

## RECONOCIMIENTO Y ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO T

Mauricio Rojas, Pablo J. Patiño  
Universidad de Antioquia

### Abreviaturas usadas en este capítulo

<b>BCR:</b>	Receptor de células B	<b>Grb2:</b>	Proteína 2 de unión del receptor del factor de crecimiento
<b>Ca<sup>+2</sup>i:</b>	Calcio intracelular	<b>GRO:</b>	Oncogen relacionado con el crecimiento
<b>CMH:</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad	<b>GTP:</b>	Guanosin trifosfato
<b>CPA:</b>	Células presentadoras de antígeno	<b>ICAM:</b>	Molécula de adhesión intercelular
<b>CTLA-4:</b>	Proteína asociada a CTL 4	<b>IL:</b>	Interleuquina
<b>CTL:</b>	Linfocitos T citotóxicos	<b>IL-2R:</b>	Receptor de Interleuquina 2
<b>DAG:</b>	Diacyl glicerol	<b>IP<sub>3</sub>:</b>	Inositol trifosfato
<b>ERK:</b>	Quinasas reguladas extracelularmente	<b>ITAM:</b>	Motivo de activación del inmunorreceptor vía tirosina
<b>FcR:</b>	Receptor para la fracción cristalizante de las inmunoglobulinas	<b>Itk:</b>	Quinasa de linfocitos T inducida por IL-2
<b>Fyn:</b>	Proteína relacionada con la proteína YES felina	<b>IP-10:</b>	Proteína de 10 kDa inducida por interferón
<b>GAP:</b>	Proteína activadora de GTPasa	<b>JAK:</b>	Quinasas de la familia Janus
<b>G-CSF:</b>	Factor estimulador de colonias de granulocitos	<b>JNK:</b>	Quinasa C-Jun N-Terminal
<b>GM-CSF:</b>	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos	<b>kDa:</b>	Kilodalton
<b>GDI:</b>	Inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina quinasa SRC carboxilo-terminal	<b>LAT:</b>	Ligador para la activación de linfocitos T
<b>GDP:</b>	Guanosin bifosfato	<b>Lck:</b>	Quinasa linfocitaria
<b>GEF:</b>	Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina	<b>LFA:</b>	Antígeno asociado a la función leucocitaria
		<b>LT:</b>	Linfocito T
		<b>MAPK:</b>	Quinasas activadas por mitógenos

**MAPKK:** Quinasa de proteínas quinasas activadas por mitógenos

**MCP:** Proteína quimioatrayente del macrófago

**M-CSF:** Factor estimulador de colonias de monocitos

**MEK:** Proteína quinasa activada por mitógenos

**MEKK:** Quinasa de MEK

**MIP:** Proteína inhibitoria del macrófago

**NF-AT:** Factor nuclear de células T activadas

**NF-κB:** Factor nuclear asociado a la cadena kappa de células B

**NK:** Asesinas naturales

**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E<sub>2</sub>

**PHA:** Fito-hematoaglutinina

**PKA:** Proteína quinasa A

**PKC:** Proteína quinasa C

**PLC:** Fosfolipasa C

**PI:** Fosfatidilinositol

**PI3K:** Fosfoinositol 3 quinasa

**PIP<sub>2</sub>:** Fosfoinositol bifosfato

**P120GAP:** Proteína activadora de GTPasa 120

**Ral-GDS:** Factor intercambiador de nucleótidos de la GTPasa Ral

**Ras:** Oncogen asociado con sarcoma en ratas

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

**SH2:** Dominio 2 de homología con Src

**SH3:** Dominio 3 de homología con Src

**SHC:** Proteína colágena y homóloga con Src

**SMAC:** Agregado supramolecular de activación

**Sos:** Homóloga la son of sevenless de la *Drosophila melanogaster*

**SRE:** Sistema reticulo endotelial

**STAT:** Transmisores de señal de activación y activadores de la transcripción

**Syk:** Tirosina quinasa esplénica

**TCF:** Factor de transcripción

**TCR:** Receptor de células T

**TLR:** Receptores tipo Toll

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**TNFR:** Receptor de factor de necrosis tumoral

**VLA:** Proteína de activación muy tardía

**XSCID:** Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada asociada al cromosoma X

**ZAP-70:** Proteína de 70 kDa asociada a z

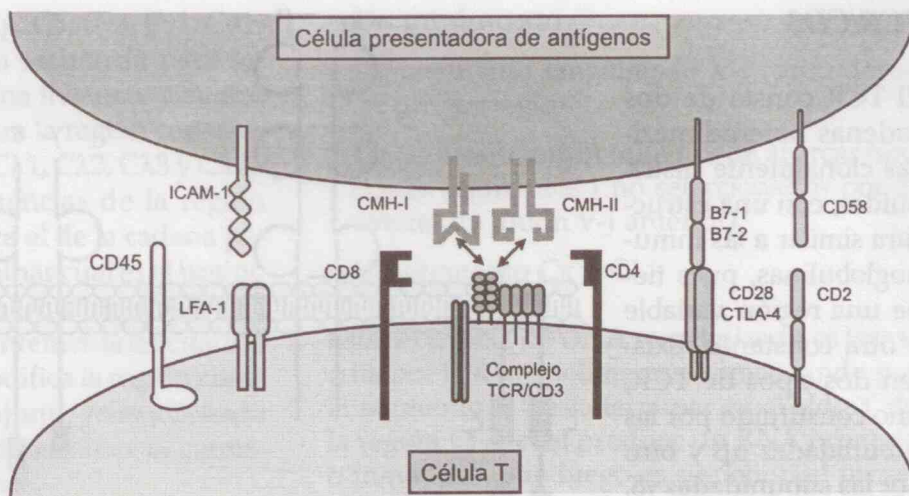
## INTRODUCCIÓN

Los LT cumplen un papel fundamental en la respuesta inmune, tradicionalmente designada como respuesta inmune adquirida o específica. Las células T "aprenden" a identificar los antígenos mediante el reconocimiento de pequeños fragmentos proteicos derivados de los antígenos que son mostrados por las denominadas CPA. A diferencia de las células B, las cuales reconocen epítopes tridimensionales, es decir estructuras como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, sacáridos, entre otros, que se encuentran en su forma nativa, las células T sólo reconocen determinantes lineales de péptidos definidos, es decir únicamente identifican la estructura primaria de fragmentos proteicos. Para estimular a las células T, los péptidos unidos al CMH deben formar estructuras estables, de tal suerte que las células T puedan interactuar el tiempo suficiente para poder ser activadas. El receptor mediante el cual los LT reconocen al CMH con el péptido antigénico es designado como TCR, el cual se encuentra unido al complejo proteico conocido como CD3 que se encarga de transmitir las señales de activación al interior de las células.

El hecho que las células T reconozcan únicamente antígenos proteicos presentados por las CPA tiene repercusiones importantes para su capacidad de respuesta. En general, las células T nunca van a actuar sobre antígenos circulantes y van a tener restricciones en sus respuestas debido a que únicamente van a poder mediar respuestas reguladoras y efectoras

mediante el contacto célula a célula. Por ejemplo, cuando las células T CD4<sup>+</sup> reciben señales para ser activadas, mediante el reconocimiento de péptidos antigénicos en el contexto del CMH clase II por parte del TCR, también envían señales a la CPA, que bien puede ser un linfocito B, una célula dendrítica o un macrófago; estas señales redundan en la supervivencia de la CPA, en su diferenciación y/o maduración. De otro lado, cuando las células T CD8<sup>+</sup> se activan completamente y se diferencian en LT citotóxicos reconocen los péptidos antigénicos expresados en el contexto del CMH clase I por cualquier célula con núcleo.

Si bien es claro que la activación de las células T es un evento que compromete únicamente la interacción entre células, los eventos posteriores a su activación, como son la diferenciación y especialización en células ayudadoras o citotóxicas, hacen parte del complejo contexto de la regulación de la respuesta inmune. En el presente capítulo se hará énfasis en los elementos celulares de la señalización que se requieren para que la célula T active los mecanismos que regulan su ciclo celular y que llevan a la producción de IL-2, una citoquina conocida como el factor de crecimiento de las células T y por lo tanto fundamental para aumentar el número de células que reconocen específicamente un antígeno dado.



**Figura 1. Activación de las células T.** La activación de las células T ocurre como consecuencia del reconocimiento que hace el TCR de un péptido que se encuentra unido al CMH de la CPA. Pero además de este reconocimiento se requiere de la presencia de varias moléculas adicionales que por un lado permiten hacer más estable la interacción y por el otro transmiten señales al interior de las células participantes de esta respuesta, de forma que se logre una adecuada activación tanto de la célula T como de la CPA.

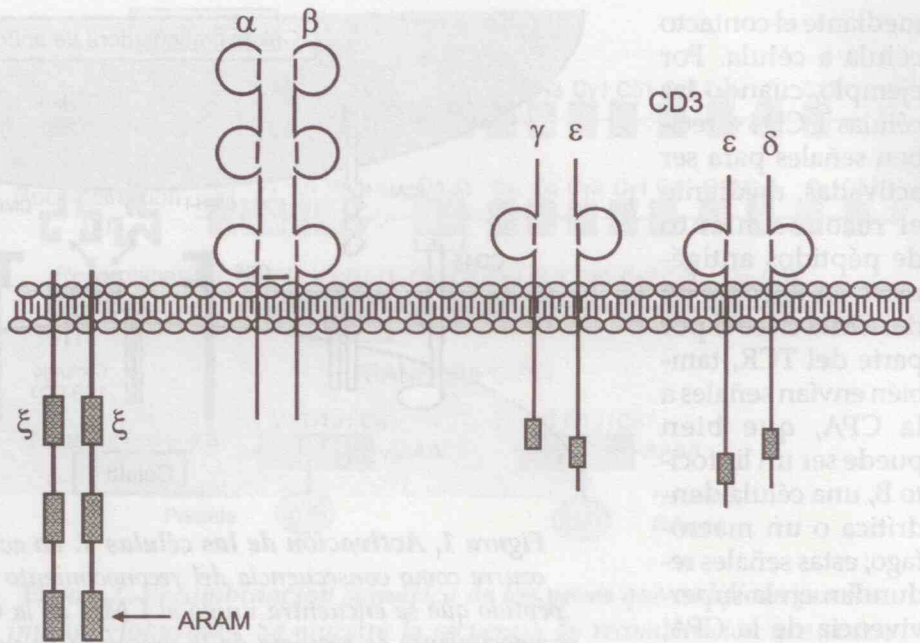
## MOLÉCULAS DE SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS T Y SUS LIGANDOS

La activación de las células T es el evento central para desencadenar la respuesta inmune adaptativa y esta activación depende esencialmente de la interacción entre las moléculas de la membrana de estas células con ligandos específicos en la membrana de la CPA (Figura 1). En general, las proteínas de la célula T se unen a los ligandos expresados en la superficie de la célula presentadora con baja afinidad, en el rango micromolar; esto es necesario, porque afinidades mayores harían difícil que se puedan separar las membranas sin alterar sus estructuras. A continuación, se describen las moléculas más importantes para la interacción y activación de las células T.

## TCR/CD3

El TCR consta de dos cadenas heterodiméricas clonalmente distribuidas, con una estructura similar a las inmunoglobulinas, pues tiene una región variable y otra constante. Existen dos tipos de TCR, uno constituido por las subunidades  $\alpha\beta$  y otro por las subunidades  $\gamma\delta$ . Al igual que los anticuerpos, el dominio variable de estas cadenas se encuentran codificado en fragmentos de DNA que se reorganizan de formas distintas, lo que permite la generación de un repertorio de diferentes regiones variables muy grande, que está alrededor de  $10^{13}$  a  $10^{14}$  especies para el TCR  $\alpha\beta$ . Las regiones variables de las subunidades  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  reconocen los péptidos antigénicos que son presentados por el CMH. Los LT CD4<sup>+</sup> reconocen fragmentos entre 10 y 25 aminoácidos unidos al CMH-II, mientras que los LT CD8<sup>+</sup> reconocen fragmentos de 8 a 10 aminoácidos presentados por el CMH-I.

La señalización desencadenada por el reconocimiento que realiza el TCR es conducida por los polipéptidos que conforman el CD3 y los cuales se unen de forma no covalente al TCR. El CD3 está conformado por tres polipéptidos invariantes ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) y por dos subunidades homodiméricas ( $\zeta$ - $\zeta$ ) o heterodiméricas ( $\zeta$ - $\eta$ ) adicionales (Figura 2). En las etapas iniciales de la activación, las colas cito-



**Figura 2. Complejo TCR/CD3.** La molécula CD3 es un complejo de polipéptidos que es esencial para el proceso de señalización que se desencadena como consecuencia del reconocimiento del antígeno. La fosforilación de los dominios ITAM que poseen las colas citoplásmicas de las cadenas  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  (o  $\eta$ ), permite iniciar las señales intracelulares que terminan en la activación de las células T.

plásmicas de estos péptidos son fosforiladas por un grupo particular de enzimas conocidas como Src quinasas, lo cual desencadena la cascada de señales intracelulares que se discutirán más adelante.

## LFA-1

Esta integrina leucocitaria ( $\alpha_1\beta_2$ ) cumple tanto funciones de adhesión celular como de molécula coestimuladora. Su ligando es el ICAM, el cual se expresa en la CPA. Una característica notoria de esta integrina es que poco después de la activación, ella incrementa su afinidad por el ligando, lo cual es un factor importante para favorecer la interacción entre células T y CPA.

### CD4

Esta molécula se encuentra asociada con el TCR/CD3 en las células T ayudadoras CD4+. Durante la interacción entre células T y CPA, el CD4 une el CMH clase II, lo cual restringe la presentación antigénica. Durante la activación, la cola citoplasmática de esta molécula se une a la Src quinasa Lck, lo cual permite que esta última se ponga en contacto con las moléculas que dan inicio al proceso de señalización. La presencia de CD4 hace que el requerimiento de complejos CMH-péptido sea mucho menor para lograr una activación completa de la célula T.

### CD8

El CD8 es una molécula dimérica ( $\alpha\beta$  o  $\alpha\alpha$ ) que se une a las moléculas del CMH clase I, lo cual restringe la interacción de los LT a aquellas células que expresan este CMH. Al igual que CD4, el CD8 potencia la respuesta de los LT gracias a que acerca la quinasa Lck al complejo TCR/CD3.

### CD28

La molécula CD28 es el principal receptor coestimulador de los LT, el cual se localiza con el TCR en la parte central de la sinapsis entre LT y CPA. Se encuentra presente en la membrana de la mayoría (el 80%) de los LT que expresan TCR y CD3. Es una glicoproteína formada por dos cadenas iguales (homodímero), que están unidas entre sí por un puente disulfuro. Cada cadena tiene tres segmentos (extracelular, transmembranal y citoplásmico). En el segmento extracelular, cada cadena posee un puente disulfuro intracatenario y adopta una conformación similar a la de los dominios de las inmunoglobulinas. Los ligandos del CD28 (B7-1 ó CD80 y B7-2 ó CD86) también pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas

y son regulados positivamente durante la activación celular sobre la superficie de las CPA.

El CD28 desencadena vías de señalización adicionales a las puestas en marcha por el TCR/CD3, las cuales potencian, en gran medida, la activación de los LT. El uso de anticuerpos monoclonales anti-CD28 ha permitido demostrar que esta molécula está relacionada con la producción de IL-2. Por lo tanto, la interacción del CD28 con las moléculas B7, es necesaria para que se inicie una respuesta adecuada de los LT después del reconocimiento de los determinantes antigénicos por el TCR. El aumento en la producción de IL-2 y otras citoquinas por las células a las cuales se les estimula a través del CD28 sugiere que la interacción CD28-B7 aumenta la transcripción de varios genes, cuya expresión va a activar tanto la célula T como la CPA.

### CTLA-4 (CD152)

CTLA-4 es una molécula transmembranal homóloga a CD28 (poseen un 30% de homología) y al igual que el CD28, se une a las moléculas B7.1 y B7.2 en la CPA; sin embargo, esta molécula solo se expresa después que el LT ha sido activado. Mientras que CD28 tiene un solo dominio de unión a B7, cada dímero de CTLA-4 se une a dos moléculas bivalentes e independientes de B7, lo cual puede explicar el porque CTLA-4 tiene 50-100 veces mayor afinidad por su ligando. Además, CTLA-4 tiene un efecto regulador negativo sobre la activación de los LT.

### CD2

El CD2 es conocido como T11, LFA-2 o Leu 5. Su masa molecular varía entre 45 y 55 kDa dependiendo de su estado de glicosilación. Se expresa en todas los LT humanos, en timocitos, en la mayoría de las células NK y en algunas células de la médula ósea. La capacidad de esta

molécula de unirse a los glóbulos rojos de carnero se ha utilizado clásicamente para su purificación mediante la estrategia conocida como formación de rosetas E. Normalmente, el CD2 puede unirse a ligandos como el CD48 y el CD58. Esta interacción promueve la adhesión específica y no específica entre la célula T y la CPA. El bloqueo de esta interacción mediante anticuerpos monoclonales contra CD2, con CD2 soluble o con anticuerpos contra sus ligandos previene la activación de la célula T, la producción de IL-2, la proliferación y la citotoxicidad. La adhesión mediada por CD2 es un factor importante en la fisiología de la respuesta T pues es un elemento de reconocimiento mediante el cual la célula T establece que está frente a una CPA y permite otras interacciones sinápticas entre moléculas presentes en ambas células.

### CD45

El CD45 es una proteína transmembrana cuya porción citoplasmática tiene actividad fosfatasa. La capacidad para desfosforilar otras proteínas es importante para la activación de las células T, lo cual se discutirá más adelante. En el humano, se encuentran diferentes isoformas de CD45 que van desde 180 a 220 kDa, dependiendo del estado de activación de las células; hasta el momento, no se conoce cual es el ligando para esta molécula.

## RECONOCIMIENTO DE LA CÉLULA T Y EL INICIO DE LA ACTIVACIÓN

Durante la fase inicial de la interacción del LT, éste extiende proyecciones de pseudópodos para unirse a otra célula (fase de búsqueda) hasta que encuentra el ligando correcto y puede ser activada. Una vez ocurre este reconocimiento se forma una sinapsis, la cual se caracteriza por

tener una acumulación de TCR/CD3 en el centro rodeada por un anillo de la integrina LFA-1.

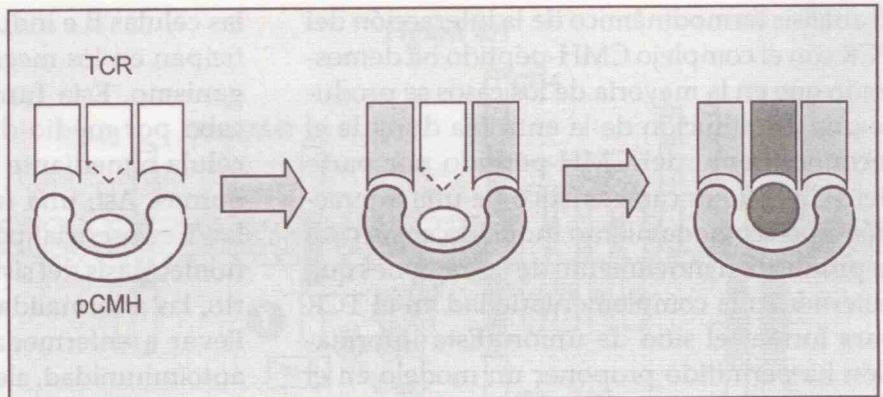
Se conoce que las células T tienen una gran variabilidad en la sensibilidad hacia el antígeno, pues la respuesta completa de una célula T se puede obtener con la interacción de solo un complejo CMH-péptido o se pueden necesitar hasta 400 complejos CMH-péptido. Sin embargo, existe una relación dosis respuesta en el proceso de activación, pues se ha demostrado que en la mayoría de las células T CD4+ un solo ligando puede inducir una leve activación del flujo de  $Ca^{2+}$ , mientras que la interacción con dos ligandos conduce a una elevación más sostenida de los niveles de  $Ca^{2+}$  y con 10 ligandos o más se produce una respuesta máxima. También se ha encontrado que una interacción de 10 ligandos induce la formación de la sinapsis inmunológica, lo cual sugiere que éste puede ser el umbral necesario para lograr una activación completa de la célula T.

La ausencia o el bloqueo del CD4 afecta de forma dramática la capacidad de las células T ayudadoras para ser activadas por un número bajo de ligandos. Cuando no hay CD4 se requieren entre 25 a 30 complejos CMH-péptido para lograr una activación similar a la obtenida con 10 complejos en presencia de CD4. Se propone que en ausencia de CD4, la activación de las células T depende de la dimerización de moléculas de TCR/CD3 que están interactuando con complejos CMH-péptido, por lo tanto se requiere de un número grande de estos complejos para que pueda haber la formación de dímeros durante la fase de búsqueda de la célula T.

Una vez se inicia la activación de la célula T, varias moléculas de membrana de esta célula, junto con los ligandos correspondientes en la célula presentadora, se ubican en regiones discretas de esta interacción, de forma tal que el

TCR/CD3, el CD28 y el CD4 o CD8 ocupan la región central mientras que la periferia está conformada por un anillo rico en LFA-1 y CD45; esta organización es conocida como sinapsis inmunológica. En la célula que está siendo reconocida, el CMH forma un centro opuesto al de la célula T y se constituye un anillo externo por moléculas ICAM-1. Simultáneamente a esta disposición de la membrana, en el interior de la célula también se presenta una organización caracterizada por la confluencia de Lck, PKC y agregados de actina inmediatamente por debajo del centro de la sinapsis.

Hasta hace poco se pensaba que el agrupamiento de las moléculas de membrana en la sinapsis inmunológica dependía de la difusión y atrapamiento de moléculas a medida que ocurría la unión con los ligandos respectivos; sin embargo, se ha demostrado que existe un mecanismo de transporte activo en la célula T, el cual depende de proteínas motoras de miosina, que se encargan de transportar TCR/CD3 y posiblemente otras moléculas hacia la sinapsis. En las células T ayudadoras, una interacción con la CPA puede mantenerse por 10 a 12 horas, pero solo se necesitan de dos a tres horas para alcanzar una activación irreversible. Esto se correlaciona con el mantenimiento de la sinapsis inmunológica y con los niveles altos de  $Ca^{2+}$ , lo que a su vez permite que los factores de transcripción se mantengan en el núcleo.



**Figura 3. Reconocimiento del péptido antigénico por el TCR.** Aunque no existe un modelo definitivo que explique como el TCR reconoce el epítipo presentado por el CMH, se ha propuesto un modelo según el cual, durante la presentación antigénica, ocurre una interacción inicial entre el TCR y las hélices  $\alpha$  del CMH, lo que permite una primera unión; esto es seguido por un plegamiento de los sitios que en el TCR interactúan con el antígeno, particularmente la región determinante de complementariedad 3 (CDR3), sobre el péptido unido al CMH. Si se establece una complementariedad adecuada se logra un estado estable final que permite dar inicio al proceso de señalización.

Los RNAm que codifican para citoquinas se detectan en los LT pocas horas después de iniciada la activación y en unas pocas horas más se inicia la liberación de vesículas secretorias en la región donde se está dando la interacción con la célula presentadora, lo cual permite la generación de señales que actúan tanto sobre la célula blanco como sobre la misma célula T ayudadora. De esta manera, se inicia la división celular en la célula T, lo que posiblemente destruye la sinapsis inmunológica. En las células T citotóxicas estas respuestas son mucho más cortas, con una elevación de  $Ca^{2+}$  que dura de 2 a 20 minutos, lo cual conduce a una rápida liberación del contenido de los gránulos que contienen agentes citotóxicos. De esta manera, puede haber lisis de células blanco en cinco minutos o menos después del reconocimiento, aunque en algunos casos ésta puede tomar algunas horas.

El análisis termodinámico de la interacción del TCR con el complejo CMH-péptido ha demostrado que en la mayoría de los casos se produce una disminución de la entropía durante el reconocimiento del CMH-péptido por parte del TCR. Esto es característico de una interacción tipo acomodamiento inducido, en la cual se produce un movimiento de las regiones que determinan la complementariedad en el TCR para formar el sitio de unión. Esta información ha permitido proponer un modelo en el cual la unión del TCR se da en dos etapas: primero, se establece un contacto del TCR con las hélices  $\alpha$  del CMH, lo cual es seguido por un plegamiento de los sitios del TCR que reconocen el antígeno sobre el péptido antigénico para lograr un estado estable final (Figura 3). De esta forma, la fase de búsqueda consiste de un contacto inicial entre TCR y CMH que permite la orientación del primero, de tal manera que rápidamente puede determinar si el péptido que ocupa la hendidura del CMH es el apropiado. Puesto que los sitios de reconocimiento del TCR pueden adquirir muchas conformaciones finales posibles, este modelo puede explicar la reactividad cruzada inherente de los TCR.

## QUINASAS Y FOSFATASAS, PARA ACTIVAR Y/O DESACTIVAR LAS CÉLULAS T

Tal vez el modelo más estudiado, aunque no del todo entendido, sobre la señalización intracelular y segundos mensajeros es el de la activación del LT. Los LT juegan un papel central en la respuesta inmune, pues son los responsables de poner en marcha la respuesta específica de tipo celular. Los LT pueden actuar como células efectoras directas (células citotóxicas, infiltrantes de tumores, reconocedoras de antígeno) o como células con capacidad reguladora sobre otros tipos de respuestas (producción de citoquinas, cooperación con

las células B e inducción de anergia) que participan en los mecanismos de defensa del organismo. Esta función reguladora se lleva a cabo por medio del contacto directo célula-célula o mediante la secreción de varias citoquinas. Así, una función apropiada de células T es esencial para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune. Por el contrario, las anomalías en su función pueden llevar a enfermedades inmunológicas, como autoinmunidad, alergias o inmunodeficiencias.

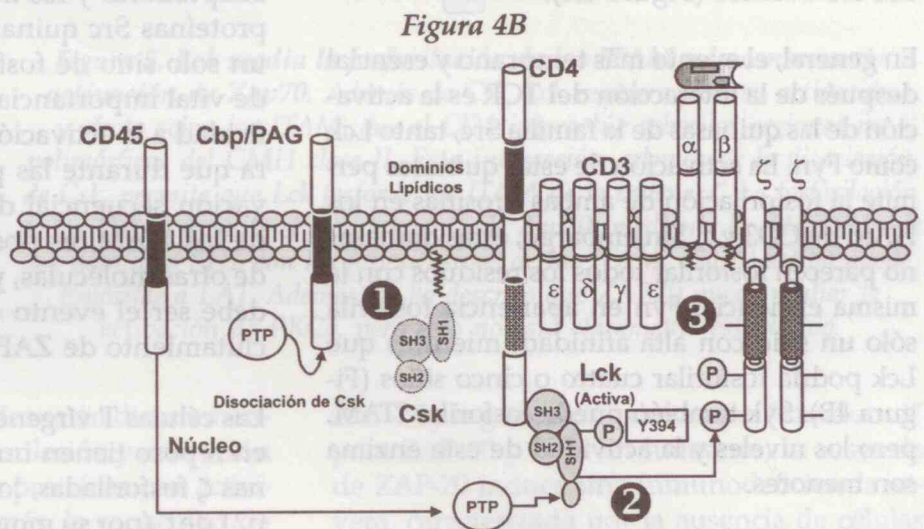
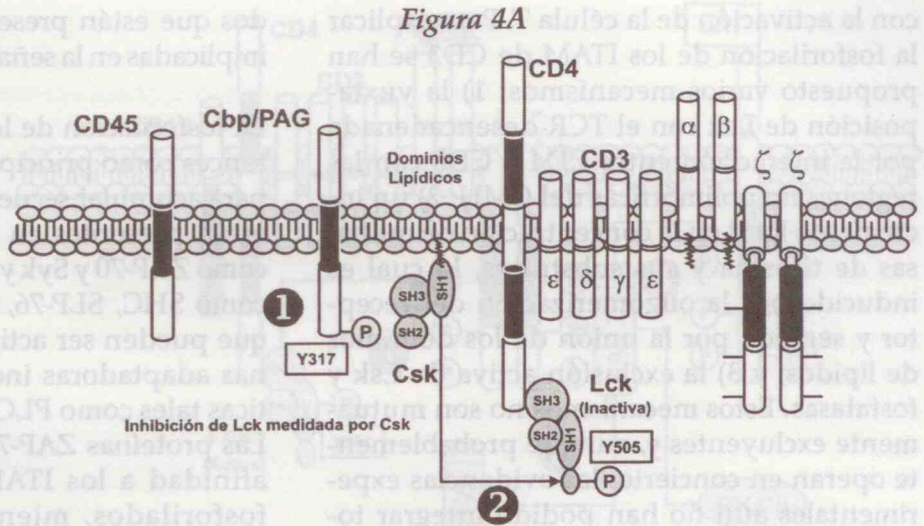
Aunque las condiciones de estimulación del LT pueden ser bastante particulares y tener diferentes efectos en su función, la activación celular de los segundos mensajeros es esencialmente un denominador común a los distintos tipos de células de un organismo. Para su activación, el LT requiere que otra célula, denominada CPA, le entregue la señal específica del antígeno y una segunda señal coestimuladora. Las células T que reconocen este antígeno en el contexto del CMH pueden empezar sus actividades metabólicas y proliferar para generar un "ejército" de células con capacidad efectora sobre el antígeno que reconocen, expresado en la membrana de alguna célula.

Existen sistemas que imitan la señal producida por la interacción TCR-CMH-péptido, los cuales han sido muy útiles para el desciframiento de las señales y vías bioquímicas que llevan a la activación de la célula T. Ejemplos de éstos son los anticuerpos agonistas que se unen al TCR o al CD3 o las lectinas que interactúan con las diferentes proteínas de membrana importantes para la activación celular. Las lectinas son glicoproteínas globulares, generalmente con una masa molecular pequeña que tienen la capacidad de unir residuos de azúcares presentes en las glicoproteínas de la membrana y así mimetizar la interacción entre las CPA y las células T.



El estímulo del TCR desencadena una serie de cambios bioquímicos que ocurren durante los primeros segundos después del reconocimiento antigénico. El evento más rápido es la fosforilación de proteínas en motivos conocidos como ITAM. Los ITAM son secuencias ordenadas de aminoácidos que están presentes en las colas citoplásmicas de varios receptores como el TCR, el BCR y los FcR. La secuencia consenso de los ITAM es YXXL/I(X<sub>6,8</sub>)YXXL/I, donde X indica cualquier aminoácido y como se puede ver cada uno de estos motivos posee dos sitios posibles de fosforilación. En el TCR/CD3 los ITAM se encuentran en las cadenas CD3γ, CD3δ, CD3ε y ζ.

No se conoce con exactitud el mecanismo por el cual la unión del TCR con el antígeno lleva a la fosforilación de los ITAM, pero la importancia de este evento es tal que el bloqueo de la actividad quinasa de tirosinas en este punto tiene buena parte de la cascada de eventos posteriores asociados



**Figura 4. Csk es apagada temporalmente durante la activación de las células T.** En las células T en reposo, la enzima Csk está presente en los dominios de lípidos mediante la fosforilación del residuo de tirosina Y317 en la molécula Cbp/PAG. La Lck se mantiene inactiva gracias a que Csk media la fosforilación sobre el sitio Y505 de Lck. Cbp es desfosforilado por una PTP que aún no se ha identificado. La desfosforilación de Cbp induce la disociación de Csk de los dominios de lípidos permitiendo la activación de Lck. El residuo Y505 es continuamente fosforilado y desfosforilado por un equilibrio entre Csk y PTPasas, probablemente a través de CD45. Cuando la isoforma de Lck desfosforilada en Y505 prevalece, disminuye su umbral de activación y es autofosforilada sobre el residuo Y394, permitiendo que esta cambie conformacionalmente y exponga el sitio con actividad quinasa que puede fosforilar los ITAM. Posteriormente, cuando cesa la señal inicial después de 2-5 minutos, Cbp/PAG es refosforilado en el residuo Y317 por Lck y/o Fyn teniendo como consecuencia el reclutamiento de Csk sobre los dominios de lípidos.

con la activación de la célula T. Para explicar la fosforilación de los ITAM de CD3 se han propuesto varios mecanismos: 1) la yuxtaposición de Lck con el TCR desencadenada por la interacción entre CD4 ó CD8 con las regiones no polimórficas del CMH; 2) un incremento local en la concentración de quinasas de tirosina y sus sustratos, lo cual es inducido por la oligomerización del receptor y seguido por la unión de los dominios de lípidos; y 3) la exclusión activa de Csk y fosfatasa. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes y, aunque probablemente operan en concierto, las evidencias experimentales aún no han podido integrar todos los eventos (Figura 4A).

En general, el evento más temprano y esencial después de la interacción del TCR es la activación de las quinasas de la familia Src, tanto Lck como Fyn. La activación de estas quinasas permite la fosforilación de ambas tirosinas en los ITAM de CD3 y  $\zeta$ . Sin embargo, estas quinasas no parecen fosforilar todos los residuos con la misma eficiencia. Fyn en apariencia fosforila sólo un sitio con alta afinidad, mientras que Lck podría fosforilar cuatro o cinco sitios (Figura 4B). Syk también puede fosforilar ITAM, pero los niveles y la actividad de esta enzima son menores.

La activación de las quinasas de tirosina por el TCR tiene varias consecuencias funcionales, siendo una de las principales la de facilitar las interacciones proteína-proteína. Las principales interacciones se establecen con otras quinasas de tirosina, con fosfatasa de tirosina o con proteínas adaptadoras. Muchas de estas interacciones dependen del reconocimiento de los residuos de tirosina fosforilados por parte de proteínas con dominios SH2, los cuales se denominan así por su homología con el dominio 2 de la proteína Src. Los dominios SH2 son sucesiones de aproximadamente 100 aminoáci-

dos que están presentes en varias moléculas implicadas en la señalización vía fosfotirosinas.

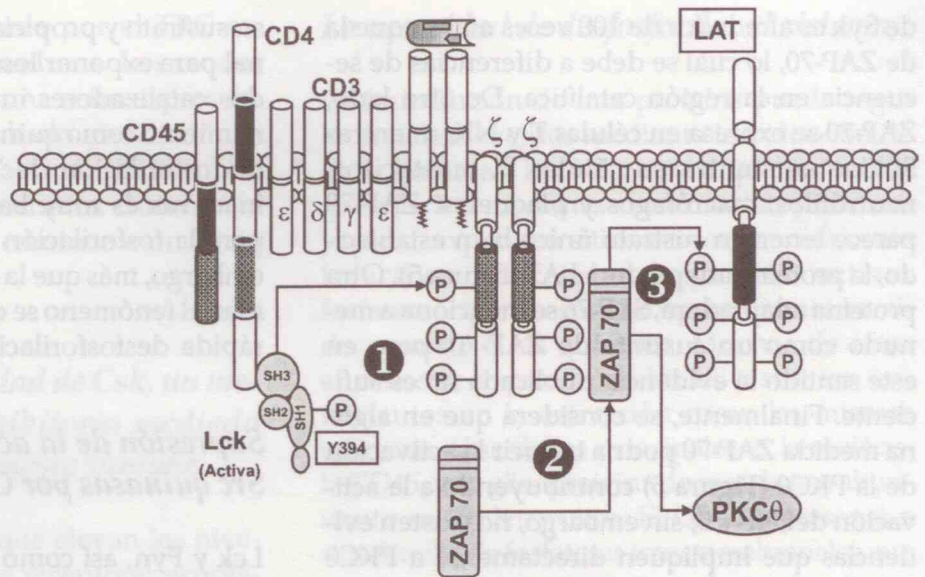
La fosforilación de los ITAM parece tener entonces como principal objetivo, generar sitios para acumular secuencias en tándem SH2 que están presentes en proteínas quinasas tales como ZAP-70 y Syk y en proteínas adaptadoras como SHC, SLP-76, Grb2, Ras, GAP. Las vías que pueden ser activadas por estas proteínas adaptadoras incluyen cascadas enzimáticas tales como PLC $\gamma$ 1, PI3K, Itk y las MAPK. Las proteínas ZAP-70 y Syk se unen con alta afinidad a los ITAM que son doblemente fosforilados, mientras que las proteínas adaptadoras y los miembros de la familia de proteínas Src quinasas reconocen ITAM con un solo sitio de fosforilación. Este evento es de vital importancia, pues le confiere especificidad a la activación de ZAP-70. Se considera que durante las primeras fases de la activación secuencial de cada uno de los sitios de los ITAM, es posible la unión transitoria de otras moléculas, y la segunda fosforilación debe ser el evento determinante para el reclutamiento de ZAP-70.

Las células T vírgenes y las que se encuentran en reposo tienen un alto porcentaje de cadenas  $\zeta$  fosforiladas, lo que constituye el estado p21 de  $\zeta$  (por su movilidad electroforética aparente en SDS-PAGE), lo cual le permite asociarse hasta con cuatro moléculas inactivas de ZAP-70. Una vez se ocurre la activación del TCR incrementa el número de moléculas p21 de  $\zeta$  y además empieza a sufrir una fosforilación hacia la forma p23. A partir de estos hallazgos se ha propuesto que las Src quinasas tienen varias funciones: primero, producir la forma p23 de  $\zeta$ ; segundo, pueden actuar sobre los demás CD3-ITAM o en otras cadenas  $\zeta$  no fosforiladas, y tercero, fosforilar a ZAP-70 y así desencadenar una respuesta completa de la célula T.

Una vez reclutada, la enzima ZAP-70 es activada por fosforilación mediada por Lck sobre el residuo Tyr-493. Debido a la presencia de diez ITAM en el complejo de TCR/CD3, se estima que diez moléculas ZAP-70 pueden aglomerarse sobre el receptor fosforilado. Después de la primera fosforilación sobre el residuo Tyr-493, ZAP-70 puede autofosforilarse y, probablemente, transfosforilarse para crear sitios que reclutan otras proteínas con dominios SH2. La familia de proteínas quinasas Src también son responsables del reclutamiento y activación de otras quinasas citoplásmicas como las relacionadas con Tec, Itk/Emt y Txk/Rlk, las cuales están directamente involucradas en la fosforilación y activación de PLC $\gamma$ 1. A su vez, estas proteínas con actividad quinasa tienen, además, la capacidad de fosforilar otros substratos tales como proteínas del citoesqueleto, proteínas adaptadoras y diversas moléculas involucradas en la señalización.

### **Importancia de ZAP-70 para la función de las células T.**

Un avance muy importante en el entendimiento del papel de la familia de quinasas Syk en la señalización de los leucocitos para su activación y desarrollo, lo constituyó la descripción de pacientes con alteraciones en el gen de



**Figura 5. Lck media la fosforilación de los ITAM y la consecuente activación de Zap70.** Además de Csk, Lck requiere para su activación y efecto sobre los ITAM, que el CD4 interactúe sobre las regiones no polimórficas del CMH clase II. Esta interacción, además de la disociación de Csk, permite que Lck fosforile los ITAM de la cadena ζ. La fosforilación de los ITAM permite el reclutamiento de Zap70, mediante la interacción de los dominios SH2 con las fosfotirosinas de los ITAM. Zap70 activo puede fosforilar a LAT. Además, se ha descrito que ZAP70 puede mediar la activación de PKCq, pero esto no está claramente establecido.

ZAP-70 y la generación de ratones "knock-out" para ZAP-70 y Syk. En humanos, la ausencia de ZAP-70 induce una inmunodeficiencia severa, caracterizada por la ausencia de células CD8+, con células CD4+ maduras incapaces de responder a la estimulación del TCR. Por su parte, los ratones "knock-out" para ZAP-70 también presentan una alteración en la producción de células T CD4+, mientras que las células NK no se afectan.

A pesar del grado relativamente alto de homología de los aminoácidos entre los dominios quinasa de ZAP-70 y Syk, estas proteínas difieren sustancialmente en sus especificidades, ya que ZAP-70 tiene un espectro de substratos mucho más limitado. Además, la actividad quinasa

de Syk es alrededor de 100 veces mayor que la de ZAP-70, lo cual se debe a diferencias de secuencia en la región catalítica. De otro lado, ZAP-70 se expresa en células T y NK, mientras Syk se encuentra en células B, mastocitos, neutrófilos, macrófagos y plaquetas. ZAP-70 parece tener un sustrato único bien establecido, la proteína adaptadora LAT (Figura 5). Otra proteína adaptadora, SLP-76 se menciona a menudo como un sustrato de ZAP-70, pero en este sentido la evidencia publicada no es suficiente. Finalmente, se considera que en alguna medida ZAP-70 podría inducir la activación de la PKC $\theta$  (Figura 5) contribuyendo a la activación del NF- $\kappa$ B; sin embargo, no existen evidencias que impliquen directamente a PKC $\theta$  como sustrato de ZAP70.

## REGULACIÓN DE LA FAMILIA DE QUINASAS SRC

Ya que Lck y Fyn, así como otros miembros de la familia de quinasas Src en otros tipos de células, juegan un papel crucial en la señalización mediada por receptores, no es sorprendente que sean reguladas de una manera muy similar; aquí tan sólo se describirán brevemente la regulación por fosforilación y desfosforilación.

### *Regulación positiva de Lck y Fyn mediante la fosforilación reversible de tirosinas.*

Un modo importante de activación de las Src quinasas está dado por la fosforilación en un residuo de tirosina conservado dentro del dominio catalizador: Y394 en Lck y Y417 en Fyn. Se presume que este fenómeno se debe a la capacidad de distintos miembros de la familia Src para autofosforilarse en dichos residuos. La fosforilación de Lck en ese aminoácido permite la exposición del sitio de interacción con

su sustrato y propicia un cambio conformacional para exponer los residuos de los aminoácidos catalizadores involucrados en su funcionamiento como quinasa. Aunque la proporción de fosforilación de Y394 de Lck en células T inactivas es muy baja, este evento es crucial para la fosforilación del sustrato de Lck; sin embargo, más que la escasa capacidad de fosforilar, el fenómeno se debe principalmente a una rápida desfosforilación.

### *Supresión de la actividad quinasa de las Src quinasas por Csk*

Lck y Fyn, así como otros miembros de la Src quinasas, son regulados negativamente por fosforilación en un residuo de tirosina conservado en la porción C-terminal (Y505 en Lck y Y528 en Fyn). Cuando se fosforila esta tirosina, el dominio SH2 de esta molécula se une a su propio dominio catalítico, lo cual genera un plegamiento que inhibe la actividad enzimática. La fosforilación de Lck en el extremo C-terminal permite que el dominio SH3 establezca el dominio quinasa en su forma inactiva. Por lo menos en células del linaje T, aproximadamente la mitad de todas las moléculas de Lck están fosforiladas en Y505, pero no se han observado cambios en la fosforilación en este punto durante la activación de la célula T. En cambio, la cantidad de Lck aumenta después de la activación de la célula T, lo cual sugiere que el uso de Lck en señalización de TCR no involucra desfosforilación de Y505.

La quinasa responsable de la fosforilación supresora de Lck en Y505 y de Fyn en Y528 es conocida como Csk, una enzima de 50 kDa que se expresa de forma ubicua, pero en mayor cantidad en células del sistema inmune. Hasta el momento, Csk es la única quinasa conocida con esta especificidad. Se ha demostrado que Csk es un inhibidor potente de la

señalización desencadenada por el TRC en timocitos y en células T maduras. Los modelos en los que se obtiene una sobreexpresión del gen *csk* dan como resultado una disminución muy drástica en la fosforilación de tirosinas de diferentes sustratos durante la activación celular, lo cual conduce a una baja producción de IL-2.

### ***Regulación de la actividad de Csk, un mecanismo molecular inhibitorio mediado por cAMP sobre la respuesta inmune.***

La PGE<sub>2</sub> y otros ligandos que elevan los niveles de cAMP por medio de receptores acoplados a proteínas G, inhiben la activación de células T dependiente del TCR y ejercen una importante función inmunoreguladora. Basados en estudios con agonistas selectivos, se ha demostrado que la activación de la PKA tipo I es necesaria y suficiente para mediar los efectos del cAMP. Aunque PKA puede interrumpir la señalización de TCR en múltiples niveles, el efecto inhibitorio observado de cAMP sobre la fosforilación de la cadena  $\zeta$  es mediado por Csk.

La purificación de dominios de lípidos de células T en reposo muestra la presencia de subunidades de PKA, constitutivamente asociadas con dichos dominios; esto sugiere que la co-localización de la PKA I y el TCR en las células T ocurre en dichos dominios. Se ha considerado que la PKA podría unirse mediante la interacción con una proteína llamada AKAP sobre los dominios de lípidos. Sin embargo, posibilidades adicionales incluyen la fijación de la PKA, mediante un grupo miristilo sobre el extremo N-terminal de la proteína, o mediante interacciones con proteínas del tipo caveolín que también están presentes en los mismos dominios.

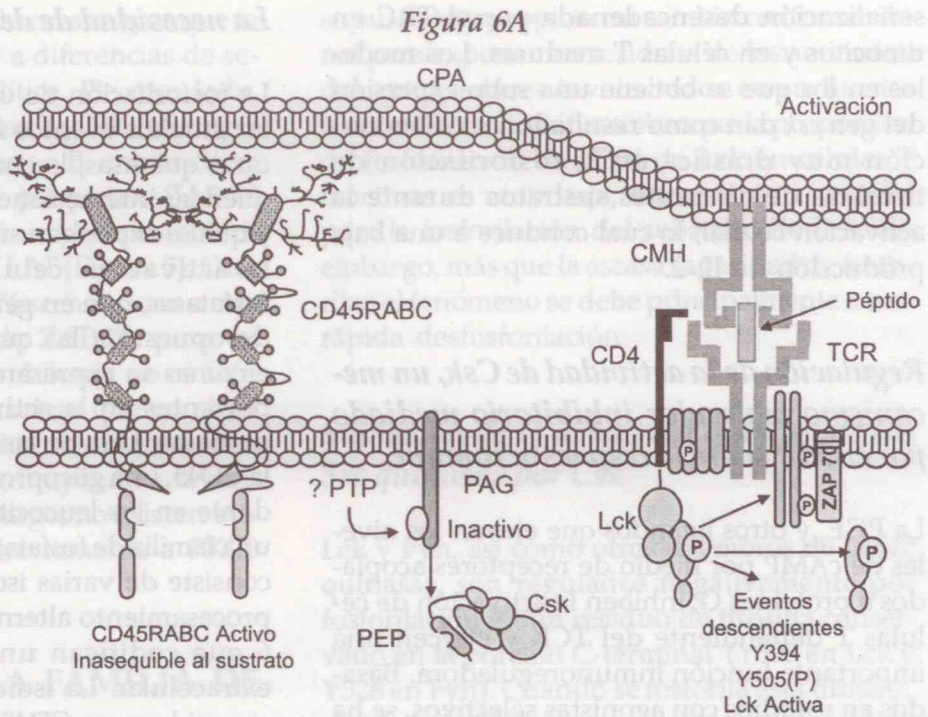
### ***La necesidad de desfosforilar el sistema***

La fosforilación de una proteína puede regular muchos eventos mediante la inducción de otras quinasas, lo cual permite que se modifiquen las interacciones entre muchas proteínas y que se expongan sitios activos, pero durante la activación celular se pueden activar fosfatasa, que en general operan en un sentido opuesto a las quinasas. Muchas de estas enzimas se expresan en los LT y son tan importantes en la activación como las mismas quinasas. Una de las principales es la molécula CD45, una glicoproteína de membrana abundante en los leucocitos. El CD45 representa a una familia de fosfatasa transmembranales que consiste de varias isoformas derivadas de un procesamiento alternativo de los exones 4, 5 y 6 que codifican una porción de la región extracelular. La isoforma de mayor tamaño, conocida como CD45RA, contiene la región codificada por estos tres exones, mientras la isoforma de menor tamaño o CD45RO ha perdido dichos exones de su RNAm. Existe una regulación estricta de la expresión de estas isoformas dependiendo del tejido y el estado de activación de la célula. Por ejemplo, en las células T, este procesamiento alternativo se regula de tal manera que las células T vírgenes expresan preferencialmente CD45RA que contienen los exones 4 y 5 o 5 y 6; pero cuando éstas se activan el procesamiento del RNA elimina los tres exones y se expresa el CD45RO (Figura 6A y 6B). Todas las isoformas contienen dos secuencias citoplasmáticas, organizadas en tándem de 300 aminoácidos, que son homólogas con varias fosfatasa. Sólo el primer dominio es catalizador, pero su actividad depende del segundo dominio que es el de reconocimiento de las moléculas blanco.

Después de la caracterización inicial de CD45, se demostró que las células T que carecían de esta proteína eran incapaces de responder a la

estimulación inducida por antígenos o por anticuerpos con capacidad mitogénica. Varios estudios demostraron que efectivamente el CD45 participaba en la activación mediada por el TCR interviniendo en el estado de fosforilación de tirosinas de diversas proteínas, como la PLC $\gamma$  y en la movilización de calcio. A su vez, la pérdida de esta actividad se correlacionaba con un incremento de grupos fosfatos en el residuo Tyr505 de Lck, por lo que se propone que la necesidad de expresión de CD45 durante la activación de las células T refleja en parte, su capacidad para antagonizar el efecto de Csk.

Estos hallazgos han permitido entender como es que CD45 funciona regulando positivamente la actividad de las quinasas de la familia Src. Parece ser que, mediante la remoción de los fosfatos activadores de la señal, la molécula CD45 mantiene las quinasas corriente arriba de PLC $\gamma$  inactivas, en un estado de defosforilación. Este evento se incrementa después que inicia la señalización por el TCR; por lo tanto, la activación del CD45 debe ser concomitante y continua durante la activación de la célula T.

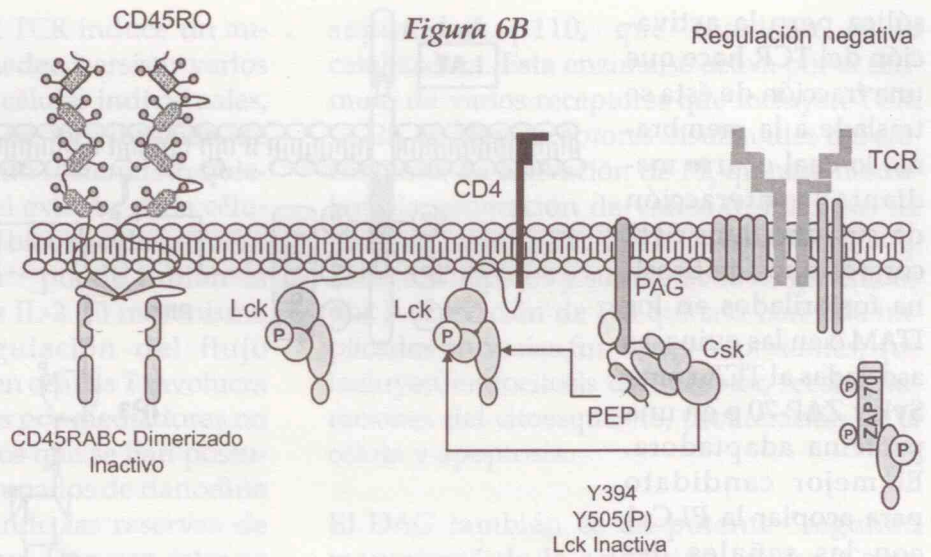


**Figura 6. Expresión diferencial de isoformas de CD45 en el linfocito T y su papel en la activación.** Un elemento importante para la activación de los linfocitos T lo constituye la presencia de diferentes isoformas de la molécula CD45. Aunque se desconoce el ligando de CD45RA si se sabe que su presencia es necesaria para la activación de las células T vírgenes. Se ha propuesto que la presencia de los dominios extracelulares adicionales que se encuentran en la isoforma CD45RA (como consecuencia de la expresión de los exones 4, 5 y 6) conduce a una glicosilación que facilita la interacción con su molécula ligando. Esto permitiría la activación de su acción fosfatasa en el dominio intracelular, la cual es necesaria para la defosforilación y por lo tanto activación de Lck. Cuando esos dominios extracelulares no están presentes en la proteína, como ocurre en la isoforma CD45RO se produce una interacción homotípica entre moléculas de la misma célula, lo cual posiblemente conduce a una inactivación recíproca de su actividad fosfatasa o a que por lo menos se limite la interacción de CD45 con otras posibles moléculas blanco.

Contrario a las expectativas iniciales, no se tienen evidencias de un cambio agudo sobre la función del CD45 después de la activación del TCR. Algunos estudios muestran que el CD45 también puede defosfosforilar el sitio regulador positivo en proteínas quinasas de la fami-

lia Src y de esta manera producir su desactivación; además, podría actuar sobre substratos adicionales como las JAK quinasas. El estudio de la sinapsis inmunológica muestra que en el área del contacto de las células T con la CPA, el CD45 está presente en medio de este agregado supramolecular por el tiempo suficiente para activar a Lck y mediar la fosforilación de la cadena  $\zeta$  y de ZAP-70; sin embargo, este periodo de tiempo no es suficiente como para dar lugar a inhibición mediada por desfosforilación de Lck y sus substratos. Por lo tanto, se acepta que el CD45 promueve la activación de LT. A pesar de esto, CD45 también puede exhibir algunas funciones inhibitorias simultáneas y el resultado final va a depender de la localización del CD45 en el espacio y en el tiempo.

Además de CD45, se han descrito un gran número de otras proteínas fosfatasa. Se estima que de los aproximadamente 95 genes de fosfatasa descritos en humanos, 30 de ellos se expresan en las células T. Entre estos están las fosfatasa transmembranales CD148 y RPTP; enzimas intracelulares como PEP, SHP1, SHP2, TCPTP, PTP1B, HePTP, el PTP-PESTE, PTP-MEG2, PTP-BAS, PTPH1, PTP-MEG1, PTP36, PRL-1, PRL-2, LMPTP-UN, -B, y -C; y fosfatasa de especificidad dual tanto para fosfotirosinas como para fosfoserinas y fosfotreoninas. Algunas de ellas regulan varios pasos en la activación de la célula T y su proliferación, mientras que otras no tienen una relación clara con la función de las células T. De hecho, se han encontrado algunas fosfatasa



(ej. TCPTP o PTP-MEG2) que no afectan para nada la señalización del TCR aún cuando se sobreexpresan 10 veces por encima del nivel endógeno, mientras que otras inhiben o estimulan las respuestas, aún cuando se encuentran en niveles fisiológicos. Esto apoya la noción que las fosfatasa son específicas y están restringidas a algunos substratos.

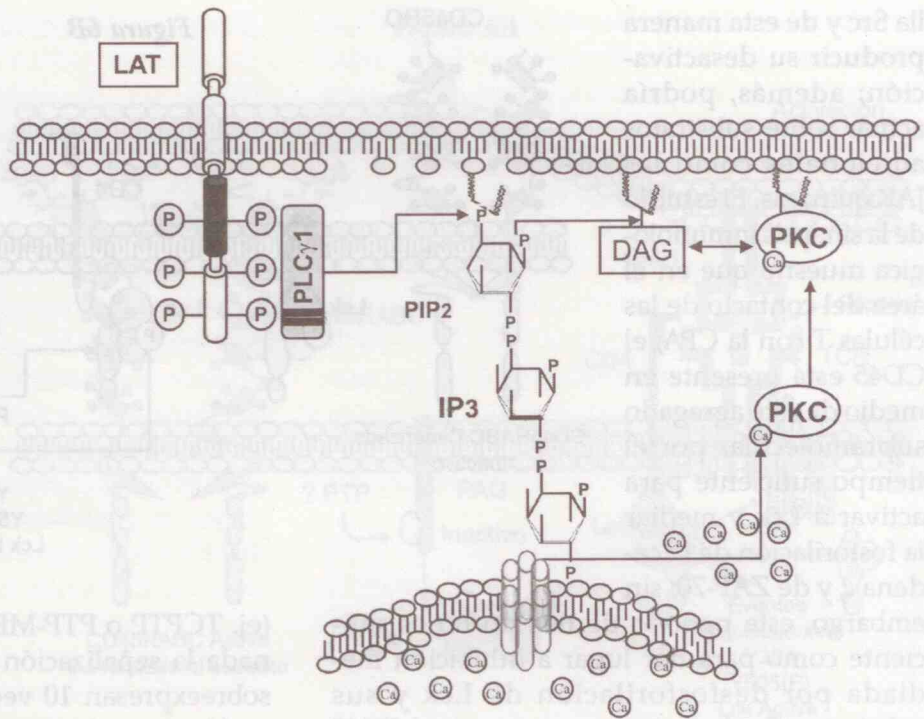
## ACTIVACIÓN DEL SEGUNDO MENSAJERO FOSFATIDILINOSITOL

La interacción entre el TCR/CD3 y las moléculas del CMH que presentan el péptido antigénico conduce a la fosforilación y desfosforilación antes descritas; sin embargo, el proceso de activación continúa corriente abajo para desencadenar otras respuestas, entre las cuales está la liberación de PI, un mediador fundamental en la activación de las células T.

El evento regulador en la cascada del PI involucra la hidrólisis de un fosfolípido de la membrana poco frecuente, llamado  $PIP_2$ , lo cual depende de la activación de la  $PLC\gamma_1$ . Normalmente la  $PLC\gamma_1$  es una enzima cito-

sólida pero la activación del TCR hace que una fracción de ésta se traslade a la membrana, lo cual ocurre mediante la interacción de sus dominios SH2 con residuos de tirosina fosforilados en los ITAM o en las quinasas asociadas al TCR como Syk y ZAP-70 o en una proteína adaptadora. El mejor candidato para acoplar la PLC $\gamma$ 1 con las señales del TCR, es una fosfoproteína de 36 kDa conocida como LAT. Una vez localizada en la membrana, la PLC $\gamma$ 1 estaría disponible para ser fosforilada por cualquiera de las quinasas reguladas por el TCR, lo cual desencadenaría su activación.

Cuando ha sido activada, la PLC $\gamma$ 1 se une al PIP $_2$  y gracias a su actividad de fosfolipasa hidroliza el PIP $_2$  a 1,4,5-IP $_3$  y a DAG. El DAG, que permanece en la superficie interna de la membrana, sigue una de dos rutas posibles: es convertido en ácido araquidónico a partir del cual se pueden generar prostaglandinas o leucotrienos, que actuarían como ligandos para otros receptores acoplados a proteínas G o puede desencadenar la activación de algunas formas de la PKC. Por su parte el 1,4,5-IP $_3$  es responsable de inducir un aumento en los niveles de Ca $^{+2}$  intracelular (Figura 7).



**Figura 7. Activación del segundo mensajero Fosfatidilinositol (PI).** El estímulo del TCR activa la fosforilación sobre tirosinas de PLC $\gamma$ 1, permitiendo que se expongan dominios que interactúan con las tirosinas de LAT. La activación de esta enzima está asociada con su unión al PIP $_2$ , produciendo la formación de 1,4,5-IP $_3$  y de DAG. El DAG, que permanece en la superficie interna de la membrana puede estimular algunas isoformas de la PKC. El 1,4,5-IP $_3$  y el DAG son los responsables de inducir un aumento en Ca $^{+2}$  y la activación de PKC, respectivamente.

### ***Función de los segundos mensajeros de la cascada de PI***

El papel del 1,4,5-IP $_3$  en la activación del calcio intracelular se ha estudiado extensamente. Este azúcar hidrosoluble tiene un receptor intracelular específico que regula la movilización Ca $^{+2}$  desde reservas en el retículo endoplásmico. La descarga de los depósitos intracelulares de Ca $^{+2}$  desencadenada por 1,4,5-IP $_3$  puede explicar la mayor parte del aumento inicial en Ca $^{+2}$  durante los dos minutos siguientes a la estimulación del TCR. Sin



embargo, el estímulo del TCR induce un aumento en el  $\text{Ca}^{+2}$  que pueden persistir varios minutos. En términos de células individuales, el análisis de imágenes de movilización de  $\text{Ca}^{+2}$  indica que el aumento sostenido requiere de fuentes de calcio del exterior de la célula. De acuerdo con esto, el bloqueo de las fuentes extracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$  puede inhibir la transcripción del gen de la IL-2. El mecanismo responsable de la regulación del flujo transmembranal de  $\text{Ca}^{+2}$  en células T involucra canales que son regulados por mediadores no identificados, dentro de los que se han postulado los receptores denominados de rianodina y que son activados cuando las reservas de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular se agotan. Una vez éstas se reestablecen, los flujos transmembranales de  $\text{Ca}^{+2}$  cesan y los canales de calcio se cierran. Este tipo de regulación de corrientes del calcio es necesario, ya que niveles altos de  $\text{Ca}^{+2}$  parecen tener una influencia negativa en la activación celular, incluso se considera que la incapacidad de regular la entrada y los flujos, desde las fuentes internas y externas puede alterar eléctricamente la polaridad de la membrana mitocondrial y activar mecanismos de apoptosis asociada con la activación celular.

La contribución potencial de los fosfatos del inositol a eventos involucrados en la activación de la célula tiene un nivel de complejidad mayor por las varias formas de fosfolípidos del inositol, el número grande de isómeros de fosfato de inositol y las numerosas enzimas que regulan estos compuestos. Por ejemplo, el 1,4,5- $\text{IP}_3$  puede ser convertido a 1,4,5,6- $\text{IP}_4$ , el cual no interactúa con el receptor intracelular en el retículo endoplásmico liso y por lo tanto regula negativamente el  $\text{Ca}^{+2}$ . Sin embargo, otros isómeros merecen mención especial, particularmente aquellos formados por la acción de la  $\text{PI}_3$ -quinasa. Esta enzima consiste en dos componentes, una subunidad p85 que sirve como un adaptador y regulador y una

subunidad p110, que funciona como catalizadora. Esta enzima se activa por el estímulo de varios receptores que incluyen TCR, CD28, IL-2R y receptores insulinoides del crecimiento. La activación de  $\text{PI}_3$ -quinasa modularía la generación de varios fosfolípidos de inositol, incluso  $\text{PI}_3\text{-P}$ ,  $\text{PI 3,4-P}_2$  y  $\text{PI 3,4,5-P}_3$ . Estos fosfolípidos y sus metabolitos generados por la activación de  $\text{PI}_3$ -quinasa han sido implicados en varias funciones importantes, que incluyen endocitosis del receptor, reestructuraciones del citoesqueleto, proliferación de la célula y apoptosis.

El DAG también es un potente "segundo mensajero" de la activación celular. Como se mencionó anteriormente, esta molécula regula a una familia de serina-treonina quinasas, isoenzimas de PKC, aumentando la afinidad de esta quinasa por los fosfolípidos. Muchas de estas isoenzimas también son dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$  y su activación ocurre por las acciones sinérgicas del DAG y del  $\text{Ca}^{+2}$ . La activación de isozimas de PKC se ha observado en células después de la estimulación del TCR. Igualmente, los ésteres del forbol también son potentes activadores de PKC, explicando la habilidad de estos compuestos para actuar sinérgicamente con ionóforos del calcio, imitando la activación por la vía del TCR.

La PKC representa a una familia de enzimas estrechamente relacionadas que comparten rasgos estructurales y algunos requerimientos del  $\text{Ca}^{+2}$  y del DAG. Todas las isoformas pueden ser activadas por ésteres de forbol pero pueden diferir en su sensibilidad al calcio. No todas las isoenzimas de PKC se expresan y participan en la activación de las células T, son particularmente importantes las isoformas PKC  $\beta$  y  $\theta$ . La activación de PKC $\beta$  es dependiente de calcio, mientras que la de PKC $\theta$  es medida por quinasas. Algu-

nas respuestas de la célula T, incluyendo la producción de IL-2, pueden ocurrir en la ausencia de PKC $\beta$  y su función parece ser redundante.

La activación de PKC puede ser limitada de varias maneras. Primero, el metabolismo de DAG a ácido fosfatídico por la DAG-quinasa sirve para limitar la disponibilidad de DAG. Segundo, se ha demostrado que proteasas activadas por calcio, las calpainas, pueden unirse *in vitro* a la PKC, modificando su actividad. Se desconoce si la actividad de las calpainas contribuye a la activación o modificación de PKC en el ambiente celular, pero podrían ser moduladores de la actividad del citoesqueleto. Tercero, la naturaleza del ligando estimulador puede influir en la activación de PKC. Por ejemplo, el estímulo de células T con anti-CD3 inmovilizado sobre una fase sólida induce una translocación más prolongada de PKC a la membrana plasmática que el mismo anticuerpo de manera soluble. Por lo tanto, la activación y regulación de PKC puede ser más compleja y puede esperarse que esa diferencia en la regulación de eventos intracelulares tenga un impacto en las respuestas celulares observadas.

## ACTIVACIÓN DEL NF- $\kappa$ B

El NF- $\kappa$ B fue identificado inicialmente como un factor de transcripción con la capacidad de unirse al promotor de la cadena liviana  $\kappa$  de las inmunoglobulinas en linfocitos B, de donde proviene su denominación. Posteriormente, se ha descrito su presencia, o de algunos miembros de la misma familia, en casi todas las células animales. Habitualmente se encuentra en el citoplasma en forma inactiva, pero luego de la estimulación del TCR, de los TLR o de otros receptores como los de TNF e IL-1 $\beta$ , el NF- $\kappa$ B es liberado de la subunidad inhibitoria (I $\kappa$ -B) y trasladado al núcleo, donde promue-

ve la actividad transcripcional de una amplia variedad de genes. El perfil de expresión génica inducido por NF- $\kappa$ B depende del tipo celular; sin embargo, los genes que más comúnmente se expresan incluyen IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  y sus receptores, quimoquinas tales como IL-8, GRO, IP-10, MCP-1, RANTES, MIP-1 y eotaxina, y factores estimulantes de colonias como M-CSF, GM-CSF y G-CSF. La activación concluye por la nueva síntesis de la subunidad inhibitoria I $\kappa$ B. Es importante resaltar que la propia expresión génica de I $\kappa$ B se encuentra bajo el control de NF- $\kappa$ B. De este modo, la activación de NF- $\kappa$ B resulta en la regulación negativa de su propia activación gracias a la inducción del inhibidor I $\kappa$ Ba que se une al NF- $\kappa$ B ligado al DNA y lo devuelve al citoplasma.

En mamíferos, la forma activa de NF- $\kappa$ B se presenta como homo o heterodímero, que se conforma entre los diversos miembros de la familia NF- $\kappa$ B-Rel, los cuales están presentes habitualmente de forma inactiva en el citoplasma. El dímero que se encuentra más habitualmente y que media la activación en la célula T, se compone de las subunidades p50 y p65. Todas las proteínas de la familia presentan una región característica que les permite unirse a una secuencia consenso del DNA o sitio  $\kappa$ B: GGGRNNYYCC, en la que R representa cualquier purina, Y una pirimidina y N una base cualquiera. Los distintos dímeros del NF- $\kappa$ B presentan afinidades diferentes a los sitios  $\kappa$ B y también difieren en su capacidad de activar la transcripción. Por ejemplo, homodímeros de p50 y heterodímeros p50 y p52 tienen actividad fundamentalmente represora y son activados por citoquinas que desactivan las respuestas celulares como la IL-10, mientras que p65 y c-Rel son potentes activadores de la transcripción. En el momento actual se desconocen muchos detalles acerca de cómo esta diversidad de estímulos converge finalmente en la activación del NF- $\kappa$ B. Se conoce con más

precisión el modo de activación derivado del estímulo con citoquinas tales como IL1 $\beta$ , TNF o la estimulación de los TLR. Sin embargo, las vías de activación más generalizadas comparten ciertas características. Pocos minutos después de la activación de señales mediante estos receptores, se produce la fosforilación y poliubiquitinación de I $\kappa$ B y su degradación proteolítica por el proteasoma. Como resultado, las secuencias de localización nuclear de NF- $\kappa$ B quedan expuestas y se produce la translocación nuclear del mismo. En general, los estímulos conducen a la activación de una cascada de fosforilación de proteínas quinasas de la familia MAP que resulta en la activación de la quinasa responsable de la fosforilación del propio I $\kappa$ B. Aunque el mecanismo de activación a partir de determinadas citoquinas tales como IL1 $\beta$  y TNF ha sido muy estudiado, quedan todavía muchos puntos por dilucidar. Por ejemplo, es bien conocido que la activación puede ser mediada por especies reactivas del oxígeno en algún punto no determinado, y se considera que esta es la explicación de la capacidad de ciertas moléculas antioxidantes para interferir con la activación del NF- $\kappa$ B.

En el LT la PKC $\theta$ , que es independiente de Ca<sup>+2</sup>, se considera como una de las principales mediadoras de la activación del NF- $\kappa$ B. La activación de la PKC $\theta$  requiere de dos señales, una mediada por el TCR y otra dependiente de la molécula CD28. En respuesta a la estimulación con el TCR, PKC $\theta$  se transloca a la membrana citoplásmica donde es rápidamente fosforilada. El papel de esta enzima ha sido estudiado mediante la generación de animales deficientes en el gen *pkc $\theta$* . Estos animales son incapaces de activar tanto AP-1 (ver adelante), como NF- $\kappa$ B, lo cual lleva a que se altere la producción de IL-2.

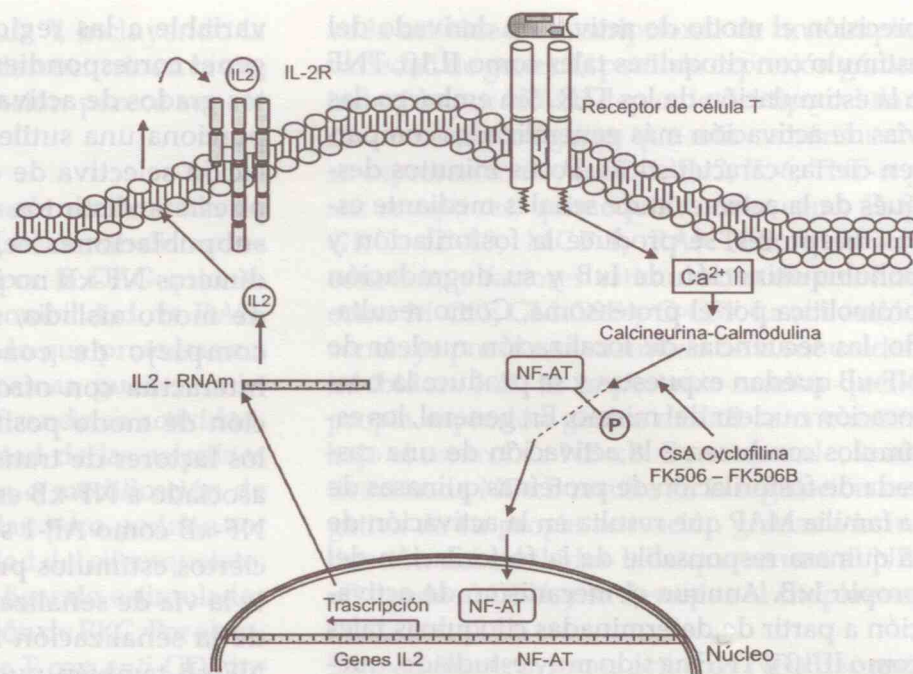
Una vez en el núcleo, los diferentes dímeros de la familia NF- $\kappa$ B se unen con afinidad

variable a las regiones promotoras de los genes correspondientes produciendo distintos grados de activación. Esta variedad proporciona una sutileza adicional en la regulación selectiva de diferentes genes en respuesta a distintos estímulos en diferentes subpoblaciones celulares. Así mismo, los dímeros NF- $\kappa$ B no inducen la transcripción de modo aislado, sino como parte de un complejo de coactivadores. El NF- $\kappa$ B interactúa con otros factores de transcripción de modo positivo o negativo. Uno de los factores de transcripción más a menudo asociado a NF- $\kappa$ B es la molécula AP-1. Tanto NF- $\kappa$ B como AP-1 se activan en respuesta a ciertos estímulos proinflamatorios o durante la vía de señalización del TCR. En el caso de la señalización mediada por el TCR, el NF- $\kappa$ B también puede unirse a un sitio conocido como CD28RE. Además, el NF- $\kappa$ B actúa de modo sinérgico con otros factores de transcripción como el NF-IL6 en la inducción de diversos mediadores de la inflamación.

De otro lado, la interacción física de NF- $\kappa$ B con otros factores de transcripción como el receptor de glucocorticoides, impide la unión de NF- $\kappa$ B al DNA, evitando la transactivación de los genes inducidos por este factor. Este se considera uno de los mecanismos principales de la actividad anti-inflamatoria de los glucocorticoides. Adicionalmente, la capacidad de bloquear la transcripción de genes regulados por NF- $\kappa$ B, como CD28RE y NF-IL-6, hace que los glucocorticoides sean potentes drogas inmunosupresoras. Los esteroides también estimulan la transcripción de la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$ . De esta manera, los esteroides pueden inhibir la expresión de una gran variedad de genes que carecen en su promotor de secuencias de respuesta a esteroides.

**Consecuencias de aumentos en  $Ca^{+2}$  y activación de isoformas dependientes de  $Ca^{+2}$  de PKC.**

El sinergismo observado entre los aumentos de  $Ca^{+2}$  y la activación de la PKC $\beta$  puede explicar muchos de los eventos que median la conjunción de estas dos vías en las cascadas de señalización subsecuentes. El aumento del  $Ca^{+2}$  desencadena eventos dependientes de la calmodulina como la activación de la actividad fosfatasa de la calcineurina y de la quinaasa de la calmodulina dependiente de  $Ca^{+2}$ . La presencia del  $Ca^{+2}$  modula la formación de un complejo que incluye la calmodulina y la calcineurina que tiene actividad fosfatasa sobre residuos fosforilados de serina-treonina. Cuando la calcineurina ha sido activada puede inducir la desfosforilación de una proteína citosólica conocida como NF-AT, que no sólo participa en la regulación transcripcional de la IL-2 sino en la de muchos genes de otras citoquinas. Es probable, que la

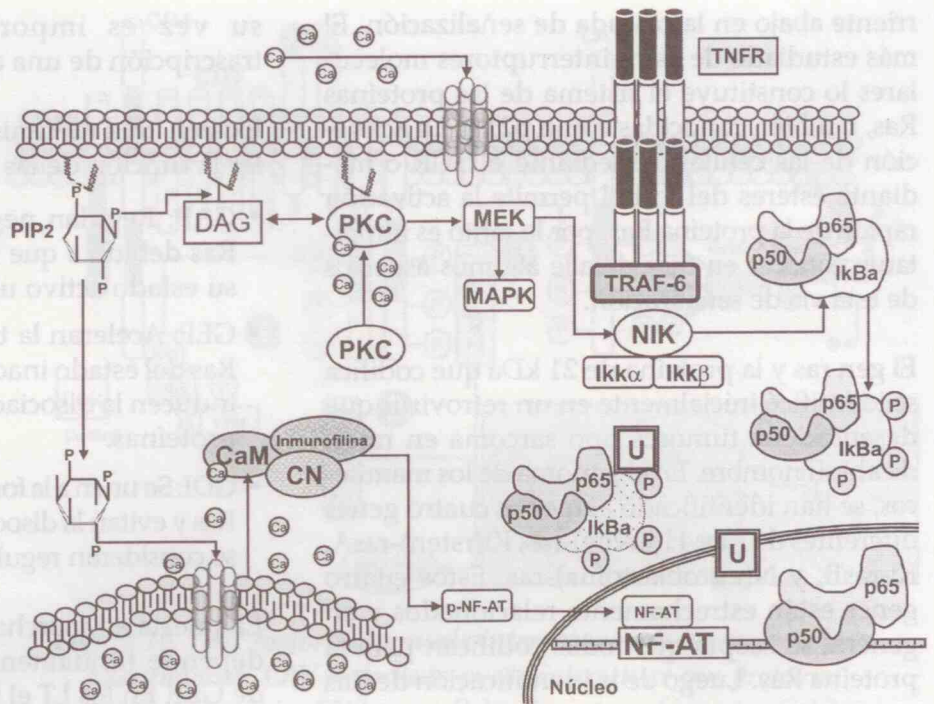


**Figura 8. Activación de la calcineurina.** La presencia de  $Ca^{+2}$  modula la formación de un complejo que incluye la calmodulina, calcineurina y la inmunofilina. Dentro de este, la calcineurina tiene actividad fosfatasa sobre los residuos serina-treonina fosforilados del NF-AT. La desfosforilación de NF-AT permite revelar un sitio del NF-AT que media su localización nuclear sobre las secuencias promotoras de los genes de las citoquinas que producen las células T cuando son activadas. La calcineurina es blanco molecular para fármacos inmunosupresores como CsA y FK506 induciendo el bloqueo del NF-AT, que no sólo participa en la regulación transcripcional de la IL-2 sino en la de muchos genes de otras citoquinas. El evento seminal para la activación del NF- $\kappa$ B es la fosforilación de los I $\kappa$ B, que es mediada por IKK. El complejo IKK (700–900 kDa) consiste en varias proteínas IKK1, IKK2 y la subunidad regulatoria NEMO también conocida como IKK $\gamma$  de la cual no se conoce que tenga actividad quinasa intrínseca. El complejo IKK es un punto de convergencia para múltiples estímulos mediante diversos receptores. Las señales de activación del NF- $\kappa$ B son bastante redundantes, además del TCR otros receptores como los TNFR, el receptor de IL-1 $\beta$  y los TLR pueden activarlo. La activación del NF- $\kappa$ B depende de la fosforilación del I $\kappa$ B, el cual es posteriormente ubiquitinado y degradado en el proteasoma liberándose la forma activa del complejo. En mamíferos, la forma activa de NF- $\kappa$ B se presenta como un homo o heterodímero. El dímero que se encuentra más habitualmente y que media la activación en la célula T, se compone de las subunidades p50 y p65. Todas las proteínas de la familia presentan una región característica por la que se unen a una secuencia consenso del DNA o sitio  $\kappa$ B:  
GGGRNNYYCC

desforilación de NF-AT permita revelar un sitio en este factor que medie su localización nuclear sobre las secuencias promotoras de los genes de las citoquinas que producen las células T cuando son activadas (Figura 8).

La calcineurina es el blanco molecular para fármacos inmunosupresores como CsA y FK506, fármacos que han revolucionado el trasplante de órganos, debido a que previenen el rechazo de los tejidos. La CsA y el FK506 pueden formar complejos moleculares con sus receptores intracelulares, la ciclofilina y el FKBP, respectivamente. Son estos complejos moleculares, no los fármacos aislados, los que inhiben la función fosfatasa de la calcineurina. Aunque la calcineurina es ubicua, se expresa a niveles más altos en los LT y esto hace que estos fármacos tengan relativa especificidad por estas células (Figura 9).

Como se mencionó anteriormente, el  $Ca^{2+}$  también activa la función quinasa de la calmodulina. En los LT, la activación de esta quinasa parece tener una influencia negativa en la expresión del gen de la IL-2. En estas células, la estimulación constitutiva de la vía de la calmodulina dependiente de  $Ca^{2+}$ , sin la activación de la PKC, puede no sólo atenuar la producción de esta citoquina, sino que puede llevar los linfocitos a un estado de incapacidad



**Figura 9.** La activación de la fosfolipasa  $C\gamma_1$  con la consecuente liberación de DAG e  $IP_3$  conduce a la activación de la PKC y a un aumento de los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ . A su vez el  $Ca^{2+}$ , gracias a su interacción con la calmodulina, conduce a la activación de la actividad fosfatasa de la calcineurina. La acción de esta enzima sobre el NF-ATp citoplasmático permite que esta proteína sea trasladada al núcleo donde actúa como factor de transcripción de varios genes, particularmente sobre el gen de la IL-2.

de responder frente a antígenos, fenómeno conocido como anergia. Sin embargo, en otros tipos celulares, incluidas células vegetales, la calmodulina puede unirse a otras proteínas quinasas, a fosfodiesterasas cíclicas o al sistema de transporte de calcio a través de la membrana citoplásmica ejerciendo otras funciones.

## SEÑALIZACIÓN MEDIANTE LA VÍA DE PROTEÍNA RAS Y ACTIVACIÓN DE LAS MAP QUINASAS

La señalización intracelular tiene puntos que actúan a modo de interruptores moleculares que reciben, modulan y transmiten señales co-

riente abajo en la cascada de señalización. El más estudiado de estos interruptores moleculares lo constituye el sistema de las proteínas Ras, también conocidas como p21<sup>ras</sup>. La activación de las células T mediante el TCR o mediante ésteres del forbol permite la activación rápida de la proteína Ras, por lo tanto es importante conocer en más detalle algunos aspectos de esta vía de señalización.

El gen ras y la proteína de 21 kDa que codifica se identificó inicialmente en un retrovirus que desencadena tumores tipo sarcoma en ratas, de ahí su nombre. En el genoma de los mamíferos, se han identificado al menos cuatro genes diferentes de Ras: H(arvey)-ras, Ki(rsten)-rasA, Ki-rasB, y N(euroblastoma)-ras. Estos cuatro genes están estrechamente relacionados y en general se acepta que todos codifican para la proteína Ras. Luego de la identificación de Ras se encontraron muchas otras proteínas con características similares lo que dio origen a la superfamilia de proteínas pequeñas Ras (monoméricas) con actividad GTPasa, las cuales se encuentran en su forma inactiva unidas a GDP y en su forma activa unidas a GTP. Cuando se encuentran en la forma unida a GTP, las proteínas Ras interactúan con moléculas blanco corriente abajo, las que a su vez se comunican con otras moléculas de señalización más lejanas en la cascada de señalización. Dentro de esta superfamilia se han descrito cinco subfamilias que son Ras/Rap, Rho/Rac, Rab, Ran y Arf.

La proteína Ras se encuentra unida a la cara interna de la membrana plasmática por medio de lípidos de anclaje, tales como los residuos farnesil o palmitoil; sin embargo, esta unión no influye sobre la capacidad catalítica o GTPasa de Ras, mas bien lo que facilita es el acercamiento con su molécula efectora, la Raf quinasa. Esta quinasa tiene actividad sobre residuos de serina y treonina. Gracias a Raf se establece un vínculo entre la señalización de Ras y la cascada de las quinastas MAP, la que a

su vez es importante para regular la transcripción de una amplia variedad de genes.

Existen tres mecanismos que permiten regular la función de las proteínas Ras:

- GAP: Regulan negativamente las proteínas Ras debido a que reducen la vida media de su estado activo unido a GTP.
- GEF: Aceleran la transición de las proteínas Ras del estado inactivo al activo debido a que inducen la disociación del GDP unido a estas proteínas.
- GDI: Se unen a la forma inactiva de las proteínas Ras y evitan la disociación del GDP, por lo tanto se consideran reguladores negativos.

La puesta en marcha de la vía de proteína Ras depende fundamentalmente de la activación de GEF. En los LT el factor que tiene esta capacidad intercambiadora de nucleótidos es la proteína Sos. A su vez, la activación de Sos depende de la proteína adaptadora Grb2, la cual tiene un dominio SH2 flanqueado a cada lado por dominios SH3. En células estimuladas mediante el TCR el dominio SH2 de Grb2 se une a LAT y a la proteína adaptadora SHC, mientras que los dominios SH3 se unen a las regiones ricas en prolina de Sos. Así, el estímulo de TCR puede activar Ras mediante la formación de complejos Grb2/Sos. La molécula de Sos asociada a membrana puede activar Ras induciendo su actividad como intercambiador de nucleótidos (Figura 10). Sin embargo, varios estudios sugieren que la activación de Ras en células T también puede ocurrir como resultado de la inhibición de la actividad GAP.

### *La proteína Ras activa la Raf quinasa*

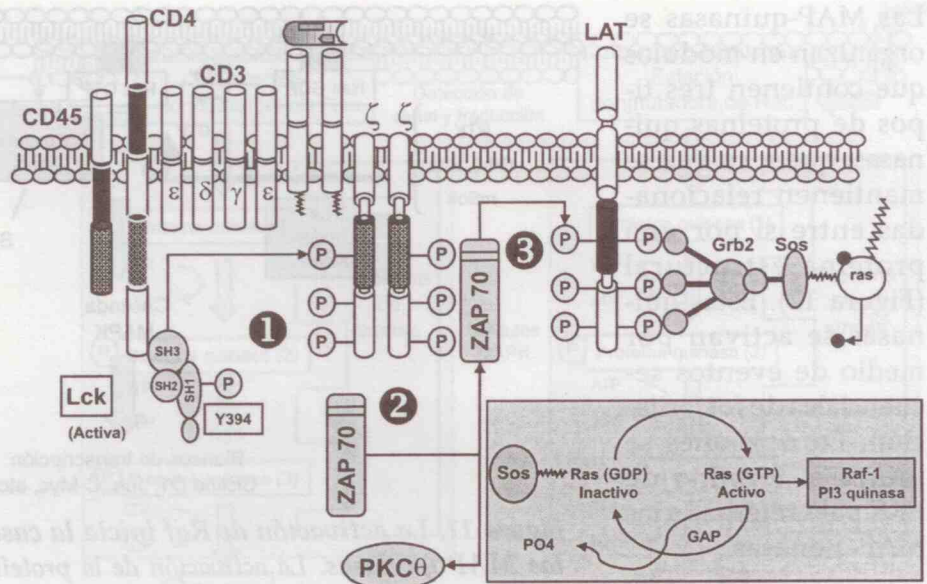
La función de la interacción Ras-Raf se ha caracterizado en detalle y ha mostrado ser importante en la señalización del TCR que lleva a la activación del gen de la IL-2. La Raf qui-

nasa es una serina–treonina quinasa que se encuentra inmediatamente corriente abajo de Ras. La forma activa de Ras (Ras-GTP) interactúa de manera específica con Raf y permite su localización en la membrana plasmática. A su vez, esto activa la actividad quinasa de Raf y hace que la señalización continúe gracias a la activación de las MAP quinasa (Figura 11). La evidencia existente indica que la función de Ras en esta vía consiste en transportar la Raf quinasa hacia la membrana en una manera controlada. Una vez en la membrana, la activación de Raf es modulada mediante su fosforilación; se propone que la fosforilación por PKC y Src quinasa activa a Raf, mientras la PKA induce una regulación negativa.

Aunque la activación de Raf quinasa es la vía más conocida, existen otras moléculas efectoras que son activadas por la proteína Ras entre las que se encuentran: las MEK quinasa, las cuales son quinasa de la vía de las MAP quinasa, la PI<sub>3</sub>-quinasa, el Ral-GDS, la p120GAP, Rac y Cdc42.

### **Cascada de proteínas de la vía de las MAP quinasa**

En general la señalización intracelular ocurre por medio de dos tipos de vías. En una prime-



**Figura 10. LAT fosforilado puede interactuar con otras proteínas adaptadoras.** LAT fosforilado puede interactuar con proteínas que contienen dominios SH2 como Grb2. La interacción entre Grb2 y las fosfotirosinas de LAT permite la exposición de los dominios SH3 que son reconocidos por proteínas con dominios ricos en prolina como Sos, la que a su vez regula la interacción con proteínas intercambiadoras de guanina. Esta interacción permite que la proteína Ras intercambie el GDP por GTP quedando Ras activado. Ras puede mediar la activación de la cascada de las MAPK, mediante el reclutamiento de Raf-1, PI<sub>3</sub>-K y de otras proteínas unificadoras de GTP, sobre Rac y Cdc42. Posteriormente, Ras se inactiva cuando pasa a GDP-Ras debido a la actividad GTPasa.

ra vía, la activación se produce mediante moléculas mensajeras que se difunden en el citosol para unirse a proteínas efectoras las cuales se activan para continuar con la cascada de señalización (por ejemplo Ca<sup>2+</sup> e IP<sub>3</sub>). Una segunda vía ocurre mediante una cascada de activación de proteínas quinasa que interactúan unas con otras y se encargan de llevar la señal desde la membrana hasta el núcleo. Puesto que este último mecanismo de señalización se identificó inicialmente en respuesta a estímulos mitogénicos, se denominó vía de las MAPK. En los LT esta vía de señalización tiene un papel importante tanto en la respuesta a la activación del TCR como de citoquinas estimuladoras de la proliferación.

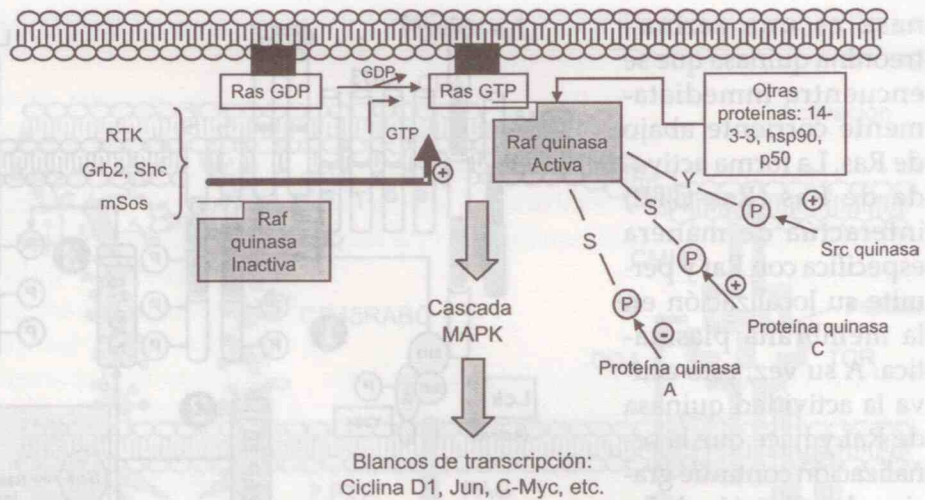
Las MAP-quinasas se organizan en módulos que contienen tres tipos de proteínas quinasas, que a su vez se mantienen relacionadas entre sí por una proteína estructural (Figura 12). Estas quinasas se activan por medio de eventos secuenciales de fosforilación. En ocasiones se utiliza el término de ERK para referirse a las MAP-quinasas.

Las proteínas MAPK/ERK se encuentran al final del módulo MAPK y por lo general están precedidas por otras dos proteínas quinasas. Por lo tanto, las proteínas MAPK/ERK son activadas por la fosforilación producida por la quinasa precedente denominada MAPK/ERK quinasa o MAPKK. A su vez, la proteína MEK es el sustrato de otra quinasa que esta en la posición previa en la cascada la cual se denomina MEKK ó MAPKKK. La Raf quinasa pertenece a las MEK quinasas activada por la proteína Ras.

## OTROS EVENTOS REGULADOS POR QUINASAS DE TIROSINA

Además de las moléculas antes descritas, existe un número grande de proteínas que son fosforiladas como consecuencia de la estimulación del TCR. Las funciones de muchas de éstas son desconocidas, sin embargo, vale la pena mencionar Vav y SLP-76.

Vav es una proteína multimodular de 95 kDa involucrada en la señalización; se expresa ex-

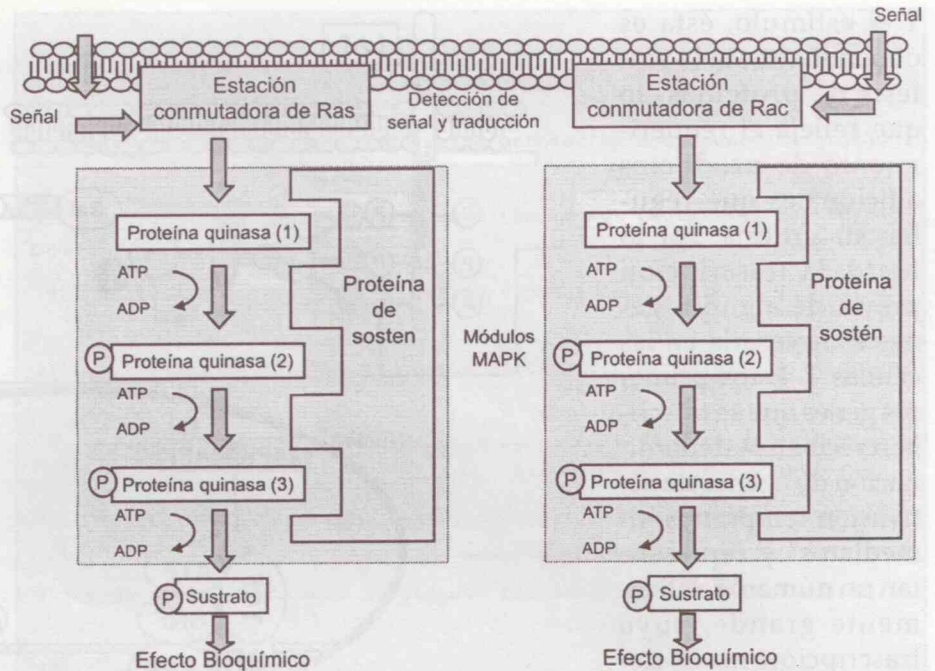


**Figura 11. La activación de Raf inicia la cascada de fosforilación de las MAP-quinasas.** La activación de la proteína Ras, que se encuentra unida a la cara citoplasmática de la membrana celular, facilita su interacción con la proteína Raf. Esta interacción desencadena la actividad quinasa de Raf, lo cual da inicio a diferentes eventos de fosforilación y por lo tanto a la activación de las MAP-quinasas.

clusivamente en células del linaje hematopoyético y en células del trofoblasto. La ausencia de Vav induce alteraciones bien definidas en las señales inducidas por la IL-2. Por el contrario, la sobreexpresión de Vav lleva a la expresión constitutiva del gen de la IL-2 y potencia los efectos de la estimulación vía TCR. Esta proteína actúa como un factor intercambiador de nucleótidos de guanina para Rac, Rho y Cdc, proteínas unidoras de GTP que han sido implicadas en arreglos estructurales de la actina del citoesqueleto. Aunque no se conocen plenamente las funciones de la actina en la activación celular, la polimerización de esta proteína del citoesqueleto en células T ocurre en sitios adyacentes a los de interacción con otras células como las CPA. El dominio SH2 de Vav juega un papel importante en interacciones con al menos dos proteínas. Este dominio, une directamente a ZAP-70 en sus porciones fosforiladas y la unión de este dominio se requiere para la fosforilación de las tirosinas de Vav. El dominio SH2 de Vav también une a



las tirosinas fosforiladas de SLP-76, una proteína adaptadora que se expresa exclusivamente en células de la línea hematopoyética. Al igual que Vav, la sobreexpresión de SLP-76 potencia las señales del TCR, llevando a la activación de NF-AT. La importancia de la interacción entre Vav y SLP-76 se refuerza por la habilidad de estas dos proteínas para sinergizar en la cascada de activación del NF-AT. En conclusión, estos estudios sugieren que el complejo de Vav y SLP-76 juega un papel importante en la transducción de señales del TCR y esto puede involucrar la actina del citoesqueleto.



**Figura 12. Organización de las MAP quinasa.** Las MAP quinasa se encuentran organizadas en módulos o complejos macromoleculares que contienen tres proteínas quinasa diferentes, unidas entre si mediante una proteína estructural que establece una especie de esqueleto. De esta manera una vez Raf fosforila a la MAPKKK se puede dar una fosforilación y activación de la MAPKK y a su vez esta fosforila a la MAPK, la cual finalmente se encarga de fosforilar un sustrato que se continúa con la señalización hacia el núcleo.

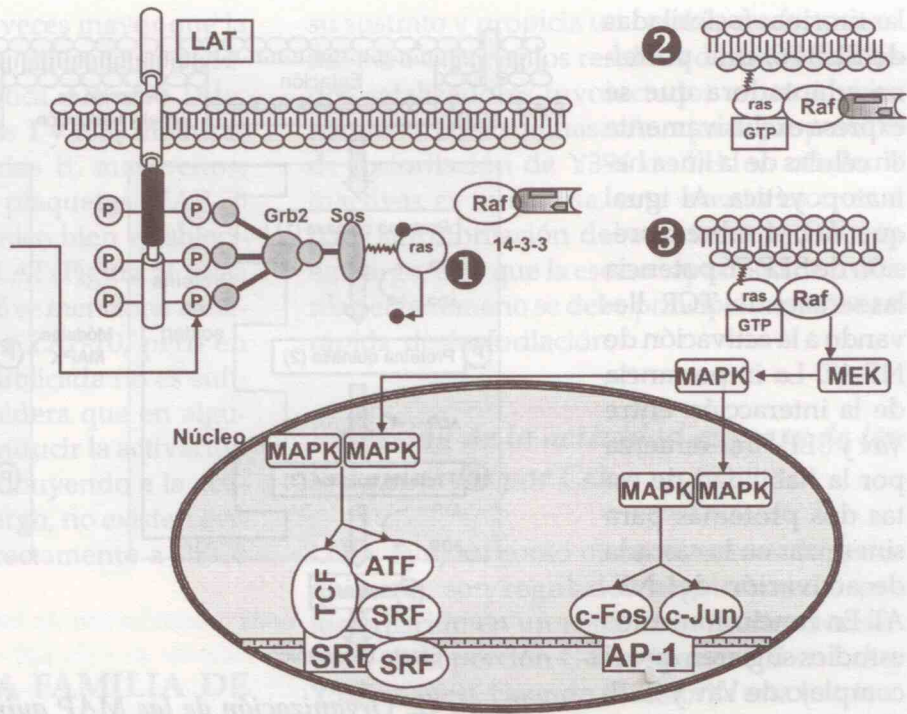
## ACTIVACIÓN DE GENES DEPENDIENTES DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

Como resultado de los eventos de señalización intracelular inducidos mediante la activación del TCR, se produce la expresión de un grupo de genes que son específicamente sensibles a la vía de señalización y que deben tornarse transcripcionalmente activos. Estos eventos transcripcionales son responsables de la diferenciación y proliferación de las células T. Anteriormente se consideraba que todos los eventos que llevan a la proliferación y adquisición de funciones diferenciadas dependían de la misma trayectoria de señalización originada

del TCR; ahora, la idea de que estos pueden operar en cascada y que, funcionalmente, cada paso se regula independientemente, permite entender que los eventos de activación génica son secuenciales y que pueden regularse condicionalmente. Los eventos iniciales llevan a la activación de la transcripción de un cierto grupo de genes; el producto de esta primera activación contribuye a la activación transcripcional de un segundo grupo de genes, y así sucesivamente. Un evento esencial en la activación del LT es la activación del gen de la IL-2 y de su receptor, IL-2R. Aunque la transcripción de estos genes empieza durante las primeras horas de exposición de la célula

T al estímulo, ésta es dependiente de la síntesis de proteínas, lo que refleja el requerimiento de productos adicionales que regulan su síntesis. Por lo tanto, la transcripción previa de algunos genes es necesaria en las células T. Estos primeros genes que se transcriben reciben la denominación de "genes de activación tempranos inmediatos" y representan un número relativamente grande, cuya transcripción no es dependiente de síntesis de proteínas. Una vez la IL-2, en forma dimerica, se une a su receptor comienzan otros eventos de transducción de señales que dan origen al segundo ciclo de la cascada de eventos involucrados en la regulación del crecimiento de la célula T. Esto se manifiesta desde varias horas a días después que la señal inicial fue dada por el antígeno.

Tres proto-oncogenes, c-myc, c-fos y c-jun, son los blancos de la vía de señalización de las proteínas nucleares reguladas por los "genes tempranos inmediatos". Ellos sirven como modelos útiles para estudiar los genes de activación tempranos inmediatos. Aunque muchos de los aspectos relacionados con la función de c-myc en el crecimiento de la célula permanecen por ser definidos, se sabe que este oncogen forma



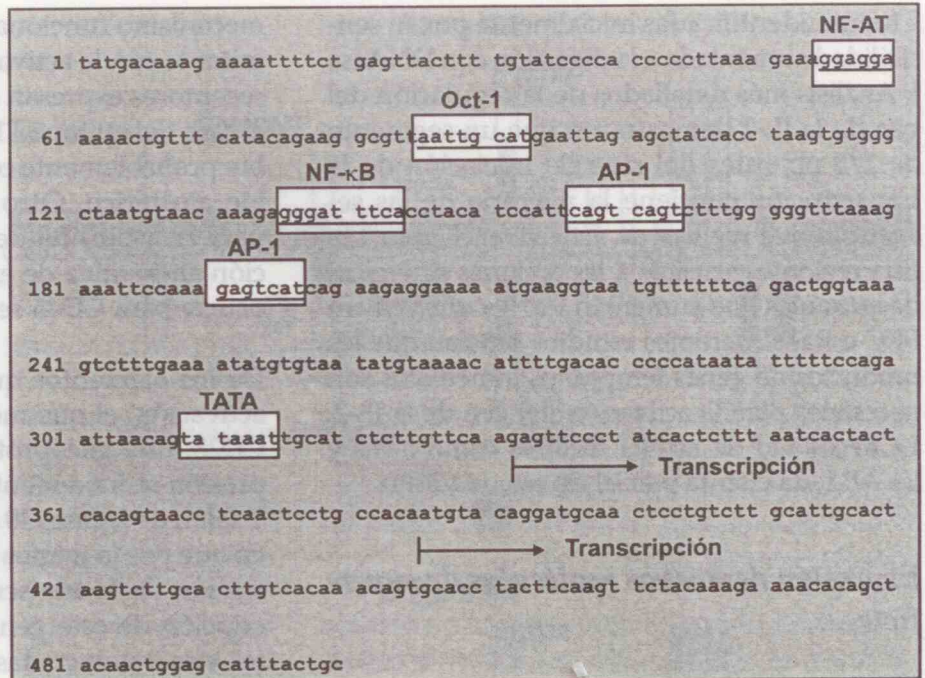
**Figura 13. Activación de las MAPK.** Raf-1 es una quinasa con especificidad dual por treonina-serina y tirosina, activa a MEK que a su vez activa a MAPK. Esta cascada de quinastas puede regular eventos nucleares involucrados en el crecimiento y diferenciación de una variedad de células. La activación de Ras contribuye a la activación transcripcional de IL-2. Las MAPK y otros miembros de la misma familia, incluyendo las quinastas JNK y ERK, que se activan en respuesta a la señalización por el TCR, median la fosforilación de c-fos y c-jun y de los SRE y del TCF, permitiendo la ocupación de los promotores regulados por esta vía.

complejos con otras proteínas nucleares para regular la transcripción. Por otro lado, el c-fos forma un dímero con c-jun, para constituir el complejo de transcripción AP-1. La modulación de la transcripción mediada por c-myc y c-fos es rápidamente perceptible, pues puede detectarse dentro de 5 a 10 minutos después de la estimulación con PHA o con anticuerpos monoclonales anti TCR ó anti CD2. No se requiere de la síntesis de proteínas para la activación de la transcripción de c-myc o c-fos en células T, indicando que la transcripción de estos genes es regulada directamente por los

primeros eventos. Las MAPK y otros miembros de la misma familia, incluso la JNK y las quinasas Erk, que se activan en células de T en respuesta a la señalización por el TCR o por ésteres de forbol o calcio, indican que la regulación depende únicamente de la fosforilación de c-fos y c-jun, mediante la ocupación de los promotores conocidos como los elementos SRE y TCF (Figura 13).

### Activación de genes de citoquinas

Muchas de las manifestaciones más prominentes de la activación de la célula T son mediadas por productos derivados de estas células, proteínas solubles secretadas, genéricamente designadas como linfoquinas o citoquinas. Estas ejercen una gran diversidad de efectos en muchos tipos de células y tejidos. Individualmente las células T secretan diferentes citoquinas en respuesta a estímulos similares. Mientras los patrones de citoquinas pueden reflejar perfiles de proteínas secretadas por las dos subpoblaciones mayores de las células T (Th1 y Th2), la base molecular para la heterogeneidad en la expresión inducida de estos genes, sólo se entiende parcialmente. Diferencias en expresión de factores reguladores específicos de tejidos, dan cuenta de algunas de estas diferencias en expresión. Por ejemplo, la persistencia del factor de transcripción GATA-3 está asociada con el fenotipo Th2. La expres-



**Figura 14.** Promotor de la IL-2. Se presenta la secuencia nucleotídica de la región promotora del gen de la IL-2, la cual contiene las regiones consenso para la unión de los diferentes factores de transcripción necesarios para su expresión (Número de acceso en el GeneBank AF031845).

sión selectiva del factor de transcripción c-Maf en presencia de NIP45, una proteína capaz de unir a NF-AT y NF-A, también está asociada con la activación de transcripción específica del gen de la IL-4. Alternativamente, el IFN $\gamma$  y la IL-12 son citoquinas que predominantemente favorecen el patrón Th1. Estas citoquinas podrían influir positivamente o negativamente en otro grupo de factores de transcripción, afectando la expresión de GATA-3 y/o c-Maf.

No obstante la participación de diferentes citoquinas en la regulación de la función de la célula T y la respuesta inmune, los mecanismos de regulación mejor entendidos son los relacionados con la expresión de la IL-2, ya que ésta cumple un papel fundamental como eje de la activación celular. Las secuencias de DNA involucradas en la regulación del gen de la IL-

2 fueron identificadas inicialmente por su sensibilidad aumentada a la digestión con DNase I. Análisis más detallados de la regulación del gen de la IL-2 demostraron que un segmento de 275 pb antes del sitio de iniciación de la transcripción contiene la mayoría de las secuencias que regulan su activación (Figura 14). Esta región es sensible a las acciones sinérgicas de estímulos que aumentan  $Ca^{2+}$  y que activan PKC o Ras. Diferentes estudios señalan que los productos de genes tempranos inmediatos son necesarios para la activación del gen de la IL-2. La necesidad de activar factores como c-Fos y las AP-1, da cuenta parcial de este requisito.

### *Expresión de nuevas moléculas de superficie*

Varias moléculas aparecen en la superficie de la célula de T en momentos diferentes, dependiendo de su activación, diferenciación y proliferación. Estas moléculas incluyen receptores de citoquinas como el CD25 (cadena  $\alpha$  del IL-2R), moléculas coestimuladoras (CD152, CD154, ICOS) receptores de insulina, de transferrina y antígenos del CMH clase II, entre otros; algunas otras, también se modulan transitoriamente durante la activación de varios tipos celulares, pero su función es desconocida, como es el caso de la molécula CD69. Estas proteínas juegan papeles diferentes en el crecimiento, diferenciación y función de células T después de la activación. Su cinética de aparición difiere notablemente; en algunos casos, aparecen dentro de minutos a horas después del estímulo, como el CD25 y el CD69 y otras aparecen sólo después de días, como VLA-2.

Además de la expresión de moléculas nuevas de superficie en la célula, la aparición de epítopes antigénicos nuevos en moléculas ya existentes en la superficie de la célula, indican un

mecanismo funcionalmente diferente. Concomitante con la activación de la célula T, ciertos receptores expresan nuevos epítopes, como es el caso del epítipo T113 del CD2, que se descubre probablemente como resultado de un cambio alostérico. Otro mecanismo responsable para la expresión de estos epítopes es la edición alternativa de exones en el RNAm, como ocurre para CD45 según se describió antes.

De los elementos que se regulan durante la activación, el que mejor se ha estudiado es el CD25, una glicoproteína de 55 kDa cuya expresión se incrementa después que las células T salen de la fase G0 del ciclo celular. El hallazgo que por lo menos tres sitios distintos de iniciación de la transcripción inducen la transcripción de este gen, sugiere que las diferentes vías involucradas en la activación de la célula T pueden influir en su expresión. Dentro de estas secuencias se identificó, en la región promotora, un sitio de unión para NF- $\kappa$ B que parece jugar un papel crítico en la expresión de CD25.

Debido a que la regulación de la IL-2 y de la cadena  $\alpha$  de IL-2R es diferente, siendo la del receptor menos exigente, una vez se expresa la IL-2 puede ejercer funciones paracrinas sobre células que se han activado previamente aún expresando niveles bajos de IL-2R. Este efecto paracrino también es la explicación más aceptada para la sinergia observada entre células CD4<sup>+</sup> productoras de IL-2 con los precursores CD8<sup>+</sup> de linfocitos citotóxicos que generalmente no producen cantidades abundantes de esta citoquina.

### **FUNCIONES DE LA IL-2**

Uno de los eventos más importantes durante la respuesta inmune es la proliferación de clones de células T específicas de antígeno. Las

frecuencias de los precursores específicos de las células T son bajas en cualquier tejido linfático periférico de un individuo que no ha tenido contacto previo con el antígeno. La expansión de las células con capacidad de identificar un antígeno, así como la activación de células de memoria, es crítica para una respuesta inmune específica eficaz y duradera. La proliferación debe regularse y debe limitarse principalmente a las células específicas para el antígeno que desencadenó el estímulo. Esto ocurre mediante la regulación de la producción de citoquinas que funcionan como factores de crecimiento, así como por la regulación de la expresión de los receptores para estas citoquinas, como se describió anteriormente.

La interacción de la IL-2 con su receptor juega un papel importante en la regulación de la proliferación de la célula T específica de antígeno. Una vez las células T inician la secreción de IL-2, esta citoquina puede actuar de manera autocrina o paracrina, facilitando su expansión clonal y modulando la respuesta de otras células. Entre estas, se incluyen células T activadas que producen bajos niveles de IL-2 (células CD8+), células T que se activaron previamente y que expresan niveles bajos del receptor de alta afinidad IL-2R (es decir células T de memoria), células B o células NK y se pueden modular las funciones de los macrófagos que también expresan dicho receptor.

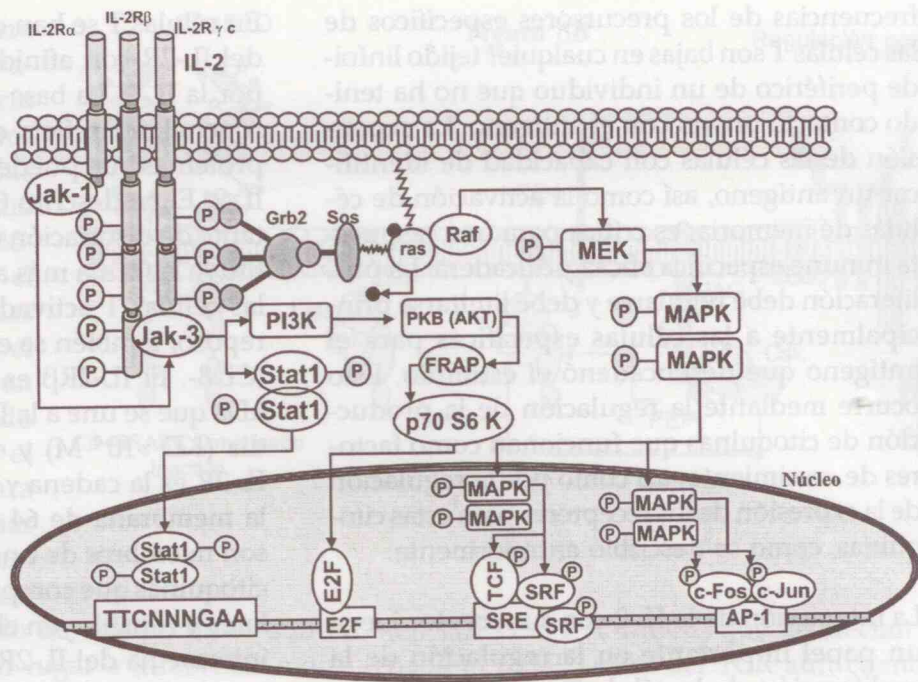
Mientras que el estímulo del TCR induce el paso de células T vírgenes de G0 a G1 y la expresión de la cadena  $\alpha$  o de alta-afinidad del IL-2R, puede decirse que la función de la IL-2 es promover el ciclo replicativo (desde G1, pasando por S, G2 hasta M) de la célula que ha sido activada. Aunque la IL-2 no es la única citoquina capaz de inducir proliferación de la célula T, si es considerada la más importante, ya que en su ausencia no se da la activación adecuada de los LT.

En células T se han descrito tres componentes del IL-2R con afinidades de unión diferentes por la IL-2. La base molecular para esta heterogeneidad refleja el hecho de que hay tres proteínas que pueden contribuir a la unión de IL-2. El ya descrito CD25 que tiene una constante de disociación (KD) de  $10^{-8}$  M y que constituye la forma más abundante de los IL-2R en las células T activadas pero no en células en reposo; también se expresa en timocitos CD4-/CD8-. El IL-2R $\beta$  es una glicoproteína de 70 kDa que se une a la IL-2 con afinidad intermedia (KD  $\gg 10^{-9}$  M) y el tercer componente del IL-2R es la cadena  $\gamma$ , una proteína integral de la membrana de 64 kDa. Estas cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  son miembros de una familia de receptores de citoquinas que comparten dominios extracelulares y constituyen el componente de afinidad intermedia del IL-2R que se encuentra en bajos niveles en las células T vírgenes, células NK y células B. Las formas de más alta afinidad de los IL-2R son dependientes de la presencia de las tres cadenas y su conformación es inducida por la unión de la IL-2.

La importancia del receptor de la IL-2 se ha hecho evidente mediante estudios de mutaciones en la cadena  $\gamma$ , las cuales son responsables de la mayoría de los casos del síndrome de inmunodeficiencia combinada severa asociada al cromosoma X (XSCID). Sin embargo, la severidad de la enfermedad no sólo depende de la incapacidad de mediar los efectos de la IL-2, sino del hecho que la cadena  $\gamma$  es un componente común a varios receptores de citoquinas, incluidos los receptores para IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Estas citoquinas juegan papeles críticos en el desarrollo tanto de las células T como de las B. También se han desarrollado ratones "knock-out" en las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del IL-2R, en los cuales se observan alteraciones severas en el sistema inmune con muchas manifestaciones de autoinmunidad, lo cual, aunque no termina de explicarse del todo,

resalta la importancia de la señalización mediante el IL-2R en el mantenimiento de la homeostasis y regulación del sistema inmune.

La transducción de la señal del IL-2R es esencialmente dependiente de las cadenas  $\gamma$  y  $\beta$ , pues la cadena  $\alpha$  tiene un dominio citoplásmico relativamente corto y su función principal parece ser, establecer la mayor afinidad del receptor por la IL-2. Los dominios citoplásmicos de las cadenas  $\gamma$  y  $\beta$  no tienen ninguna actividad enzimática, actúan recíprocamente con proteínas citoplásmicas para iniciar las señales requeridas para inducir la proliferación y la diferenciación celular. Estas cadenas involucran en su señalización a las proteínas citoplásmicas JAK y a factores de transcripción de la familia conocida como STAT. La dimerización de las cadenas  $\gamma$  y  $\beta$  del IL-2R permite la exposición de regiones conservadas, adyacentes a la membrana plasmática que se encargan de activar recíprocamente a JAK3 y JAK1. A su vez, esto induce la fosforila-



**Figura 15. La IL-2 activa la vía JAK-STAT.** La transducción de la señal del IL-2R se considera que es esencialmente dependiente de las cadenas  $\gamma$  y  $\beta$ , pues la cadena  $\alpha$  tiene un dominio citoplásmico relativamente corto, y su función principal parece ser el aumento de la afinidad del receptor por la IL-2. Las cadenas  $\gamma$  y  $\beta$  del IL-2R involucran en su señalización a unas proteínas citoplásmicas de la familia JAK y proteínas activadoras de transcripción (STAT). La dimerización de las cadenas  $\gamma$  y  $\beta$  del IL-2R permite la exposición de regiones conservadas que son adyacentes a la membrana plasmática y son responsables de activar recíprocamente a JAK3 y JAK1, mediante su fosforilación en residuos de tirosina. Esto induce la fosforilación de dos proteínas de STAT5. Aunque no está claro cómo las proteínas STAT se asocian con JAK1 y JAK3 o con la cadena del receptor, se ha evidenciado la necesidad de la fosforilación de tirosinas específicas dentro de la cadena  $\beta$  del IL-2R para mediar la fosforilación de STAT5. JAK1 y JAK3 pueden mediar la fosforilación de la cadena  $\beta$  del receptor para reclutar a los STAT5. Las proteínas STAT5 fosforiladas pueden formar homo o heterodímeros mediante los dominios de unión SH2, uniendo la tirosina fosforilada del otro monómero de STAT, lo que permite la exposición de una señal de localización nuclear oculta que permite que los dímeros de STAT se transloquen. En el núcleo se unen a secuencias de DNA específicas contribuyendo a la activación de la transcripción de genes blanco. Varios eventos adicionales han sido asociados con transducción de señales mediadas por el IL-2R. Además de la activación del sistema de JAK-STAT, el estímulo del IL-2R puede activar otras quinasas como Lck, Lyn y Syk. Estos eventos median la activación de c-Fos/c-Jun. Además, de las quinasas los dominios SH2 de la subunidad p85 de la  $PI_3$ -quinasa también actúan recíprocamente con residuos de tirosina sobre la cadena  $\beta$ . El papel de  $PI_3$ -quinasa en la función del linfocito T, y las múltiples sendas que se activan corriente abajo involucran a Akt/PKB.

ción de dos proteínas STAT5. Aunque no está claro cómo las proteínas STAT se asocian con JAK1 y JAK3 o con las cadenas del receptor, se ha evidenciado la necesidad de la fosforilación de tirosinas específicas dentro de la cadena  $\beta$  del IL-2R para mediar la fosforilación de STAT5. Aparentemente JAK1 y JAK3 inducen la fosforilación de la cadena  $\beta$  del receptor para reclutar a STAT5. Las proteínas STAT5 fosforiladas pueden formar homo o heterodímeros, mediante sus dominios de unión SH2 que unen la tirosina fosforilada del otro monómero de STAT. Esta dimerización de STAT permite la exposición de una señal de localización nuclear oculta que finalmente conduce a que los dímeros de STAT se trasladen al núcleo donde se unen a secuencias de DNA específicas, contribuyendo a la activación de la transcripción de genes blanco (Figura 15).

Varios eventos adicionales han sido asociados con la transducción de señales mediadas por el IL-2R. Además de la activación del sistema de JAK-STAT, el estímulo del IL-2R puede activar otras quinasas como Lck, Lyn y Syk. Se piensa que las quinasas Src actúan recíproca y directamente con Syk sobre una región rica en serinas dentro de la cadena  $\beta$  del IL-2R. Estas interacciones se correlacionan con la activación de las proteínas c-Fos/c-Jun y Myc. Sin embargo, ratones deficientes para Lck, Fyn o Syk tienen una respuesta normal del IL-2R, lo cual sugiere que la vía de JAK-STAT puede sobrepasar los efectos de las vías alternas.

## REGULACIÓN DE LA RESPUESTA Y ANERGIA DEL LINFOCITO T

Para cualquier organismo es fundamental poseer mecanismos que limiten la activación, tanto en tiempo como en intensidad, de la respuesta inmune debido a las consecuencias deletéreas que ésta puede tener sobre distintas

células y tejidos. Puesto que las células T son el elemento central de dicha respuesta, la regulación negativa de la función de dichas células es un mecanismo importante para evitar que la respuesta inmune se extienda indefinidamente o sea más intensa de lo requerido. Se ha considerado que el primer indicio para la finalización de esta respuesta es el agotamiento o eliminación del antígeno. Aunque los mecanismos reguladores relacionados con la señalización intracelular apenas se están explorando, cabe mencionar los mecanismos identificados.

Como hemos visto, los eventos de señalización que son inducidos durante el reconocimiento del antígeno involucran la fosforilación de residuos de tirosina, de serina y de treonina. Las quinasas que fosforilan estos aminoácidos deben existir en equilibrio con las fosfatas respectivas, las cuales además de remover los fosfatos que median la activación, promueven la relocalización de los substratos a su posición inicial. Dentro de éstas, se encuentran fosfatasas con dominios SH2, como SHP-1 y SHP-2, que para cumplir su función requieren la propia fosforilación sobre residuos de tirosina; a su vez, esto las convierte en blanco de otras proteínas reguladoras, mediante el reconocimiento de sus dominios SH2. Los ratones que son deficientes en SHP-1 tienen una enfermedad letal caracterizada por un sistema inflamatorio excesivamente activo y alteraciones funcionales en el timo debido a la hiporespuesta de Src en timocitos.

Un ejemplo importante, es la molécula CTLA-4 (CD152) que puede actuar recíprocamente con fosfatasas SHP-2. Es regulada positivamente durante la activación de la célula T y, aunque su papel en la activación celular ha sido objeto de controversias, su función en la regulación negativa se ha demostrado mediante ratones deficientes en ella, los cuales desarrollan un síndrome linfoproliferativo que se asocia a la activación policlonal de las células T.

CTLA-4 actúa como regulador negativo para suprimir la respuesta de células T, mediante el reclutamiento de fosfatasa SHP-2 sobre la membrana plasmática, donde estas pueden actuar sobre sustratos asociados con el complejo TCR/CD3. Aunque las células T CD4+ y CD8+ activadas expresan 10 – 100 veces menos la molécula CTLA-4 que CD28, la primera se enlaza al B7-1 y al B7-2 con una afinidad que puede llegar a ser 100 veces mayor. Las células T en reposo también expresan esta molécula, pero buena parte de ella se mantiene de manera intracelular y su salida a la superficie parece ser estrictamente dependiente de la IL-2. Esto demuestra que la misma IL-2 participa en los mecanismos de retroalimentación negativa para prevenir la hiperreactividad de las células T.

Para la terminación de la respuesta de las células T también intervienen otras proteínas como Csk, la cual se mencionó previamente. Ésta es una quinasa con capacidad de fosforilar sitios reguladores negativos de otras quinasas como por ejemplo la Lck. Aunque Csk no es regulada mediante su fosforilación, su función depende de sus dominios SH2 y SH3, los cuales pueden servir de blanco para moléculas inhibitoras después de iniciarse la respuesta celular.

El estímulo bajo ciertas condiciones *in vivo* o *in vitro* de las células T, ha demostrado que la estimulación inadecuada de las células T lleva a un estado de incapacidad reversible de respuesta que es conocido como anergia. Este estado puede ser inducido únicamente cuando se le dan señales parciales a las células T como la estimulación mediante el TCR en ausencia de señales coestimuladoras. El fenómeno más preponderante de la anergia es la incapacidad de producir IL-2, lo cual bloquea la proliferación de las clonas específicas de los antígenos. Este estado de anergia puede ser inducido en

clonas de células T estimuladas con péptidos alterados, anticuerpos monoclonales contra el TCR ó el CD3 o con citoquinas.

La naturaleza y el contexto del estímulo también son factores críticos en la inducción de anergia. Para inducir anergia se han utilizado antígenos presentados en la superficie de células epiteliales tratadas con IFN- $\gamma$ , el cual modula positivamente la expresión de moléculas del CMH clase II; también se han utilizado membranas de lípidos planares que expresan CMH clase II. En ambos casos, se pretende realizar una presentación antigénica que estimule lo suficiente a las células T CD4+ para generar células T específicas de antígeno pero que sean incapaces de proliferar. Sin embargo, la inactivación no es completa, ya que estas células producen cantidades moderadas de IFN $\gamma$  e IL-3, en respuesta al antígeno aunque no producen IL-2. Es más, la proliferación puede restaurarse mediante el suministro exógeno de IL-2.

Aunque no se ha establecido con certeza el mecanismo responsable de la inducción de anergia, se han propuesto varias alternativas. El reconocimiento del antígeno en ausencia de las señales coestimuladoras adecuadas como es la interacción entre CD28 y B7-1 ó B7-2, impide una activación completa del LT y por lo tanto es incapaz de producir IL-2. De otro lado, los péptidos alterados también pueden inducir un estado de anergia aún en presencia de una apropiada señal coestimuladora. Otros estudios hacen pensar que un defecto en la activación de Ras, con consecuencias en la activación de MAPK y en la activación de JNK, posterior al estímulo del TCR, se pueda asociar con la inducción de anergia. La incapacidad para activar Ras y MAP quinasas ayuda a explicar los resultados que muestran disminución en la ocupación de sitios AP-1 en clonas de células T anérgicas.



Los mecanismos mediante los cuales el CD28 modula la función celular tienen pocos elementos específicos de esta vía. La unión de B7-2 ó de B7-1 con el CD28 induce la activación de la  $PI_3$ -K y de Grb2-Sos-Ras; a su vez, Grb2 une a LAT y activa a PLC $\gamma$ 1 en forma similar a como ocurre durante la activación del TCR, lo cual induce la movilización de calcio y los eventos que se mencionaron anteriormente. Sin embargo, el CD28 tiene como evento específico la activación de las quinasas JNK1 y JNK2, lo que conduce a la transactivación de AP-1. Esta vía se considera como la mediadora de la activación del elemento CD28RE, estrechamente relacionado con el NF- $\kappa$ B. Así, la activación de los elementos CD28RE parece ser exclusiva del CD28, mientras que la del NF- $\kappa$ B, es redundante entre el CD28 y la PKC $\theta$ .

## RESUMEN

La activación de las células T se inicia por la formación de un conglomerado molecular entre estas células y las células presentadoras de antígenos en el contexto de un péptido. Este conglomerado conduce a la formación de la sinapsis inmunológica también conocida como

SMAC. La señalización intracelular se inicia cuando el TCR reconoce el péptido específico unida al CMH, lo cual involucra además el reconocimiento de regiones no polimorfas de este CMH por parte de los correceptores CD4 o CD8. Tanto CD4 como CD8 se asocian con la quinasa de tirosinas Lck, de manera que la formación de la sinapsis permite que los complejos CD4-Lck o CD8-Lck se pongan en cercanía a los complejos TCR-CD3. Estos eventos conducen a la fosforilación de los ITAM presentes en las cadenas del CD3 y en la cadena  $\zeta$ , lo que permite el reclutamiento de las tirosina quinasas ZAP-70 y Syk. Luego se produce la fosforilación de proteínas adaptadoras tales como LAT, la cual junto con SLP-76 permite el reclutamiento de la fosfolipasa  $C\gamma$ 1 y su posterior fosforilación por las quinasas de la familia TEC. La fosfolipasa  $C\gamma$ 1 una vez activada hidroliza el fosfolípido de membrana  $PIP_2$  para generar DAG e  $IP_3$ ; este último induce un rápido incremento del calcio intracelular, el cual junto con otras cascadas de señalización activa distintos factores de transcripción (NF-AT, NF $\kappa$ B y AP-1). Estos factores inducen la expresión de una amplia gama de genes, pero en particular aquellos de citoquinas que a su vez activan la replicación y diferenciación de los linfocitos T.

## LECTURAS RECOMENDADAS

1. Alonso A, Rahmouni S, Williams S. Tyrosine phosphorylation of VHR phosphatase by ZAP-70. *Nat Immunol.* 2003;4:44-48.
2. Asada H, Ishii N, Sasaki Y. Grf40, A novel Grb2 family member, is involved in T cell signaling through interaction with SLP-76 and LAT. *J Exp Med* 1999;189:1383-1390.
3. Astoul E, Edmunds C, Cantrell DA, Ward SG.  $PI_3$ -K and T-cell activation: limitations of T-leukemic cell lines as signaling models. *Trends Immunol* 2001;22:490-496.
4. Bi K, Altman A. Membrane lipid microdomains and the role of PKC $\theta$  in T cell activation. *Semin Immunol* 2001;13:139-146.
5. Billadeau B, Leibson P. ITAM versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *J Clin Invest* 2002;109:161-168.
6. Brown M, Shaw S. T-cell activation: interplay at the interface. *Curr Biol* 1999;9:R26-R28
7. Chatila T, Silverman L, Miller R, Geha R. Mechanisms of T cell activation by the calcium

- ionophore ionomycin. *J Immunol* 1989;143:1283-1289.
8. Davis M, Krogsgaard M, Ehrlich L. Dynamics of cell surface molecules during T cell recognition. *Annu Rev Biochem* 2003;72:717-742
  9. Feske S, Giltman J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2001;2:316-324.
  10. Frauwirth K, Thompson C. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest* 2002;109:295-299
  11. Hermiston M, Xu Z, Majeti R, Weiss A. Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases. *J Clin Invest* 2002;109:9-14
  12. Komada H, Nakabayashi H, Hara M et al. Mechanisms of interleukin-2-mediated signaling and role of calcium in T cell mitogenesis. *Immunol Invest* 1985;14:435-442.
  13. Latour S, Veillette A. Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr Opin Immunol* 2001;13:299-306
  14. Leo A, Wienands J, Baier G, Horejsi V, Schraven B. Adapters in lymphocyte signaling. *J Clin Invest* 2002;109:301-309
  15. Rudd C, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev* 2003; July.
  16. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003;21:305-334.
  17. Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol Res* 1999;19:1-24.
  18. Wilson I, Garcia C. T-cell receptor structure and TCR complexes. *Curr Opin Struct Biol* 1997;7:839-848.