżenie ilości WASP (ang. Wiskott–Aldrich Syndrome protein) nie ma znaczącego wpływu na trwałość i formowanie IS [24]. Natomiast jedno z białek z rodziny WASP- WAVE2 jest krytycznym regulatorem kompleksu Arp2/3 głównego białka regulującego polimeryzację aktyny niezbędną dla formowania synapsy [16]. Kolejnym ważnym regulatorem formowania synapsy jest leukocytarny homolog kortaktyny (HS-1). Wyciszenie ekspresji HS-1 za pomocą siRNA obniża polimeryzację aktyny w rejonie IS zakłócając tym samym jej formowanie. Deficyt ten skutkuje defektem sygnałowym m.in. w napływie jonów wapnia i produkcji IL-2. Natomiast w depolimeryzacji szkieletu aktynowego znaczący udział biorą PKC i WASP [2,22].

Odpowiedni poziom ekspresji fosfatazy tyrozynowej CD45 jest niezbędny dla właściwej sygnalizacji TCR i produkcji cytokin przez limfocyty T. Mutacje w ludzkim genie białka CD45 są związane z chorobami zakaźnymi oraz niedoborów odporności m.in. SCID (ang. Severe Combined Immune Deficiency) – ciężkiego złożonego niedoboru odporności [4]. Aktywność cytoplazmatycznej domeny CD45 przyczynia się do aktywacji komórek T poprzez usunięcie grup fosforanowych blokujących aktywność kinaz z rodziny Src zasocjowanych z błoną. Substratami CD45 są m.in. LCK, FYN (kinazy tyrozynowe z rodziny Src) i Zap-70 (białka z domeną SH2 o masie 76 kDa). Ponadto CD45 poprzez domenę cytoplazmatyczną oddziałuje z białkami szkieletowymi błony, takimi jak spektryna i ankiryne. Związanie przynajmniej jednej izoforny spektrynowej zwiększa katalityczną aktywność CD45, podczas gdy interakcje spektryny z ankiryną są wymagane do efektywnej translokacji i sygnalizacji receptorowej [3]. Udowodniono, że oddziaływanie spektryny z ankiryną jest kluczowe dla regulacji bocznej ruchliwości CD45, prowadząc do immobilizacji receptora w zaktywowanej komórce. Wykazano również, że spektryna β I ułatwia przemieszczanie się CD45 oraz kompleksu CD3 do powierzchni limfocyty, co jest niezbędne do aktywacji komórki i utworzenia synapsy immunologicznej [15].

TRATWY LIPIDOWE W SYNAPSIE IMMUNOLOGICZNEJ

Mikrodomeny błonowe bogate w cholesterol i sfingolipidy zwane tratwami lipidowymi rekrutują różne cząstki sygnałowe limfocytów takie jak kinazy z rodziny Src, białka Ras, LAT oraz białka kotwiczące GPI [13,18]. Wiele danych sugerowało, że tratwy lipidowe stanowią platformę stabilizującą kompleksy sygnałowe dla aktywacji komórek. Najnowsze badania wskazują jednak, że nie są one decydujące w aktywacji limfocytów [25]. Ponadto, tratwy te formują się w błonie niezależnie od klasterów TCR [9]. Wyniki te sugerują, że tratwy lipidowe nie uczestniczą aktywnie w tworzeniu platformy sygnalizacyjnej TCR, lecz regulują rekrutację białek do błony komórkowej, natomiast ta kumulacja lipidów

w błonie w rejonie cSMAC może pomagać w uwypuklaniu błony i endocytozie. Z drugiej strony okazuje się, że białko CD46 wykorzystywane przez wiele czynników zakaźnych może kontrolować polarność komórek T, a zmiany w tej polarności powodują funkcjonalne oddziaływania CD46 z tratwami lipidowymi, przez co tratwy stają się głównym aktorem w rywalizacji do kontrolowania polarności komórek T przez receptory sygnalizacyjne [14]. Jak dotąd funkcja tratw lipidowych w aktywacji komórek T pozostaje wciąż niejasna i kontrowersyjna.

FUNKCJE SYNAPSY IMMUNOLOGICZNEJ

Główną funkcją synapsy immunologicznej jest zapewnienie ukierunkowanego przekazu cytokin i cząsteczek sygnałowych. Przebywające w ciągłym ruchu limfocyty w momencie rozpoznania antygeny ulegają zatrzymaniu i rozpoczynają formowanie stabilnego kontaktu z APC. Oprócz wzrostu zdolności do adhezji krytycznym zdarzeniem jest repolaryzacja komórki [23]. Markerem zmian polarności komórki CD8 w odpowiedzi na antygen jest MTOC – cytoplazmatyczne centrum komórki, które w momencie tworzenia IS przemieszcza się z dalszych części komórki T do rejonu kontaktu z APC. Polaryzacja centrosomów zapewnia kierowanie ziarnistości w kierunku IS [21]. Przyjmuje się, że cSMAC jest odpowiedzialny za rozpoznanie antygeny, a następnie aktywację limfocytów T, podczas gdy pSMAC umożliwia powstanie sprzężenia pomiędzy komórkami i podtrzymanie architektury IS. Zarówno pSMAC jak i dSMAC mogą być analogiczne do struktur bogatych w aktyne, takich jak lamella oraz lamellipodia [7].

AKTYWACJA LIMFOCYTÓW T

Decydującym zdarzeniem w inicjacji adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej jest aktywacja limfocytów T. Procesem pośredniczącym w aktywacji jest oddziaływanie TCR z kompleksami peptydów MHC. W wyniku stymulacji TCR dochodzi do fosforylacji reszt tyrozynowych przez rodzinę kinaz tyrozynowych Src i powstania proksymalnego kompleksu sygnalizacyjnego (PSC). PSC uruchamia liczne szlaki sygnalizacyjne, które prowadzą do aktywacji odpowiednich czynników transkrypcyjnych i ekspresji ich genów docelowych [20]. PSC poprzez TCR aktywuje, co najmniej trzy rodziny czynników transkrypcyjnych: czynniki jądrowe aktywowanych komórek T (NFAT), białka aktywujące (AP-1) oraz czynniki jądrowe - κ B (NF- κ B) [17].

Czynniki jądrowe aktywowanych komórek T (NFAT)

NFAT odgrywają decydującą rolę w różnicowaniu komórek T. Rodzina ta obejmuje pięć czynników: NFAT1 (NFATp lub NFATc2), NFAT2 (NFATc lub

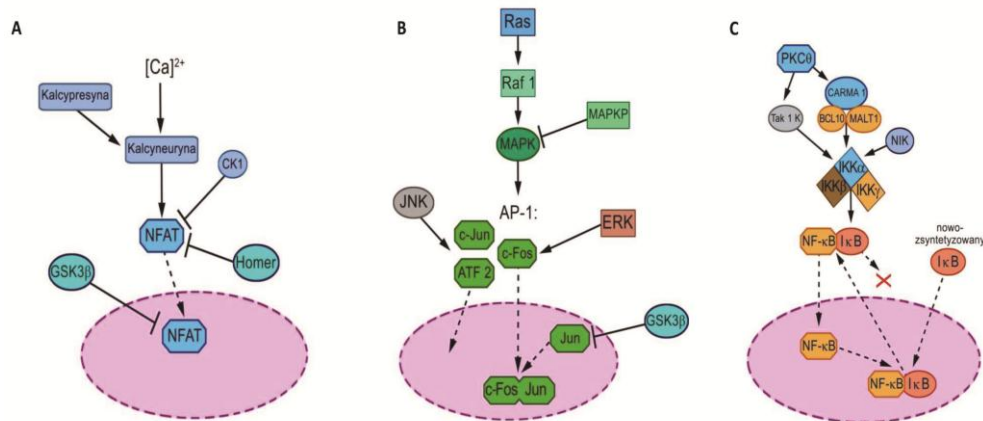
NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATc3) i NFAT5, z czego NFAT3 nie jest ekspresjonowany w limfocytach T. Białka NFAT zawierają konserwatywną, homologiczną do Rel, domenę regulatorową oraz domenę wiążącą DNA. Wszystkie NFAT, z wyjątkiem NFAT5, podlegają regulacji przez wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia, które aktywują zależną od wapnia fosfatazę - kalcyneurynę. Zaktywowana kalcyneuryna powoduje translokację NFAT do jądra komórkowego w wyniku jego defosforylacji. Ponowna fosforylacja konserwatywnych reszt seryny NFAT przez kinazę syntazy glikogenowej 3 (GSK-3) powoduje eksport tego czynnika z jądra. Natomiast kinaza kazeiny 1 (CK1) reguluje ujemnie NFAT4 poprzez jego fosforylację w cytozolu. Innym mechanizmem ujemnej regulacji NFAT jest kalcypresyna, która wiąże się do kalcyneuryny i w ten sposób ją hamuje. Białka z rodziny Homer konkurują z kalcyneuryną wiążąc NFAT i uniemożliwiają ich aktywację [17]. Regulację aktywności białek NFAT przedstawiono schematycznie na rycinie 2A.

Białka aktywujące (AP-1)

Białka AP-1 są czynnikami transkrypcyjnymi, będącymi głównymi partnerami białek z rodziny NFAT. Ich aktywność transkrypcyjna wymaga sygnału zarówno z TCR jak i kostymulatorów (takich jak CD28). Białka te mają znaczny wpływ na regulację genu kodującego interleukinę 2, a wspólnie z NFAT wspomagają swoje działanie i indukują ekspresję m.in. interleukin IL2-5, IL13 oraz interferonu γ (IFN- γ).

Interakcja AP-1 z NFAT stanowi połączenie obu szlaków sygnalizacyjnych, tj. szlaku zależnego od jonów wapnia ze szlakiem Ras-MAPK. Rodzina AP-1 obejmuje dimeryczne kompleksy białkowe składające się głównie z białek Fos (c-Fos, v-Fos, FosB, Fra1, Fra2) oraz Jun (c-Jun, v-Jun, JunB, JunD). Białka te posiadają zamki leucynowe, poprzez które wiążą się ze sobą i w ten sposób tworzą różne homo- i heterodimery. Heterodimeryzacja białek Fos z Jun jest kluczowym procesem przemieszczania się pomiędzy jądrem komórkowym a cytozolem: w postaci monomerów są bardzo aktywne, natomiast ich wzajemne połączenie hamuje ich transport do cytozolu. Do rodziny AP-1 ze względu na ich zdolność do dimeryzacji z białkami Fos i Jun należą także białka ATF (ATF2, ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2) oraz Maf (c-MAF, MafA, MafB, Nr1). Aktywność AP-1 jest regulowana przez kinazy białkowe aktywowane mitogenem (MAPK). MAPK podlega ujemnej regulacji przez fosfatazę MAPK (MAPKP), która oddziałuje z cytoplazmatycznym ogonem CD28 i jest regulowana sygnałem pochodzącym z tego koreceptora. Aktywacja kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK) powoduje indukcję c-Fos, która skutkuje wzrostem jego syntezy i translokacją do jądra komórkowego. Wewnątrz jądra, c-Fos wiąże się z obecnymi tam białkami Jun, tworząc dimery AP-1 odznaczającymi się większą stabilnością niż formy monomeryczne. Fosforylacja c-Jun przez kinazy N-końca Jun (JNK) oraz ATF2 przez JNK lub p38MAPK działa stymulująco na ich

aktywność transkrypcyjną. Inhibitorem AP-1 jest natomiast kinaza syntazy glikogenowej 3 (GSK3 β) [17]. Regulację aktywności białek AP-1 przedstawiono na rycinie 2B.



RYCINA 2.

Schemat regulacji aktywności:

A. czynników jądrowych aktywowanych komórek T (NFAT)

B. białek aktywujących (AP-1)

C. czynników jądrowych κ B (NF- κ B)

CK1- kinaza kazeiny 1; GSK3 β - kinaza syntazy glikogenowej 3, ERK- kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym; JNK- kinaza N-końca Jun; MAPK - kinaza białkowa aktywowana mitogenem; MAPKP- fosfataza MAPK; PKC θ - kinaza białkowa C; Tak1-kinaza Tak1; I κ B- inhibitor NF- κ B; IKK α , β , γ - kinazy I κ B; NIK- kinaza indukująca NF- κ B; Homer - rodzina białek adaptorowych biorących udział w sygnalizacji wapniowej

FIGURE 2.

Regulation of the activity diagram:

A. nuclear factor of activated T cells (NFAT)

B. activating protein (AP-1)

C. nuclear factor κ B (NF- κ B)

CK1- casein kinase 1; GSK3 β - glycogen synthase kinase 3; ERK- extracellular signal regulated kinase; GSK3 β - glycogen synthase kinase 3; JNK- N-terminal Jun kinase; MAPK- mitogen-activated protein kinase; MAPKP- MAPK phosphatase; PKC θ - protein kinase C; Tak1- Tak1 kinase; I κ B- NF- κ B inhibitor; IKK α , β , γ - I κ B kinases; NIK- inducing kinase NF- κ B; Homer - adapter protein family involved in calcium signaling

Czynniki jądrowe- κ B (NF- κ B)

Czynniki jądrowe NF- κ B regulują ekspresję wielu genów zaangażowanych w proliferację komórek i apoptozę oraz pełnią szczególnie istotną rolę w regulacji procesów odpornościowych. Wszyscy członkowie NF- κ B w pewnym stopniu mają wpływ na proliferację limfocytów T indukowaną stymulacją TCR [8]. NF- κ B są dimerami białek z rodziny Rel, która obejmuje 5 członków: RelA (p65), c-Rel,

RelB, p50 i p52. Wszystkie białka z rodziny Rel posiadają domenę homologiczną do Rel odpowiedzialną za wiązanie DNA i dimeryzację [8,10]. Domena transaktywacji występuje tylko u RelA, c-Rel i RelB i dlatego homodimery tych białek pozytywnie regulują docelowe geny, natomiast homodimery p50 i p52 działają jak represory. W limfocytach T najliczniej występują heterodimery p65-p50. Czynniki jądrowe κ B rezydują w cytoplazmie w kompleksie z ich inhibitorami (IkB), obejmującymi głównie białka IkB α , IkB β , IkB ϵ , a także IkB γ , Bcl-3, p100 i p105. Związanie dimeru NF- κ B z IkB czyni go nieaktywnym, ponieważ IkB maskuje sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) przy jednoczesnej ekspozycji sygnału eksportu jądrowego. Podczas sygnalizacji kinazy IkB (IKK) fosforylują IkB, powodując ich degradację. Trimeryczny kompleks IKK składa się z podjednostek IKK α IKK β IKK γ . Uwolniony NF- κ B przemieszcza się do jądra komórkowego gdzie transkrybuje zarówno geny docelowe jak i geny inhibitorów IkB. Nowo syntetyzowane białka IkB wiążą w jądrze dimery NF- κ B, powodując ich inaktywację i eksport z jądra. Stymulacja TCR powoduje aktywację NF- κ B na kilku szlakach. Aktywacja kompleksu IKK i w konsekwencji NF- κ B zachodzi także dzięki kompleksowi CBM (CARMA1, BCL10, MALT1) zależnego od kinazy białkowej C θ (PKC θ). Również kompleks IKK ulega aktywacji zależnie od PKC θ , w wyniku fosforylacji przez kinazę Tak1. Szlakiem alternatywnym jest aktywacja przez kinazę indukującą NF- κ B (NIK) kinazy IKK α , która poprzez fosforylację białka p100 prowadzi do proteolitycznego przekształcenia tego inhibitora w jeden z czynników NF- κ B – białko p52 [17]. Regulację aktywności białek NF- κ B przedstawiono na rycinie 2C.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy pracy dziękują prof. dr hab. Aleksandrowi Sikorskiemu za cenne wskazówki i merytoryczną dyskusję podczas pisania niniejszej pracy oraz Grzegorzowi Wowerowi za pomoc graficzną w przygotowywaniu rycin.

LITERATURA

- [1] ALARCON B, MESTRE D, MARTINEZ-MARTIN N. The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? *Immunology* 2011;**133** (4):420-425.
- [2] BILLADEAU DD, NOLZ JC, GOMEZ TS. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol* 2007;**7** (2):131-143.
- [3] CAIRO CW, DAS R, ALBOHY A, BACA QJ, PRADHAN D, MORROW JS, COOMBS D, GOLAN DE. Dynamic regulation of CD45 lateral mobility by the spectrin-ankyrin cytoskeleton of T cells. *J Biol Chem* 2010;**285** (15):11392-11401.
- [4] DAWES R, PETROVA S, LIU Z, WRAITH D, BEVERLEY PC, TCHILIAN EZ. Combinations of CD45 isoforms are crucial for immune function and disease. *J Immunol* 2006;**176** (6):3417-3425.
- [5] DUSTIN ML. The cellular context of T cell signaling. *Immunity* 2009;**30** (4):482-492.
- [6] DUSTIN ML. PKC-theta: hitting the bull's eye. *Nat Immunol* 2011;**12** (11):1031-1032.

- [7] DUSTIN ML, CHAKRABORTY AK, SHAW AS. Understanding the structure and function of the immunological synapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;**2** (10):a002311.
- [8] GHOSH S, HAYDEN MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2008;**8** (11):837-848.
- [9] HASHIMOTO-TANE A, YOKOSUKA T, ISHIHARA C, SAKUMA M, KOBAYASHI W, SAITO T. T-cell receptor microclusters critical for T-cell activation are formed independently of lipid raft clustering. *Mol Cell Biol* 2010;**30** (14):3421-3429.
- [10] HAYDEN MS, GHOSH S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008;**132** (3):344-362.
- [11] HUPPA JB, GLEIMER M, SUMEN C, DAVIS MM. Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nat Immunol* 2003;**4** (8):749-755.
- [12] KAIZUKA Y, DOUGLASS AD, VARMA R, DUSTIN ML, VALE RD. Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104** (51):20296-20301.
- [13] LILLEMEIER BF, PFEIFFER JR, SURVILADZE Z, WILSON BS, DAVIS MM. Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103** (50):18992-18997.
- [14] LUDFORD-MENTING MJ, CRIMEEN-IRWIN B, OLIARO J, PASAM A, WILLIAMSON D, PEDERSEN N, GUILLAUMOT P, CHRISTANSEN D, MANIE S, GAUS K, RUSSELL SM. The Reorientation of T-Cell Polarity and Inhibition of Immunological Synapse Formation by CD46 Involves Its Recruitment to Lipid Rafts. *J Lipids* 2011;**2011**:521863.
- [15] MACHNICKA B, GROCHOWALSKA R, BOGUSLAWSKA DM, SIKORSKI AF, LECOMTE MC. Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling. *Cell Mol Life Sci* 2011;**69** (2):191-201.
- [16] NOLZ JC, MEDEIROS RB, MITCHELL JS, ZHU P, FREEDMAN BD, SHIMIZU Y, BILLADEAU DD. WAVE2 regulates high-affinity integrin binding by recruiting vinculin and talin to the immunological synapse. *Mol Cell Biol* 2007;**27** (17):5986-6000.
- [17] PADHAN K, VARMA R. Immunological synapse: a multi-protein signalling cellular apparatus for controlling gene expression. *Immunology* 2010;**129** (3):322-328.
- [18] SHAW AS. Lipid rafts: now you see them, now you don't. *Nat Immunol* 2006;**7** (11):1139-1142.
- [19] SIMONSON WT, FRANCO SJ, HUTTENLOCHER A. Talin1 regulates TCR-mediated LFA-1 function. *J Immunol* 2006;**177** (11):7707-7714.
- [20] SMITH-GARVIN JE, KORETZKY GA, JORDAN MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2009;**27**:591-619.
- [21] STINCHCOMBE JC, MAJOROVITS E, BOSSI G, FULLER S, GRIFFITHS GM. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 2006;**443** (7110):462-465.
- [22] SUZUKI J, YAMASAKI S, WU J, KORETZKY GA, SAITO T. The actin cloud induced by LFA-1-mediated outside-in signals lowers the threshold for T-cell activation. *Blood* 2007;**109** (1):168-175.
- [23] UEDA H, MORPHEW MK, MCINTOSH JR, DAVIS MM. CD4+ T-cell synapses involve multiple distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108** (41):17099-17104.
- [24] WERNIMONT SA, CORTESIO CL, SIMONSON WT, HUTTENLOCHER A. Adhesions ring: a structural comparison between podosomes and the immune synapse. *Eur J Cell Biol* 2008;**87** (8-9):507-515.
- [25] YOKOSUKA T, SAITO T. The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010;**340**:81-107.

Redaktor prowadzący - Jan Żeromski

Otrzymano: 14.12.2011

Przyjęto: 01.02.2012

Dr Beata Machnicka

Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski

ul. Szafrańska 1, 65-516 Zielona Góra

tel.: +48 68 328 2341

e-mail: b.machnicka@wnb.uz.zgora.pl