

Received: 2009.06.29
Accepted: 2009.10.05
Published: 2009.10.29

Rola sierocych receptorów jądrowych w rozwoju limfocytów T w grasicy*

The roles of orphan nuclear receptors in T-lymphocyte development in the thymus

Janusz Matuszyk

Laboratorium Białek Sygnałowych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Proces dojrzewania prekursorów limfocytów T w grasicy (tymocytów) składa się z kolejnych etapów różnicowania, selekcji i ekspansji tymocytów. W procesie dojrzewania tymocytów można wyróżnić dwa punkty kontrolne, w których wiele białek sygnałowych i czynników transkrypcyjnych pełni ważną rolę w szlakach sygnałowych receptorów antygenowych (pre-TCR i TCR), które pobudzają procesy różnicowania i selekcji. Sieroce receptory jądrowe ROR γ i Nur77 biorą udział w procesach różnicowania i selekcji, które zależą od aktywacji pre-TCR i TCR. Białka ROR γ i Nur77 mają przeciwstawny wpływ na żywotność komórek. Receptor jądrowy ROR γ aktywuje gen kodujący antyapoptotyczne białko Bcl-X_L i jest niezbędny do przeżycia tymocytów CD4⁺CD8⁺, podczas gdy receptor jądrowy Nur77 indukuje apoptozę tych tymocytów CD4⁺CD8⁺, które zawierają TCR wykazujący zbyt wysokie powinowactwo do prezentowanych w grasicy własnych antygenów.

Słowa kluczowe: rozwój limfocytów T • tymocyty • sieroce receptory jądrowe • selekcja negatywna • apoptoza

Summary

T-lymphocyte development in the thymus proceeds through successive steps of differentiation, selection and expansion of thymocytes. Multiple signaling proteins and transcription factors play important roles in mediating the response to signals delivered through the pre-T-cell receptor (pre-TCR) and T-cell receptor (TCR) at two checkpoints during T-cell development. The orphan nuclear receptors ROR γ and Nur77 are involved in the differentiation and selection processes that are induced following activation of the pre-TCR and TCR, respectively, and they exert opposite effects on the survival of thymocytes. ROR γ activates the gene encoding the antiapoptotic protein Bcl-X_L and is required for the survival of CD4⁺CD8⁺ thymocytes, while Nur77 is involved in the apoptosis of CD4⁺CD8⁺ thymocytes bearing TCRs with a high affinity for self antigens presented in the thymus.

Key words: T-lymphocyte development • thymocytes • orphan nuclear receptors • negative selection • apoptosis

* Praca jest zmienioną i uzupełnioną częścią rozprawy habilitacyjnej pt. „Mechanizmy regulacji ekspresji i funkcji receptora jądrowego Nur77”.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=897255>

Word count: 6285

Tables: –

Figures: 3

References: 124

Adres autora: dr Janusz Matuszyk, Laboratorium Białek Sygnałowych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, ul. R.Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: matuszyk@iitd.pan.wroc.pl

Wykaz skrótów: **APC** – komórka prezentująca antygeny (antigen-presenting cell); **BH3** – proapoptotyczna sekwencja aminokwasów Leu-X-X-X-Gly-Asp, która przyjmuje strukturę amfipatycznej helisy α ; **DAG** – diacyloglicerol; **DN** – tymocyty podwójnie negatywne, tzn. $CD4^-CD8^-$ (double negative); **DP** – tymocyty podwójnie pozytywne, tzn. $CD4^+CD8^+$ (double positive); **ERK1/2** – kinazy białkowe ERK1 i ERK2 serynowo-treoninowe z rodziny MAPK (extracellular signal-regulated kinases); **GADS** – białko adaptorowe podobne do GRB2; **GDP** – guanozynodifosforan; **GRB2** – białko adaptorowe (growth factor receptor-bound protein 2); **GTP** – guanozynotrifosforan; **HY** – antygen HY występujący tylko u samców; **IP3** – trifosforan inozytolu; **ISP** – niedojrzałe tymocyty pojedynczo pozytywne, tzn. $CD4^{niski}CD8^-$ lub $CD4^-CD8^{niski}$ (immature single-positive); **ITK** – cytoplazmatyczna kinaza tyrozynowa z rodziny Tec (IL-2-inducible T cell kinase); **JNK** – kinazy białkowe JNK1, JNK2 i JNK3 serynowo-treoninowe z rodziny MAPK (c-Jun N-terminal kinases); **LAT** – białko adaptorowe (linker for activation of T cells); **LCK** – cytoplazmatyczna kinaza tyrozynowa z rodziny Src (leukocyte-specific protein tyrosine kinase); **MHC** – główny kompleks zgodności tkankowej (major histocompatibility complex); **MINK** – kinaza białkowa serynowo-treoninowa (misshapen-NCK-interacting kinase-related kinase); **NCK** – białko adaptorowe (non-catalytic region of tyrosine kinase); **NFAT** – czynnik transkrypcyjny (nuclear factor of activated T cells); **p38** – kinazy białkowe $p38\alpha$, $p38\beta$, $p38\gamma$ i $p38\delta$ serynowo-treoninowe z rodziny MAPK; **PLC γ 1** – fosfolipaza $C\gamma$ 1; **pre-TCR** – heterodimer złożony z $TCR\beta$ i $pT\alpha$; **RasGAP** – GTP-aza Ras (Ras GTPase-activating protein); **RasGRP1** – wymiennicz nukleotydu GDP/GTP w białku Ras (Ras guanine nucleotide releasing protein 1); **SLP76** – białko adaptorowe (SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa); **SOS** – wymiennicz nukleotydu GDP/GTP w białku Ras (son of sevenless); **SP** – tymocyty pojedynczo pozytywne, tzn. $CD4^+CD8^-$ lub $CD4^-CD8^+$ (single positive); **TCR** – receptor antygenowy na komórkach T (T cell receptor); **TCR $\alpha\beta$ anty-HY/Db** – receptor swoisty wobec samczego antygeny HY, prezentowanego przez białko MHC klasy I kodowane przez gen regionu D haplotypu H-2^b; **VAV** – wymiennicz nukleotydu GDP/GTP w białkach RAC/CDC42; **ZAP70** – cytoplazmatyczna kinaza tyrozynowa z rodziny Syk (ζ -chain-associated protein kinase of 70 kDa).

1. WPROWADZENIE

Receptory jądrowe są to czynniki transkrypcyjne aktywowane przez ligandy, którymi są rozpuszczalne w tłuszczach hormony steroidowe (np. kortyzol i estradiol), tyroksyna, pochodne witamin A i D, metabolity cholesterolu i kwasów tłuszczowych oraz ksenobiotyki [19]. Sierocymi receptorami jądrowymi są natomiast białka, których ligandy nie zostały poznane lub nawet białka te nie są regulowane przez naturalne ligandy, lecz zostały one zaklasyfikowane do nadrodziny receptorów jądrowych na podstawie analizy porównawczej sekwencji aminokwasowej wskazującej na obecność w białku domen typowych dla klasycznych receptorów jądrowych: (1) zawierającej dwa tzw. palce cynkowe domeny wiążącej DNA; (2) regionu homologicznego z domeną wiążącą ligand w klasycznych receptorach jądrowych.

Funkcja sierocych receptorów jądrowych jest regulowana na poziomie transkrypcji genów kodujących receptory ją-

drowe i fosforylacji receptorów jądrowych lub współdziałających z nimi kofaktorów. Zatem sieroce receptory jądrowe mogą pełnić rolę w aktywacji genów regulowanych przez wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe. Ekspresję sierocych receptorów jądrowych ROR γ i Nur77 wykazano tylko w niektórych stadiach rozwojowych prekursorów limfocytów T w grasicy (tymocytów), co może świadczyć o ich udziale w regulacji różnicowania tymocytów [26,72]. W procesie różnicowania tymocytów dochodzi do rearanżacji genów kodujących receptor dla antygeny limfocyty T (TCR). Celem pracy jest przedstawienie roli receptorów jądrowych ROR γ i Nur77 w różnicowaniu i selekcji komórek, które mogą być użyteczne w rozpoznaniu obcego antygeny.

2. LIMFOCYTY T I TYMOCYTY

Limfocytami T nazywamy komórki układu odpornościowego, które na powierzchni mają receptor antygenowy (TCR). Nazwa limfocytów T wywodzi się od nazwy grasicy (łac. *thymus*), w której dojrzewają komórki prekursorowe lim-

focytów T nazywane tymocytami. Ze względu na zawarty receptor antygenowy limfocyty T dzieli się na komórki linii $\alpha\beta$ (mają TCR $\alpha\beta$) i komórki linii $\gamma\delta$ (mają TCR $\gamma\delta$). Na podstawie występowania białek markerowych, takich jak CD4, CD8 (heterodimer CD8 $\alpha\beta$) i CD25 wyróżnia się wśród limfocytów T linii $\alpha\beta$ subpopulacje komórek CD4⁺CD8⁻CD25⁻, CD4⁺CD8⁻CD25⁺ i CD4⁺CD8⁺CD25⁻ [51]. Należy jednak podkreślić, że komórki zasiedlające granicę różnicują się nie tylko w kierunku limfocytów T, ale również w kierunku komórek NKT, NK i komórek dendrytycznych pochodzenia limfoidalnego. Komórki w grasicy nie mają natomiast w warunkach fizjologicznych zdolności do różnicowania się w kierunku limfocytów B oraz komórek linii mieloidalnej i erytroidalnej [2]. Receptor TCR $\alpha\beta$ limfocytów T CD8⁺ może rozpoznawać antygen (peptyd) prezentowany przez białka MHC klasy I, czyli cząsteczki głównego kompleksu zgodności tkankowej, które występują na większości komórek organizmu [47]. Receptor TCR $\alpha\beta$ limfocytów T CD4⁺ może natomiast rozpoznawać antygen (peptyd) prezentowany przez białka MHC klasy II, które występują na profesjonalnych komórkach prezentujących antygeny (APC), takich jak makrofagi, limfocyty B, komórki dendrytyczne oraz komórki epitelialne kory i rdzenia grasicy [4,37,47]. Białka markerowe CD4 i CD8 są nazywane koreceptorami, gdyż wiążą się z niepolimorficzną częścią MHC i współdziałają z receptorem TCR $\alpha\beta$ w rozpoznawaniu MHC. Koreceptor CD8 rozpoznaje MHC klasy I, podczas gdy koreceptor CD4 rozpoznaje MHC klasy II. Większość dojrzałych komórek T CD8⁺ pełni funkcje cytotosycyczne, podczas gdy większość konwencjonalnych komórek T CD4⁺CD25⁻ pełni funkcje pomocnicze. Komórki T CD4⁺CD25⁺ są limfocytami T regulatorowymi i pełnią funkcje supresorowe.

Cząsteczki MHC klasy I prezentują peptydy będące produktem rozkładu przez proteasom białek endogennych (zarówno prawidłowych białek własnych, jak i białek obcych lub nieprawidłowych białek własnych) – w konsekwencji limfocyt T CD8⁺ może powodować liżę komórki zakażonej przez mikroorganizmy (wirusy, bakterie wewnątrzkomórkowe) lub transformowanej nowotworowo [47]. Cząsteczki MHC klasy II prezentują głównie peptydy egzogenne, wywodzące się z trawionych białek zewnątrzkomórkowych, które dostają się do komórki drogą fagocytozy lub pinoocytozy. Cząsteczki MHC klasy II mogą również prezentować peptydy endogenne będące produktem autofagocytozy (autofagii) własnych elementów struktury komórki [24,114]. Komórki dendrytyczne mogą prezentować limfocytom T egzogenne antygeny zarówno w kontekście MHC klasy II, jak i krzyżowo w kontekście MHC klasy I [44].

3. STADIA RÓZNICOWANIA TYMOCYTÓW

Tymocyty różnicują się z zasiedlających grasicę komórek progenitorowych, które wywodzą się ze szpiku kostnego [14,49,115]. Komórki te mają receptor kwasu hialuronowego (marker CD44) i receptor czynnika wzrostowego komórek macierzystych (białko cKit, marker CD117). Na komórkach zasiedlających granicę dochodzi do krótkotrwałej ekspresji markera CD4 (komórki CD117⁺CD44⁺CD4^{niski}). W następnych stadiach różnicowania tymocyty, które jeszcze nie mają koreceptorów CD4 i CD8 (CD4⁻CD8⁻), są określane jako tymocyty podwójnie negatywne (DN). Na podstawie ekspresji markerów CD44 i CD25 (podjednostka

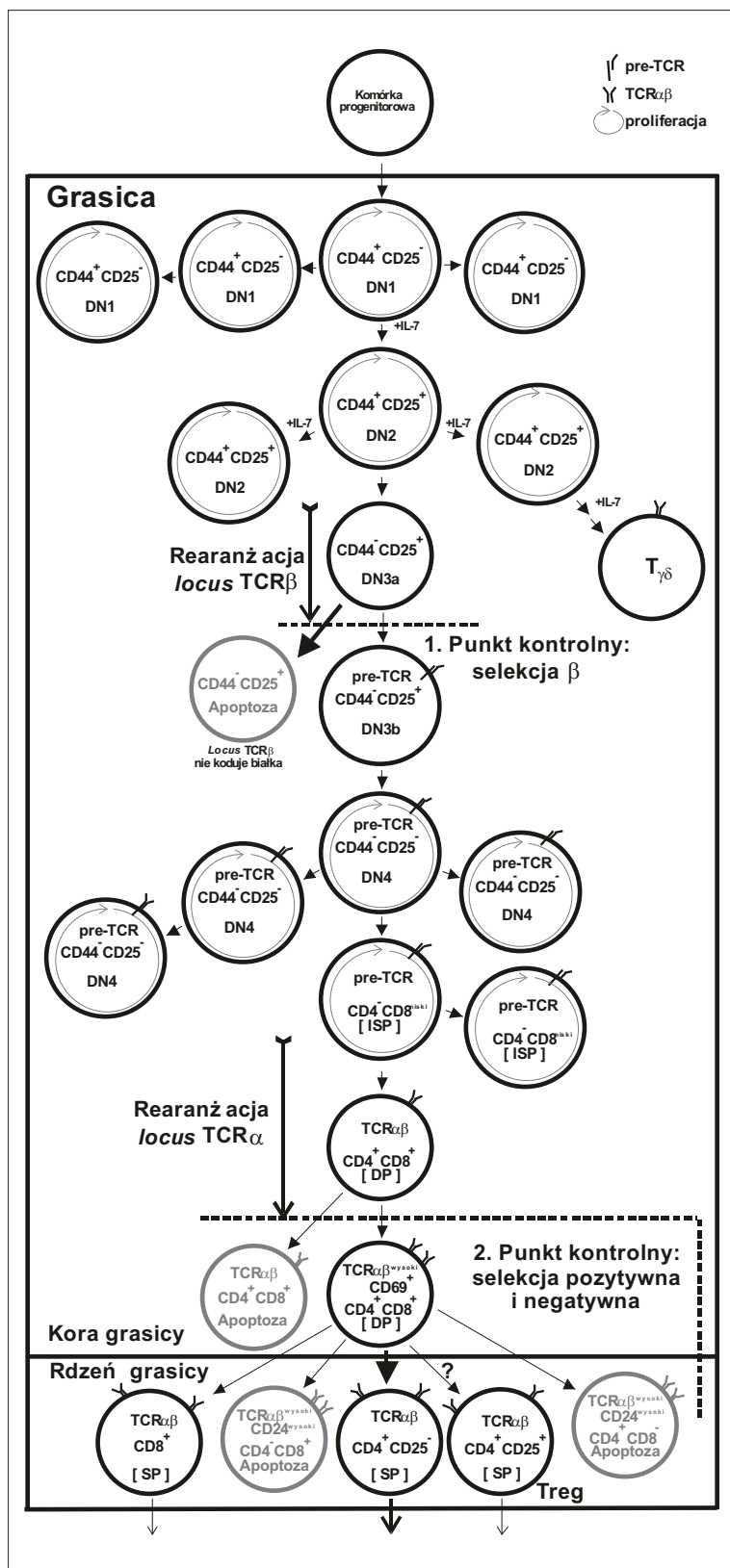
α receptora interleukiny 2) wyróżniono kolejne stadia różnicowania tymocytów DN: CD117⁺CD44⁺CD25⁻ (DN1), CD117⁺CD44⁺CD25⁺ (DN2), CD117^{niski}CD44⁻CD25⁺ (DN3), CD117⁻CD44⁻CD25⁻ (DN4) [32,84] (ryc. 1).

Tymocyty DN1 intensywnie proliferują i stanowią bardzo heterogenną populację komórek, wśród których są najwcześniejsze komórki prekursorowe różnicujące się do limfocytów T [60,84]. Rozwój tymocytów DN1 w kierunku limfocytów B jest hamowany przez aktywację receptorów Notch. Receptorowe białka Notch występują na powierzchni tymocytów i mogą oddziaływać z ligandami, takimi jak białka rodziny Delta (Delta-like) i Jagged, które są prezentowane przez komórki zrębu grasicy [101]. Aktywacja Notch powoduje proteolityczne odszczepienie wewnątrzkomórkowego fragmentu Notch (Notch-ICD, Notch intracellular domain), który ulega translokacji do jądra komórki. W jądrze Notch-ICD łączy się z czynnikiem transkrypcyjnym RBPJ (recombination site binding protein J). Białko RBPJ jest związane z odpowiednim elementem odpowiedzi w DNA i bez połączenia z Notch-ICD jest represorem genu. W kompleksie z Notch-ICD białko RBPJ staje się natomiast aktywatorem transkrypcji genów biorących udział w różnicowaniu tymocytów [84,102].

Tymocyty DN1 różnicują się do tymocytów DN2, które migrują w korze grasicy z przestrzeni okołonaczyniowej w kierunku warstwy komórek epitelium pod torebką grasicy [84]. W czasie migracji następuje wzrost ekspresji markera CD25 na powierzchni tymocyta (w stadium DN2) i stopniowo obniżenie ekspresji markerów CD117 (w stadiach DN2 i DN3) oraz CD44 (w stadium DN3) [4,84,96]. Tymocyty DN1 i DN2 mogą różnicować się w kierunku komórek T linii $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$, ale mogą jeszcze różnicować się do komórek NK, komórek dendrytycznych i nawet do makrofagów [25,49,101,115]. Przeżycie tymocytów we wczesnych stadiach różnicowania DN1 i DN2 zależy od odpowiedniej stymulacji czynnikami wzrostowymi, takimi jak SCF (czynnik wzrostowy komórek macierzystych) i interleukina 7, które działają za pośrednictwem receptora SCF (białko cKit) i receptora interleukiny 7. Interleukina 7 jest niezbędna w indukcji proliferacji limfocytów stadium DN2 i ekspresji genu *Mcl-1* (myeloid cell leukemia sequence 1), który koduje białko antyapoptotyczne z rodziny Bcl-2 [2,122]. Białko Mcl-1 chroni przed apoptozą tymocyty, w których rozpoczynają się rearanżacje genów kodujących receptory antygenowe. Dalszy rozwój tymocytów do komórek T linii $\alpha\beta$ nie wymaga stymulacji przez interleukinę 7. Za to interleukina 7 jest niezbędna w różnicowaniu komórek T linii $\gamma\delta$ [88]. Szlaki sygnałowe inicjowane przez receptor interleukiny 7 pobudzają rearanżację *locus* TCR γ i przypuszczalnie dlatego komórki z dużą liczbą receptorów tej interleukiny mają większy potencjał rozwojowy w kierunku komórek T linii $\gamma\delta$, niż tymocyty z niską liczbą receptorów interleukiny 7, które różnicują się preferencyjnie do komórek T linii $\alpha\beta$ [79]. Dalsze różnicowanie tymocytów zależy od wyniku rearanżacji genów kodujących receptory antygenowe.

4. REARANŻACJE GENÓW KODUJĄCYCH RECEPTORY ANTYGENOWE

Rearanżacją *locus* TCR (α , β , γ , δ) jest nazywany proces rekombinacji somatycznej genów kodujących TCR, który polega na charakteryzującym się zmiennością przemiesz-



Ryc. 1. Różnicowanie komórek T linii αβ w grasicy. Przedstawiono kolejne stadia rozwojowe tymocytów podwójnie negatywnych (DN1, DN2, DN3a, DN3b, DN4), niedojrzałych tymocytów pojedynczo pozytywnych (ISP), tymocytów podwójnie pozytywnych (DP) i dojrzałych tymocytów pojedynczo pozytywnych (SP). Oznaczenia: Tγδ – komórki T linii γδ; Treg – naturalne limfocyty T regulatorowe. Wyjaśnienie pozostałych oznaczeń jest w wykazie skrótów i tekście

czaniem i delecją sekwencji DNA (minigenów) w obrębie określonych segmentów V/D/J (variable/diversity/joining segments), co powoduje nieodwracalne utworzenie sekwencji genów kodujących receptory TCRγδ lub TCRαβ o uni-

katowej swoistości rozpoznawanego antygeny. Najbardziej zmienny region w łańcuchach polipeptydowych podjednostek TCRα (V_αJ_α/C_α) i TCRβ (V_βD_βJ_β/C_β) receptora antygenowego jest kodowany przez region DNA będący miej-

scem łączenia segmentów V(D)J w procesie odznaczającym się dużą zmiennością [55]. Rearanżacja genów kodujących podjednostki TCR γ ($V_{\gamma}J_{\gamma}/C_{\gamma}$) i TCR δ ($V_{\delta}D_{\delta}J_{\delta}/C_{\delta}$) rozpoczyna się w stadium różnicowania DN2. Tymocyty, w których rearanżacje genów TCR γ i TCR δ nie doprowadziły do powstania funkcjonalnego receptora TCR $\gamma\delta$, wciąż mają szansę na rozwój w kierunku komórek T linii $\alpha\beta$. Rearanżacja genu TCR β zachodzi najczęściej w stadiach DN2 i DN3. W przypadku nieproduktywnego wyniku rearanżacji jednego allelu *locus* TCR β jest podejmowana próba rearanżacji drugiego allelu [62,110].

Łańcuch polipeptydowy TCR β w wyniku połączenia mostkiem dwusiarczkowym z niezmiennym łańcuchem polipeptydowym pT α tworzy stabilny heterodimer pre-TCR [36,55]. Produktywne rearanżacje *loci* TCR skutkują ekspresją genów kodujących receptory TCR $\gamma\delta$ lub pre-TCR. Komórki w stadium DN3 stanowią heterogenną populację komórek, gdyż część komórek należy do subpopulacji małych komórek bez receptora TCR $\gamma\delta$ lub pre-TCR (stadium DN3a), a część komórek należy do subpopulacji większych komórek (stadium DN3b), które już mają na powierzchni receptor TCR $\gamma\delta$ lub pre-TCR i mogą aktywować wewnątrzkomórkowe białka sygnałowe (ryc. 1). TCR $\gamma\delta$ lub pre-TCR są ekspozowane na powierzchni komórki w kompleksie z białkami CD3, które występują w postaci dimerów CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\epsilon\delta$ i $\zeta\zeta$ [121]. Zewnątrzkomórkowe domeny białek CD3 $\gamma\epsilon$ i CD3 $\epsilon\delta$ oddziałują z TCR, podczas gdy części cytoplazmatyczne białek CD3 zawierają motywy ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Łańcuchy ζ zawierają trzy motywy ITAM, a po jednym motywie ITAM mają pozostałe białka kompleksu CD3. Motywy ITAM zawierają reszty dwóch tyrozyn, które są fosforylowane przez białkową kinazę tyrozynową w wyniku aktywacji kompleksu TCR/CD3. Sekwencje ITAM z fosforylowanymi resztami tyrozyn stanowią miejsca zakotwiczenia białek sygnałowych, które dokonują tłumaczenia informacji o aktywacji TCR/CD3 przez ligand (peptyd/MHC) na sekwencje zmian biochemicznych, takich jak fosforylacja białek, wytwarzanie wtórnych przekaźników sygnału i aktywacje genów.

Indukcja różnicowania tymocytów linii $\alpha\beta$ ze stadium DN3 do DN4 wymaga współdziałania aktywacji Notch i pre-TCR [38,103,107]. W stadium DN4 tymocyty intensywnie proliferują i następnie różnicują się do komórek CD4⁺CD8⁺, które są nazywane tymocytami podwójnie pozytywnymi (DP). W wyniku rearanżacji *locus* TCR α receptor pre-TCR jest w tymocytach stadium DP zastępowany przez receptor TCR $\alpha\beta$.

Rearanżacja *locus* TCR α może zachodzić jednocześnie na obu chromosomach i jest procesem mniej złożonym od rearanżacji *locus* TCR β , gdyż są łączone segmenty V_{α} i J_{α} . Rearanżacje *locus* TCR α zachodzą w tymocytach DP, chociaż czasami mogą zachodzić już w końcowym stadium DN4 [96]. W wyniku rearanżacji *locus* TCR α ekspresja genów kodujących receptor TCR $\gamma\delta$ jest już niemożliwa z dwóch powodów:

- (1) rearanżacja $V_{\alpha}J_{\alpha}$ powoduje delecję *locus* TCR δ , który jest umiejscowiony między segmentami V_{α} i J_{α} ;
- (2) transkrypcja genu $V_{\gamma}J_{\gamma}/C_{\gamma}$ zostaje wyciszona w komórkach T linii $\alpha\beta$ [28,42].

5. PUNKTY KONTROLNE RÓZNICOWANIA TYMOCYTÓW

W procesie różnicowania tymocytów w kierunku limfocytów T linii $\alpha\beta$ można wyróżnić przynajmniej dwa punkty kontrolne: **selekcję β** w stadium DN3 oraz **selekcję pozytywną i selekcję negatywną** w stadium DP [52,54,81,104,108]. W pierwszym punkcie kontrolnym, który decyduje o dalszym rozwoju komórek T linii $\gamma\delta$ lub $\alpha\beta$, aktywacja szlaków sygnałowych receptora TCR $\gamma\delta$ lub pre-TCR dostarcza sygnałów ratujących tymocyty DN3 przed apoptozą (ryc. 1). Z kolei w drugim punkcie kontrolnym tymocyty DP są ratowane przed apoptozą przez sygnały selekcji pozytywnej, które zależą od aktywacji TCR $\alpha\beta$. Selekcja pozytywna do dalszego różnicowania dopuszcza tymocyty z TCR $\alpha\beta$ użytecznym, tzn. zdolnym do rozpoznania obcego antygeny w kontekście MHC i aktywacji wewnątrzkomórkowych białek sygnałowych. Skutkiem selekcji pozytywnej jest rozwój tymocytów DP w kierunku dojrzałych komórek T, które mają tylko jeden koreceptor (CD4 lub CD8) i dlatego są określane jako tymocyty pojedynczo pozytywne (SP) (ryc. 1). W drugim punkcie kontrolnym są również w procesie selekcji negatywnej eliminowane potencjalnie autoreaktywne limfocyty T, głównie za pośrednictwem apoptozy w następstwie zbyt silnej aktywacji TCR $\alpha\beta$. Część negatywnie selekcionowanych tymocytów nie ulega jednak apoptozie, ale kontynuuje rearanżację *locus* TCR α , która prowadzi do zmiany swoistości receptora TCR $\alpha\beta$ lub opuszczające grasicę komórki T są w stanie anergii [34,74].

6. PIERWSZY PUNKT KONTROLNY RÓZNICOWANIA TYMOCYTÓW: WYBÓR LINII $\gamma\delta$ LUB $\alpha\beta$ (SELEKCJA β)

W pierwszym punkcie kontrolnym jest podejmowana decyzja o dalszym różnicowaniu tymocytu albo w kierunku limfocytu T linii $\gamma\delta$, albo w kierunku limfocytu T linii $\alpha\beta$. Do dalszego rozwoju w kierunku komórek T linii $\alpha\beta$ są selekcionowane tylko te tymocyty, w których produktem zrearanżowanego genu TCR β jest łańcuch polipeptydowy zdolny do utworzenia heterodimeru z podjednostką pT α (stąd nazwa: selekcja β). Przypuszczalnie silny sygnał aktywacji receptora antygenowego (TCR $\gamma\delta$ lub przedwczesnego TCR $\alpha\beta$) determinuje rozwój tymocytów w kierunku limfocytów T linii $\gamma\delta$ [60]. Przeciwnie zaś, słabsza aktywacja białek sygnałowych przez pre-TCR, we współdziałaniu ze szlakiem sygnałowym Notch, pobudza różnicowanie tymocytów myszy w kierunku limfocytów T linii $\alpha\beta$ [42,62]. W wyniku selekcji β w tymocytach dochodzi do wyciszenia transkrypcji genu kodującego TCR γ [28]. Jednak tymocyty, które otrzymały sygnał od pre-TCR do różnicowania w kierunku komórek T linii $\alpha\beta$ mogą w wyniku silnej aktywacji kompleksu TCR/CD3 *in vitro* jeszcze ulec konwersji do komórek T linii $\gamma\delta$ [60]. Także przedwczesna ekspresja transgenów TCR $\alpha^T\beta^T$ w tymocytach DN może pobudzać różnicowanie takich tymocytów w kierunku komórek T linii $\gamma\delta$, które wówczas nie rozpoczynają rearanżacji *locus* TCR α i opuszczają grasicę jako funkcjonalne komórki „ $\gamma\delta$ ”, ale z receptorem TCR $\alpha^T\beta^T$ [15,111]. Natomiast u myszy nietransgenicznnej rearanżacja *locus* TCR α prowadzi do usunięcia *locus* TCR γ , co uniemożliwia konwersję komórek T linii $\alpha\beta$ do linii $\gamma\delta$.

6.1. Szlaki sygnałowe pre-TCR

Kompleks białek pre-TCR/CD3 jest połączony z kinazą białkową LCK [55]. Pre-TCR na powierzchni komór-

ki ulega oligomeryzacji, co powoduje aktywację szlaków sygnałowych w komórce [120]. Aktywacja kompleksu pre-TCR/CD3 powoduje aktywację kinaz tyrozynowych LCK i ZAP70 oraz fosforylację ważnych białek adaptacyjnych: zakotwiczonego w błonie komórkowej białka LAT oraz cytosolowego białka SLP76 [109,110]. Pre-TCR ulega następnie szybkiej internalizacji i degradacji [3,109].

U myszy z nokautem *Slp76*^{-/-} obserwowano całkowite zahamowanie różnicowania tymocytów w stadium DN3 oraz złamanie zasady wyłączenia allelicznego [59]. Terminem „wyłączenie alleliczne” (allelic exclusion) w tym wypadku określa się zahamowanie rearanżacji drugiego allelu *locus* TCR β , a ściślej odstępianie od połączenia segmentu V β ze zrearanżowanym regionem D β J β [55]. Fenotyp myszy *Slp76*^{-/-} wskazuje zatem na rolę białek sygnałowych (rekrutowanych do kompleksu pre-TCR/CD3 za pośrednictwem białka SLP76) w przekazaniu informacji o powstaniu produktywniej rearanżacji *locus* TCR β w postaci sygnału do wyłączenia rearanżacji drugiego allelu *locus* TCR β i do ekspansji (głównie w stadium DN4) tylko tych klonów tymocytów, w których proces rearanżacji *locus* TCR β doprowadził do utworzenia funkcjonalnego TCR β [59]. Istotną rolę w przeżyciu tymocytów stadium DN4 pełni białko antyapoptotyczne Bcl-2A1 (Bcl-2-related protein A1) w błonie mitochondrium [68,122]. Ekspresja genu *Bcl-2A1* jest indukowana przez zależną od pre-TCR aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [68]. Tymocyty w stadium różnicowania DN4 rozpoczynają migrację z części podtorebkowej grasicy przez korę w kierunku rdzenia grasicy [4,96]. Różnicowanie tymocytów DN4 postępuje poprzez przejściowe stadium ISP (CD4^{niski}CD8⁻ lub CD4⁻CD8^{niski}) do stadium komórek DP [81] (ryc. 1). Podsumowując, występowanie pre-TCR na powierzchni komórki wskazuje na produktywną rearanżację *locus* TCR β i w konsekwencji powoduje wyłączenie rearanżacji drugiego allelu *locus* TCR β , ponadto ratuje tymocyty przed apoptozą oraz indukuje ekspansję klonalną i prowadzi do ekspresji koreceptorów CD4/CD8 w następnym stadium różnicowania komórek T linii $\alpha\beta$.

6.2. Rola sierociego receptora jądrowego ROR γ t w rozpoczęciu rearanżacji *locus* TCR α oraz w przeżyciu tymocytów wczesnego stadium CD4⁺CD8⁺

Konsekwencją selekcji β jest faza ekspansji tymocytów z produktywną rearanżacją *locus* TCR β . Tymocyty intensywnie proliferują w stadiach rozwojowych DN4 i ISP (ryc. 1). Jednak w następnym stadium różnicowania, czyli w tymocytach DP, zachodzą procesy rearanżacji *locus* TCR α . Zatrzymanie proliferacji tymocytów jest warunkiem niezbędnym do rozpoczęcia rearanżacji genu. W jaki sposób na poziomie molekularnym jest koordynowane wyhamowanie proliferacji komórki i rozpoczęcie rearanżacji *locus* TCR α ? Aby odpowiedzieć na to pytanie, należy wyjaśnić relacje między trzema czynnikami transkrypcyjnymi: Egr3, Id3 i ROR γ t. Aktywacja pre-TCR prowadzi do zwiększenia stężenia czynników transkrypcyjnych rodziny Egr (early growth response), które następnie indukują ekspresję genu kodującego białko represorowe Id3 (inhibitor of DNA binding 3) [119]. Z kolei białko Id3 jest represorem genu kodującego receptor jądrowy ROR γ t [117,119]. Białko ROR γ t jest występującą w tymocytach izoformą czynnika transkrypcyjnego ROR γ (retinoic acid receptor-related or-

phan receptor γ), który jest sierocym receptorem jądrowym (tzn. nie zidentyfikowano liganda receptora). Na znaczenie ROR γ t w różnicowaniu tymocytów wskazuje obserwacja u myszy z nokautem *ROR γ ^{-/-}* zahamowanie różnicowania tymocytów stadium ISP do tymocytów DP oraz obniżenie żywotności tymocytów DP [39]. Białko Egr3 może tworzyć kompleksy z białkiem ROR γ t hamując ekspresję genów aktywowanych przez ROR γ t [119]. Podsumowując, szlaki sygnałowe pre-TCR, za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych Egr3 i Id3, powodują wyciszenie ekspresji i funkcji receptora jądrowego ROR γ t.

Jednak wraz z kolejnymi podziałami tymocytów stadium DN4 stężenie białka Egr3 w komórce obniża się poniżej stężenia niezbędnego do podtrzymania ekspresji genu kodującego represor Id3. Wyciszenie ekspresji *Id3* prowadzi natomiast do wzrostu stężenia białka ROR γ t. Białko ROR γ t jest w tymocytach aktywatorem transkrypcji m.in. genów kodujących białko Cpeb4 (cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4), rekombinazę Rag2 (recombination activating gene 2) oraz antyapoptotyczne białko Bcl-X_L [119]. Aktywność białka Cpeb4 powoduje zatrzymanie proliferacji tymocytów i wówczas rekombinaza Rag2 może rozpocząć rearanżację *locus* TCR α .

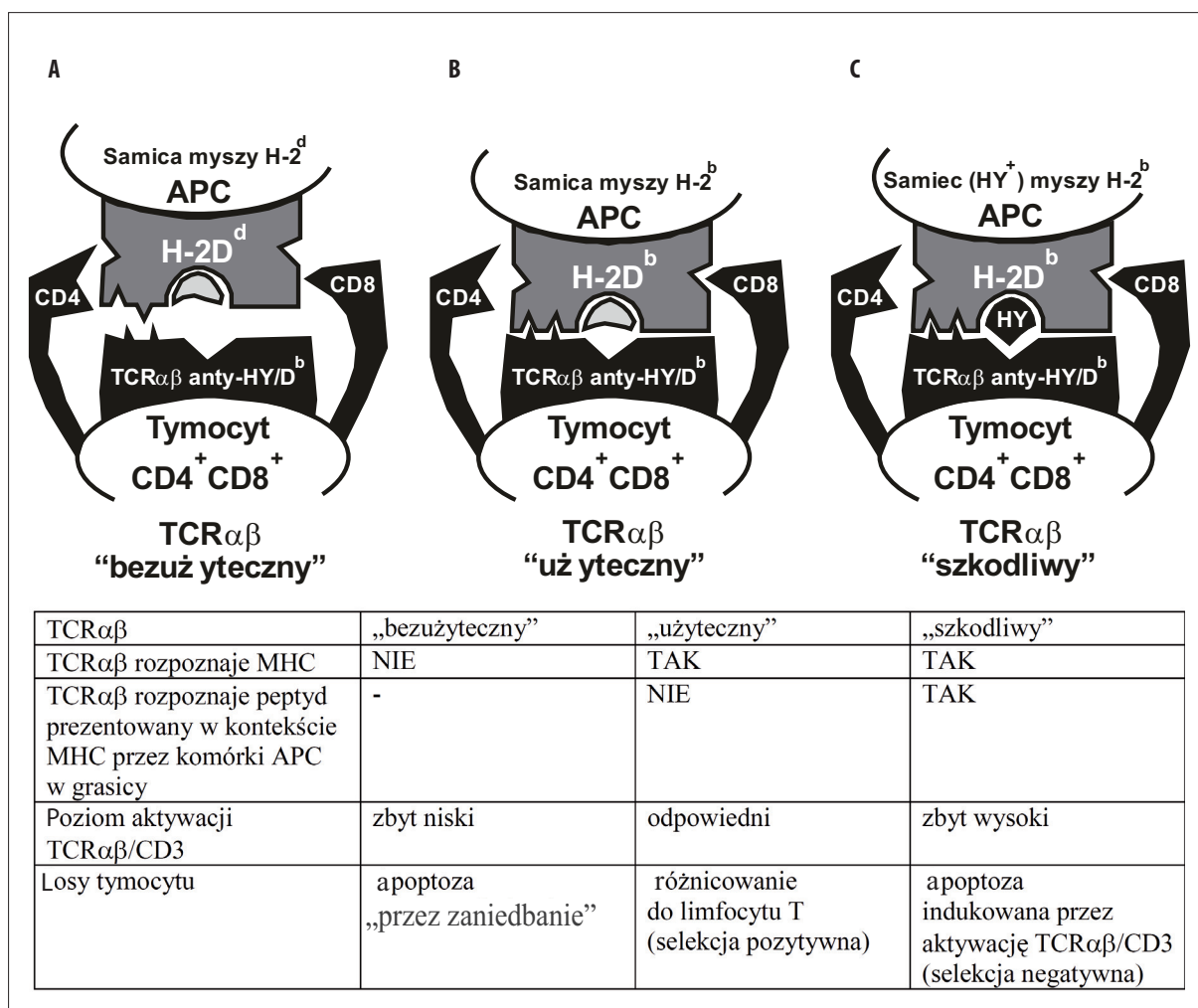
W tymocytach myszy z nokautem genu *ROR γ ^{-/-}* odnotowano jedynie śladową ilość białka Bcl-X_L, co wskazuje na ważną rolę białek ROR γ w indukcji ekspresji genu *bcl-x* kodującego Bcl-X_L [117]. Białko Bcl-X_L przypuszczalnie chroni przed apoptozą tymocyty wczesnego stadium DP, w których jeszcze może dojść do produktywniej rearanżacji *locus* TCR α i do ratującej przed apoptozą aktywacji receptora TCR $\alpha\beta$ przez ligandy selekcjonujące pozytywnie [18].

7. DRUGI PUNKT KONTROLNY: SELEKCJA POZYTYWNA I NEGATYWNA TYMOCYTÓW Z TCR $\alpha\beta$

Wytworzone receptory TCR $\alpha\beta$ o unikalnej swoistości wobec antygenów prezentowanych w kontekście MHC mogą być dla organizmu użyteczne, bezużyteczne lub nawet szkodliwe [112,113]. Limfocyty T są dla organizmu użyteczne, jeżeli za pomocą TCR $\alpha\beta$ mogą rozpoznawać obce antygeny, prezentowane w kontekście cząsteczek MHC przez inne komórki organizmu. Użyteczny TCR $\alpha\beta$ musi rozpoznawać MHC klasy I lub II (gdyż w przeciwnym wypadku byłby receptorem bezużytecznym), ale nie może rozpoznawać własnych antygenów organizmu w kontekście MHC (gdyż w przeciwnym wypadku wyposażone w taki receptor limfocyty T mogłyby być szkodliwe dla organizmu). W drugim punkcie kontrolnym są pobudzone do dalszego rozwoju tymocyty, których TCR $\alpha\beta$ jest receptorem użytecznym i proces ten jest nazywany selekcją pozytywną. Natomiast tymocyty z potencjalnie szkodliwym TCR $\alpha\beta$ są eliminowane w procesie selekcji negatywnej. Przykładowo, receptor TCR $\alpha\beta$ anty-HY/D^b rozpoznaje samczy antygen HY w kontekście H-2D^b. Antygen HY nie występuje u samic. Tymocyty z receptorem TCR $\alpha\beta$ anty-HY/D^b u myszy z haplotypem H-2^b są więc selekcjonowane pozytywnie u samic i negatywnie u samców (ryc. 2).

7.1. Rola białek Bax i Bak w apoptozie tymocytów

W procesie różnicowania tymocyty DP są zaprogramowane do apoptozy, jeżeli w określonym czasie nie otrzymają



Ryc. 2. Selekcja tymocytów z TCRαβ anty-HY/D^b. Receptor antygenowy komórek T może być dla organizmu bezużyteczny (A), użyteczny (B) lub szkodliwy (C). Oznaczenia: H-2D^b i H-2D^d – cząsteczki MHC klasy I kodowane przez gen w regionie D (tutaj haplotypy b i d), które prezentują peptydy receptorom antygenowym (TCRαβ) na limfocytach T CD8⁺. Wyjaśnienie pozostałych oznaczeń jest w wykazie skrótów

sygnału antyapoptotycznego, który ratuje tymocyty przed śmiercią „przez zaniedbanie” [55,95] (ryc. 2). Brak białka antyapoptotycznego może być wystarczający do indukcji apoptozy tymocytów z bezużytecznym TCRαβ w wyniku spontanicznej aktywacji białek Bax (Bcl-2-associated X protein) i Bak (Bcl-2-antagonist/killer), które są białkami proapoptotycznymi z rodziny Bcl-2 [122]. Do rodziny Bcl-2 są klasyfikowane białka, które mają przynajmniej jedną z czterech konserwowanych domen BH1-BH4 (Bcl-2 homology domains). Białka rodziny Bcl-2 można podzielić na proapoptotyczne (m.in. Bax, Bak, Bim) i antyapoptotyczne (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-2A1) [1,122]. Białka proapoptotyczne ekspozują na zewnątrz proapoptotyczną sekwencję BH3. W strukturze białek antyapoptotycznych jest natomiast formowana szczelina hydrofobowa (utworzona przez helisy α domen BH1, BH2 i BH3), która może pomieścić helisę amfipatyczną BH3 inaktywowanego białka proapoptotycznego [1]. Rola antyapoptotycznego białka Bcl-2 i Bcl-X_L polega właśnie na wiązaniu i tym samym neutralizacji wolnych sekwencji proapoptotycznych BH3. Tymocyty wczesnego stadium DP są chronione przed apoptozą przez białko Bcl-X_L, które w następstwie selekcji pozytywnej jest zastępowane przez białko Bcl-2.

Białka Bax i Bak działają redundantnie jako induktory apoptozy [83]. Bax i Bak występują w komórce w postaci nieaktywnej: Bax występuje w cytosolu w postaci monomerycznej, podczas gdy Bak jest umiejscowiony w błonie mitochondrialnej, ale nie jest aktywny, gdyż tworzy kompleks z białkami antyapoptotycznymi Bcl-X_L lub Mcl-1 [122]. Brak sygnału ratującego komórkę przed apoptozą sprzyja spontanicznej aktywacji Bax i Bak. W wyniku aktywacji białko Bax ulega translokacji z cytosolu do zewnętrznej błony mitochondrium. Następnie aktywne białka Bax i Bak oligomeryzują w błonie mitochondrium i tworzą kompleks przepuszczalny dla niektórych białek mitochondrialnych (w tym dla cytochromu c), które po przedostaniu się do cytosolu aktywują szlaki apoptozy zależnej od mitochondrium, w tym sekwencyjne aktywacje proteaz nazywanych kaspazami [122]. Cytochrom c po uwolnieniu z mitochondrium tworzy w cytosolu kompleks z białkami APAF-1 (apoptotic protease-activating factor-1) i prokaspazą 9, który jest nazywany apoptosomem. W apoptosomie zachodzi aktywacja kaspazy 9. Aktywna kaspaza 9 z kolei inicjuje aktywację kaspazy 3, która następnie trawi białka komórki w fazie egzekucyjnej apoptozy [98].

Podsumowując, tymocyty DP są zaprogramowane do apoptozy „przez zaniedbanie”, jeżeli w określonym czasie nie otrzymają ratującego przed apoptozą sygnału selekcji pozytywnej. Apoptoza jest indukowana w wyniku aktywacji białek Bax i Bak, do której może dochodzić spontanicznie, tzn. bez specjalnego induktora apoptozy. Podejrzewa się także udział glikokortykoidów lub adenozyiny w indukcji apoptozy tych tymocytów DP, które nie otrzymały sygnałów selekcji pozytywnej [6,56]. Glikokortykoidy i adenozyina mogłyby przyspieszać aktywację białek Bax/Bak. Głównym źródłem glikokortykoidów w organizmie są nadnercza, lecz także komórki epitelialne grasicy mogą wytwarzać glikokortykoidy [6,48]. Po wnikięciu do komórki glikokortykoidy łączą się w cytoplazmie z receptorem glikokortykoidów, który po translokacji do jądra reguluje transkrypcję wielu genów. Natomiast adenozyina jest w grasicy wytwarzana przez makrofagi fagocytujące apoptotyczne tymocyty [56]. Receptory A_{2A} adenozyiny znajdują się na powierzchni tymocytów i ich aktywacja prowadzi do syntezy cyklicznego adenyzynomonofosforanu (cAMP) [91]. Z kolei aktywacja kinazy białkowej A przez cAMP prowadzi do apoptozy tymocytów [71]. Szlaki biochemiczne aktywowane przez glikokortykoidy i receptor A_{2A} adenozyiny mogą współdziałać w indukcji apoptozy z udziałem białek Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death) [123].

7.2. Sygnały ratujące tymocyty przed programowaną śmiercią

Tymocyty wczesnego stadium DP są chronione przed apoptozą przez białko Bcl- X_L , którego poziom zależy od ekspresji genu aktywowanego przez receptor jądrowy ROR γ t, a następnie stężenia białek ROR γ t i Bcl- X_L ulegają obniżeniu [43,96]. Z kolei tymocyty późnego stadium DP przed apoptozą ratuje dopiero indukcja ekspresji genu *bcl-2* przez sygnały selekcji pozytywnej tych tymocytów, których TCR $\alpha\beta$ wiąże kompleksy peptyd/MHC na komórkach epitelialnych kory grasicy z powinowactwem wystarczającym do wywołania zmian konformacyjnych kompleksu TCR $\alpha\beta$ /CD3 i aktywacji wewnątrzkomórkowych białek sygnałowych [18,80].

Tymocyty, które otrzymały sygnał selekcji pozytywnej wyróżniają się ekspresją CD69 (wczesny marker aktywacji limfocytów T) i zwiększeniem liczby receptorów TCR $\alpha\beta$ na powierzchni komórki. Sygnał selekcji pozytywnej powoduje również wyciszenie ekspresji genu kodującego pT α i genów Rag1/Rag2 [109]. Tymocyty późnego stadium DP/CD69⁺ różnicują się w kierunku tymocytów stadium SP (CD4⁺CD8⁻ lub CD4⁺CD8⁺) w zależności od koreceptora (CD4 lub CD8) współdziałającego z TCR $\alpha\beta$ w oddziaływaniu z kompleksem peptyd/MHC [54,104].

Tymocyty DP/TCR $\alpha\beta$ ^{niski} z receptorem TCR $\alpha\beta$ anty-HY/D^b, które jeszcze nie otrzymały sygnału selekcji pozytywnej (gdyż były izolowane z myszy H-2^d), po wszczepieniu do grasicy samicy H-2^b (MHC selekcyjnej pozytywnej) różnicowały się do komórek CD4⁺CD8⁺TCR $\alpha\beta$ ^{wysoki}, co stanowi bezpośredni dowód na różnicowanie tymocytów DP do tymocytów stadium SP w obecności pozytywnie selekcyjnych kompleksów peptyd/MHC [100]. Proces selekcji pozytywnej tymocytów, ratujący przed zaprogramowaną śmiercią i dostarczający impulsów do dalszego różnicowania w kierunku komórek SP, wymaga wielokrotnych od-

działywań TCR $\alpha\beta$ /CD3 z kompleksami peptyd/MHC na komórkach epitelialnych w korze grasicy [53].

7.3. Indukcja apoptozy zależnej od aktywacji TCR $\alpha\beta$ /CD3

Tymocyty po selekcji pozytywnej migrują z kory do rdzenia grasicy, czyli do miejsca końcowego dojrzewania komórek T przed opuszczeniem grasicy. Jeżeli jednak TCR $\alpha\beta$ tymocytów ma zbyt duże powinowactwo do kompleksu peptyd/MHC na komórkach epitelialnych rdzenia grasicy i na komórkach dendrytycznych, to wówczas takie tymocyty są eliminowane w procesie selekcji negatywnej. Głównym mechanizmem selekcji negatywnej w grasicy jest indukcja apoptozy zależnej od aktywacji TCR $\alpha\beta$ /CD3 [93]. Negatywnie selekcyjonowane tymocyty oprócz aktywacji TCR $\alpha\beta$ /CD3 otrzymują również dodatkowy sygnał nazywany kostymulacją, który może być skutkiem aktywacji CD28 na tymocytach przez ligandy CD80/CD86, występujące na komórkach prezentujących antygeny w rdzeniu grasicy, a więc zarówno na komórkach dendrytycznych, jak i na komórkach epitelialnych [74,95]. Delekcję tymocytów DP/TCR $\alpha\beta$ ^{niski} w procesie apoptozy indukowanej w wyniku aktywacji autoreaktywnego TCR $\alpha\beta$ anty-HY/D^b u samców myszy H-2^b obserwowano jednak na wcześniejszym etapie różnicowania tymocytów jeszcze w korze grasicy [52,99] (ryc. 2). Zatem delekcja autoreaktywnych tymocytów może zachodzić zarówno w stadium różnicowania tymocytów DP/TCR $\alpha\beta$ ^{niski} w korze grasicy, jak i w późniejszych stadiach dojrzewania tymocytów SP/CD24^{wysoki} w rdzeniu grasicy [45,50,95,111]. Należy jednak uczynić zastrzeżenie, że istotne rozbieżności między modelami badawczymi w ustaleniu stadium różnicowania tymocytów, które *in vivo* podlegają procesom selekcji negatywnej, mogą być spowodowane zarówno przedwczesną ekspresją transgenów kodujących TCR $\alpha\beta$, jak też potencjalnymi różnicami w prezentacji selekcyjnego antygeny. Prekursory autoreaktywnych komórek T CD8⁺ rozpoznających autoantygeny wszędziebylskie mogłyby być eliminowane głównie w korze grasicy z udziałem komórek epitelialnych kory grasicy, podczas gdy tymocyty rozpoznające autoantygeny tkankowoswoiste, a zwłaszcza autoreaktywne komórki T CD4⁺ byłyby eliminowane w rdzeniu grasicy przy współudziale komórek dendrytycznych i epitelialnych [74,111]. Należy również podnieść istotne zastrzeżenie do modeli selekcji negatywnej tymocytów *in vivo*, w których myszom wstrzykuje się przeciwciała anty-TCR $\alpha\beta$ /CD3 lub antygeny rozpoznawane przez TCR $\alpha\beta$, gdyż wówczas delekcja niedojrzałych tymocytów w grasicy może być indukowana zarówno przez aktywację TCR $\alpha\beta$ /CD3 na tymocytach, jak również przez kortykosteron (glikokortykoid) i czynnik martwicy nowotworu (TNF- α), które są uwalniane do krążenia w wyniku aktywacji TCR $\alpha\beta$ /CD3 na obwodowych limfocytach T [13,95].

Aby proces selekcji negatywnej był skuteczny w eliminacji autoreaktywnych tymocytów, muszą istnieć mechanizmy prezentacji w grasicy nie tylko antygenów występujących powszechnie na wszystkich komórkach organizmu, ale również mechanizmy ekspresji antygenów tkankowoswoistych. Czynniki transkrypcyjny AIRE (autoimmunity regulator) reguluje ekspresję przynajmniej części tkankowoswoistych antygenów w komórkach epitelialnych rdzenia grasicy [4,5]. Antygeny tkankowoswoiste prezentowa-

ne przez komórki dendrytyczne pochodzenia szpikowego mogą natomiast pochodzić z fagocytowanych apoptotycznych komórek epitelialnych rdzenia grasicy [27,45,87]. Warto odnotować, że u myszy z nokautem *AIRE*^{-/-} wykazano zahamowanie selekcji negatywnej autoreaktywnych tymocytów w stadiach różnicowania DP i SP, co może pośrednio wskazywać na prezentację tkankowoswoistych antygenów również w korze grasicy [66].

Selekcja negatywna tymocytów w grasicy, nazywana centralnym mechanizmem tolerancji immunologicznej, nie jest oczywiście jedynym mechanizmem tolerancji wobec własnych antygenów, tym bardziej że część potencjalnie autoreaktywnych komórek T nie ulega apoptozie i przedostaje się z grasicy do obwodowych narządów limfatycznych [45]. Autoreaktywne obwodowe limfocyty T na skutek ciągłej stymulacji TCR $\alpha\beta$ przez autoantigen są eliminowane w procesie apoptozy zależnej od aktywacji receptora Fas przez ligand Fas [98]. Znaczącą rolę w aktywnym utrzymywaniu tolerancji wobec własnych antygenów pełnią komórki T regulatorowe (CD4⁺CD25⁺), których rozwój i aktywność supresorowa zależą od ekspresji i funkcji czynnika transkrypcyjnego Foxp3 [30,46]. Jednak na znaczenie centralnego mechanizmu tolerancji immunologicznej w usuwaniu autoreaktywnych komórek T wskazuje dramatyczne przyspieszenie rozwoju chorób autoimmunizacyjnych i skrócenie czasu życia myszy z podwójnym nokautem *AIRE*^{-/-}*Foxp3*^{-/-} w porównaniu ze zwierzętami z nokautem jedynie *Foxp3*^{-/-} [93].

8. SZLAKI SYGNAŁOWE TCR $\alpha\beta$

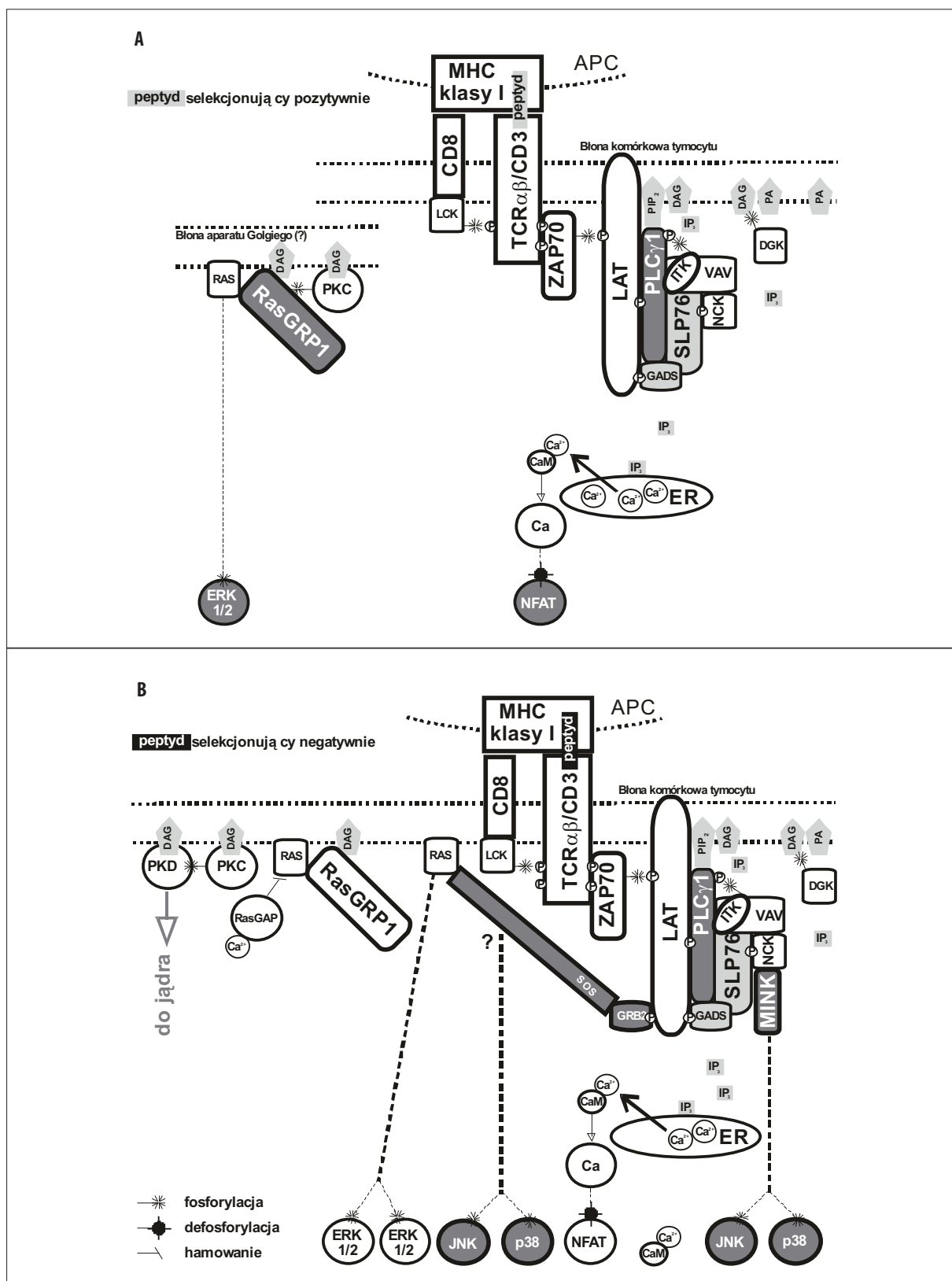
Oddziaływanie kompleksu TCR $\alpha\beta$ /CD3 komórki T z kompleksem peptyd/MHC na komórce APC wywołuje zmiany konformacyjne wewnątrz kompleksu TCR $\alpha\beta$ /CD3, które umożliwiają fosforylację reszt tyrozyny w motywach ITAM przez kinazę białkową LCK, która jest w kompleksie z koreceptorami [55]. W następstwie fosforylacji do miejsc ITAM jest rekrutowana kinaza białkowa ZAP70 oraz białko adaptorowe LAT. Kinaza białkowa ZAP70 fosforyluje reszty tyrozyny w białku LAT [94]. Fosforylowane białko LAT może wiązać fosfolipazę C γ 1 (PLC γ 1) oraz białko adaptorowe GRB2 i GADS, które w cytosolu występują w kompleksach GRB2/SOS i GADS/SLP76 (ryc. 3). Oddziaływanie TCR $\alpha\beta$ z peptydami selekcyjnymi negatywnie prowadziło do wyższego poziomu fosforylacji białka LAT (i w konsekwencji do rekrutacji kompleksu białek GRB2/SOS), niż w następstwie oddziaływania TCR $\alpha\beta$ z peptydami selekcyjnymi pozytywnie [22,82]. Fosfolipaza C γ 1, która za pośrednictwem białek adaptorowych LAT i SLP76 jest rekrutowana do kompleksu białek sygnałowych połączonych z TCR $\alpha\beta$ /CD3, wymaga jeszcze aktywacji przez kinazę białkową fosforylującą reszty tyrozyny. Rola tę pełni kinaza białkowa ITK, która wiąże się z białkiem SLP76 w sąsiedztwie PLC γ 1 i jest aktywowana przez kinazę białkową LCK [10] (ryc. 3). Fosfolipaza C γ 1 hydrolizuje fosfatydyloinozitol błony komórkowej do trifosforanu inozytolu (IP3) i diacyloglicerolu (DAG). IP3 jest rozpuszczalny w cytosolu i wiąże się ze swoistymi receptorami w siateczce śródplazmatycznej, co powoduje wzrost stężenia jonów Ca²⁺ w cytosolu, aktywację kalcyneuryny przez Ca²⁺ i zależną od kalcyneuryny translokację czynnika transkrypcyjnego NFAT do jądra komórki. Oddziaływanie TCR $\alpha\beta$ z peptydami selekcyjnymi

negatywnie prowadziło do większego wzrostu stężenia Ca²⁺ w cytosolu, niż w następstwie oddziaływania TCR $\alpha\beta$ z peptydami selekcyjnymi pozytywnie [22]. W przeciwieństwie do IP3, DAG pozostaje w błonie komórkowej i może aktywować kinazy białkowe C i D oraz RasGRP1 (ryc. 3).

Białko RasGRP1 jest wymiennikiem nukleotydu guanozynowego w białkach Ras. Białka Ras w stanie nieaktywnym wiążą GDP. Białko RasGRP1 pobudza dysocjację GDP, co umożliwia zajęcie wolnego miejsca w Ras przez GTP, a to powoduje zmianę konformacji białka i aktywację Ras. Białko RasGRP1 jest niezbędne w selekcji pozytywnej, podczas gdy nie wykazano znaczącej roli tego białka w selekcji negatywnej tymocytów [97]. Białko RasGRP1 w wyniku aktywacji PLC γ 1 może być – za pośrednictwem DAG – rekrutowane z cytosolu do błony zewnątrzkomórkowej oraz do błony aparatu Golgiego, gdzie jest aktywowane przez fosforylację przez kinazę białkową C [9,23] (ryc. 3A). Jednak aktywowana przez Ca²⁺ GTPaza Ras (RasGAP) powoduje szybkie wyciszenie aktywacji białka Ras związanego z zewnętrzną błoną komórkową, podczas gdy aktywność Ras związanego z błoną aparatu Golgiego jest długotrwała [9,76] (ryc. 3). Aktywacja Ras przez RasGRP1 prowadzi do aktywacji kinaz białkowych ERK1/ERK2, które pobudzają selekcję pozytywną tymocytów [96].

W wyniku aktywacji TCR $\alpha\beta$ /CD3 do białka LAT – za pośrednictwem białka GADS – jest rekrutowane wspomniane białko adaptorowe SLP76. Kinaza białkowa ZAP70 fosforyluje reszty tyrozyny w białku SLP76, które wówczas stają się miejscem rekrutacji kolejnych białek. Do białka SLP76 jest m.in. rekrutowane białko VAV, biorące udział w aktywacji białek RAC/CDC42, które biorą udział w przebudowie szkieletu komórki T w regionie tzw. synapsy immunologicznej, utworzonej między komórką T i komórką APC [35,75,105]. Białka adaptorowe LAT i SLP76 stanowią rusztowanie dla białek, które w następstwie aktywacji TCR $\alpha\beta$ /CD3 są w sposób skoordynowany rekrutowane do wieloskładnikowego kompleksu, stabilizowanego dzięki wzajemnym oddziaływaniom tworzących go składników [59]. Na przykład rekrutacja PLC γ 1 wymaga związania tego enzymu zarówno z białkiem LAT, jak i z białkiem SLP76 (ryc. 3). Wspomniane białko VAV jest niezbędne zarówno w pozytywnej, jak i negatywnej selekcji tymocytów, gdyż VAV dzięki oddziaływaniami z innymi białkami stabilizuje strukturę wieloskładnikowego kompleksu białek połączonych z TCR $\alpha\beta$ /CD3 i w ten sposób przyczynia się nawet do aktywacji PLC γ 1 [58,59,105].

Proponowany model aktywacji TCR $\alpha\beta$ /CD3 zakłada zróżnicowaną rekrutację białek sygnałowych do kompleksu TCR $\alpha\beta$ /CD3 w zależności od siły wiązania kompleksu peptyd/MHC przez TCR $\alpha\beta$ i od czasu trwania aktywacji TCR $\alpha\beta$ /CD3 [45,80,82,96]. Na przykład rekrutacja białka adaptorowego NCK do białka SLP76 wymaga odpowiednich zmian konformacyjnych w części cytoplazmatycznej CD3 ϵ , zachodzących w wyniku oddziaływania TCR $\alpha\beta$ /CD3 z kompleksem peptyd/MHC [31]. Do białka NCK może być rekrutowana kinaza białkowa serynowo-treoninowa MINK, która jest niezbędna w selekcji negatywnej tymocytów (ryc. 3B). Szlak sygnałowy zależny



Ryc. 3. Kompleks TCR $\alpha\beta/CD3$ aktywuje białka sygnałowe pełniące rolę w selekcji pozytywnej (A) i negatywnej (B) tymocytów. Ciemne figury oznaczają białka niezbędne w selekcji pozytywnej (PLC γ 1, RasGRP1, ERK1/2, NFAT) i negatywnej (PLC γ 1, GRB2/SOS, MINK, JNK, p38); Ca – kalcyneuryna (fosfataza białkowa serynowo-treoninowa aktywowana przez kalmodulinę/Ca²⁺); CaM – kalmodulina (białko wiążące Ca²⁺); DGK - kinazy diacyloglicerolu; ER – siateczka śródplazmatyczna; PIP₂ – dwufosforan fosfatydoinozytolu; PA – kwas fosfatydowy; PKC – kinaza białkowa C; PKD – kinaza białkowa D. Wyjaśnienie pozostałych oznaczeń jest w wykazie skrótów

od aktywności kinazy białkowej MINK nie został wyjaśniony, chociaż udokumentowano udział MINK w szlakach sygnałowych prowadzących do aktywacji kinaz białkowych JNK i indukcji ekspresji proapoptotycznego genu *bim* w tymocytach [73].

Reasumując:

- (1) struktura kompleksu białek rekrutowanych do TCR $\alpha\beta$ /CD3 jest zależna od powinowactwa TCR $\alpha\beta$ do kompleksu peptyd/MHC;
- (2) w zależności od składu kompleksu białek związanych z TCR $\alpha\beta$ /CD3 mogą w nim przeważać białka, których aktywność prowadzi do selekcji pozytywnej lub negatywnej tymocytów. Na przykład RasGRP1 pełni istotną rolę w selekcji pozytywnej, podczas gdy kinaza białkowa MINK pełni istotną rolę w selekcji negatywnej tymocytów.

8.1. Rola aktywacji kinaz białkowych ERK1/ERK2 w selekcji pozytywnej oraz kinaz białkowych JNK w selekcji negatywnej tymocytów

W wyniku oddziaływania TCR $\alpha\beta$ z ligandami selekcyjnymi pozytywnie dochodzi do aktywacji białka RasGRP1 przez diacyloglicerol (DAG) w błonie aparatu Golgiego i następnie do słabej, ale długotrwałej aktywacji kinaz białkowych ERK1/ERK2, których aktywność jest niezbędna do selekcji pozytywnej tymocytów [22,96] (ryc. 3A). Jednak zbyt duża aktywność kinaz białkowych ERK1/ERK2 może hamować różnicowanie tymocytów z późnego stadium DP/CD69⁺ do stadium SP, co zostało wykazane u myszy z nokautem izoform kinazy diacyloglicerolu [40].

W wyniku oddziaływania TCR $\alpha\beta$ z ligandami selekcyjnymi negatywnie dochodzi natomiast do aktywacji kinazy białkowej MINK oraz rekrutacji kompleksu białek GRB2/SOS do LAT (ryc. 3B). Białko SOS jest wymiennicem GDP/GTP w białku Ras, którego aktywność jest jeszcze wzmacniana przez aktywny Ras [23]. Rekrutacja kompleksu GRB2/SOS do LAT prowadzi więc do silnej aktywacji Ras oraz silnej, ale krótkotrwałej aktywacji ERK1/ERK2 [96]. Powyżej zaznaczono, że selekcja pozytywna wymaga słabej i długotrwałej aktywności ERK1/ERK2, podczas gdy krótkotrwała i silna aktywacja ERK1/ERK2 raczej powoduje apoptozę tymocytów. Aktywacja genów ściśle zależy od czasu trwania aktywacji kinaz białkowych. Na przykład krótkotrwała aktywacja ERK1/ERK2 jest wystarczająca do indukcji ekspresji *c-fos*, ale fosforylacja i stabilizacja białka c-Fos wymaga już dłuższego czasu aktywacji ERK1/ERK2 [7,78]. Od aktywności kinazy białkowej MINK i od białka GRB2 zależy aktywacja kinaz białkowych JNK i p38 w tymocytach selekcyjowanych negatywnie [33,73] (ryc. 3B). Dominujący negatywny mutant Ras nie powodował obniżenia zależnej od białka GRB2 aktywacji kinaz białkowych JNK, co wskazuje na niezależną od Ras aktywację kinaz białkowych JNK [33]. Tymocyty DP myszy z nokautami izoform JNK odznaczały się natomiast opornością na indukcję apoptozy przez przeciwciała anti-CD3 *in vivo* oraz *in vitro*, co wskazuje na zaangażowanie kinaz białkowych JNK w selekcji negatywnej tymocytów [85,86]. Reasumując, aktywacja kinaz białkowych ERK1/ERK2 jest niezbędna do selekcji pozytywnej tymocytów, podczas gdy kinazy białkowe MINK i JNK przekazują sygnały do selekcji negatywnej. Kinazy biał-

kowe MINK i JNK indukują m.in. ekspresję genu proapoptotycznego *bim* [73].

8.2. Rola białka Bim w selekcji negatywnej tymocytów

Białko Bim należy do grupy białek zawierających tylko proapoptotyczną sekwencję BH3 (tzn. nie zawiera charakterystycznych dla białek rodziny Bcl-2 domen BH1, BH2 i BH4). Za pośrednictwem proapoptotycznej sekwencji BH3 białko Bim może się wiązać z białkami antyapoptotycznymi rodziny Bcl-2 i inaktywować ich funkcję antyapoptotyczną [122]. Alternatywne składowanie eksonów prowadzi do powstawania kilku izoform Bim, wśród których są zawierające sekwencję BH3 izoformy Bim_{AD}, Bim_S, Bim_L oraz Bim_{EL} [69]. Izofomy Bim_{AD} i Bim_S mogą przez bezpośrednie oddziaływanie aktywować proapoptotyczne białko Bax [69].

U samców myszy z haplotypem H-2^b, które zawierają transgeny kodujące receptor TCR $\alpha\beta$ rozpoznający samczy antygen HY w kontekście H-2D^b (TCR $\alpha\beta$ anti-HY/D^b), delecji ulegają tymocyty DP rozpoznające autoantigen [52] (ryc. 2). Obserwowano natomiast całkowite zahamowanie delecji autoreaktywnych tymocytów z TCR $\alpha\beta$ anti-HY/D^b u samców (HY⁺H-2^b) myszy z nokautem *bim*^{-/-} [12]. Tymocyty DP izolowane z myszy *bim*^{-/-} były również odporne na indukcję apoptozy w wyniku poliklonalnej aktywacji TCR $\alpha\beta$ /CD3 *in vitro* z użyciem przeciwciał anti-CD3 ϵ /CD28 lub traktowania jonoforem Ca²⁺ [11,12]. Obserwacje te wskazują na białko Bim, które w tymocytach jest niezbędne do apoptozy inicjowanej przez aktywację TCR $\alpha\beta$ /CD3 i wzrost stężenia jonów Ca²⁺ w cytosolu.

Sygnal selekcji negatywnej powoduje wzrost stężenia białka Bim_S, które ulega translokacji do mitochondrium [8,17]. Mechanizm indukcji ekspresji *bim* w tymocytach nie został jeszcze wyjaśniony. Postuluje się natomiast udział kinaz białkowych MINK i JNK w regulacji ekspresji *bim* [93]. Kinazy białkowe JNK fosforylują reszty seryny w białku c-Jun powodując aktywację czynnika transkrypcyjnego AP-1, który może uczestniczyć w aktywacji genu *bim* [90]. Sygnal selekcji negatywnej prowadzi także do syntezy białek Bim_L i Bim_{EL} [89]. Jednak izoformy Bim_L i Bim_{EL} mogą być sekwestrowane w cytosolu i ich translokacja do mitochondrium zależy od fosforylacji Bim przez kinazy białkowe JNK [64].

Białko Bim indukuje apoptozę zależną od aktywacji kaspazy 9 w apoptosomie z udziałem cytochromu c i białka APAF-1. Jednak w przeciwieństwie do całkowitego zahamowania delecji tymocytów z autoreaktywnym TCR $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$ anti-HY/D^b) u myszy z nokautem *bim*^{-/-}, stwierdzono jedynie częściowe zahamowanie apoptozy tymocytów z autoreaktywnym TCR $\alpha\beta$ u myszy z nokautem *APAF-1*^{-/-} lub kaspazy 9^{-/-} [41,106]. Postuluje się, że oprócz apoptozy zależnej od apoptosomu (cytochrom c/APAF-1/kaspaza 9), także inne mechanizmy apoptozy zależnej od mitochondrium mogą brać udział w eliminacji autoreaktywnych tymocytów [61,70,92].

8.3. Rola sierocego receptora jądrowego Nur77 w selekcji negatywnej tymocytów

Sygnal selekcji negatywnej tymocytów powoduje skoordynowaną zmianę ekspresji wielu genów kodujących za-

również czynniki transkrypcyjne, jak i białka przyczyniające się do zmniejszenia adhezji tymocytów do macierzy międzykomórkowej i zwiększenia adhezji do sąsiednich komórek oraz do indukcji apoptozy [89]. Kompleksowa analiza ekspresji genów w kilku modelach doświadczalnych selekcji negatywnej tymocytów wskazuje na wzrost ekspresji m.in. genu wczesnej odpowiedzi, który koduje czynnik transkrypcyjny Nur77 [8,89]. Nur77 i homologiczne białko Nor-1 należą do nadrodziny receptorów jądrowych, obejmującej także klasyczne receptory hormonów steroidowych. Jednak Nur77 i Nor-1 są receptorami sierocymi, gdyż nie jest znany ich ligand, a badania strukturalne wykazały, że Nur77 nie ma nawet kieszeni mogącej pomieścić ligand [29]. Ekspresję genów *nur77* i *nor-1* obserwowano w apoptotycznych tymocytach myszy, którym podawano dootrzewnowo przeciwciała anti-CD3 [20]. Także aktywacja *in vitro* kompleksu TCR $\alpha\beta$ /CD3 w hybridoma limfocytu T prowadziła do utrzymującej się kilkanaście godzin ekspresji *nur77* i apoptozy komórek, podczas gdy traktowanie estrem forbolu powodowało jedynie krótkotrwałą indukcję ekspresji *nur77*, której nie towarzyszyła apoptoza komórek [67,118]. Masową apoptozę tymocytów DP obserwowano również w grasicach myszy z ekspresją transgenów *nur77* lub *nor-1*, podczas gdy tymocyty DN charakteryzowały się opornością na indukcję apoptozy przez Nur77 i Nor-1 [16,20,116]. Analiza ekspresji Nur77 w subpopulacjach tymocytów izolowanych z prawidłowych myszy szczepu C57BL/6 wykazała ekspresję Nur77 w tymocytach DP/CD69⁺ kory grasicy oraz w niedojrzałych tymocytach SP/CD24^{wysoki} rdzenia grasicy, a więc w tymocytach wrażliwych na selekcję negatywną [21].

Wyciszenie ekspresji genu *nur77* lub hamowanie funkcji białka Nur77 (przez dominujący negatywny mutant Nur77) prowadziły do hamowania apoptozy hybridoma komórek T w odpowiedzi na aktywację TCR $\alpha\beta$ /CD3 [67,118]. Dominujący negatywny mutant Nur77 hamował *in vivo* delecję autoreaktywnych tymocytów z TCR $\alpha\beta$ anti-HY/D^b u samców (HY⁺H-2^b), co wskazuje na udział Nur77 w procesie selekcji negatywnej tymocytów [124]. Jednak u myszy z nokautem *nur77*^{-/-} nie stwierdzono zaburzenia procesu selekcji negatywnej tymocytów [63]. Przypuszczalnie białko Nor-1 może w tymocytach zastępować Nur77 w szlakach sygnałowych apoptozy zależnej od aktywacji TCR $\alpha\beta$ /CD3 lub selekcja negatywna tymocytów może zachodzić bez udziału białek Nur77. Myszy z podwójnym nokautem *nur77*^{-/-}*nor-1*^{-/-} nie przeżywały miesiąca z powodu ostrych białaczek szpikowych, pozostawiając bez odpowiedzi pytania o wrażliwość tymocytów *nur77*^{-/-}*nor-1*^{-/-} na apoptozę w odpowiedzi na aktywację TCR $\alpha\beta$ /CD3 [77].

Podsumowując, Nur77 powoduje apoptozę tymocytów w odpowiedzi na aktywację TCR $\alpha\beta$ /CD3, ale w przeciwieństwie do Bim, selekcja negatywna tymocytów przypuszczalnie może zachodzić także bez udziału Nur77. Białko Nur77 pełni funkcję aktywatora transkrypcji w jądrze komórki i może również przekazywać sygnał do zmia-

ny konformacji białka Bcl-2 w błonie mitochondrium [57]. Oddziaływanie białek Nur77 i Bcl-2 może prowadzić do wyciszenia antyapoptotycznej funkcji Bcl-2 i ekspozycji przez Bcl-2 proapoptotycznej sekwencji BH3, która z kolei może wyciszać antyapoptotyczną funkcję białka Bcl-X_L [57,65]. Przypuszczalnie białko Nur77, indukowane w tymocytach w następstwie aktywacji TCR $\alpha\beta$ /CD3 przez kompleks peptyd/MHC selekcyjony negatywnie, może wspomagać białko Bim w indukcji apoptozy tymocytów rozpoznających własne antygeny organizmu.

9. PODSUMOWANIE

Istotą różnicowania tymocytów są rearanżacje genów kodujących receptory antygenowe (TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$), w połączeniu z selekcją prekursorów limfocytów T zawierających receptory użyteczne w rozpoznaniu obcych antygenów. TCR $\alpha\beta$ może być użyteczny w rozpoznaniu obcego antygeny, jeżeli rozpoznaje własne MHC, ale nie rozpoznaje prezentowanych w kontekście MHC własnych antygenów organizmu. Procesy selekcji i ekspansji tymocytów zawierających użyteczny produkt zrearanżowanych genów (TCR $\gamma\delta$, pre-TCR, TCR $\alpha\beta$) są regulowane przez wiele czynników transkrypcyjnych, w tym przez sierocy receptory jądrowe ROR γ t i Nur77. Sierocy receptor jądrowy ROR γ t jest niezbędny w różnicowaniu tymocytów stadium ISP (z pre-TCR) do tymocytów DP (z TCR $\alpha\beta$) oraz w przeżyciu tymocytów wczesnego stadium DP, gdyż ROR γ t reguluje poziom antyapoptotycznego białka Bcl-X_L. W kolejnych stadiach rozwojowych tymocytów aktywacja TCR $\alpha\beta$ dostarcza zarówno sygnałów ratujących przed apoptozą tymocyty z TCR $\alpha\beta$ użytecznym, jak i sygnałów indukujących apoptozę tymocytów z TCR $\alpha\beta$ wykazującym zbyt duże powinowactwo do własnych antygenów w kontekście MHC. W wyniku oddziaływania TCR $\alpha\beta$ z ligandami selekcyjnymi negatywnie jest indukowana ekspresja m.in. genów kodujących proapoptotyczne białko Bim i sierocy receptor jądrowy Nur77. Białko Bim, które jest niezbędne w selekcji negatywnej tymocytów, może bezpośrednio aktywować proapoptotyczne białko Bax prowadząc do aktywacji kaspazy i fazy egzekucyjnej apoptozy. Natomiast rola Nur77 w selekcji negatywnej tymocytów nie została w pełni wyjaśniona. Ekspresja genu *nur77* prowadzi do apoptozy tymocytów, ale selekcja negatywna tymocytów może zachodzić także bez udziału Nur77. Białko Nur77 może pełnić funkcję zarówno aktywatora transkrypcji genów, jak i poprzez oddziaływanie z białkami na powierzchni mitochondrium może prowadzić do wyciszenia antyapoptotycznej funkcji białek Bcl-2 i Bcl-X_L. Przypuszczalnie białko Nur77 może wspomagać białko Bim w indukcji apoptozy tymocytów rozpoznających własne antygeny organizmu, co wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach.

PODZIĘKOWANIA

Dziękuję Panu Profesorowi Piotrowi Kuśnierczykowi i Pani Doktor Dagmarze Kłopotowskiej za cenne uwagi merytoryczne i redakcyjne.

PIŚMIENNICTWO

[1] Adams J.M., Cory S.: The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 1998; 281: 1322–1326

[2] Aifantis I., Mandal M., Sawai K., Ferrando A., Vilimas T.: Regulation of T-cell progenitor survival and cell-cycle entry by the pre-T-cell receptor. *Immunol. Rev.*, 2006; 209: 159–169

- [3] Aifantis I., Raetz E., Buonamici S.: Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008; 8: 380–390
- [4] Anderson G., Lane P.J., Jenkinson E.J.: Generating intrathymic micro-environments to establish T-cell tolerance. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007; 7: 954–963
- [5] Anderson M.S., Venanzi E.S., Klein L., Chen Z., Berzins S.P., Turley S.J., von Boehmer H., Bronson R., Dierich A., Benoist C., Mathis D.: Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, 2002; 298: 1395–1401
- [6] Ashwell J.D., Lu F.W., Vacchio M.S.: Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu. Rev. Immunol.*, 2000; 18: 309–345
- [7] Assoian R.K.: Common sense signalling. *Nat. Cell Biol.*, 2002; 4: E187–E188
- [8] Baldwin T.A., Hogquist K.A.: Transcriptional analysis of clonal deletion *in vivo*. *J. Immunol.*, 2007; 179: 837–844
- [9] Bivona T.G., Perez De Castro I., Ahearn I.M., Grana T.M., Chiu V.K., Lockyer P.J., Cullen P.J., Pellicer A., Cox A.D., Philips M.R.: Phospholipase C γ activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature*, 2003; 424: 694–698
- [10] Bogin Y., Ainey C., Beach D., Yablonski D.: SLP-76 mediates and maintains activation of the Tec family kinase ITK via the T cell antigen receptor-induced association between SLP-76 and ITK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 6638–6643
- [11] Bouillet P., Metcalf D., Huang D.C., Tarlinton D.M., Kay T.W., Köntgen F., Adams J.M., Strasser A.: Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*, 1999; 286: 1735–1738
- [12] Bouillet P., Purton J.F., Godfrey D.I., Zhang L.C., Coultas L., Puthalakath H., Pellegrini M., Cory S., Adams J.M., Strasser A.: BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature*, 2002; 415: 922–926
- [13] Brewer J.A., Kanagawa O., Sleckman B.P., Muglia L.J.: Thymocyte apoptosis induced by T cell activation is mediated by glucocorticoids *in vivo*. *J. Immunol.*, 2002; 169: 1837–1843
- [14] Brown G., Hughes P.J., Michell R.H., Rolink A.G., Ceredig R.: The sequential determination model of hematopoiesis. *Trends Immunol.*, 2007; 28: 442–448
- [15] Bruno L., Fehling H.J., von Boehmer H.: The $\alpha\beta$ T cell receptor can replace the $\gamma\delta$ receptor in the development of $\gamma\delta$ lineage cells. *Immunity*, 1996; 5: 343–352
- [16] Calnan B.J., Szychowski S., Chan F.K., Cado D., Winoto A.: A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity*, 1995; 3: 273–282
- [17] Cante-Barrett K., Gallo E.M., Winslow M.M., Crabtree G.R.: Thymocyte negative selection is mediated by protein kinase C- and Ca²⁺-dependent transcriptional induction of bim. *J. Immunol.*, 2006; 176: 2299–2306
- [18] Chao D.T., Korsmeyer S.J.: BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.*, 1998; 16: 395–419
- [19] Chawla A., Repa J.J., Evans R.M., Mangelsdorf D.J.: Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*, 2001; 294: 1866–1870
- [20] Cheng L.E., Chan F.K., Cado D., Winoto A.: Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J.*, 1997; 16: 1865–1875
- [21] Cho H.J., Edmondson S.G., Miller A.D., Sellars M., Alexander S.T., Somersan S., Punt J.A.: Cutting edge: identification of the targets of clonal deletion in an unmanipulated thymus. *J. Immunol.*, 2003; 170: 10–13
- [22] Daniels M.A., Teixeira E., Gill J., Hausmann B., Roubaty D., Holmberg K., Werlen G., Hollander G.A., Gascoigne N.R., Palmer E.: Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature*, 2006; 444: 724–729
- [23] Das J., Ho M., Zikherman J., Govern C., Yang M., Weiss A., Chakraborty A.K., Roose J.P.: Digital signaling and hysteresis characterize ras activation in lymphoid cells. *Cell*, 2009; 136: 337–351
- [24] Dengjel J., Schoor O., Fischer R., Reich M., Kraus M., Müller M., Kreyborg K., Altenberend F., Brandenburg J., Kalbacher H., Brock R., Driessen C., Rammensee H.G., Stevanovic S.: Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 7922–7927
- [25] Di Santo J.P.: Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu. Rev. Immunol.*, 2006; 24: 257–286
- [26] Dzhagalov I., Zhang N., He Y.W.: The roles of orphan nuclear receptors in the development and function of the immune system. *Cell. Mol. Immunol.*, 2004; 1: 401–407
- [27] Ferguson B.J., Cooke A., Peterson P., Rich T.: Death in the AIRE. *Trends Immunol.*, 2008; 29: 306–312
- [28] Ferrero I., Mancini S.J., Grosjean F., Wilson A., Otten L., MacDonald H.R.: TCR γ silencing during $\alpha\beta$ T cell development depends upon pre-TCR-induced proliferation. *J. Immunol.*, 2006; 177: 6038–6043
- [29] Flaig R., Greschik H., Peluso-Itlis C., Moras D.: Structural basis for the cell-specific activities of the NGFI-B and the Nurrl ligand-binding domain. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 19250–19258
- [30] Fontenot J.D., Rudensky A.Y.: A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat. Immunol.*, 2005; 6: 331–337
- [31] Gil D., Schamel W.W., Montoya M., Sanchez-Madrid F., Alarcon B.: Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell*, 2002; 109: 901–912
- [32] Godfrey D.I., Kennedy J., Suda T., Zlotnik A.: A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3–CD4–CD8– triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J. Immunol.*, 1993; 150: 4244–4252
- [33] Gong Q., Cheng A.M., Akk A.M., Alberola-Ila J., Gong G., Pawson T., Chan A.C.: Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency. *Nat. Immunol.*, 2001; 2: 29–36
- [34] Goodnow C.C., Sprent J., Fazekas de St Groth B., Vinuesa C.G.: Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*, 2005; 435: 590–597
- [35] Grakoui A., Bromley S.K., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S., Allen P.M., Dustin M.L.: The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 1999; 285: 221–227
- [36] Groettrup M., Ungewiss K., Azogui O., Palacios R., Owen M.J., Hayday A.C., von Boehmer H.: A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor β chain and a 33 kd glycoprotein. *Cell*, 1993; 75: 283–294
- [37] Guermonprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Thery C., Amigorena S.: Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002; 20: 621–667
- [38] Guidos C.J.: Synergy between the pre-T cell receptor and Notch: cementing the $\alpha\beta$ lineage choice. *J. Exp. Med.*, 2006; 203: 2233–2237
- [39] Guo J., Hawwari A., Li H., Sun Z., Mahanta S.K., Littman D.R., Krangel M.S., He Y.W.: Regulation of the TCR α repertoire by the survival window of CD4(+)CD8(+) thymocytes. *Nat. Immunol.*, 2002; 3: 469–476
- [40] Guo R., Wan C.K., Carpenter J.H., Mousallem T., Boustany R.M., Kuan C.T., Burks A.W., Zhong X.P.: Synergistic control of T cell development and tumor suppression by diacylglycerol kinase α and ζ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 11909–11914
- [41] Hara H., Takeda A., Takeuchi M., Wakeham A.C., Itie A., Sasaki M., Mak T.W., Yoshimura A., Nomoto K., Yoshida H.: The apoptotic protease-activating factor 1-mediated pathway of apoptosis is dispensable for negative selection of thymocytes. *J. Immunol.*, 2002; 168: 2288–2295
- [42] Hayes S.M., Li L., Love P.E.: TCR signal strength influences $\alpha\beta/\gamma\delta$ lineage fate. *Immunity*, 2005; 22: 583–593
- [43] He Y.W.: Orphan nuclear receptors in T lymphocyte development. *J. Leukoc. Biol.*, 2002; 72: 440–446
- [44] Heath W.R., Belz G.T., Behrens G.M., Smith C.M., Forehan S.P., Parish I.A., Davey G.M., Wilson N.S., Carbone F.R., Villadangos J.A.: Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol. Rev.*, 2004; 199: 9–26
- [45] Hogquist K.A., Baldwin T.A., Jameson S.C.: Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005; 5: 772–782
- [46] Hori S., Nomura T., Sakaguchi S.: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003; 299: 1057–1061
- [47] Jensen P.E.: Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat. Immunol.*, 2007; 8: 1041–1048
- [48] Jondal M., Pazirandeh A., Okret S.: Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? *Trends Immunol.*, 2004; 25: 595–600
- [49] Kawamoto H.: A close developmental relationship between the lymphoid and myeloid lineages. *Trends Immunol.*, 2006; 27: 169–175
- [50] Kishimoto H., Sprent J.: Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J. Exp. Med.*, 1997; 185: 263–271

- [51] Kiselow P.: Development and selection of T cells: how many subsets? How many rules? Arch. Immunol. Ther. Exp., 2003; 51: 407–414
- [52] Kiselow P., Bluthmann H., Staerz U.D., Steinmetz M., von Boehmer H.: Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4⁺ thymocytes. Nature, 1988; 333: 742–746
- [53] Kiselow P., Mizsek A.: Positive selection of T cells: rescue from programmed cell death and differentiation require continual engagement of the T cell receptor. J. Exp. Med., 1995; 181: 1975–1984
- [54] Kiselow P., Teh H.S., Bluthmann H., von Boehmer H.: Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. Nature, 1988; 335: 730–733
- [55] Kiselow P., von Boehmer H.: Development and selection of T cells: facts and puzzles. Adv. Immunol., 1995; 58: 87–209
- [56] Kiss I., Oskolas H., Toth R., Bouillet P., Toth K., Fulop A., Scholtz B., Ledent C., Fesus L., Szondy Z.: Adenosine A2A receptor-mediated cell death of mouse thymocytes involves adenylate cyclase and Bim and is negatively regulated by Nur77. Eur. J. Immunol., 2006; 36: 1559–1571
- [57] Kolluri S.K., Zhu X., Zhou X., Lin B., Chen Y., Sun K., Tian X., Town J., Cao X., Lin F., Zhai D., Kitada S., Luciano F., O'Donnell E., Cao Y., He F., Lin J., Reed J.C., Satterthwait A.C., Zhang X.K.: A short Nur77-derived peptide converts Bcl-2 from a protector to a killer. Cancer Cell, 2008; 14: 285–298
- [58] Kong Y.Y., Fischer K.D., Bachmann M.F., Mariathasan S., Kozieradzki L., Nghiem M.P., Bouchard D., Bernstein A., Ohashi P.S., Penninger J.M.: Vav regulates peptide-specific apoptosis in thymocytes. J. Exp. Med., 1998; 188: 2099–2111
- [59] Koretzky G.A., Abtahian F., Silverman M.A.: SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. Nat. Rev. Immunol., 2006; 6: 67–78
- [60] Kreslavsky T., Garbe A.I., Krueger A., von Boehmer H.: T cell receptor-instructed $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ lineage commitment revealed by single-cell analysis. J. Exp. Med., 2008; 205: 1173–1186
- [61] Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C.: Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol. Rev., 2007; 87: 99–163
- [62] Lauritsen J.P., Haks M.C., Lefebvre J.M., Kappes D.J., Wiest D.L.: Recent insights into the signals that control $\alpha\beta/\gamma\delta$ -lineage fate. Immunol. Rev., 2006; 209: 176–190
- [63] Lee S.L., Wesselschmidt R.L., Linette G.P., Kanagawa O., Russell J.H., Milbrandt J.: Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77). Science, 1995; 269: 532–535
- [64] Lei K., Davis R.J.: JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003; 100: 2432–2437
- [65] Lin B., Kolluri S.K., Lin F., Liu W., Han Y.H., Cao X., Dawson M.I., Reed J.C., Zhang X.K.: Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. Cell, 2004; 116: 527–540
- [66] Liston A., Lesage S., Wilson J., Peltonen L., Goodnow C.C.: Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. Nat. Immunol., 2003; 4: 350–354
- [67] Liu Z.G., Smith S.W., McLaughlin K.A., Schwartz L.M., Osborne B.A.: Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene *nur77*. Nature, 1994; 367: 281–284
- [68] Mandal M., Borowski C., Palomero T., Ferrando A.A., Oberdoerffer P., Meng F., Ruiz-Vela A., Ciofani M., Zuniga-Pflucker J.C., Screpanti L., Look A.T., Korsmeyer S.J., Rajewsky K., von Boehmer H., Aifantis I.: The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. J. Exp. Med., 2005; 201: 603–614
- [69] Marani M., Tenev T., Hancock D., Downward J., Lemoine N.R.: Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. Mol. Cell. Biol., 2002; 22: 3577–3589
- [70] Marsden V.S., O'Connor L., O'Reilly L.A., Silke J., Metcalf D., Ekert P.G., Huang D.C., Cecconi F., Kuida K., Tomaselli K.J., Roy S., Nicholson D.W., Vaux D.L., Bouillet P., Adams J.M., Strasser A.: Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. Nature, 2002; 419: 634–637
- [71] Matuszyk J., Cebrat M., Kalas W., Strzadala L.: HA1004, an inhibitor of serine/threonine protein kinases, restores the sensitivity of thymic lymphomas to Ca²⁺-mediated apoptosis through a protein kinase A-independent mechanism. Int. Immunopharmacol., 2002; 2: 435–442
- [72] Matuszyk J., Strzadala L.: Regulacja ekspresji i funkcji receptorów jądrowych rodziny Nur77 i ich udział w kontrolnych punktach szlaków sygnałowych prowadzących do apoptozy, różnicowania i produkcji hormonów steroidowych. Post. Biol. Kom., 2002; 29: 61–80
- [73] McCarty N., Paust S., Ikizawa K., Dan I., Li X., Cantor H.: Signaling by the kinase MINK is essential in the negative selection of autoreactive thymocytes. Nat. Immunol., 2005; 6: 65–72
- [74] McCaughy T.M., Hogquist K.A.: Central tolerance: what have we learned from mice? Semin. Immunopathol., 2008; 30: 399–409
- [75] Monks C.R., Freiberg B.A., Kupfer H., Sciaky N., Kupfer A.: Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. Nature, 1998; 395: 82–86
- [76] Mor A., Philips M.R.: Compartmentalized Ras/MAPK signaling. Annu. Rev. Immunol., 2006; 24: 771–800
- [77] Mullican S.E., Zhang S., Konopleva M., Ruvolo V., Andreeff M., Milbrandt J., Conneely O.M.: Abrogation of nuclear receptors Nr4a3 and Nr4a1 leads to development of acute myeloid leukemia. Nat. Med., 2007; 13: 730–735
- [78] Murphy L.O., Smith S., Chen R.H., Fingar D.C., Blenis J.: Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. Nat. Cell Biol., 2002; 4: 556–564
- [79] Narayan K., Kang J.: Molecular events that regulate $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ T cell lineage commitment: old suspects, new players and different game plans. Curr. Opin. Immunol., 2007; 19: 169–175
- [80] Palmer E., Naecher D.: Affinity threshold for thymic selection through a T-cell receptor-co-receptor zipper. Nat. Rev. Immunol., 2009; 9: 207–213
- [81] Petrie H.T., Hugo P., Scollay R., Shortman K.: Lineage relationships and developmental kinetics of immature thymocytes: CD3, CD4, and CD8 acquisition *in vivo* and *in vitro*. J. Exp. Med., 1990; 172: 1583–1588
- [82] Prasad A., Zikherman J., Das J., Roose J.P., Weiss A., Chakraborty A.K.: Origin of the sharp boundary that discriminates positive and negative selection of thymocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009; 106: 528–533
- [83] Rathmell J.C., Lindsten T., Zong W.X., Cinalli R.M., Thompson C.B.: Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. Nat. Immunol., 2002; 3: 932–939
- [84] Rothenberg E.V., Moore J.E., Yui M.A.: Launching the T-cell-lineage developmental programme. Nat. Rev. Immunol., 2008; 8: 9–21
- [85] Sabapathy K., Hu Y., Kallunki T., Schreiber M., David J.P., Jochum W., Wagner E.F., Karin M.: JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. Curr. Biol., 1999; 9: 116–125
- [86] Sabapathy K., Kallunki T., David J.P., Graef I., Karin M., Wagner E.F.: c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have similar and stage-dependent roles in regulating T cell apoptosis and proliferation. J. Exp. Med., 2001; 193: 317–328
- [87] Savill J., Fadok V.: Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature, 2000; 407: 784–788
- [88] Schlissel M.S., Durum S.D., Muegge K.: The interleukin 7 receptor is required for T cell receptor γ locus accessibility to the V(D)J recombinase. J. Exp. Med., 2000; 191: 1045–1050
- [89] Schmitz I., Clayton L.K., Reinherz E.L.: Gene expression analysis of thymocyte selection *in vivo*. Int. Immunol., 2003; 15: 1237–1248
- [90] Shaulian E., Karin M.: AP-1 as a regulator of cell life and death. Nat. Cell Biol., 2002; 4: E131–E136
- [91] Sitkovsky M.V., Lukashov D., Apasov S., Kojima H., Koshiba M., Caldwell C., Ohta A., Thiel M.: Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. Annu. Rev. Immunol., 2004; 22: 657–682
- [92] Sohn S.J., Rajpal A., Winoto A.: Apoptosis during lymphoid development. Curr. Opin. Immunol., 2003; 15: 209–216
- [93] Sohn S.J., Thompson J., Winoto A.: Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes. Curr. Opin. Immunol., 2007; 19: 510–515
- [94] Sommers C.L., Samelson L.E., Love P.E.: LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways. Bioessays, 2004; 26: 61–67
- [95] Sprent J., Kishimoto H.: The thymus and negative selection. Immunol. Rev., 2002; 185: 126–135
- [96] Starr T.K., Jameson S.C., Hogquist K.A.: Positive and negative selection of T cells. Annu. Rev. Immunol., 2003; 21: 139–176

- [97] Stone J.C.: Regulation of Ras in lymphocytes: get a GRP. *Biochem. Soc. Trans.*, 2006; 34: 858–861
- [98] Strasser A., Puthalakath H., O'Reilly L.A., Bouillet P.: What do we know about the mechanisms of elimination of autoreactive T and B cells and what challenges remain. *Immunol Cell Biol.*, 2008; 86: 57–66
- [99] Swat W., Ignatowicz L., von Boehmer H., Kisielow P.: Clonal deletion of immature CD4⁺8⁺ thymocytes in suspension culture by extrathymic antigen-presenting cells. *Nature*, 1991; 351: 150–153
- [100] Swat W., von Boehmer H., Kisielow P.: Small CD4⁺8⁺TCR^{low} thymocytes contain precursors of mature T cells. *Eur. J. Immunol.*, 1994; 24: 1010–1012
- [101] Taghon T., Rothenberg E.V.: Molecular mechanisms that control mouse and human TCR- $\alpha\beta$ and TCR- $\gamma\delta$ T cell development. *Semin. Immunopathol.*, 2008; 30: 383–398
- [102] Tanigaki K., Honjo T.: Regulation of lymphocyte development by Notch signaling. *Nat. Immunol.*, 2007; 8: 451–456
- [103] Tanigaki K., Tsuji M., Yamamoto N., Han H., Tsukada J., Inoue H., Kubo M., Honjo T.: Regulation of $\alpha\beta/\gamma\delta$ T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity*, 2004; 20: 611–622
- [104] Teh H.S., Kisielow P., Scott B., Kishi H., Uematsu Y., Blüthmann H., von Boehmer H.: Thymic major histocompatibility complex antigens and the $\alpha\beta$ T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature*, 1988; 335: 229–233
- [105] Turner M., Billadeau D.D.: VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002; 2: 476–486
- [106] Villunger A., Marsden V.S., Zhan Y., Erlacher M., Lew A.M., Bouillet P., Berzins S., Godfrey D.I., Heath W.R., Strasser A.: Negative selection of semimature CD4⁺8⁺ HSA⁺ thymocytes requires the BH3-only protein Bim but is independent of death receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 7052–7057
- [107] von Boehmer H.: Coming to grips with Notch. *J. Exp. Med.*, 2001; 194: F43–F46
- [108] von Boehmer H.: Selection of the T-cell repertoire: receptor-controlled checkpoints in T-cell development. *Adv. Immunol.*, 2004; 84: 201–238
- [109] von Boehmer H.: Unique features of the pre-T-cell receptor α -chain: not just a surrogate. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005; 5: 571–577
- [110] von Boehmer H., Aifantis I., Feinberg J., Lechner O., Saint-Ruf C., Walter U., Buer J., Azogui O.: Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.*, 1999; 11: 135–142
- [111] von Boehmer H., Kisielow P.: Negative selection of the T-cell repertoire: where and when does it occur? *Immunol Rev.*, 2006; 209: 284–289
- [112] von Boehmer H., Kisielow P.: Self-nonself discrimination by T cells. *Science*, 1990; 248: 1369–1373
- [113] von Boehmer H., Teh H.S., Kisielow P.: The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol. Today*, 1989; 10: 57–61
- [114] Vyas J.M., Van der Veen A.G., Ploegh H.L.: The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008; 8: 607–618
- [115] Wada H., Masuda K., Satoh R., Kakugawa K., Ikawa T., Katsura Y., Kawamoto H.: Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature*, 2008; 452: 768–772
- [116] Weih F., Ryseck R.P., Chen L., Bravo R.: Apoptosis of nur77/N10-transgenic thymocytes involves the Fas/Fas ligand pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 5533–5538
- [117] Winoto A., Littman D.R.: Nuclear hormone receptors in T lymphocytes. *Cell*, 2002; 109(Suppl): S57–S66
- [118] Woronicz J.D., Calnan B., Ngo V., Winoto A.: Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature*, 1994; 367: 277–281
- [119] Xi H., Schwartz R., Engel I., Murre C., Kersh G.J.: Interplay between ROR γ t, Egr3, and E proteins controls proliferation in response to pre-TCR signals. *Immunity*, 2006; 24: 813–826
- [120] Yamasaki S., Ishikawa E., Sakuma M., Ogata K., Sakata-Sogawa K., Hiroshima M., Wiest D.L., Tokunaga M., Saito T.: Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nat. Immunol.*, 2006; 7: 67–75
- [121] Yamasaki S., Saito T.: Molecular basis for pre-TCR-mediated autonomous signaling. *Trends Immunol.*, 2007; 28: 39–43
- [122] Youle R.J., Strasser A.: The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2008; 9: 47–59
- [123] Zhang L., Insel P.A.: The pro-apoptotic protein Bim is a convergence point for cAMP/protein kinase A- and glucocorticoid-promoted apoptosis of lymphoid cells. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 20858–20865
- [124] Zhou T., Cheng J., Yang P., Wang Z., Liu C., Su X., Blüthmann H., Mountz J.D.: Inhibition of Nur77/Nurrl leads to inefficient clonal deletion of self-reactive T cells. *J. Exp. Med.*, 1996; 183: 1879–1892

Autor deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.