

SYNAPSY IMMUNOLOGICZNE I ICH ROLA W MECHANIZMACH EFEKTOROWYCH UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO*

IMMUNOLOGICAL SYNAPSES AND THEIR ROLE IN EFFECTOR MECHANISMS OF THE IMMUNE SYSTEM

Lidia SZULC**, Marek Gabriel NIEMIAŁTOWSKI

Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Streszczenie: Współdziałanie limfocytów T z komórkami prezentującymi antygen (APC) prowadzi do utworzenia powierzchni kontaktowej określanej jako synapsa immunologiczna (IS). Struktura ta utworzona jest z obszaru centralnego zawierającego receptory antygenowe, otoczonego przez pierścień cząsteczek adhezyjnych z rodziny integryn, co zapewnia stabilność IS przez kilka godzin. W niniejszej pracy przedstawiono obecny stan wiedzy o powstawaniu, funkcji oraz heterogenności IS. Utworzenie IS wymaga rearanżacji cytoszkieletu limfocytów T, co związane jest z dostarczaniem sygnałów poprzez cząsteczki kostymulujące. Miejscem wstępnego i trwałego przekazywania sygnału aktywacji są mikroskupienia (MC) receptorów limfocytów T (TCR). Limfocyty T mogą tworzyć różnorodne formy IS w zależności od stanu ich aktywacji, rodzaju APC, z którymi dochodzi do interakcji, a także od warunków środowiskowych oraz rodzaju antygeny. Typy interakcji obejmują zarówno oddziaływania stabilne i długotrwałe, jak również dynamiczne i krótkotrwałe. Mimo iż w pełni nie poznano biologicznej funkcji IS, wiadomo jednak, iż odgrywają one kluczową rolę w uruchamianiu oraz działaniu mechanizmów efektorowych związanych z antygenowo-swoistą odpornością nabytą.

Słowa kluczowe: synapsa immunologiczna (IS), limfocyty T, komórki prezentujące antygen (APC), cytoszkielet, kostymulacja.

* Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006–2008 jako projekt badawczy nr 2 PO5A 050 30 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Warszawie (kierownik projektu: prof. dr hab. Marek G. Niemiałtowski). ** Doktorantka dziennego studium doktoranckiego „*Ksenobiotyki oraz biologia czynników zakaźnych i inwazyjnych*” (2005–2009) przy Wydziale Medycyny Weterynaryjnej SGGW (kierownik studium oraz promotor: prof. dr hab. Marek G. Niemiałtowski).

Summary: T cells and antigen presenting cells (APC) form a specialized cell-cell junction termed the immunological synapse (IS). It is characterized by a central region of antigen receptors, a ring of integrin family adhesion molecules, and temporal stability over hours. This minireview discusses the current knowledge on the formation, function and diversity of immunological synapses. Cytoskeletal remodeling in T cells, which is connected with signals delivered by costimulatory molecules, plays a crucial role in a formation of IS. Microclusters (MCs) are the site for initial and sustained T cell receptor (TCR) signals. T lymphocytes form different ISs depending on their state of activation, on APCs with which they interact, also on environmental conditions and antigen load. The types of interactions between T cells and APC range from stable and long lived to dynamic and short lived. Although biological role of the IS has not been fully characterized we know well that this process is crucial for the antigen recognition particularly in the adaptive immune response of T cells.

Key words: immunological synapse (IS), T lymphocytes, antigen presenting cells (APC), cytoskeleton, costimulation.

Objaśnienie użytych skrótów: **Akt** (*protein kinase B (PKB)*) – kinaza białkowa B; **APC** (*antigen presenting cells*) – komórki prezentujące antygen; **CD** (*cluster of differentiation*) – kompleks różnicowania; **CTL** (*cytotoxic T lymphocyte(s)*) – limfocyty T cytotoksyczne; **CTLA-4** (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) – antygen 4 związany z limfocytom T cytotoksycznym; **DC** (*dendritic cell(s)*) – komórki dendrytyczne; **d.p.z.** – dni po zakażeniu; **ECTV** (*ectromelia virus*) – wirus ektromelii; **ERK** (*extracellular-signal-regulated kinase*) – kinazy regulowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe; **ERM** (*e-zrin/radixin/moesin*) – ezryna/radyksyna/moezyna; **GCK** (*germinal center kinase*); **GIT** (*G-protein-coupled receptor kinase interactor*); **HIP-55** (*hematopoietic progenitor kinase 1 [HPK1]-interacting protein of 55 kDa*) – białko 55 kDa oddziałujące z hematopoetyczną progenitorową kinazą 1; **HPK1** (*hematopoietic progenitor kinase 1*) – hematopoetyczna progenitorowa kinaza 1; **ICAM** (*intercellular adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej; **ICOS** (*inducible co-stimulator*) – indukowany kostymulator; **IL** (*interleukin(s)*) – interleukiny; **IFN** (*interferon(s)*) – interferony; **IS** (*immunological synapse*) – synapsa immunologiczna; **Itk** (*IL-2-induced T-cell kinase*) – kinaza limfocytów T indukowana IL-2; **LAT** (*linker for activation of T cells*) – łącznik aktywacji limfocytów T; **LFA** (*leukocyte function-associated antigen*) – antygen związany z czynnością limfocytów; **MARCKS** (*myristoylated alanine-rich C kinase substrate*) – substrat kinazy C bogaty w mirystylowaną alaninę; **MCs** (*microcluster(s)*) – mikroskupienia; **MHC** (*major histocompatibility complex*) – główny układ zgodności tkankowej; **Mφ** (*macrophage(s)*) – makrofagi; **MTOC** (*microtubule-organizing centre*) – centrum organizacji mikrotubul; **NFAT** (*nuclear factor of activated T cell*) – czynnik jądrowy aktywowanych limfocytów T; **PAK1** (*p21-activated kinase 1*) – kinaza 1 aktywowana p21; **PDK1** (*phosphatidylinositol-dependent protein kinase 1*) – fosfatydyloinozytolo-zależna kinaza białkowa 1; **PH** (*pleckstrin homology domain*) – domena plekstrynowa; **PI3K** (*phosphatidylinositol-3-kinase*) – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu; **PIX** – (*PAK-interacting exchange factor*) – czynnik wymiany oddziałujący z PAK; **PKC-θ** (*protein kinase C-θ*) – kinaza białkowa C-θ; **PLC** (*phospholipase C*) – fosfolipaza C; **p-MHC** (*peptide-MHC*) – peptyd-MHC; **PtdIns(3,4,5)P₃** (*phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate*) – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan; **PtdIns(4,5)P₂** (*phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate*) – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan; **PSTPIP1** (*proline, serine, threonine phosphatase-interacting protein 1*) – fosfataza białkowa 1 oddziałująca z prolina, seryną, treoniną; **SHP2** (*Src homology 2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2*) – domena 2 homologii Src zawierająca białkową fosfatazę tyrozynową 2; **SLP-76** (*Src homology 2 (SH2) domain-containing leukocyte protein of 76 kDa*) – domena 2 homologii Src zawierająca białko leukocytów o masie 76 kDa; **SMAC** (*supramolecular activation cluster(s)*); **TCR** (*T-cell receptor*) – receptor limfocytów T; **TEC** (*tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma*) – kinaza tyrozynowa ulegająca ekspresji na komórkach raka wątroby; **WASP** (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) – białko syndromu Wiskott-Aldrich; **WIP** (*WASP-interacting protein*) – białko oddziałujące z WASP; **ZAP-70** (*ξ-associated protein of 70 kDa*) – białko 70 kDa połączone z łańcuchem ξ.

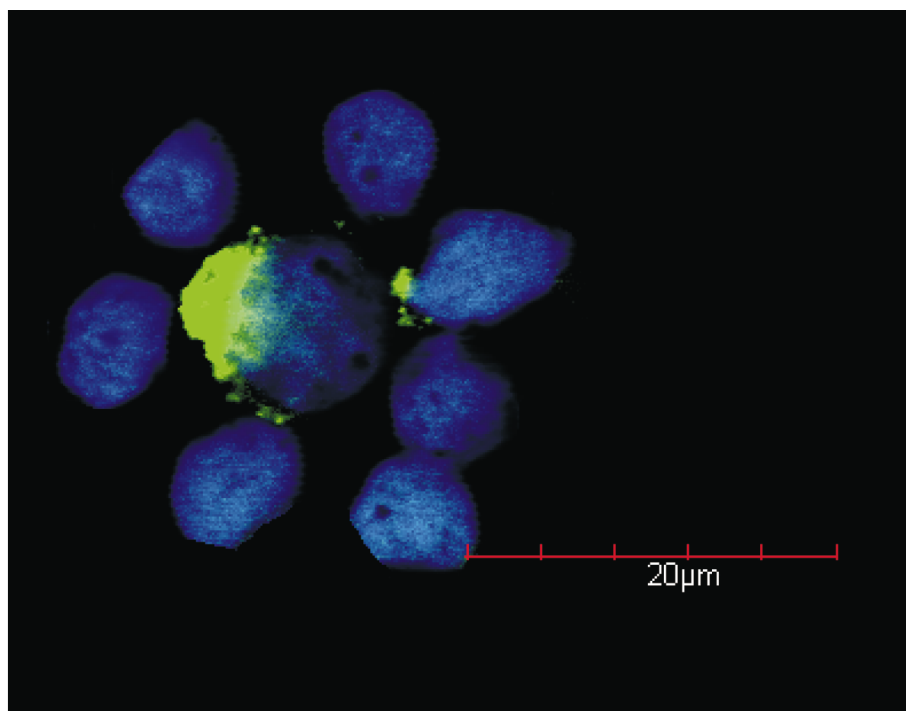
1. WSTĘP

Dies Diem Docet

Z każdym dniem jesteśmy mądrzejsi

Ta rzymska maksyma odnosi się również do naszej szybko rosnącej wiedzy o prezentacji obcych antygenów komórkom układu odpornościowego, w tym do wzajemnych relacji między komórkami prezentującymi antygen, APC, a antygenowo-swoistymi limfocytami T. Aktywacja komórek T zachodzi w następstwie długotrwałego fizycznego kontaktu tych limfocytów z APC, którymi są komórki dendrytyczne (DC), makrofagi (Mø) oraz limfocyty B [25,45]. Interakcje limfocytów T z APC możliwe są przede wszystkim dzięki cząsteczkom adhezyjnym znajdującym się na powierzchni tych komórek, jak na przykład, LFA-1 – ICAM-1/2 oraz LFA-2 (CD2) – LFA-3, które to cząsteczki ułatwiają uruchomienie szlaków przekazywania sygnałów aktywacji poprzez TCR (ang. *T-cell receptor*), będące polimorficzną strukturą swoiście rozpoznającą antygeny [12, 33]. Specyficzne oddziaływania limfocytów T z APC doprowadzają do wielokomórkowej agregacji oraz tworzenia stabilnych skupisk komórek (rozetek) *in vitro* [66] i *in vivo* [29] (ryc. 1). Stwierdzono, iż minimalny czas kontaktu TCR z kompleksem peptyd-MHC (pMHC), niezbędny dla pełnej aktywacji dziewiczych limfocytów T, wynosi około 20 godzin. Minimalny czas przekazywania sygnału poprzez TCR w limfocytach T w wyniku ich kontaktu z dojrzałymi DC jest krótszy niż 6 godzin, natomiast w przypadku hybrydowych limfocytów T (*hybridoma T cells*) pozostających w kontakcie z Mø, czas ten wynosi około 2 godzin [25]. Skupiska komórek T i APC nie tylko umożliwiają wstępną aktywację limfocytów T CD4⁺ podczas rozwoju nabytej (antygenowo-swoistej) odpowiedzi immunologicznej, ale są też przypuszczalnym obszarem wzajemnych oddziaływań różnych populacji limfocytów w wyniku rozpoznawania wspólnych epitopów antygenowych. Obejmuje to przede wszystkim funkcje limfocytów T CD4⁺ we wspomaganiu limfocytów T CD8⁺ i limfocytów B, różnicowanie się dziewiczych limfocytów T w subpopulacje Th1 (IL-2⁺, IFN-γ⁺) lub Th2 (IL-4⁺, IL-10⁺) oraz supresję efektorowych limfocytów T przez regulatorowe limfocyty T CD4⁺. W konsekwencji interakcje te mogą doprowadzić do rozwoju odpowiedzi immunologicznej lub utrzymania stanu tolerancji na własne antygeny [27].

Interakcje limfocytów T z APC skutkują utworzeniem płaszczyzny kontaktowej określanej terminem „synapsa immunologiczna” (IS) [13, 30]. Po raz pierwszy termin synapsa immunologiczna został zastosowany przez M. Norcrossa w 1984 roku dla zdefiniowania wzajemnych oddziaływań pomiędzy limfocytami T a APC [28]. IS początkowo zaobserwowano pomiędzy limfocytami T i B oraz limfocytami T a płaskimi dwuwarstwowymi błonami lipidowymi – BLM (ang. *bilayer lipid membrane*) z wbudowanymi cząsteczkami MHC [47, 57].



RYCINA 1. Prezentacja antygenów ortopokswirusa ektromelii – ECTV (*ectromelia [mousepox] virus*): widoczna rosetka utworzona przez komórki efektorowe T (na fotografii widoczne tylko jądra limfocytów T wybarwione na niebiesko) otaczające APC o kolorze niebiesko-zielonym (zielony kolor wskazuje na lokalizację w APC antygenów ECTV-MOS). Z badań własnych: komórki wyizolowano z węzłów chłonnych myszy BALB/c (H-2^d) w 10 d.p.z. szczepem Moscow ECTV (ECTV-MOS) otrzymanym od dr R.M.L.Bullera z St.Louis University, Health Sciences Center (St.Louis, MO, USA). Preparat barwiono koniugatem fluorescencyjnym: królicze Ab anti-ECTV-MOS/FITC oraz SYTOX Blue (1 μg/ml; Invitrogen). Analizy komórek dokonano w mikroskopie konfokalnym (Olympus FV 1000) udostępnionym przez prof. dr hab. Ewę Sawosz (SGGW)

2. FORMOWANIE DOJRZALEJ SYNAPSY IMMUNOLOGICZNEJ

Monks i wsp. [47] jako pierwsi zaobserwowali, że TCR nie gromadzi się w sposób jednolity na styku pomiędzy limfocytym T a APC, lecz w centralnym regionie synapsy, który został przez nich nazwany c-SMAC (ang. *central supramolecular activation cluster*). Termin „synapsa immunologiczna” obejmuje część centralną c-SMAC, otoczoną przez część obwodową (peryferyjną) p-SMAC (ang. *peripheral SMAC*) [13, 30, 57]. Obszar c-SMAC utworzony jest poprzez akumulację TCR-pMHC, wzbogacony także w koreceptory (CD8, CD4), cząsteczki kostymulujące i ich ligandy (CD28/CD80), a także cytoplazmatyczne białka przekąźnikowe (kinazy Lck, Fyn, PKC-θ) [57, 70]. Z kolei region p-SMAC utworzony jest przede wszystkim z pierścienia receptorów cząsteczek adhezyjnych i ich ligandów (głównie LFA-1/ICAM-1) oraz

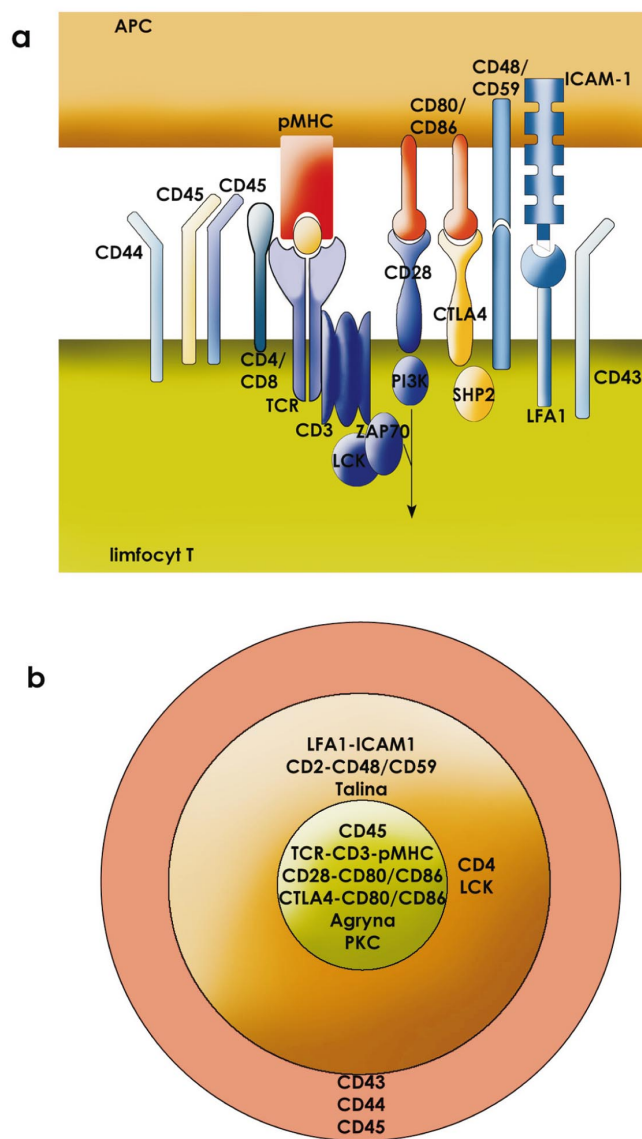
białka taliny (wiążącego aktynę) [47, 57]. Udział wapnia oraz kinaz tyrozynowych w przekazywaniu sygnałów ma miejsce przed segregacją SMAC na poszczególne obszary, dlatego też nadano tej strukturze nazwę „dojrzała IS” w celu odróżnienia jej od poprzedzającej ją, krótkotrwałej i wysoce płynnej, „niedojrzałej” formy. Charakterystycznymi cechami dojrzałej IS są:

- (i) obecność w centralnym regionie TCR i PKC- θ bez cząsteczek CD43 [3],
- (ii) występowanie w niej wysoce dynamicznych struktur, jakimi są mikroskupienia (ang. *microclusters*) oraz
- (iii) względna stabilność (obecność c-SMAC może być obserwowana co najmniej 1 godzinę po połączeniu TCR z p-MHC) [30] (ryc. 2).

W IS można ponadto wyróżnić obszar bardziej peryferyjny niż p-SMAC, tzw. dystalny (ang. *distal*) d-SMAC, do którego dołączane są białka mogące uniemożliwiać przekazywanie sygnału do komórki [57]. Fosfataza tyrozynowa (CD45) we wczesnym etapie przyłącza się do c-SMAC, gdzie aktywuje Lck w początkowym stadium aktywacji limfocyta T, przemieszczając się później do d-SMAC, prawdopodobnie ze względu na swoje właściwości defosforylujące, co może znosić efekt działania kinaz tyrozynowych aktywujących szlaki przekazywania sygnału do komórki [18]. Natomiast sialoproteina CD43 może hamować interakcje białek przekaźnikowych, dlatego tuż po połączeniu TCR z pMHC, zostaje usunięta z c-SMAC i przemieszczona do d-SMAC [1]. Limfocyty T niestymulowane antygenem mają bowiem wysoki poziom ufosforylowanej moezyny, w wyniku czego cząsteczki CD43 zakotwiczone są w cytoszkieletie za pośrednictwem białek z rodziny ERM (ang. *e_zrin/radixin/moesin*) [16]. Aktywacja limfocytów T powoduje defosforylację moezyny (ang. *moesin, membrane organising extension spike protein*), następstwem czego jest oddysocjowanie CD43 od białek ERM i jego translokacja do obszaru d-SMAC [1, 16]. Do dystalnego regionu IS przemieszczeniu ulegają także cząsteczki adhezyjne CD44, odgrywające rolę w kostymulacji limfocytów T [56] (ryc. 2).

3. ROLA CZĄSTECZEK KOSTYMULUJĄCYCH W TWORZENIU IS

Przekazywanie sygnałów poprzez TCR bez udziału kostymulacji wywołuje stan niereaktywności limfocytów T, określany anergią, będący jednym z mechanizmów fizjologicznej tolerancji własnych antygenów na obwodzie. Receptory sygnałowe limfocytów T, włączając CD28, LFA-1, ICOS, 4-1BB, OX40 oraz CTLA-4, mające odpowiednie ligandy na komórkach APC, dostarczają różnorodnych sygnałów kostymulujących [32, 36] (tab. 1). Białka te bądź rezydują w mikrodomenach (*lipid rafts*), bądź asocjują z nimi po związaniu antygeny przez TCR. Fuzja mikrodomen niosących poszczególne receptory i ko-receptory warunkuje zorganizowanie funkcjonalnego kompleksu sygnałowego receptora TCR i uformowanie IS. Dzięki stabilności tej struktury, utrzymywanej przy udziale cytoszkieletu aktynowego, TCR może być efektywnie aktywowany przez zaledwie kilkaset cząsteczek antygeny [37].



RYCINA 2. Schemat dojrzałej synapsy immunologicznej – IS: (a) widoczna koncentracja par ligandów i cząsteczek sygnałowych biorących udział w tworzeniu IS między limfocytem T a komórką prezentującą antygen (APC). Kompleks peptyd-MHC przedstawiono na czerwono, cząsteczki aktywujące/kostymulujące na niebiesko, cząsteczki inhibitorowe na żółto, a kolorem błękitnym oznaczono cząsteczki, które nie biorą udziału w przekazywaniu sygnałów (CD43 i CD44). Strzałką oznaczono skupianie się sygnałów prowadzących do aktywacji limfocytów T (widok z boku); (b) wysoce uporządkowana struktura dojrzałej IS (tzw. „oko byka”) zawierająca pary receptor-ligand, tworząca centralny obszar c-SMAC oznaczony kolorem zielonym, p-SMAC z cząsteczkami adhezyjnymi kolorem pomarańczowym oraz obszar d-SMAC – kolor różowy (widok z góry); CTLA-4 – antygen 4 związany z limfocytem T cytotoksycznym; ICAM1 – cząsteczka adhezji międzykomórkowej; LFA – antygen związany z czynnością limfocytów; PI3K – kinaza 3-fosfatydoinozytolu; SHP2 – domena 2 homologii Src zawierająca białkową fosfatazę tyrozynową 2; ZAP-70 – białko 70 kDa połączone z łańcuchem ξ (dalsze objaśnienia w tekście pracy; adaptacja własna wg [28])

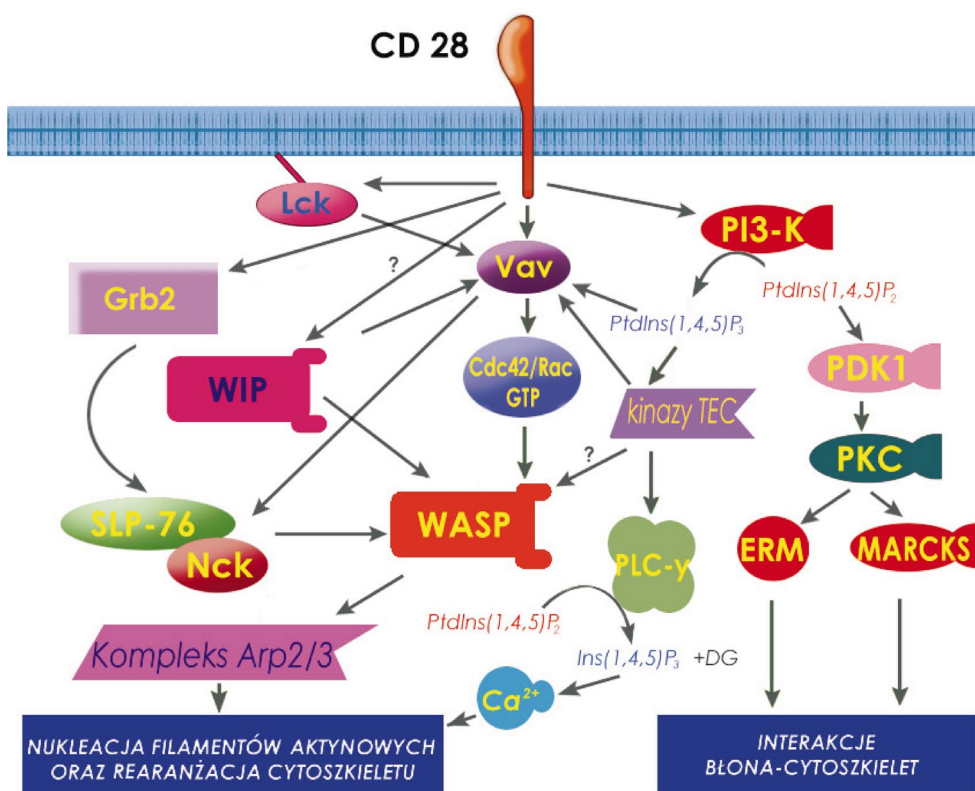
TABELA 1. Częsteczki kostymulujące biorące udział w aktywacji lub hamowaniu aktywacji limfocytów T

Receptory	Ligandy	Wpływ na limfocyty T
CD28	B7-1 (CD80) B7-2 (CD86)	Aktywacja (\uparrow IL-2, \uparrow IL-4, \uparrow prolifерacja) [53]
CTLA-4 (CD152)	B7-1 (CD80) B7-2 (CD86)	Hamowanie aktywacji (\downarrow IL-2, \downarrow IL-4, \downarrow prolifерacja) [56]
LFA-1 = Integryna α L β 2	ICAM-1	Adhezja [32]
ICOS	B7h/B7RP-1	Aktywacja (\uparrow IL-4, \uparrow IL-10, \uparrow TNF- α) [32]
4-1BB (CD137)	4-1BB-L	Podtrzymanie aktywacji (\uparrow ekspresji genów antyapoptotycznych <i>bcl-x</i> i <i>bfl-1</i>) [37]
CD2	CD58 (komórki ludzkie) CD48 (komórki mysie)	Aktywacja (\uparrow IFN- γ) [19]
OX40 (CD134)	OXO40-L (nadrodzina TNF)	Aktywacja (\uparrow IL-12, \uparrow TNF- α , \uparrow prolifерacja) [47]
CD6	CD166	Aktywacja (\uparrow prolifерacja) [23]
CD26	Deaminaza ekto-adenozyny	Aktywacja (\uparrow IL-6, \uparrow IFN- γ , \uparrow TNF- α) [44]

Bromley i wsp. [8] wykazali na modelu dwuwarstwowej struktury lipidowej, iż oddziaływanie CD28 z B7-1 nie wywiera znaczącego wpływu na wzmocnienie połączenia TCR-pMHC oraz formowanie IS. Ostatnie publikacje [35, 67, 68] wskazują na rolę cząsteczek kostymulujących w tworzeniu IS oraz przekazywaniu sygnałów aktywacji do wnętrza komórki warunkujących pełną aktywację limfocytów T. W obrębie IS ulegają akumulacji także inne cząsteczki kostymulujące obejmujące następujące pary receptor-ligand: CD2-CD58 [19], CD40-CD40L [5], CD6-CD166 [23] oraz CD26-deaminaza ektoadenozyny, która zakotwiczona jest w DC prawdopodobnie poprzez receptor adenozyne A_{2B} [48].

Najbardziej reprezentatywnymi cząsteczkami kostymulującymi są CD28 oraz CTLA-4. Rola cząsteczek CD28 w tworzeniu IS podlega ciągłej dyskusji, mimo iż ich interakcje z CD80 mają miejsce w centralnym obszarze SMAC [67]. Najbardziej prawdopodobna wydaje się być rola CD28 w integrowaniu różnorodnych cząsteczek sygnałowych w rejonie synapsy, w wyniku czego może ona indukować przekazywanie sygnałów do wnętrza komórki [30]. CD28 może zapoczątkowywać proces kostymulacji przez werbowanie i aktywację kinazy 3-fosfatydiloinozytolu (PI3-K) i domeny PH (ang. *pleckstrin homology domain*) zawierającej kinazę tyrozynową Itk oraz może fosforylować CD3 ξ i aktywować

kinazę Lck poprzez różne motywy znajdujące się w cytoplazmatycznej części CD28 [8, 59]. CD28 może także łączyć się i aktywować kinazę Lck i kinazy TEC (ang. *tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma*) oraz regulować funkcje WASP i nukleację filamentów aktynowych poprzez kompleks Arp2/3 (ang. *actin-related protein 2/3 complex*) [61]. Z kolei Michel i wsp. [44] wykazali, że CD28 ułatwia przekazywanie sygnału poprzez TCR. Przy mniejszym poziomie stymulacji TCR, przekazywanie sygnału poprzez CD28 doprowadza do wzrostu napływu wapnia do komórki oraz do aktywacji fosfolipazy C γ 1 w sposób zależny od Itk, co może



RYCINA 3. Regulacja reorganizacji cytoszkieletu przez CD28. CD28 oddziałuje na kompleks Arp2/3 poprzez asocjację z Vav oraz dalszą aktywację Cdc42, Rac i WASP. Powstawanie $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ zależne od PI3-K wpływa na funkcje Vav, kinaz TEC i WASP. Ponadto CD28 wchodzi w interakcję z Grb2, co prowadzi do rekrutacji SLP-76, Nck i WASP. Lck i WIP mogą wywierać wpływ na funkcję Vav i aktywność Cdc42 (Rac), natomiast CD28 może prowadzić do regulacji oddziaływań molekularnych błona-cytoszkielet poprzez udział w kaskadzie cząsteczek sygnałowych (PDK1, PKC, białka ERM i MARCKS); DG – diacyloglicerol; ERM – ezryna/radyksyna/moezyna; MARCKS – substrat kinazy C bogaty w mirystylowaną alaninę; PDK – fosfatydylinozytolo-zależna kinaza białkowa 1; $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ – fosfatydylinozytolo-4,5-bisfosforan; $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ – fosfatydylinozytolo-3,4,5-trifosforan; PKC- θ – kinaza białkowa C; SLP-76 – domena 2 homologii Src zawierająca białko leukocytów o masie 76 kDa; TEC – kinaza tyrozynowa ulegająca ekspresji na komórkach raka wątroby; WASP – białko syndromu Wiskott-Aldrich; WIP – białko oddziałujące z WASP; ZAP-70 – białko 70 kDa połączone z łańcuchem ξ (szczegółowe objaśnienia podano w tekście pracy; adaptacja własna wg [57])

sugerować, iż CD28 odgrywa rolę we wczesnym etapie aktywacji limfocytów T, jeszcze przed uformowaniem dojrzałej synapsy [30] (ryc. 3).

W przeciwieństwie do CD28, CTLA-4 występuje w pęcherzykach wewnątrzkomórkowych i przemieszcza się do IS jedynie w późnym etapie stymulacji limfocytów T [30]. Allison i wsp. [49] zademonstrowali, iż akumulacja CTLA-4 w IS jest uzależniona od stopnia nasilenia sygnału przez TCR. Wykazali, że silniejsze bodźce efektywniej werbują CTLA-4 do IS oraz hamują odpowiedź komórkową, a także powodują, że B7-1 i B7-2 wpływają na proces selektywnej migracji CTLA-4 i CD28 do obszaru IS. Stwierdzono także, iż CTLA-4 zaburza funkcjonowanie IS poprzez skupianie się tych molekuł wraz z TCR, jak również, że CTLA-4 może brać udział w kontrolowaniu akumulacji i/lub zatrzymaniu CD3 ξ w obszarze IS [57].

Batista i wsp. [2] wysunęli hipotezę, iż błonowe glikoproteinowe receptory transferynowe (TfR, CD71) także mogą uczestniczyć w formowaniu IS. Wykazano, iż stymulacja TfR doprowadza do fosforylacji tyrozyny w CD3 ξ i odwrotnie, stymulacja TCR wzmacnia fosforylację tyrozyny w TfR. Werbowanie TfR do IS powoduje jego lokalizację w sąsiedztwie kompleksu TCR, co może ułatwiać współdziałanie między tymi dwoma receptorami. Ponadto, TfR może brać udział w wydarzeniach mających miejsce przed formowaniem IS, mianowicie w przekazywaniu sygnału aktywacji poprzez TCR. Z kolei Kane i wsp. [31] wykazali, iż Akt, pod wpływem czynników zewnętrznych i wewnętrznych, lokalizuje się na styku limfocytów T z APC, jakkolwiek rola Akt w aktywacji limfocytów T pozostaje nieznana.

4. ROLA CYTOSZKIELETU W TWORZENIU IS

Niektóre sygnały przekazywane poprzez TCR doprowadzają w rezultacie do rearanżacji cytoszkieletu aktynowego, który odgrywa kluczową rolę w powstawaniu i funkcjonowaniu IS. Funkcję centralną w procesie przemodelowania cytoszkieletu aktynowego spełnia fosfolipaza C γ (PLC γ), która może napływać do TCR w sposób zależny od LAT lub SLP-76 [54]. Zaktywowana PLC γ zmniejsza lokalne stężenie fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu [PtdIns(4,5)P $_2$], który może oddziaływać na różnorodne białka cytoszkieletu oraz białka powiązane z cytoszkieletem aktynowym, np. profiliną czy kofiliną. Degradacja PtdIns(4,5)P $_2$ powoduje także wzrost cytoplazmatycznego wolnego Ca $^{2+}$, co ma wpływ na aktywność pewnych izoform kinazy białkowej C oraz białek cytoszkieletu (gelsoliny), w konsekwencji czego dochodzi do rearanżacji cytoszkieletu aktynowego w obrębie IS [61]. Zmiany w cytoszkielecie powodowane są także przez PI3-K, a werbowanie tych cząsteczek do TCR może wymagać ich interakcji z białkami adaptorowymi LAT i cząsteczkami oddziałującymi z TCR (TRIM) lub poprzez bezpośrednie wiązanie z CD28. PI3-K fosforyluje PtdIns(4,5)P $_2$ doprowadzając do powstania fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforanu [PtdIns(3,4,5)P $_3$], który m.in. rekrutuje czynnik wymiany Vav dla GTPazy Rac i Cdc42, które uczestniczą w formowaniu, odpowiednio, lamelipodium lub filopodium [57].

Burkhardt i wsp. [38] przedstawili alternatywny sposób na miejscową polimeryzację aktyny w obrębie IS, w którym to biorą udział kinazy tyrozynowe TEC oraz kinaza tyrozynowa Brutona (Btk), wiążące się do $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ poprzez domenę plekstrynową. Wykazano także, iż kinazy TEC są konieczne do aktywacji Cdc42 i białka syndromu Wiskott-Aldrich (WASP), jak również do naboru białka Vav do obszaru synapsy [38, 61]. Kinazy TEC mogą w końcu oddziaływać na PKC, a ta z kolei na białka efektorowe, tj. ERM czy białka MARCKS (ang. *myristoylated alanine-rich C kinase substrate*), które łączą błonę plazmatyczną z cytoszkieletem aktynowym [10].

W obrębie IS dochodzi do nukleacji i elongacji filamentów aktynowych, gdzie ważną rolę odgrywa kompleks Arp2/3, będący jednym z głównych czynników cytoplazmatycznych biorących udział w nukleacji, jakkolwiek najnowsze badania wykazały, iż transport MTOC do IS może również odbywać się bez udziału kompleksu Arp2/3, za pośrednictwem nieznanego jeszcze mechanizmu [24]. Do swojej pełnej aktywności kompleks Arp2/3 wymaga interakcji z WASP [61]. WASP akumuluje się w IS wraz z Cdc42-GTP, doprowadzając do aktywacji WASP w wyniku zmian konformacyjnych. Białko WASP w obszarze IS może być także aktywowane w wyniku fosforylacji tyrozyny, stwarzając w ten sposób miejsca wiązania kinaz z rodziny Src czy innych białek mających domenę SH2 [11]. Zipfel i wsp. [71] wykazali, iż kompleks białek Abi/Wave, podobnie jak białko WASP, bierze udział w formowaniu IS oraz w regulacji przemodelowania cytoszkieletu poprzez łączenie się z Rac i Arp2/3.

Z kolei badania nad ruchliwością *Listeria monocytogenes* wykazały, iż białka z rodziny Ena/VASP (ang. *vasodilator-stimulated phosphoprotein*) są niezbędne do elongacji filamentów aktynowych. Białka Ena/VASP ulegają kolokalizacji z aktyną oraz Fyb/SLAP-130 w obszarze IS, natomiast ich przemieszczenie z tego obszaru poważnie narusza przemodelowanie cytoszkieletu aktynowego, co sugeruje, iż są niezbędne do formowania IS. Ena/VASP poprzez interakcje z Fyb/SLAP-130 może regulować elongację filamentów aktynowych poprzez werbowanie kompleksów profilina-aktyna. Ponadto, Ena/VASP może oddziaływać poprzez regiony bogate w pralinę na białka WASP, możliwe jest zatem, że werbowane są one do IS poprzez asocjację tych białek [61]. Ostatnio wykazano, iż regulacja polarności limfocytów T oraz powstawania IS odbywa się przy udziale białek Scribble, Crumbs3 i Par3 zawierających domeny PDZ (ang. *postsynaptic density protein-95*, *disc-large*, *zo-1*) [43]. Mechanizm z udziałem pęcherzyków transportowych zawierających SNAREs (ang. *N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) uczestniczy w przetwarzaniu i włączaniu TCR na nowo do IS, warunkując w ten sposób dynamiczny nabór TCR do obszaru synapsy [14].

Podczas intensywnych badań nad IS odkryto także inne cząsteczki koncentrujące się w obrębie synapsy oraz biorące udział w przemodelowaniu cytoszkieletu aktynowego. Należą do nich m.in. PAK1 i HIP-55. Cząsteczki PAK1 są przyłączane do obszaru IS, gdzie ulegają aktywacji. Prawdopodobnie w proces przemieszczania się PAK1 do IS zaangażowany jest kompleks GIT-PIX-PAK [50]. Natomiast HIP-55, jako białko wiążące aktynę, może potencjalnie wywierać wpływ na przekazywanie sygnałów w

limfocytach T poprzez regulację reorganizacji cytoszkieletu [26, 54]. Ponadto wykazano, iż białko to reguluje końcowe etapy przekazywania sygnałów aktywacji w limfocytach T poprzez wiązanie się i aktywację HPK1, należącej do rodziny kinaz GCK, uczestniczących w negatywnej regulacji limfocytów T [26]. Kompleks HIP-55-HPK1 negatywnie reguluje aktywację jądrowego czynnika aktywowanych limfocytów T (NFAT) poprzez TCR. HIP-55 może kontrolować proces przekazywania sygnałów w limfocytach T w wyniku wspomagania cząsteczek HPK1 w przemieszczaniu się do powierzchni styku limfocytów T z APC i/lub regulację ich aktywności. Rekrutacja białka HIP-55 do IS może być związana z jego oddziaływaniem z HPK1, przyłączonym do innych białek adaptorowych, takich jak: Gads lub SLP-76 (ang. *src homology (SH)2 domain-containing leukocyte-specific phosphoprotein of 76 kDa*), jakkolwiek nie należy wykluczyć alternatywnych dróg naboru HIP-55 do obszaru IS [26].

5. MIKROSKUPIENIA TCR

Krummel i wsp. [35] po raz pierwszy zaobserwowali przy użyciu białek połączonych z GFP (ang. *green fluorescent protein*) małe rozproszone skupiska cząsteczek CD3 ξ i CD4, które pojawiły się w tym samym czasie co wstępna odpowiedź Ca²⁺ po kontakcie limfocytów T z APC. Zapoczątkowanie aktywacji limfocytów T nie korelowało z powstawaniem struktury SMAC/synapsy opisywanej przez Monksa i wsp. [47], lecz z formowaniem małych, bardzo niestabilnych skupień CD3 ξ i CD4. Z kolei Bunnell i wsp. [9] wykazali powstawanie mikroskupień (ang. *microclusters*) przy użyciu białaczkowych komórek Jurkat stymulowanych przeciwciałami anty-CD3. W ciągu kilku sekund po kontakcie limfocytów T z przeciwciałami, powstawały małe skupienia o wielkości 0,5–1,0 μ m, regulowane w dynamiczny sposób.

Kombinacja technik z wykorzystaniem układu modelowego płaskich dwuwarstwowych błon lipidowych (ang. *planar bilayer system*) oraz mikroskopii TIRF (ang. *total internal reflection fluorescence microscopy*) umożliwiła dokładne wykrywanie dynamiki ruchu cząsteczek sygnałowych w czasie rzeczywistym oraz oznaczenie kinetyki i liczby mikroskupisk [69]. W momencie łączenia się limfocytów T z p-MHC, zakotwiczonych w dwuwarstwowej błonie lipidowej, dochodziło do formowania MCs na całej powierzchni złącza komórek T. Ukazano, iż w obrębie wczesnych TCR-MCs zawarte były cząsteczki sygnałowe, tj. TCR, CD3 (30–150 cząsteczek CD3 ξ), ZAP-70, LAT, SLP-76, Grb2, Gads, Cbl oraz fosfotyrozyna [9, 69]. Cząsteczki LAT, Grb2 i Gads przelotnie przyłączały się do skupisk TCR i mimo tego, że skupiska zawierające ZAP-70 utrzymywały się przez ponad 20 min, obserwowano ciągłe naprzemienne odłączanie i przyłączanie ZAP-70 do tych skupisk. Tymczasem SLP-76 po procesie grupowania TCR ulegało dynamicznej translokacji do nieokreślonej struktury okołojądrowej [69]. Po maksymalnym rozprzestrzenieniu mikroskupisk (1–2 min), TCR-MCs zaczynały ulegać przemie-

szczeniu do centralnego obszaru powierzchni kontaktu z prędkością ok. 50 nm/s i formować c-SMAC [13, 57], podczas gdy przeważająca część kinaz (ZAP-70) i białek adaptorowych (SLP-76) odłączała się od TCR-MCs i nie przemieszczała do centralnego obszaru [69]. Jedynie peryferyjne MCs zawierały ZAP-70 i SLP-76, niezbędne do aktywacji limfocytów T. Wykazano także, iż kiedy formowanie dojrzałej IS było kompletne (po 20–30 min), TCR-MCs stale były wytwarzane na obrzeżach synapsy, gdzie TCRs łączyły się z p-MHC, tworząc dynamiczne struktury podobne do lamellipodium, oraz stale były przemieszczane do obszaru centralnego [58]. Dodatek inhibitora polimeryzacji aktyny znosi wytwarzanie peryferyjnych MCs oraz hamuje trwałą aktywację bez zniszczenia struktury c-SMAC. Tak więc wydaje się prawdopodobne, że sygnały trwałej aktywacji są wytwarzane w miejscu nowo powstałych peryferyjnych MCs. Teoria ta tłumaczy także, w jaki sposób limfocyty T mogą być aktywowane bez formowania c-SMAC [69]. Fosforylacja tyrozyny i napływ Ca^{2+} występuje podczas formowania MCs, ale przed powstawaniem c-SMAC, co sugeruje, iż MCs służą jako miejsce indukcji początkowych sygnałów aktywacji po związaniu TCR z pMHC [30, 57].

6. FUNKCJE IS

Ponieważ MCs są miejscem wstępnego i trwałego przekazywania sygnału aktywacji, należy ponownie przeprowadzić ocenę funkcji c-SMAC. Przedstawiony obraz jest podsumowaniem aktualnej wiedzy na temat rozmaitych możliwości funkcjonowania tego wyrafinowanego układu biologicznego, które nie muszą się wzajemnie wykluczać.

Uważa się, że c-SMAC jest rodzajem adaptacyjnego kontrolera, który zwiększa częstość wiązań TCR-pMHC oraz osłabia stopień nasilenia sygnałów w komórce [41]. Związane jest to z faktem, iż c-SMAC jest miejscem degradacji kompleksów TCR i cząsteczek sygnałowych, dzięki którym aktywacja limfocytów T zachowuje równowagę [57]. Lee i wsp. [41] wykazali, iż limfocyty T z niedoborem CD2-AP, niezdolne do tworzenia c-SMAC, cechują się wzmożoną ekspresją TCR na powierzchni komórki, co wynika z uszkodzenia procesu odzyskiwania i/lub degradacji CD2-AP i jest zgodne z aktywną endocytozą TCR oraz z ich reorganizacją poprzez ruch wewnątrzkomórkowy [57]. Wykazano, iż c-SMAC ułatwiają fosforylację TCR poprzez kinazę Lck, która lepiej fosforyluje TCR tworzące mikroskupienia niż pojedyncze cząsteczki TCR, a ponieważ degradacji ulegają w pełni ufosforylowane receptory, większy poziom produkcji całkowicie ufosforylowanych TCR w obszarze c-SMAC nasila degradację receptorów. Natomiast wzmożona degradacja TCR obniża fosforylację tyrozyny w obrębie c-SMAC, w wyniku czego zmniejsza aktywność przekazywanych sygnałów. Ponieważ zaobserwowano nasiloną apoptozę komórek $\text{CD2AP}^{-/-}$, sugeruje się, iż długotrwałe osłabienie silnych sygnałów może chronić komórki przed śmiercią w wyniku nadstymulacji [41]. IS może zatem brać

udział we wzmacnianiu oraz podtrzymywaniu sygnałów aktywacji oraz w utrzymywaniu stanu równowagi pomiędzy przekazywaniem sygnału poprzez TCR a jego degradacją [15, 28].

Ponadto, c-SMAC mogą uczestniczyć w transdukcji sygnałów TCR. Mimo iż fosforylacja tyrozyny zachodzi głównie w obszarze peryferyjnym synapsy oraz większość cząsteczek sygnałowych nie ulega translokacji do c-SMAC, niektóre cząsteczki jak PKC- θ czy IKK (*I κ B kinase*) koncentrowane są w c-SMAC [69]. Tak więc, c-SMAC mogą pośredniczyć w transdukcji późnych sygnałów, np. indukcji aktywacji NF- κ B, produkcji cytokin i/lub chemokin, jak również proliferacji limfocytów T. Alternatywnie, c-SMAC mogą brać udział w przekazywaniu sygnałów innych niż sygnały TCR, na przykład sygnały wzrostu bądź kostymulacji [57].

Kolejną możliwą funkcją IS jest rola w wyznaczaniu kierunku wydzielania cytokin i chemokin [15] oraz w ekspresji ich receptorów [46]. Zaobserwowano, iż centrosomy ulegały reorientacji do powierzchni złącza komórki efektorowej (CTL) z komórką docelową, polaryzacja sekrecji zachodziła także po kilkugodzinnym kontakcie limfocytów T CD4⁺ z limfocytami B. Struktura p-SMAC tworząca stabilny pierścień adhezyjny, otaczający c-SMAC, może służyć jako mocna kotwica dla mikrotubul oraz zapewniać rotację centrosomów w kierunku synapsy [65]. Podczas kontaktu CTL z komórką docelową MTOC limfocytów cytotoksycznych ulega polaryzacji w kierunku komórki docelowej, a ziarnistości wędrują wzdłuż mikrotubul w kierunku bieguna minus do MTOC [64]. Wewnątrzkomórkowe ziarnistości zawierające cytokiny, tj. IFN- γ i TNF- α migrują w kierunku c-SMAC i są wydzielane na styku limfocytów T z APC, regulując odpowiedź komórkową limfocytów Th1/Th2. Taki system sekrecji rozproszonych i rozpuszczalnych mediatorów może zapewnić sprawną komunikację pomiędzy limfocytami T a APC [57]. Należy jednak nadmienić, iż dojrzała IS nie jest bezwzględnie konieczna do polaryzacji centrosomów lub aparatu sekrecyjnego zarówno u limfocytów Th, jak i CTL [65]. Wykazano także, iż w momencie, gdy receptory chemokinowe limfocytów T ulegały akumulacji w rejonie IS podczas kontaktu limfocytów T z APC, limfocyty T stawały się niewrażliwe na gradient chemokinowy, tworzyły bardziej stabilne połączenia oraz odpowiadały nasiloną proliferacją i wytwarzaniem cytokin [46].

c-SMAC mogą również funkcjonować jako miejsca dla „sygnałów stopu” [64] w celu utrzymywania przez długi czas kontaktu limfocytów T z APC. Sygnały te są określone poprzez kooperację cząsteczek adhezyjnych oraz cytoszkieletu aktynowego z TCR [54]. „Sygnały stopu” są potrzebne również z tego powodu, że kontakt limfocyty T z APC, nie mając ligandu agonistycznego, jest stosunkowo krótki i trwa około 1 min w warunkach *in vitro*. „Sygnały stopu” mogą powstawać podczas wiązania TCR do pMHC oraz muszą współzawodniczyć z gradientem chemokinowym, który w przeciwnym wypadku spowoduje, iż limfocyty T ulegną chemotaksji [34]. Mimo iż poszczególne „affinity” TCR są niskie, c-SMAC poprzez akumulację TCR wykazują większą siłę wiązania z pMHC na APC. Wytwarzanie sygnałów aktywacji ma miejsce w peryferyjnych MC, a ciągła akumulacja TCR-pMHC może powodować utrzymywanie bezpośrednich interakcji. Zmniejszone wytwarzanie

peryferyjnych MC w wyniku braku antygeny, doprowadza w konsekwencji do spadku liczby c-SMAC, osłabiając interakcje limfocytów T z APC oraz wygaszając „sygnały stopu” [57].

7. ZRÓŻNICOWANIE IS

Podczas interakcji limfocytów T z APC dochodzi do reorganizacji powierzchni komórki, dotyczącej przede wszystkim rozmieszczenia receptorów oraz stanu ich agregacji, a także montowania kompleksu sygnałowego. Opierając się na analizach IS w żywych i martwych komórkach przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej, zidentyfikowano pięć wariantów IS, różniących się pod względem topograficznym i molekularnym, poczynając od struktur wysoce uporządkowanych i skupionych (stabilne połączenia), poprzez struktury częściowo uporządkowane, kończąc natomiast na strukturach rozproszonych (ruchome połączenia) [21, 22] (ryc. 4).

7.1. Stabilna (monocentryczna) IS

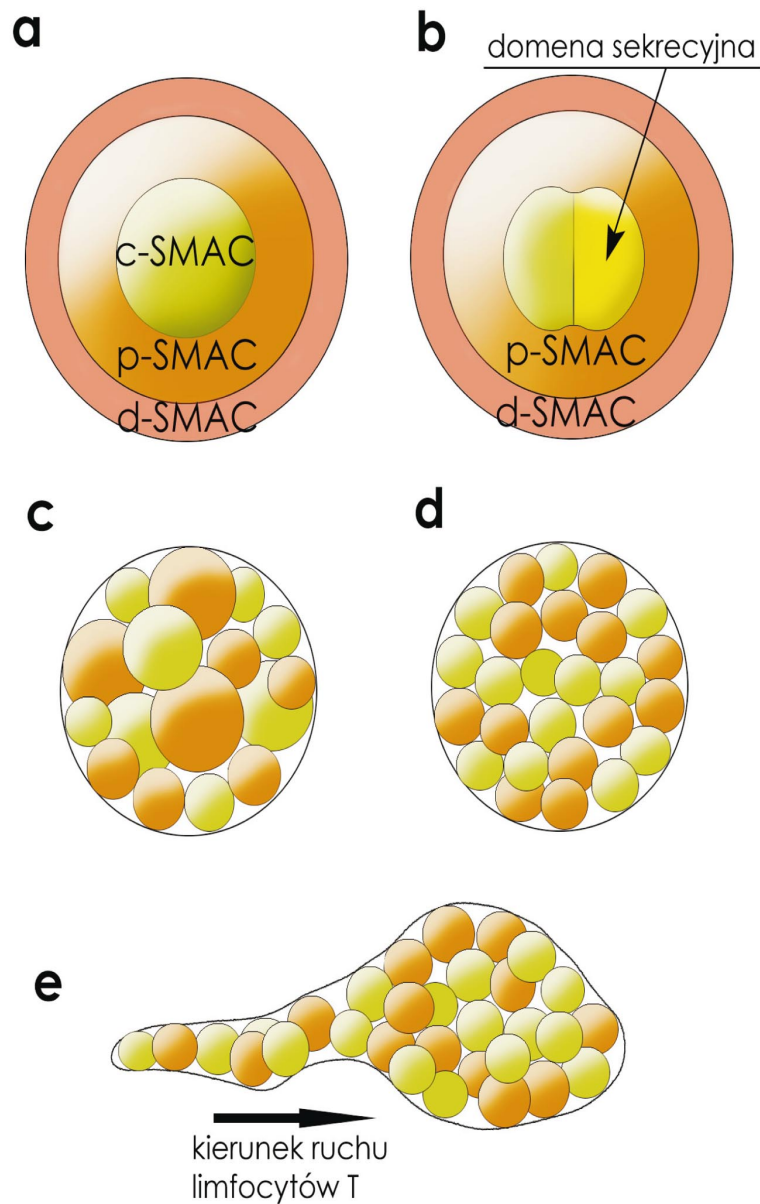
Powstanie stabilnej (dojrzałej) IS wymaga polaryzacji limfocytów T oraz uporządkowania powierzchniowych receptorów oraz cząsteczek sygnałowych w procesie zwanym „segregacją”. Rozwój IS obejmuje pięć etapów: (1) komórkowe skanowanie, kontakt komórek, adhezja; (2) wczesne montowanie IS (proces ten, jak również rola cząsteczek kostymulujących i cytoszkieletu w formowaniu IS, patrz pk. 3 i 4); (3) dojrzewanie i segregacja receptorów (formowanie c-, p-, d-SMAC); (4) internalizacja TCR z cytoplazmatycznymi pęcherzykami; (5) rozpad synapsy w wyniku oddzielenia się limfocytów T od APC [21, 22, 30].

Warto dodać, iż przedstawione powyżej fazy powstawania stabilnej IS występują także w przypadku formowania innych struktur synaptycznych, jakkolwiek różnice mogą dotyczyć stopnia skupiania się TCR oraz rodzaju receptorów werbowanych do obszaru synapsy.

7.2. Wydzielnicza (sekrecyjna) IS

Przykładem w pełni uporządkowanej, stabilnej IS jest efektorowa (wydzielnicza) synapsa, formowana przez cytotoksyczne limfocyty T (CTL), pomocnicze limfocyty T (Th) oraz komórki NK na styku z odpowiednimi komórkami docelowymi [6]. Wykazano, iż związanie zaledwie dziesięciu kompleksów pMHC obecnych na APC przez limfocyty T CD8⁺, doprowadza do powstawania c-SMAC, zaś związanie trzech kompleksów pMHC indukuje CTL do zabijania komórek docelowych. Wykazano także, iż formowanie c-SMAC nie jest konieczne do zabijania komórek docelowych przez CTL CD8⁺ [52].

Powstawanie wydzielniczej IS obejmuje podobne etapy jak w przypadku montowania stabilnej IS. Centralny obszar styku CTL z komórkami docelowymi, zwany obszarem podobnym do c-SMAC, zawiera CD8, LCK, PKC- θ , LAT i AKT,



RYCINA 4. Różnorodność molekularnych form IS (widok z góry): (a) monocentryczna IS (stabilna IS) ma stabilne złącze adhezyjne oraz jest w pełni uporządkowaną strukturą, gdzie można wyróżnić c-, p-, oraz d-SMAC, w wyniku czego zachodzi uczulenie („*priming*”) limfocytów T oraz trwałe przekazywanie sygnałów [22, 7, 30, 14]; (b) wydzielnicza IS, mająca domenę sekrecyjną, w miejscu której dochodzi do egzocytozy cytokin i/lub perforyn i granzymów; (c) multicentryczna IS (częściowo uporządkowana IS) nie mająca wyraźnie wyodrębnionych obszarów c- i p-SMAC; (d) nieuporządkowana IS wzbogacona jest w TCR, cząsteczki kostymulujące i sygnałowe, bez segregacji p- i c-SMAC; (e) dynamiczna IS jest strukturą asymetryczną, powstającą na styku migrujących limfocytów T z APC (dalsze objaśnienia w tekście; adaptacja własna wg [21, 22])

podczas gdy talina, LFA-1, CD2 i CD11a zlokalizowane są w otaczającym go peryferyjnym obszarze, podobnym do p-SMAC [21, 62]. Do regionu c-SMAC wzbogaconego w TCR przylega domena wydzielnicza [15], zawierająca centrum organizacji mikrotubul (MTOC) i spolimeryzowaną tubulinę wspomagającą egzo-cytozę zawartości pęcherzyków w kierunku komórki docelowej [62]. Ziarnistości w efektorowych CTL zawierają m.in. granzymy, perforinę, proteoglikany i enzymy lizosomalne [6, 21].

Z kolei w aktywowanych pomocniczych limfocytach T ($CD4^+Th$) domena wydzielnicza nie występuje w pierścieniu zawierającym cząsteczki adhezyjne [63], w komórkach tych bowiem dochodzi do gwałtownej polaryzacji pęcherzyków zawierających cytokiny, np. IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ , w kierunku powierzchni kontaktowej z limfocytami B [22]. Region p-SMAC, zawierający cząsteczki adhezyjne LFA-1 i talinę, stabilizuje wiązanie komórka-komórka oraz redukuje „wyciekanie” uwalnianych ziarnistości doprowadzając do jak największego skoncentrowania zawartości pęcherzyków wydzielniczych [21, 22].

7.3. Częściowo uporządkowana (multicentryczna) IS

Limfocyty T tworzą zróżnicowane struktury z APC zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* oraz ulegają aktywacji w wyniku sumowania się sygnałów na powierzchni APC [17]. Multicentryczna IS składa się z częściowo uporządkowanych cząsteczek TCR, LFA-1 i/lub platform sygnałowych, nie obserwuje się natomiast wyraźnego wyodrębnienia regionów c-SMAC i p-SMAC. Proces ten zachodzi podczas agregacji TCR i CD3 w niejednorodne skupienia o średnicy powyżej 1 μm , co prowadzi do utworzenia synaps „niekompletnie dojrzałych” [21, 22, 65].

Multicentryczne IS, tworzone przede wszystkim przez tymocyty podczas selekcji negatywnej, pozostają małe, złożone z dynamicznie poruszających się skupień TCR i kinaz tyrozynowych Lck w obrębie styku z komórkami nabłonkowymi grasicy [55]. Brak powstawania c-SMAC zaobserwowano także w przypadku mysich niedojrzałych tymocytów $CD4^+ CD8^+$, aktywowanych specyficznymi kompleksami pMHC znajdujących się w płaskiej dwuwarstwie lipidowej. Wykazano, iż TCR/CD3 nie akumulują się w centralnym obszarze synapsy, lecz formują małe skupienia rozprzerstrzenione na całej powierzchni styku limfocytów T z APC lub są usuwane z centralnego obszaru synapsy [4]. Te małe, ruchome skupienia indukują przekazywanie sygnałów poprzez TCR oraz fosforylację tyrozyn w cząsteczkach sygnałowych [21]. Z kolei w przypadku dojrzałych limfocytów T oddziałujących z DC, formowanie częściowo uporządkowanej IS doprowadza do przekazywania sygnału poprzez TCR w wyniku rekrutacji PKC- θ i fosforylacji tyrozyny oraz aktywowania końcowych procesów, włączając napływ wapnia do komórki, aktywację kinaz ERK i czynnika NFAT oraz sekrecję IFN- γ [3].

7.4. Nieuporządkowana IS

TCR i cząsteczki sygnałowe w synapsie nieuporządkowanej (ang. *non-segregated IS*) ulegają co prawda wzbogaceniu na styku limfocytów T i APC, ale nie tworzą skupisk. Revy i wsp. [53] wykazali, iż podczas braku antygeny lub cząsteczek MHC, dochodzi do formowania synapsy między limfocytami T i APC, co doprowadza do lokalnego wzrostu fosforylacji tyrozyny, niskiej odpowiedzi Ca^{2+} oraz słabej proliferacji limfocytów T. Z kolei Lee i wsp. [42] zaobserwowali, iż nieuporządkowana IS może powstawać także wówczas, gdy silny sygnał aktywacji zostaje wytworzony przed segregacją IS na obszar c-SMAC i p-SMAC, gdyż płaszczyzna interakcji między komórkami jest rozproszona. Na przykład, mimo iż cząsteczki TCR i LFA-1 biorą udział w tworzeniu połączeń na styku z komórkami APC i mimo tego, iż połączenia te doprowadzają do silnej fosforylacji ZAP70 i LCK, nie dochodzi do tworzenia skupień TCR oraz segregacji TCR i LFA1.

Nieuporządkowane połączenie obserwowane jest także podczas formowania sekrecyjnej IS pomiędzy CTL a komórką docelową w obecności niskiej dawki antygeny, mimo iż osiągnięta zostaje egzocytoza pęcherzyków i zabijanie komórek docelowych. Także w przypadku spoczynkowych i aktywowanych limfocytów T stabilnie oddziałujących z DC, IS często nie ulega segregacji [21]. Jednakże nieuporządkowana IS bierze udział we wczesnym przekazywaniu sygnałów poprzez TCR, np. w fosforylacji wczesnych białek sygnałowych lub efektorowych mechanizmach limfocytów T, tj. egzocytozie enzymów litycznych [22].

7.5. Dynamiczna IS

Migrujące komórki T tworzą przejściowe wiązania z każdą napotkaną APC. Jeżeli początkowe oddziaływanie tych komórek nie doprowadzi do zwiększenia siły ich adhezji, to utrzymywany jest stan migracji limfocytów T, doprowadzający do powstawania dynamicznej płaszczyzny kontaktowej między komórkami [21, 22]. Dynamiczna IS jest alternatywną strukturą wspomagającą rozpoznawanie specyficznych antygenów, angażowanie powierzchniowych receptorów, włączając TCR i cząsteczki kostymulujące, napływ Ca^{2+} , indukcję przekazywania sygnałów aktywacji do limfocytów T, transkrypcję genów i proliferację. Badania wykazały, iż dynamiczna IS przemieszcza się wraz z ruchem limfocytów T [67]. Jednakże struktura molekularna interakcji komórek efektorowych T z APC pozostaje w dalszym ciągu niedostatecznie poznana.

Dynamiczne kontakty między komórkami, przyczyniające się do wstępnej lub całkowitej aktywacji limfocytów T, obserwowano – między innymi – głównie w trójwymiarowych modelach tkankowych *in vitro* podczas negatywnej selekcji w hodowlach tymocytów [7] oraz *in vivo* podczas skanowania DC przez dziewicze limfocyty T CD8⁺ w węzłach chłonnych [22]. Dynamiczna IS, przynajmniej częściowo aktywująca limfocyty T, była obserwowana w przypadku różnorodnych APC, włączając Mφ, fibroblasty z ekspresją cząsteczek MHC klasy II, limfocyty B i DC [21].

8. PODSUMOWANIE

W ostatnich latach nastąpił gwałtowny rozwój badań nad rozpoznawaniem antygenów znajdujących się w ich „nośnikach” (tj. APC) przez komórki efektorowe (komórki NK oraz limfocyty T). Jest to związane z rozwojem licznych technik obrazowania, pozwalających na wykonywanie precyzyjnych badań nad komórkowymi i molekularnymi mechanizmami zachodzącymi w komórkach i tkankach. Ponieważ jednak IS jest wysoce dynamiczną i zorganizowaną strukturą, dalsze badania są niezbędne do wyjaśnienia mechanizmów warunkujących indukcję początkowych oraz trwałych sygnałów aktywacji poprzez analizę dodatkowych funkcji cząsteczek kostymulujących oraz regulacji cytoszkieletu. W przyszłości należy zbadać funkcje c-SMAC, szczególnie w kontekście roli, jaką pełni w endocytozie i degradacji TCR dla zrównoważenia procesu transdukcji sygnału oraz w ukierunkowanej sekrecji chemokin i cytokin. Połączenie zaawansowanych technik badawczych powinno zaowocować wyjaśnieniem molekularnych mechanizmów leżących u podstaw powstawania oraz określeniem fizjologicznej funkcji IS, co powinno przyczynić się do lepszego poznania i zrozumienia mechanizmów patogenezы i, w rezultacie, pomóc w opracowaniu skutecznych metod terapii i profilaktyki (nowe generacje szczepionek !) wielu chorób.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALLENSPACH EJ, CULLINAN P, TONG J, TANG Q, TESCUBA AG, CANNON JL, TAKAHASHI SM, MORGAN R, BURKHARDT JK, SPERLING AI. ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* 2001; **15**: 739–750.
- [2] BATISTA A, MILLÁN J, MITTELBRUNN M, SÁNCHEZ-MADRID F, ALONSO MA. Recruitment of transferrin receptor to immunological synapse in response to TCR engagement. *J Immunol* 2004; **172**: 6709–6714.
- [3] BLANCHARD N, DECRAENE M, YANG K, MIRO-MUR F, AMIGORENA S, HIVROZ C. Strong and durable TCR clustering at the T/dendritic cell immune synapse is not required for NFAT activation and IFN- γ production in human CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2004; **173**: 3062–3072.
- [4] BLANCHARD N, HIVROZ C. The immunological synapse: the more you look the less you know... *Biol Cell* 2002; **94**: 345–354.
- [5] BOISVERT J, EDMONDSON S, KRUMMEL MF. Immunological synapse formation licenses CD40-CD40L accumulations at T-APC contact sites. *J Immunol* 2004; **173**: 3647–3652.
- [6] BOSSI G, TRAMBAS C, BOOTH S, CLARK R, STINCHCOMBE J, GRIFFITHS GM. The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol Rev* 2002; **189**: 152–160.
- [7] BOUSSO P, BHAKTA NR, LEWIS RS, ROBEY E. Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 2002; **296**: 1876–1880.
- [8] BROMLEY SK, IABONI A, DAVIS SJ, WHITTY A, GREEN JM, SHAW AS, WEISS A, DUSTIN ML. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol* 2001; **2**: 1159–1166.
- [9] BUNNELL SC, HONG DI, KARDON JR, YAMAZAKI T, MCGLADE CJ, BARR VA, SAMELSON LE. T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J Cell Biol* 2002; **158**: 1263–1275.
- [10] CALABRESE B, HALPAIN S. Essential role for the PKC target MARCKS in maintaining dendritic spine morphology. *Neuron* 2005; **48**: 77–90.

- [11] CANNON JL, BURKHARDT JK. Differential roles for Wiskott-Aldrich Syndrome Protein in immune synapse formation and IL-2 production. *J Immunol* 2004; **173**: 1658–1662.
- [12] CARRASCO YR, FLEIRE J, CAMERON T, DUSTIN ML, BATISTA FD. LFA-1/ICAM-1 interaction lowers the threshold of B cell activation by facilitating B cell adhesion and synapse formation. *Immunity* 2004; **20**: 589–599.
- [13] CEMERSKI S, SHAW A. Immune synapses in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 2006; **18**: 298–304.
- [14] DAS V, NAL B, DUJEANCOURT A, THOULOZE MI, GALLI T, ROUX P, DAUTRY-VARSAT A, ALCOVER A. Activation-induced polarized immunological synapse; involvement of SNARE complexes. *Immunity* 2004; **20**: 577–588.
- [15] DAVIS MD, DUSTIN ML. What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol* 2004; **25**: 323–327.
- [16] DELON J, KAIBUCHI K, GERMAIN RN. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* 2001; **15**: 691–701.
- [17] DEPOIL D, ZARU R, GUIRAUD M, CHAUVEAU A, HARRIAGUE J, BISMUTH G, UTZNY C, MÜLLER S, VALITUTTI S. Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization. *Immunity* 2005; **22**: 185–194.
- [18] DUSTIN ML. Membrane domains and the immunological synapse: keeping T cells resting and ready. *J Clin Invest* 2002; **109**: 155–160.
- [19] ESPAGNOLLE N, DEPOLI D, ZARU R, DEMEUR C, CHAMPAGNE E, GUIRAUD M, VALITUTTI S. CD2 and TCR synergize for the activation of phospholipase C γ /calcium pathway at the immunological synapse. *Int Immunol* 2007; **19**: 239–248.
- [20] FAROUDI M, UTZNY C, SALIO M, CERUNDOLO V, GUIRAUD M, MÜLLER S, VALITUTTI S. Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 14145–14150.
- [21] FRIEDL P, DEN BOER AT, GUNZER M. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**: 532–545.
- [22] FRIEDL P, STORIM J. Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse. *Trends Cell Biol* 2004; **14**: 557–567.
- [23] GIMFERRER I, IBANEZ A, FARNOS M, SARRIAS MR, FENUTRIA R, ROSELLO S, ZIMMERMANN P, DAVID G, VIVES J, SERRA-PAGES C, LOZANO F. The lymphocyte receptor CD6 interacts with syntenin-1, a scaffolding protein containing PDZ domains. *J Immunol* 2005; **175**: 1406–1414.
- [24] GOMEZ TS, KUMAR K, MEDEIROS RB, SHIMIZU Y, LEIBSON PJ, BILLADEAU DD. Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse. *Immunity* 2007; **26**: 177–190.
- [25] GUNZER M, SCHÄFER A, BORGMANN S, GRABBE S, ZÄNKER KS, BRÖCKER EB, KÄMPGEN E, FRIEDL P. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* 2000; **13**: 323–332.
- [26] HAN J, SHUI J-W, ZHANG X, ZHENG B, HAN S, TAN T-H. HIP-55 is important for T-cell proliferation, cytokine production, and immune responses. *Molec Cell Biol* 2005; **25**: 6869–6878.
- [27] HOMMEL M, KYEWSKI B. Dynamic changes during the immune response in T cell-antigen-presenting cell clusters isolated from lymph nodes. *J Exp Med* 2003; **197**: 269–280.
- [28] HUPPA JB, DAVIS MM. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature Rev Immunol* 2003; **3**: 973–983.
- [29] INGULLI E, MONDINO A, KHORTUS A, JENKINS MK. *In vivo* detection of dendritic cell antigen presentation to CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1997; **185**: 2133–2141.
- [30] JACOBELLI J, ANDRES PG, BOISVERT J, KRUMMEL MF. New views of the immunological synapse: variations in assembly and function. *Curr Opin Immunol* 2004; **16**: 345–352.
- [31] KANE LP, MOLLENAUER MN, WEISS A. A proline-rich motif in the C terminus of Akt contributes to its localization in the immunological synapse. *J Immunol* 2004; **172**: 5441–5449.
- [32] KIEFER F, VOGEL WF, ARNOLD R. Signal transduction and co-stimulatory pathways. *Transpl Immunol* 2002; **9**: 69–82.
- [33] KOSMACZEWSKA A, FRYDECKA I, CISZAK L, BOĆKO D. Struktura i biologia kompleksu receptora limfocytów T (TCR/CD3). *Post Biol Kom* 2001; **28**: 163–182.
- [34] KRUMMEL MF, DAVIS MM. Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr Opin Immunol* 2002; **14**: 66–74.

- [35] KRUMMEL MF, SJAASTAD MD, WÜLFING C, DAVIS MM. Differential clustering of CD4 and CD3 ζ during T cell recognition. *Science* 2000; **289**: 1349–1352.
- [36] KUSZTAL M, JEZIOR D, WEYDE W, KRAJEWSKA M, KLINGER M. Odpowiedź układu immunologicznego na alop przeszczep nerki. Część I. Rola antygenów zgodności tkankowej, komórek prezentujących antygen i limfocytów w rozpoznawaniu aloantygenu; dwusygnałowa aktywacja limfocytu T. *Post Hig Med Dosw* 2007; **61**: 13–20.
- [37] KWIATKOWSKA K, SOBOTA A. Mikrodomeny błony komórkowej miejscem zapoczątkowania szlaków sygnałowych przez immunoreceptory. *Kosmos* 2004; **263**: 113–122.
- [38] LABNO CM, LEWIS CM, YOU D, LEUNG DW, TAKESONO A, KAMBEROS N, SETH A, FINKELSTEIN LD, ROSEN MK, SCHWARTZBERG PL, BURKHARDT JK. Itk functions to control actin polymerization at the immune synapse through localized activation of Cdc42 and WASP. *Curr Biol* 2003; **13**: 1619–1624.
- [39] LE BRAS S, FOUCAULT I, FOUSSAT A, BRIGNONE C, ACUTO O, DECKERT M. Recruitment of the actin-binding protein HIP-55 to the immunological synapse regulates T cell receptor signaling and endocytosis. *J Biol Chem* 2004; **279**: 15550–15560.
- [40] LEE H-W, PARK S-J, CHOI BK, KIM HH, NAM K-O, KWON BS. 4-1BB promotes the survival of CD8⁺ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-x_L and Bfl-1. *J Immunol* 2002; **169**: 4882–4888.
- [41] LEE K-H, DINNER AR, TU C, CAMPI G, RAYCHAUDHURI S, VARMA R, SIMS TN, BURACK WR, WU H, WANG J, KANAGAWA O, MARKIEWICZ M, ALLEN PM, DUSTIN ML, CHAKRABORTY AK, SHAW AS. The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* 2003; **302**: 1218–1222.
- [42] LEE KH, HOLDORF AD, DUSTIN ML, CHAN AC, ALLEN PM, SHAW AS. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 2002; **295**: 1539–1542.
- [43] LUDFORD-MENTING MJ, OLIARO J, SACIRBEGOVIC F, CHEAH ET, PEDERSEN N, THOMAS SJ, PASAM A, IAZZOLINO R, DOW LE, WATERHOUSE NJ, MURPHY A, ELLIS S, SMYTH MJ, KER-SHAW MH, DARCY PK, HUMBERT PO, RUSSELL SM. A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity* 2005; **22**: 737–748.
- [44] MICHEL F, ATTAL-BONNEFOY G, MANGINO G, MISE-OMATA S, ACUTO O. CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities. *Immunity* 2001; **15**: 935–945.
- [45] MILLER A, JĘDRZEJCZAK WW. Komórki dendrytyczne w immunoterapii. *Post Biol Kom* 2002; **28**: 51–68.
- [46] MOLON B, GIORGIA G, BETTELLA M, GÓMEZ-MOUTÓN C, LANZAVECCHIA A, MARTINEZ-A C, MAÑES S, VIOLA A. T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 2005; **6**: 465–471.
- [47] MONKS CR, FREIBERG BA, KUPFER H, SCIACKY N, KUPFER A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 1998; **395**: 82–86.
- [48] PACHECO R, MARTINEZ-NAVIO JM, LEJEUNE M, CLIMENT N, OLIVIA H, GATELL JM, GALLART Y, MALLOL J, LLUIS C, FRANCO R. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 9583–9588.
- [49] PENTCHEVA-HOANG T, EGEN JG, WOJNOONSKI K, ALLISON JP. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 2004; **21**: 401–413.
- [50] PHEE H, ABRAHAM RT, WEISS A. Dynamic recruitment of PAK1 to the immunological synapse is mediated by PIX independently of SLP-76 and Vav1. *Nat Immunol* 2005; **6**: 608–617.
- [51] PRELL RA, EVANS DE, THALHOFER C, SHI T, FUNATAKE C, WEINBERG AD. OX40-mediated memory T cell generation is TNF receptor-associated factor 2 dependent. *J Immunol* 2003; **171**: 5997–6005.
- [52] PURBHOO MA, IRVINE DJ, HUPPA JB, DAVIS MM. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol* 2004; **5**: 524–530.
- [53] REVY P, SOSPEDRA M, BARBOUR B, TRAUTMANN A. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2001; **2**: 925–931.
- [54] REY M, SANCHEZ-MADRID F, VALENZUELA-FERNANDEZ A. The role of actomyosin and the microtubular network in both the immunological synapse and T cell activation. *Front Biosci* 2007; **12**: 437–447.
- [55] RICHIE LI, EBERT PJR, WU LC, KRUMMEL MF, OWEN JJT, DAVIS MM. Imaging synapse formation during thymocyte selection: inability of CD3 ζ to form a stable central accumulation during negative selection. *Immunity* 2002; **16**: 595–606.

- [56] ROSENMAN SJ, GANJI AA, TEDDER TF, GALLATIN WM. Syn-capping of human T lymphocyte adhesion/activation molecules and their redistribution during interaction with endothelial cells. *J Leukoc Biol* 1993; **53**: 1–10.
- [57] SAITO T, YOKOSUKA T. Immunological synapse and microclusters: the site for recognition and activation of T cells. *Curr Opin Immunol* 2006; **18**: 305–313.
- [58] SAKATA-SOGAWA K, TOKUNAGA M. Molecular imaging and analysis of microclusters responsible for initiating T cell receptor signaling. *Nippon Rinsho* 2007; **65**: 242–246.
- [59] SANCHEZ-LOCKHART M, MILLER J. Engagement of CD28 outside of the immunological synapse results in up-regulation of IL-2 mRNA stability but not IL-2 transcription. *J Immunol* 2006; **176**: 4778–4784.
- [60] SCHWARTZ JD, ZHANG X, NATHENSON SG, ALMO SC. Structural mechanisms of costimulation. *Nat Immunol* 2002; **3**: 427–434.
- [61] SECHI AS, WEHLAND J. Interplay between TCR signaling and actin cytoskeleton dynamics. *Trends Immunol* 2004; **25**: 257–265.
- [62] STINCHCOMBE JC, BOSSI G, BOOTH S, GRIFFITHS GM. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 2001; **15**: 751–761.
- [63] STINCHCOMBE JC, GRIFFITHS GM. The role of the secretory immunological synapse in killing by CD8⁺ CTL. *Semin Immunol* 2003; **15**: 301–305.
- [64] STINCHCOMBE JC, MAJOROVITS E, BOSSI G, FULLER S, GRIFFITHS GM. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 2006; **443**: 462–465.
- [65] TRAUTMANN A, VALITUTTI S. The diversity of immunological synapse. *Curr Opin Immunol* 2003; **15**: 249–254.
- [66] VAN VOORHIS WC, VALINSKY J, HOFFMAN E, LUBAN J, HAIR LS, STEINMAN RM. Relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T cell replication. *J Exp Med* 1983; **158**: 174–191.
- [67] WETZEL SA, MCKEITHAN TW, PARKER DC. Live-cell dynamics and the role of costimulation in immunological synapse formation. *J Immunol* 2002; **169**: 6092–6101.
- [68] WÜLFING C, SUMEN C, SJAASTAD MD, WU LC, DUSTIN ML, DAVIS MM. Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nat Immunol* 2002; **3**: 42–47.
- [69] YOKOSUKA T, SAKATA-SOGAWA K, KOBAYASHI W, HIROSHIMA M, HASHIMOTO-TANE A, TOKUNAGA M, DUSTIN ML, SATO T. Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap-70 and SLP-76. *Nat Immunol* 2005; **6**: 1253–1262.
- [70] ZAMBRICKI E, ZAL T, YACHI P, SHIGEOKA A, SPRENT J, GASCOIGNE N, MCKEY D. *In vivo* anergized T cells form altered immunological synapses *in vitro*. *Am J Transplant* 2006; **6**: 2572–2579.
- [71] ZIPFEL PA, BUNNELL SC, WITHEROW DS, GU JJ, CHISLOCK EM, RING C, PENDERGAST AM. Role for the Abi/wave protein complex in T cell receptor-mediated proliferation and cytoskeletal remodeling. *Curr Biol* 2006; **16**: 35–46.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 20.09.2007

Przyjęto: 22.10. 2007 r.

Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych,

Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW

ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

e-mail: lidiaszulc@gmail.com