

Received: 2006.07.25  
Accepted: 2006.12.26  
Published: 2007.02.16

## Rola cząsteczki CD28 w tolerancji immunologicznej\*

### The role of the CD28 molecule in immunological tolerance

Anna Korecka<sup>1</sup>, Anna Duszota<sup>1</sup>, Grażyna Korczak-Kowalska<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Zakład Immunologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

<sup>2</sup> Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Transplantologii, Akademia Medyczna w Warszawie

#### Streszczenie

Cząsteczka CD28 jest glikoproteiną obecną przede wszystkim na limfocytach T. Spełnia liczne funkcje w organizmie, z czego najistotniejszą jest rola kostymulatora w aktywacji limfocytów T. Wiążąc się z ligandami B7-1 (CD80) oraz B7-2 (CD86) obecnymi na komórkach prezentujących antygen (APC) zapewnia niezbędny do aktywacji limfocytów T drugi sygnał oraz ułatwia bliską apozycję błon komórkowych APC i limfocyta T. Kostymulacja poprzez CD28 zwiększa transkrypcję i stabilność mRNA IL-2, ekspresję białek antyapoptotycznych Bcl-X<sub>L</sub>, (podtrzymując przez to proliferację aktywowanych limfocytów T), a także zmienia polaryzację limfocytów Th w kierunku Th2. CD28 funkcjonuje głównie jako regulator pozytywny aktywacji limfocytów T, odkryto jednak, że wpływa na negatywną selekcję obwodowych limfocytów T. Sygnały CD28 przyczyniające się do ekspansji klonalnej oraz funkcji efektorowych, czynią jednocześnie limfocyty T bardziej podatnymi na śmierć komórki indukowaną aktywacją – AICD. Przy aktywacji limfocytów T na skutek silnego sygnału TCR, sygnały CD28 redukują ekspansję limfocytów T, zwiększając apoptozę i ułatwiają tolerancję. Limfocyty T CD8+ pozbawione antygeny CD28 pełnią w organizmie funkcję limfocytów regulatorowych.

Blokada interakcji CD28-B7 może być użyteczna w zapobieganiu niepożądaney aktywacji układu immunologicznego w alergiach, po transplantacji oraz w wielu chorobach autoimmunizacyjnych. Ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się przeciwciałom monoklonalnym anti-CD28 i możliwościom leczenia nimi pacjentów z chorobami autoimmunizacyjnymi oraz po przeszczepach.

#### Słowa kluczowe:

CD28 • kostymulacja • limfocyt T

#### Summary

The CD28 molecule is a glycoprotein presented mainly on T lymphocytes. It performs several functions in the organism, an important one being its role of costimulator for the activation of T lymphocytes. Binding with B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) ligands on antigen-presenting cells (APCs) induces the second signal essential for the activation of T lymphocytes and facilitates close apposition of the cell membranes of the APC and T cell. Costimulation through CD28 enhances the transcription and stability of IL-2 mRNA, the expression of Bcl-X<sub>L</sub> antiapoptotic molecules (thus supporting the proliferation of activated T lymphocytes), and also changes the polarization of Th lymphocytes towards the Th2 type. CD28 is mainly a positive regulator of T-cell activation, but it was also found to influence the negative selection of peripheral T lymphocytes. CD28 signals contributing to clonal expansion and effector functions make T cells more sensitive to activation-induced cell death (AICD). When T lymphocytes are involved as a result of a strong TCR signal, the CD28 signal reduces the expansion of T cells, enhances apoptosis, and

\* Praca finansowana z projektu badawczego MNiI nr 3 PO5B 07425.

facilitates tolerance. CD8+ T lymphocytes, which lack the CD28 marker, play the role of regulatory cells.

Blockade of the CD28-B7 interaction could be useful in preventing undesirable activation of the immune system in allergies, after transplantation, and in autoimmune diseases. Recently, more and more attention is being paid to anti-CD28 monoclonal antibodies and the possibilities of treating patients with autoimmune diseases and patients after transplantation.

**Key words:** CD28 • costimulation • lymphocyte T

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_61/10123.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10123.pdf)

**Word count:** 4798

**Tables:** –

**Figures:** –

**References:** 41

**Adres autorki:** mgr Anna Korecka, Zakład Immunologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: akorecka@biol.uw.edu.pl

**Wykaz skrótów:** **APC** – komórka prezentująca antygen (antigen presenting cell); **DC** – komórka dendrytyczna (dendritic cell); **IFN** – interferon; **IL** – interleukina; **mAb** – przeciwciało monoklonalne; **MHC** – główny układ zgodności tkankowej (major histocompatibility complex); **TCR** – receptor limfocyty T (T cell receptor); **Th** – limfocyt T pomocniczy; **TNF** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor).

## 1. WPROWADZENIE

Cząsteczka CD28 (początkowo znana jako Tp44) po raz pierwszy została scharakteryzowana w 1980 r. przez Hansena jako nowy antygen powierzchniowy limfocytów T [9]. Dalsze badania ujawniły jego kostymulującą rolę w aktywacji tych komórek. CD28 to glikoproteina o masie 44 kDa, wiążąca się z ligandami B7-1 (CD80) oraz B7-2 (CD86) obecnymi na komórkach prezentujących antygen – APC (makrofagi, komórki dendrytyczne, limfocyty B). CD28 pełni liczne role i ma ogromne znaczenie w sprawnym funkcjonowaniu systemu immunologicznego [9].

CD28 wywiera bezpośrednie działanie na progresję cyklu komórkowego, aktywację czynników transkrypcyjnych NF-AT, NF-κB, AP-1, MYC, FOS i JUN, przebudowę chromatyny i demetylację DNA [1]. Pośrednio wpływa na różnicowanie cytotoksycznych limfocytów T, ekspansję klonalną, ekspresję innych immunoreceptorów. Zapobiega reakcji nadwrażliwości. Zmienia polaryzację limfocytów Th na korzyść Th2. W odpowiedzi humoralnej wpływa na przełączanie izotypu oraz hipermutacje somatyczne [1].

## 2. STRUKTURA I EKSPRESJA

### 2.1. Struktura molekuli CD28

Cząsteczka CD28 należy do nadrodziny immunoglobulin. Homologi ludzkiego genu kodującego to białko wykryto u wielu zwierząt, w tym u myszy, gdzie występuje do 77% podobieństwa z ludzkim genem. Ludzka cząsteczka CD28 jest glikoproteina o masie cząsteczkowej 44 kDa i ma strukturę homodimeru. Zbudowana jest z pojedynczej pozakomórkowej domeny w kształcie litery V, zawierającej wiązania dwusiarczkowe i motyw MYPPPY niezbęd-

ny do wiązania liganda B7, oraz z części błonowej i krótkiej domeny cytoplazmatycznej [3].

Cytoplazmatyczna domena monomerycznego CD28 składa się z 41 aminokwasów [11]. W przeciwieństwie do czynników wzrostu, nie ma aktywności kinazy, nie ma również wewnętrznej aktywności katalitycznej. Zawiera natomiast swoiste miejsca fosforylacji seryny/treoniny oraz ściśle konserwatywną sekwencję – motyw YNMN zaangażowany w rekrutację kilku wewnątrzkomórkowych kinaz, włączając w to lipidową kinazę PI3 (phosphatidylinositol 3-kinase) [3].

### 2.2. Glikozylacja molekuli CD28

Glikozylacja ma zasadnicze znaczenie dla dojrzewania białek i sortowania ich do organelli docelowych. Reguluje ponadto rozmieszczenie receptorów w obrębie synapsy immunologicznej oraz ich swoiste modyfikacje wzmacniające wiązanie ligandów. Prawie 50% masy molekularnej cząsteczki CD28 stanowi N-glikan. W razie zablokowania N-glikozylacji (mutacja punktowa lub inhibitory), znacznie zwiększa się zdolność cząsteczki CD28 do wiązania się z B7-1 (CD80) znajdującym się na komórce prezentującej antygen (APC), a stymulacja poprzez hipoglikozylowaną molekułę CD28 silniej indukuje aktywność promotora IL-2. Zatem N-glikozylacja reguluje negatywnie interakcje CD28-B7-1, zmniejszając tym samym sygnał przekazywany poprzez CD28. Przypuszcza się również, że N-glikany regulują gęstość skupiania się molekuł CD28 po ligacji z B7-1/B7-2 [22].

### 2.3. Gen kodujący molekułę CD28

Gen kodujący molekułę CD28 ma wielkość 300 kb, podobnie jak gen kodujący cząsteczkę CTLA-4. U ludzi znajdu-

je się w obrębie prążka q33 chromosomu drugiego, u myszy w prążku C chromosomu pierwszego [14]. Składa się z czterech eksonów, z których każdy koduje swoistą funkcjonalnie domene. Co więcej, wyizolowano cztery różne produkty mRNA, będące rezultatem alternatywnego cięcia i składania oraz poliadenylacji pierwotnego transkryptu genu CD28 [9]. Ekspresja genu CD28 jest regulowana przez wiele różnych czynników transkrypcyjnych, które nie są jeszcze do końca poznane [6,7].

#### 2.4. Ekspresja markera CD28 na limfocytach T

Cząsteczka CD28 ulega konstytutywnej ekspresji na 95% komórek CD4+ i na 50% komórek CD8+ [9,11,21]. Występuje na ludzkich limfocytach w ilości  $6 \times 10^4$  cząsteczek na komórkę, dla porównania receptor TCR –  $2 \times 10^4$  cząsteczek na komórkę. Ekspresja CD28 zwiększa się po związaniu kompleksu TCR/CD3 i pod wpływem substancji naśladujących sygnały receptorowe dla limfocytów T. Związanie molekuly CD28 przez B7 podczas aktywacji limfocytów T przez APC obniża zarówno poziom mRNA cząsteczki CD28 jak i jej ekspresję powierzchniową. Ujemna regulacja mRNA jest przejściowa i trwa 4–24 godziny, podczas gdy obniżona ekspresja CD28 utrzymuje się do 48 godzin. Wydłuża to okres braku możliwości wygenerowania odpowiedzi w wyniku restymulacji CD28 i może mieć znaczenie w ograniczaniu zakresu i trwania odpowiedzi immunologicznej [9].

#### 2.5. Ekspresja CD28 na innych komórkach układu odpornościowego

Obecność markera CD28, chociaż charakterystyczną dla limfocytów T, wykazano także w innych komórkach układu odpornościowego: neutrofilach i eozynofilach [35,37,38,39]. Molekuła CD28 ekspresjonowana na neutrofilach ma taką samą masę cząsteczkową, jak molekuła CD28 limfocytów T, ale odmienną niż na eozynofilach. Neutrofile migrują do miejsca infekcji i/lub zapalenia, gdzie pełnią rozmaite funkcje. Przyczyniają się do rozwoju wielu chorób, takich jak stwardnienie rozsiane, zespół ostrego wyczerpania oddechowego oraz łuszczyca. Leczenie chorych na łuszczycę białkiem fuzyjnym CTLA-4-Ig, blokującym interakcje między CD28 oraz jego ligandami, zapobiega infiltracji komórkowej neutrofilów, co sugeruje udział CD28 w migracji tych komórek [35].

Receptor CD28 obecny na eozynofilach pełni rolę silnego aktywatora tych komórek. Sygnały płynące z CD28 indukują uwalnianie cytokin typu pierwszego (IL-2 oraz IFN- $\gamma$ ) oraz typu drugiego (IL-13) [37,38,39]. W odróżnieniu od limfocytów T wymagających sygnału kostymulującego, do aktywacji eozynofili wystarczy stymulacja samego receptora CD28.

### 3. FUNKCJE BIOLOGICZNE MOLEKULY CD28

#### 3.1. Wpływ CD28 na sygnalizację poprzez receptor TCR

Proces aktywacji limfocytów zapoczątkowany jest przez tworzenie synapsy immunologicznej (IS) między limfocytom T a komórką prezentującą antygen (APC). W obrębie synapsy dochodzi do zageszczenia receptorów TCR i stabi-

lizacji ich połączeń z kompleksami peptyd-MHC poprzez interakcje cząsteczek adhezyjnych. Obecnie uważa się, że sygnał przekazywany do wnętrza komórki poprzez CD28 ułatwia bliską apozycję błon komórkowych limfocyty T i komórki APC. Wykazano, że cząsteczka CD28 pośredniczy w adhezji komórkowej w nieobecności stymulacji TCR, co sugeruje znaczenie tej molekuly dla wczesnego kontaktu APC-TCR [2].

Do optymalnej aktywacji limfocytów T swoistych antygenowo są niezbędne dwa sygnały. Po swoistym rozpoznaniu antygenem przez TCR, kompleks CD3 inicjuje transdukcję sygnału pierwszego. Sygnał drugi, który może być zarówno stymulujący jak i hamujący, jest zapewniany przez molekuły kostymulujące, m.in. cząsteczkę CD28 i CTLA-4 [3,29]. Związanie receptora TCR w nieobecności sygnałów CD28 prowadzi do apoptozy lub anergii. Przy małej częstości pobudzania receptora TCR, CD28 zapewnia potężny sygnał synergiczny prowadzący do efektywnej aktywacji czynników transkrypcyjnych, takich jak NF- $\kappa$ B, NF-AT, oraz białko aktywatorowe AP-1, które z kolei kontrolują proliferację komórki, śmierć i różnicowanie [1,9]. Natomiast przy silnej lub długotrwałej stymulacji, kostymulacja CD28 nie zawsze jest wymagana do aktywacji limfocytów T [27]. Jednakże aktywacja za pomocą słabych agonistów lub przy małej koncentracji peptydu jest zależna od kostymulacji CD28 [27].

#### 3.2 Wpływ CD28 na wytwarzanie IL-2

Molekuła CD28 wpływa na proliferację i wytwarzanie cytokin przez limfocyty CD4+ oraz CD8+. Kostymulacja zwiększa proliferację obydwu populacji limfocytów, ale zwiększenie wytwarzania cytokin, w tym IL-2, obserwuje się głównie wśród limfocytów CD4+. Następuje tu czterdziestokrotne zwiększenie wydzielania IL-2 natomiast limfocyty CD8+ w wyniku kostymulacji zwiększają wytwarzanie IL-2 około pięciokrotnie [26]. IL-2 jest czynnikiem wzrostu limfocytów Th, NK oraz limfocytów T regulatorowych. Zdecydowanie najważniejszą funkcją IL-2 jest jednak pobudzanie proliferacji limfocytów T cytotoksyicznych CD8+.

CD28 wzmacnia wytwarzanie IL-2 i ekspresję IL-2R oraz przyspiesza rozpoczęcie i przebieg cyklu komórkowego [1]. Kostymulacja CD28 znacząco zwiększa transkrypcję genów IL-2 oraz TNF- $\beta$  w naiwnych limfocytach CD4+, natomiast nie wpływa na wytwarzanie cytokin w efektorowych/limfocytach pamięci CD4+ [26]. Zdolność CD28 do promowania wytwarzania IL-2 wymaga sprawnego motywu wiążącego kinazę Lck [31].

#### 3.3. Wpływ CD28 na polaryzację limfocytów Th

Limfocyty Th zawierają na swojej powierzchni cząsteczkę CD4 biorącą udział w wiązaniu cząsteczki MHC klasy II. Limfocyty te, po określonej liczbie podziałów, mogą się różnicować w dwóch kierunkach – działających prozapalnie Th1 i przeciwzapalnych Th2, zależnie od swoistych cytokin polaryzujących, niezbędnych do efektywnej indukcji czynników jądrowych T-bet oraz GATA3. Limfocyty Th1 wytwarzają m.in. cytokiny IFN- $\gamma$  oraz TNF- $\alpha$ , działające głównie na aktywację makrofagów. Th2 biorą natomiast udział w indukcji odpowiedzi humoralnej – wytwarza-

ją IL-4, IL-5 i IL-6, niezbędne do dojrzewania i różnicowania limfocytów B. Wykazano, że ekspresja czynnika GATA3 wymaga obecności czynnika NF- $\kappa$ B z jednoczesnym sygnałem płynącym od CD28. Zatem sygnał z molekuly CD28 faworyzuje różnicowanie komórek Th w limfocyty Th2 [27].

### 3.4. Wpływ CD28 na apoptozę

Przekazanie sygnału z kompleksu TCR nie zawsze musi prowadzić do aktywacji limfocyty. Jego konsekwencją może być wejście w stan anergii lub apoptoza. Proces ten odgrywa główną rolę w selekcji tymocytów w grasicy, jednak również obwodowe limfocyty mogą reagować apoptozą na sygnał TCR. Warunkiem sprzyjającym apoptozie tych komórek jest duża ilość antygeny przy jednoczesnym braku czynników prozapalnych, wśród których w warunkach fizjologicznych znajdują się również cytokiny przeciwapoptotyczne.

Jednymi z głównych mediatorów apoptozy limfocytów T są cząsteczki Fas/FasL uczestniczące w wyzwalaniu tzw. śmierci komórek indukowanej aktywacją (activation induced cell death - AICD). AICD jest wyzwalana w komórce przez połączenie cząsteczki Fas znajdującej się na jej powierzchni z FasL tej samej lub innej komórki. Stymulacja TCR/CD3 wcześniej aktywowanego limfocyty (reaktywacja) indukuje ekspresję FasL na komórce i sprzyja połączeniu FasL z Fas. Powoduje to rekrutację molekuł efektorowych do domeny cytoplazmatycznej Fas i aktywację komórkowej kaspazy 8, co uruchamia kaskadę kaspaz wiodącą do apoptozy komórki.

Limfocyty T CD4<sup>+</sup> myszy z wyłączonym genem CD28 są bardzo wrażliwe na apoptozę indukowaną przez Fas. Cząsteczka CD28 zapewnia ochronę przed apoptozą z udziałem Fas dzięki aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej z udziałem kinaz PI3 oraz Akt. Limfocyty T wykazujące ekspresję aktywnej Akt są odporne na apoptozę za pośrednictwem Fas zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Aktywność Akt hamuje rekrutację kaspazy 8, czego rezultatem jest blokada kaskady apoptotycznej w myszach transgenicznych Akt [17].

Kaskada kaspaz może być uruchomiona również przez zwiększenie przepuszczalności błon otaczających mitochondrium. W regulacji przepuszczalności tych błon uczestniczą białka błonowe należące do rodziny Bcl. Niektóre z tych białek (np. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) zwiększają prawdopodobieństwo przeżycia komórki, inne (np. Bak i Bax) doprowadzają komórkę do apoptozy. CD28 promuje przetrwanie limfocytów T, przez wzmacnianie ekspresji Bcl-X<sub>L</sub>, który z kolei zapobiega indukowanej przez Fas śmierci komórki. Mechanizm w jaki CD28 reguluje indukcję Bcl-X<sub>L</sub> pozostaje nieznan. Mimo że sygnalizacja poprzez TCR jest wystarczająca do stymulacji transkrypcji mRNA Bcl-X<sub>L</sub>, CD28 poprzez aktywację kinazy PI3 zapewnia krytyczny sygnał regulujący translację transkryptu Bcl-X<sub>L</sub> [9].

Apoptoza może być też indukowana w limfocytach obwodowych, gdy występuje częsta lub stała stymulacja antygenowa. Takie wywołanie apoptozy, zależne od stymulacji antygenowej, jest ważne w regulacji puli limfocytów obwodowych. Dowiedziono, że duże dawki antygeny lub

silne wiązanie TCR może doprowadzić do osłabienia odpowiedzi limfocytów T na skutek utraty części nowo zaktwowanych przez antygen limfocytów za pośrednictwem apoptozy. Wykazano, że w procesie tym może uczestniczyć antygen CD28, zwłaszcza w sytuacji, kiedy sygnał TCR osiągnie poziom krytyczny [41].

Reasumując, kombinacja sygnałów z TCR oraz CD28 determinuje zarówno pozytywną, jak i negatywną regulację aktywności i przeżycia limfocytów T. Jeśli poziom sygnału dostarczonego w wyniku wiązania liganda jedynie przez receptor TCR jest niewystarczający, aby mógł osiągnąć próg wymagany dla aktywacji, sygnały dostarczane przez CD28 promują proliferację komórek. Jeśli poziom sygnału dostarczonego z wiązania TCR jest optymalny, CD28 zwielokrotnia proliferację. Jeśli natomiast poziom sygnału dostarczonego z wiązania TCR znacznie przekracza próg wymagany do aktywacji, sygnały z CD28 wzmacniają apoptozę [41].

### 3.5. Wpływ CD28 na selekcję limfocytów (tolerancja pierwotna)

W trakcie dojrzewania limfocytów T w grasicy zachodzi kilka etapów selekcji, w wyniku czego następuje eliminacja ponad 90% dojrzewających komórek. Proces dojrzewania można podzielić na dwa etapy: fazę wczesną (bez TCR) i późną (selekcja pozytywna i negatywna) [33].

Selekcji pozytywnej są poddawane limfocyty podwójnie pozytywne – zawierające zarówno marker CD4 jak i CD8 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). W jej wyniku dochodzi do restrykcji MHC, czyli nastawienia limfocytów T na rozpoznawanie w przyszłości antygenów prezentowanych przez autogeniczne cząsteczki MHC. W procesie selekcji pozytywnej znaczącą rolę odgrywa cząsteczka CD28. Na modelu doświadczalnym udowodniono, że nieobecność kostymulacji CD28/B7 prowadzi do nasilenia selekcji w grasicy. Molekuła CD28 hamuje bowiem różnicowanie dojrzałych limfocytów T pojedynczo pozytywnych poprzez hamowanie ich selekcji w czasie różnicowania w grasicy [33].

W grasicy, podczas rozwoju, powstają limfocyty T z receptorami swoistymi dla antygenów własnych. Selekcja negatywna polega na tym, że w celu wyeliminowania ryzyka autoimmunizacji, limfocyty zbyt silnie wiążące własne MHC klasy I i II są usuwane za pośrednictwem apoptozy [41]. Prawdopodobnie w negatywną selekcję *in vitro* są zaangażowane dwie odmienne ścieżki. Pierwsza – zależna od CD28, dla interakcji o małej zdolności wiązania, oraz druga – niezależna od CD28, dla interakcji o dużym powinowactwie [33].

Tymocyty do przeżycia potrzebują przede wszystkim sygnałów hamujących ich apoptozę. Sygnał płynący od molekuly CD28 wzmacnia ekspresję Bcl-X<sub>L</sub>, co z kolei zapobiega indukowanej przez Fas śmierci komórki, uczestnicząc tym samym w procesie nabywania przez limfocyty tolerancji na własne antygeny podczas dojrzewania limfocytów w pierwotnych narządach limfatycznych (tolerancja pierwotna) [41]. Stwierdzono, że prenatalne zablokowanie ścieżek B7-1 i B7-2 hamuje delecję klonalną limfocytów T w grasicy i prowadzi do akumulacji autoreaktywnych limfocytów T na obwodzie [33,41]. Negatywna selekcja podwójnie po-



zytywnych tymocytów jest zredukowana w odpowiedzi na antygen lub przeciwciała anty-TCR/CD3 w myszach pozbawionych CD28, co jednoznacznie wskazuje na udział CD28 w tym procesie [9,33].

### 3.6. Znaczenie molekuly CD28 w nabywaniu tolerancji obwodowej

W trakcie selekcji w grasicy część autoreaktywnych limfocytów nie ulega eliminacji, głównie dlatego, że nie wszystkie antygeny są w grasicy obecne. Niezbędne są zatem mechanizmy zapewniające nabywanie tolerancji obwodowej.

Aktywacja dziewiczego limfocyta T wiąże się z przekazaniem mu przez komórki dendrytyczną pełniącą rolę APC dwóch sygnałów: poprzez receptor TCR oraz cząsteczkę CD28 (kostymulacja) [33]. Gdy podczas przechodzenia przez tkanki obwodowe receptor TCR limfocytów nawiąże wiązkę cząsteczkę MHC bez prezentacji własnych antygenów i udziału cząsteczek kostymulujących, wiedzie to do anergii. Ponadto aktywacja limfocytów dziewiczych prowadzi do ekspresji antygeny CTLA-4, który jest źródłem sygnału negatywnego i hamuje aktywność limfocytów T. Stan anergii może mieć wiele stopni nasilenia – od obniżenia poziomu ekspresji TCR do śmierci komórki łącznie. W stanie anergii, w limfocycie zmniejsza się wytwarzanie wielu cytokin, w tym IL-2. Limfocyt nie ulega aktywacji po rozpoznaniu swoistego antygeny, nawet jeśli otrzymuje jednocześnie kostymulację wystarczającą do aktywacji limfocyta dziewiczego. Anergia na skutek braku kostymulacji jest jednym z podstawowych mechanizmów fizjologicznej tolerancji własnych antygenów na obwodzie.

## 4. LIMFOCYTY CD28<sup>-</sup>

### 4.1. Populacja limfocytów CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>

Zwiększająca się proporcja komórek CD28<sup>-</sup> została również udokumentowana w przypadku chorób związanych z chroniczną stymulacją antygenową. Przykładem może być zwiększająca się liczba komórek CD28<sup>-</sup> u osób zakażonych wirusem HIV, która może sięgać prawie 65% [10,12,18]. Sugeruje się, że dominacja komórek CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> w infekcji wirusem HIV odzwierciedla ciągle różnicowanie komórek CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> w komórki efektorowe w odpowiedzi na chroniczną wirusową stymulację [10].

Zwiększenie populacji limfocytów CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> zaobserwowano również po przeszczepie organów, w przewlekłych zapaleniach, w chorobach autoimmunizacyjnych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, w czasie infekcji, przy niedoborach immunologicznych, nadmiarze metali, w przypadkach ciężkiego alkoholizmu oraz wielu innych [5,34].

Ekspresja molekuly CD28 na limfocytach T zmniejsza się z wiekiem. Jedynie 1% limfocytów T krwi obwodowej noworodków nie wykazuje ekspresji antygeny CD28, natomiast między 77 a 99 rokiem życia odsetek ten wynosi około 25% (zakres: 3–73%) [10].

Obecnie uważa się, że limfocyty CD28<sup>-</sup> wywodzą się z komórek CD28<sup>+</sup>, które przeszły już swoją maksymalną, pro-

gramowaną liczbę podziałów komórkowych i osiągnęły limit Hayflicka [10,34]. Replikatywne starzenie (replicative senescence – RS) jest charakterystyką prawidłowych komórek somatycznych, opisującą ich skończoną i przewidywalną liczbę podziałów, zanim osiągną nieodwracalny stan zahamowania wzrostu. Przy odpowiednim odżywianiu, kultury komórek, które osiągnęły RS mogą być utrzymywane przy życiu przez wiele miesięcy, mimo braku proliferacji. Wykazano, że limfocyty T, które osiągnęły RS mają krótsze telomery podziałowe o długości 5–7 kb [10].

Chroniczna stymulacja układu odpornościowego może prowadzić do jego dysfunkcji. Jest to niebezpieczne zwłaszcza u osób starszych ze względu na inwolucję grasicy i to, że limfocyty T mogły już przejść wiele rund podziałów. Ogólnie, komórki CD28<sup>-</sup> są lepiej poznane i mają większe znaczenie wśród limfocytów CD8<sup>+</sup>, czyli tych związanych z obroną przeciwwirusową. Jednak nadal pozostaje niepewne czy ekspansja limfocytów CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> jest bezpośrednio zaangażowana w swoistą odpowiedź przeciwwirusową. Nie do końca wiadomo też jaką rolę odgrywa cząsteczka CD28 w programie starzenia się [10].

### 4.2. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> jako limfocyty regulatorowe

Limfocyty CD8<sup>+</sup> mogą pełnić zarówno rolę efektorów, jak i regulatorów odpowiedzi odpornościowej. Liczne badania nad tym zagadnieniem doprowadziły do scharakteryzowania populacji regulatorowych komórek CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>. Odkryto, że za funkcje regulatorowe odpowiada właśnie brak ekspresji molekuly CD28, zarówno u myszy CD28<sup>-/-</sup>, jak i u myszy dzikich [25].

Limfocyty CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> dzielą się szybciej i żyją dłużej niż CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>. Prawdopodobnie jest to wynikiem krótszego podziału komórkowego, odmiennej odpowiedzi na cytokiny regulatorowe oraz większej oporności na apoptozę [34,36]. Należy zaznaczyć, że istnieją sprzeczne dane dotyczące częstotliwości, z jaką limfocyty CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> ulegają spontanicznej apoptozie. Większość badaczy wskazuje, że komórki takie są relatywnie odporne na apoptozę [24,34,36]. Dla kontrastu, istnieją dane pochodzące od osób zainfekowanych wirusem HIV, u których populacje CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> były bardzo podatne na spontaniczną apoptozę [28,36]. Oporność komórek CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> na apoptozę jest tym bardziej zagadkowa, że jak wspomniano wcześniej, ekspresja markera CD28 chroni komórki przed apoptozą.

Funkcją limfocytów CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> jest indukowanie różnicowania APC, poprzez nadawanie im właściwości tolerogennych względem limfocytów Th. Zdolność limfocytów Th do wytwarzania IL-2 w odpowiedzi na APC zostaje zredukowana i zamiast aktywacji komórek CD4<sup>+</sup> Th rozwija się stan anergii [8,23]. APC pod wpływem regulatorowych komórek CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> różnicują się w profesjonalne komórki supresorowe i nie powracają już do fenotypu stymulacyjnego [13].

### 4.3 Limfocyty CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> w transplantologii oraz chorobach autoimmunizacyjnych

Zaobserwowano, że pacjenci po przeszczepie narządowym wykazują ekspansję limfocytów CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>. Fenotyp lim-

focytów CD28<sup>-</sup> i CD28<sup>+</sup> u pacjentów odrzucających i tolerujących przeszczep nie różni się pod względem markerów aktywacji i pamięci [8]. Wykazano natomiast różnice w oddziaływaniu komórek CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> na APC. U pacjentów tolerujących przeszczep, limfocyty CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> indukują w APC ekspresję ILT3 i ILT4, co w konsekwencji hamuje ścieżkę sygnałową CD40/CD40L i sprzyja przeżyciu przeszczepu. Komórki CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> u pacjentów w okresie ostrego odrzucania przeszczepu, nie mają takich właściwości. W obydwu przypadkach limfocyty CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> nie wykazują cytotoksyczności. Z kolei komórki CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> są cytotoksyczne tylko u pacjentów odrzucających przeszczep [8].

Myszy pozbawione genu CD28 są naturalnie odporne na aktywnie indukowane zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (EAE – doświadczalne alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego – experimental autoimmune encephalomyelitis). W tym mysim modelu ludzkiego stwardnienia rozsianego następuje demielinizacja ośrodkowego układu nerwowego (OUN) z udziałem limfocytów T CD4<sup>+</sup>. Udowodniono, że regulatorowe komórki CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> przyczyniają się do naturalnej odporności na EAE przy nieobecności kostymulacji CD28. Odkryto, że limfocyty T CD28<sup>-/-</sup> wytwarzają mniej makrofagowego białka zapalnego 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) niż limfocyty T osobników kontrolnych. Brak objawów klinicznych może być przynajmniej w części następstwem niewystarczającej migracji komórek do OUN [25].

Dowodem na pełnienie przez komórki CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> funkcji regulatorowych było wykazanie, że zredukowanie odsetka komórek CD8<sup>+</sup> (poniżej 1% obwodowych limfocytów podczas badania cytometrem przepływowym) czyniło myszy pozbawione genu CD28 podatnymi na EAE. Wydaje się jednak, że w mechanizmy regulacyjne komórek CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> jest zaangażowana także cząsteczka CD8, ponieważ zmniejszona ekspresja powierzchniowa CD8 u myszy heterozygotycznych jest powiązana z utratą funkcji regulatorowych *in vivo*. Supresja EAE przez komórki CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> może mieć źródło w ich działaniu inhibitorowym wywieranym na ekspansję komórkową limfocytów Th1 [25].

#### 4.4. Populacja limfocytów CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>

Dane literaturowe, wskazują że utrata antygeny CD28 przez limfocyty CD4<sup>+</sup> jest wynikiem powtarzanej stymulacji antygenowej i przedłużonej ekspozycji komórek T na TNF- $\alpha$ . Szczególnie interesujące jest występowanie limfocytów CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> w reumatoidalnym zapaleniu stawów oraz miażdżycy tętnic wieńcowych, ponieważ nasilenie przebiegu wymienionych chorób jest ściśle skorelowane z rosnącym odsetkiem tych komórek [34].

Limfocyty CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> są wysoce autoreaktywne. Stwierdzono, że wytwarzają one na wysokim poziomie IFN- $\gamma$ , co czyni je komórkami prozapalnymi. Tracąc swoje właściwości limfocytów pomocniczych, nabierają cech charakterystycznych dla komórek NK, takich jak receptory KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors) [34].

Ekspresja molekuly CD28 na limfocytach CD4<sup>+</sup> zmniejsza się u biorców przeszczepów nerkowych, co wydaje się mieć ścisły związek z długością przeżycia przeszczepu.

Limfocyty CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> są ciągle aktywowane u pacjentów z długoterminowym przeżyciem przeszczepu, a to może mieć bezpośredni związek z tolerancją przeszczepu. U niektórych pacjentów z wyższym odsetkiem limfocytów CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> odpowiedź przeciwko komórkom dawcy jest słabsza. Konsekwentnie, chroniczne odrzucanie przeszczepu zaobserwowano u pacjentów z mniejszą liczbą limfocytów CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> [19]. Sugeruje to, że tolerancja na przeszczep alogeniczny może się rozwijać z udziałem pewnych stałych zmian w zdolności limfocytów Th do otrzymywania sygnału od molekuly CD28. W zwierzęcych modelach chorób autoimmunizacyjnych, populacja komórek CD4<sup>+</sup> ekspresjonujących CD28 na niskim poziomie wzrasta dramatycznie przed pojawieniem się choroby. Transfer takich limfocytów do zwierzęcia zapobiega powstawaniu uszkodzeń autoimmunologicznych związanych z wytwarzaniem auto przeciwciał. Przypuszcza się, że limfocyty CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> pełnią funkcje komórek supresorowych, które hamują odpowiedź immunologiczną w długotrwałym przyjęciu ludzkich przeszczepów alogenicznych [19].

## 5. ZNACZENIE MOLEKULY CD28 DLA ZDROWIA CZŁOWIEKA

### 5.1. Przeciwciała monoklonalne anti-CD28

Przeciwciała monoklonalne (mAb) są szeroko stosowane jako ligandy zdolne do blokowania lub zapoczątkowania sygnalizacji płynącej od receptorów powierzchniowych. Obecnie są prowadzone liczne badania nad przeciwciałami anti-CD28 w kontekście modulowania mechanizmów kostymulujących, a co za tym idzie ich zastosowania w terapii chorób autoimmunologicznych oraz transplantologii. Wyróżnia się dwa rodzaje przeciwciał anti-CD28: konwencjonalne (niemitogenne) oraz superagonistyczne (mitogenne) [16].

Przeciwciała CD28-swoiste są używane w modelach eksperymentalnych do naśladowania naturalnych ligandów i zapewnienia sygnałów kostymulacyjnych dla limfocytów T, co zapobiega anergii limfocytów T *in vitro*. Jednak *in vivo*, te same przeciwciała anti-CD28, hamują ekspansję limfocytów T i wytwarzanie cytokin w wyniku stymulacji superantigenem lub antygenem peptydowym. Odkryto, że zastosowanie przeciwciał anti-CD28 zapobiega chorobie GVHD (przeszczep przeciw gospodarzowi – graft versus host disease) u myszy, a u szczurów przedłuża przeżycie przeszczepów alogenicznych [40]. W przypadku choroby GVHD przyjmuje się, że objawy są wywoływane przez alloreaktywne limfocyty T pochodzące z przeszczepionego organu, które naciekają tkanki gospodarza i wpływają na nie cytotoksycznie. Udowodniono, że przeciwciała anti-CD28 jest agonistyczne *in vivo* i wywołuje immunosupresję na skutek utraty aktywowanych przez alloantigen limfocytów T. Wykazano, że terapia przeciwciałami anti-CD28 usuwa limfocyty T CD4<sup>+</sup> oraz CD8<sup>+</sup>, proliferujące w odpowiedzi na alloantigen, za pośrednictwem apoptozy, przez co zapobiega chorobie GVHD [40].

Mitogenne sygnały CD28 nie są zupełnie autonomiczne, ale zależą od słabych, spontanicznych lub tonicznych sygnałów pochodzących od kompleksu TCR. Przeciwciała CD28-swoiste mające aktywność superagonistów są zdolne do stymulacji limfocytów T bez zaangażowania receptora TCR. Zastosowanie superagonistów CD28 przynosi

rozmaite efekty terapeutyczne w różnych zwierzęcych modelach chorób autoimmunologicznych, m.in. w EAE i zapaleniu stawów (adjuvant arthritis – AA) [6,16]. Na podstawie eksperymentów z regulatorowymi limfocytami T pochodzącymi od szczurów traktowanych superagonistami CD28 udowodniono, że ochrona przed EAE zależy od limfocytów T regulatorowych aktywowanych przez superagonistów CD28. Przeciwciała superagonistyczne CD28 są obiecującym narzędziem w supresji chorób autoimmunizacyjnych człowieka.

Apoptoza limfocytów T z udziałem przeciwciał anti-CD28 wymaga niezaburzonej ekspresji IFN- $\gamma$  w limfocytach T dawcy, nie można jej też zapobiec poprzez wzrost ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-X<sub>L</sub> i pojawia się niezależnie od ekspresji receptorów Fas i TNF. Wskazuje to, że przeciwciało swoiste dla CD28 może być użyte jako owa metoda terapeutyczna, w celu zapobiegania nieprawidłowej odpowiedzi limfocytów T poprzez selektywną utratę aktywowanych limfocytów T. Działanie agonistyczne przeciwciała anti-CD28 powoduje delecję dzielących się limfocytów T rozpoznających alloantygeny *in vivo*. Odkrycie to dostarcza uzasadnienia dla potencjalnej terapii z użyciem przeciwciał monoklonalnych anti-CD28 w celu indukcji swoistej tolerancji limfocytów T [40].

Wprowadzie wyniki badań na modelach zwierzęcych są obiecujące, to jednak zastosowanie przeciwciał anti-CD28 u ludzi może nie przynieść oczekiwanych efektów, a wręcz może być niebezpieczne. W marcu 2006 r. przeprowadzono tragiczne w skutkach badanie kliniczne z użyciem przeciwciał anti-CD28. Sześciu zdrowym mężczyznom w wieku 18–40 lat wstrzyknięto preparat o nazwie TGN1412 zawierający humanizowane przeciwciała monoklonalne anti-CD28. Lek miał być pomocny w leczeniu chorób, takich jak stwardnienie rozsiane, białaczka oraz reumatoidalne zapalenie stawów. Jednak zamiast wytłumić działanie układu odpornościowego, zapoczątkował nasiloną odpowiedź odpornościową. W ciągu kilku godzin od podania preparatu ochotnicy zaczęli odczuwać liczne dolegliwości, w tym bóle głowy, pleców, mdłości, spadek ciśnienia krwi, ostatecznie doszło u nich do uszkodzenia funkcji wielu narządów, tzw. niewydolności wielonarządowej. Dwóch pacjentów zapadło w śpiączkę, jeden wymagał leczenia na oddziale intensywnej terapii. Obecnie przyczyn tego tragicznego finału użycia leku dopatruje się w tym, że użyte przeciwciała anti-CD28 oprócz aktywacji limfocytów supresorowych, intensywnie zaktywowały również limfocyty T pomocnicze, pobudzając je do wytwarzania cytokin i wywołując przez to reakcję zapalną całego organizmu [15,30].

## 5.2. Blokada interakcji CD28-B7

Wiele doniesień wskazuje na korzystne skutki zablokowania interakcji CD28/B7 w leczeniu chorób autoimmunizacyjnych [4,16], w tym EAE. Podczas wczesnej fazy rozwoju choroby całkowita blokada oddziaływań CD28-B7 często prowadzi do złagodzenia objawów i wiąże się ze zmniejszoną proliferacją w węzłach chłonnych limfocytów skierowanych przeciw mielinie. W fazie ostrej i w czasie remisji może natomiast zapobiec dalszym nawrotom choroby [4]. Następstwa zablokowania kostymulacji zależą jednak od dawki, czasu działania antagonistów, linii myszy bądź

szczurów oraz metody indukcji choroby. Zdarza się, że w niektórych przypadkach zamiast osłabienia objawów EAE następuje nasilenie symptomów [27].

Wykazano również znaczenie oddziaływań CD28-B7 w mysim modelu ludzkiej cukrzycy typu I (autoimmunizacyjna postać cukrzycy z obecnością przeciwciał przeciwko komórkom  $\beta$  trzustki) – tzw. myszy NOD (non-obese diabetic). Myszy te rozwijają cukrzycę spontanicznie około 20–30 tygodnia życia. Podanie przeciwciał blokujących anti-CD86 (anti-B7-2) w ciągu pierwszych 2–7 tygodni życia myszy zapobiega wystąpieniu choroby. Zastosowanie przeciwciał w późniejszym okresie nie przynosi już takiego efektu. Myszy pozbawione CD86 (B7-2) nie rozwijają spontanicznie cukrzycy, natomiast wydają się u nich rozwijać autoimmunizacyjne polineuropatie obwodowe. Zaskakujące jest to, że zastosowanie przeciwciał anti-CD80 (anti-B7-1) prowadzi do nasilenia się choroby, a u myszy NOD z wyłączeniem genu CD28 następuje szybsze pojawienie się cukrzycy o gwałtowniejszym przebiegu [27].

Kostymulacja poprzez CD28 jest najważniejsza dla różnicowania naiwnych limfocytów CD4<sup>+</sup> w kierunku Th2. Brak kostymulacji lub zablokowanie interakcji między CD28 i B7 skutkuje przewagą różnicowania się w kierunku Th1 oraz dominacją odpowiedzi Th1, prowadzącą do ostrzejszych objawów choroby autoimmunizacyjnej. Mamy tu do czynienia z pewnym paradoksem. Blokada omawianej ścieżki preferencyjnie blokuje różnicowanie limfocytów Th2 w kierunku Th1, co może potencjalnie zapobiegać chorobom wywołanym przez autoreaktywne przeciwciała (takim jak toczeń układowy). A przy tym powoduje nasilenie objawów chorób autoimmunizacyjnych będących skutkiem działania limfocytów Th1 (takich jak autoimmunizacyjna cukrzyca) [27].

Interakcja CD28-B7 odgrywa także istotną rolę w migracji komórek i zapaleniu. Kostymulacja CD28 jest niezbędna do wytwarzania chemokin, które pełnią istotne funkcje przy migracji jednojądrzastych komórek do ośrodkowego układu nerwowego oraz w patogenezie EAE. Tak więc istotną funkcją molekuly CD28 w chorobach autoimmunizacyjnych swoistych tkankowo jest kontrola migracji komórek zapalnych oraz autoimmunizacyjnego ataku tych komórek na tkanki [27].

W świetle dotychczasowych badań wydaje się, że różne metody przerywające interakcje CD28-B7 przyczyniają się do zwiększenia szans na przyjęcie przeszczepu. Zaobserwowano wydłużenie przeżycia alogenicznego przeszczepu komórek z wysp trzustkowych u myszy w przypadku blokowania szlaku sygnałowego za pomocą monoklonalnych przeciwciał anti-B7-1 i anti-B7-2 [7]. W innym doświadczeniu traktowanie szczurów CTLA-4Ig (białko fuzyjne wiążące z dużym powinowactwem oba ligandy CD28) znacząco zwiększało przeżycie przeszczepów serca [27]. Blokada interakcji CD28-B7 z użyciem ludzkich przeciwciał CTLA-4Ig była stosowana również u ludzi w próbach klinicznych. W jednym z doświadczeń, u prawie połowy pacjentów w stanie stabilnej łuszczycy popospolitej nastąpiła ponad 50% poprawa kliniczna [27].

Blokada oddziaływań CD28-B7 prowadzi do nieskutecznej aktywacji limfocytów T. Wykazano to niejednokrotnie



na przykładzie ksenogenicznych przeszczepów wysepek Langerhansa, które wywołują silną odpowiedź limfocytów T, trudną do ograniczenia za pomocą konwencjonalnej immunosupresji [4]. Obecnie prowadzi się badania nad modyfikacjami genetycznymi dawców oraz alternatywnymi strategiami hamującymi aktywację limfocytów T. Potencjalnie taką terapią hamującą aktywację limfocytów T może być blokada kostymulacji.

Blokada ścieżki CD28 i CD40L jest skuteczna w inibicji odpowiedzi zależnej od limfocytów CD4<sup>+</sup>, ale przy aktywacji limfocytów CD8<sup>+</sup> wydaje się być możliwy jakiś alternatywny model kostymulacji. Wykazano, że blokada dróg sygnałowych CD28 i CD40L redukuje częstość podziałów komórek alloreaktywnych i zmniejsza odsetek komórek ulegających apoptozie. Blokada taka nie hamuje jednak proliferacji zupełnie [20]. Myszy transgeniczne Bcl-X<sub>L</sub> są odporne na indukcję tolerancji przeszczepu serca poprzez blokadę kostymulacji. Jest to związane z odpornością alloreaktywnych limfocytów T na tzw. śmierć przez zaniedbanie – apoptozę wywołaną odcięciem ich od czynników wzrostu limfocytów T (passive cell death – PCD). Myszy z nokautem genu IL-2 i głębokim defektem apoptozy indukowanej aktywacją limfocytów T, są również odporne na indukcję tolerancji na przeszczepy wysepek Langerhansa i serca poprzez blokadę kostymulacji oraz rapamycynę [20].

### 5.3. CD28 a leki immunosupresyjne

#### Cyklosporyna A

Podstawowym mechanizmem działania cyklosporyny A (CsA) jest blokada wytwarzania IL-2 przez limfocyty T [7]. CsA łączy się z cyklofiliną A formując kompleks wiążący i hamujący zależną od Ca<sup>++</sup>/kalmodulina fosfatazę kalcyneurynę. W rezultacie kalcyneuryna nie defosforyluje cytosolowej postaci czynnika transkrypcyjnego NF-AT, zapobiegając tym samym transportowi NF-AT na teren jądra, gdzie czynnik ten wiąże się do regionu enhancera genu IL-2 inicjując transkrypcję [7]. Ostatnio wykazano także, że CsA hamuje translokację czynnika NF-κB. Oprócz tego, jest również inhibitorem transkrypcji kilku innych genów, niezależnych od funkcji NF-AT.

CsA hamuje ekspresję cząsteczki CD28 indukowaną aktywacją, przywrócenie ekspresji indukowalnej wymaga restymulacji w nieobecności CsA. Lek ten nie wpływa natomiast na ekspresję konstytutywną CD28. CsA poprzez inibicję ekspresji indukowanej aktywacją wpływa na zdolność sygnału przekazywanego poprzez CD28 do przedłużania okresu półtrwania mRNA IL-2 [7]. Może więc od-

działywać na zdolność cząsteczki CD28 do zapewnienia sygnału podtrzymującego wytwarzanie IL-2.

#### Rapamycyna

Rapamycyna (RAPA) hamując proliferację limfocytów T, nie wpływa na ekspresję receptora IL-2 [13], ale blokuje sygnały zależne od IL-2 oraz wytwarzanie IL-2 przez aktywowane obwodowe limfocyty T. Wprawdzie blokuje sygnały proliferacyjne, ale w odróżnieniu od cyklosporyny A, nie blokuje apoptozy poprzez AICD i może wzmacniać inne procesy apoptotyczne przez inibicję ekspresji Bcl-2/Bcl-xl [20].

Badania wykazały, że ekspresja CD28 wywołana aktywacją jest przynajmniej w części procesem zależnym od IL-2 [7]. W indukowaniu ekspresji CD28 biorą udział czynniki AP-1 oraz NF-κB. Są one indukowane właśnie przez IL-2. Zauważono, że RAPA w stężeniach hamujących proliferację limfocytów T, nie jest w stanie wpłynąć na ekspresję CD28 indukowaną aktywacją. Należy jednak dodać, że w obydwu przypadkach blokowanie ścieżki IL-2 jest niekompletne i możliwy jest wpływ IL-2 na indukowaną ekspresję genu CD28 [7].

#### Azatiopryna

Dokładny mechanizm działania azatiopryny jest nieznan. Odkryto jednakże, że lek ten indukuje apoptozę w ludzkich limfocytach CD4<sup>+</sup>. Wydaje się, że szlak kostymulujący zależny od CD28, wiodący do zwiększenia ekspresji antyapoptotycznego białka bcl-x<sub>L</sub>, jest celem działania azatiopryny. Pod wpływem azatiopryny i jej metabolitów następuje supresja ekspresji bcl-x<sub>L</sub> w limfocytach T CD4<sup>+</sup> i w rezultacie apoptoza tych komórek [32].

## 6. ZAKOŃCZENIE

Mimo że molekula CD28 jest jedną z najczęściej badanych i opisywanych cząsteczek kostymulujących, wciąż wiele zagadnień z nią związanych pozostaje niewyjaśnionych. Szczególne zainteresowanie molekułą CD28 jest związane z jej wpływem na osiągnięcie tolerancji transplantacyjnej, a przez to potencjalnymi możliwościami leczenia chorób autoimmunizacyjnych oraz zapobiegania odrzucenia przeszczepu. Dużo uwagi poświęca się obecnie metodom oddziaływań ścieżki CD28- B7 oraz przeciwciałom monoklonalnym anty-CD28. W celu uniknięcia w przyszłości niepowodzeń, takich jak próba kliniczna z lekiem TGN1412, należy jeszcze wnikliwiej zbadać cząsteczkę CD28 i jednoznacznie wyjaśnić wszelkie nieścisłości dotyczące jej roli i wpływu na organizm.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Acuto O., Michel F.: CD28-mediated co-stimulation a quantitative support for TCR signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003; 3: 939–951
- [2] Acuto O., Mise-Omata S., Mangino G., Michel F.: Molecular modifiers of T cell antigen receptor triggering threshold: the mechanism of CD28 costimulatory receptor. *Immunol. Rev.*, 2003; 192: 21–31
- [3] Alegre M.L., Frauwirth K.A., Thompson C.B.: T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol.*, 2001; 1: 220–228
- [4] Anand S., Chen L.: Control of autoimmune diseases by the B7-CD28 family molecules. *Curr. Pharm. Design*, 2004; 10: 121–128
- [5] Arosa F.A.: CD8+CD28– T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset. *Immunol. Cell Biol.*, 2002; 80: 1–13
- [6] Beyersdorf N., Hanke T., Kerkau T., Hunig T.: CD28 superagonists put a break on autoimmunity by preferentially activating CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells. *Autoimmun. Rev.*, 2006; 5: 40–45
- [7] Butler J.J., Cochran J., Ward N., Hoskin D.W.: Activation-induced expression of cell surface CD28 on mouse T lymphocytes is inhibited by cyclosporine A. *Am. J. Transplant.*, 2002; 2: 215–222



- [8] Chang C.C., Ciubotariu R., Manavalan J.S., Yuan J., Colovai A.I., Piazza F., Lederman S., Colonna M., Cortesini R., Dalla-Favera R. and Suci-Foca N.: Tolerization of dendritic cells by TS cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat. Immunol.*, 2002; 3: 237–243
- [9] Edmead C.E., Lamb J.R., Hoyne G.F.: The T cell surface protein, CD28. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1997; 29: 1053–1057
- [10] Effros R.B.: Loss of CD28 expression on T lymphocytes: a marker of replicative senescence. *Dev. Comp. Immunol.*, 1997; 21: 471–478
- [11] Evans E.J., Esnouf R.M., Manso-Sancho R., Gilbert R.J., James J.R., Yu C., Fennelly J.A., Vowles C., Hanke T., Walse B., Hunig T., Sorensen P., Stuart D.I., Davis S.J.: Crystal structure of a soluble CD28-Fab complex. *Nat. Immunol.*, 2005; 6: 271–279
- [12] Gamberg J., Pardoe I., Bowmer M.I., Howley C., Grant M.: Lack of CD28 expression on HIV-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with disease progression. *Immunol. Cell Biol.*, 2004; 82: 38–46
- [13] Ghosh P., Buchholz M., Yano S., Taub D., Longo D.L.: Effect of rapamycin on the cyclosporin A-resistant CD28-mediated costimulatory pathway. *Blood*, 2002; 99: 4517–4524
- [14] Heinzmann A., Plesnar C., Kuehr J., Forster J., Deichmann K.A.: Common polymorphisms in the CTLA-4 and CD28 genes at 2q33 are not associated with asthma or atopy. *Eur. J. Immunogenet.*, 2000; 27: 57–61
- [15] Hopkin M.: Can super-antibody drugs be tamed? *Nature*, 2006; 440: 855–856
- [16] Hunig T., Dennehy K.: CD28 superagonists: mode of action and therapeutic potential. *Immunol. Lett.*, 2005; 100: 21–28
- [17] Jones R.G.: CD28 signaling and T cell death. *Mod. Asp. Immunobiol.*, 2003; 3: 4
- [18] Kalayjian R.C., Landay A., Pollard R.B., Taub D.D., Gross B.H., Francis I.R., Sevin A., Pu M., Spritzler J., Chernoff M., Namkung A., Fox L., Martinez A., Waterman K., Fiscus S.A., Sha B., Johnson D., Slater S., Rousseau F., Lederman M.M.; for the Adult AIDS Clinical Trials Group 5015 and 5113 Protocol Teams: Age-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus (HIV) disease: association of age and HIV infection with naïve CD8+ cell depletion, reduced expression of CD28 on CD8+ cells, and reduced thymic volumes. *J. Infect. Dis.*, 2003; 187: 1924–1933
- [19] Kato M., Ono Y., Kinukawa T., Hattori R., Kamihira O., Ohshima S.: Long time follow up of CD28– CD4+ T cells in living kidney transplant patients. *Clin. Transplant.*, 2004; 18: 242–246
- [20] Li Y., Li X.C., Zheng X.X., Wells A.D., Turka L.A., Strom T.B.: Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat. Med.*, 1999; 5: 1298–1302
- [21] Linsley P.S.: New look at an old costimulator. *Nat. Immunol.*, 2005; 6: 231–232
- [22] Ma B.Y., Mikolajczak S.A., Yoshida T., Yoshida R., Kelvin D.J., Ochi A.: CD28 T cell costimulatory receptor function is negatively regulated by N-linked carbohydrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 317: 60–67
- [23] Manavalan J.S., Kim-Schulze S., Scotto L. Naiyer A.J., Vlad G., Colombo P.C., Marboe C., Mancini D., Cortesini R., Suci-Foca N.: Alloantigen specific CD8+CD28– FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int. Immunol.*, 2004; 16: 1055–1068
- [24] Menezes C.A., Rocha M.O., Souza P.E., Chaves A.C., Gollob K.J., Dutra W.O.: Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28– cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004; 137: 129–138
- [25] Najafian N., Chitnis T., Salama A.D., Zhu B., Benou C., Yuan X., Clarkson M.R., Sayegh M.H., Khoury S.J.: Regulatory functions of CD8+CD28– T cells in an autoimmune disease model. *J. Clin. Invest.*, 2003; 112: 1037–1048
- [26] Rochford R., Riggs J.E., Clavo A., Ernst D.N., Hobbs M.V.: Differential effects of CD28 costimulation upon cytokine production by CD4+ and CD8+ T cells. *Immunobiology*, 2004; 209: 513–522
- [27] Salomon B., Bluestone J.A.: Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001; 19: 225–252
- [28] Sansom D.M.: CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology*, 2000; 101: 169–177
- [29] Sharpe A.H., Freeman G.J.: The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002; 2: 116–126
- [30] SuperMAB on trial. *Lancet*, 2006; 367: 960
- [31] Tai X., Cowan M., Feigenbaum L., Singer A.: CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat. Immunol.*, 2005; 6: 152–162
- [32] Tiede I., Fritz G., Strand S., Poppe D., Dvorsky R., Strand D., Lehr H.A., Wirtz S., Becker C., Atreya R., Mudter J., Hildner K., Bartsch B., Holtmann M., Blumberg R., Walczak H., Iven H., Galle P.R., Ahmadian M.R., Neurath M.F.: CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 2003; 111: 1133–1145
- [33] Vacchio M.S., Williams J.A., Hodes R.J.: A novel role for CD28 in thymic selection: elimination of CD28–B7 interactions increases positive selection. *Eur. J. Immunol.*, 2005; 35: 418–427
- [34] Vallejo A.N., Weyand C.M., Goronzy J.J.: T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. *Trends Mol. Med.*, 2004; 10: 119–124
- [35] Venuprasad K., Parab P., Prasad D.V., Sharma S., Banerjee P.R., Deshpande M., Mitra D. K., Pal S., Bhadra R., Mitra D., Saha B.: Immunobiology of CD28 expression on human neutrophils. I. CD28 regulates neutrophil migration by modulating CXCR-1 expression. *Eur. J. Immunol.*, 2001; 31: 1536–1543
- [36] Werwitzke S., Tiede A., Drescher B.E., Schmidt R.E., Witte T.: CD8 $\beta$ /CD28 expression defines functionally distinct populations of peripheral blood T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003; 133: 334–343
- [37] Woerly G., Decot V., Loiseau S., Loyens M., Chihara J., Ono N., Capron M.: CD28 and secretory immunoglobulin A-dependent activation of eosinophils: inhibition of mediator release by the anti-allergic drug, suplatast tosilate. *Clin. Exp. Allergy*, 2004; 34: 1379–1387
- [38] Woerly G., Lacy P., Younes A.B., Roger N., Loiseau S., Moqbel R., Capron M.: Human eosinophils express and release IL-13 following CD28-dependent activation. *J. Leukoc. Biol.*, 2002; 72: 769–779
- [39] Woerly G., Roger N., Loiseau S., Dombrowicz D., Capron A., Capron M.: Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon  $\gamma$ ): inhibition by immunoglobulin A complexes. *J. Exp. Med.*, 1999; 190: 487–495
- [40] Yu X.Z., Albert M.H., Martin P.J., Anasetti C.: CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN- $\gamma$ -dependent depletion of T cells that recognize alloantigens. *J. Clin. Invest.*, 2004; 113: 1624–1630
- [41] Yu X.Z., Martin P.J., Anasetti C.: CD28 signal enhances apoptosis of CD8 T cells after strong TCR ligation. *J. Immunol.*, 2003; 170: 3002–3006