

Received: 2006.11.29
Accepted: 2007.01.12
Published: 2007.01.22

Odpowiedź układu immunologicznego na alop przeszczep nerki. Część I. Rola antygenów zgodności tkankowej, komórek prezentujących antygen i limfocytów w rozpoznawaniu aloantygeny; dwusygnałowa aktywacja limfocyta T

The immune response to kidney allograft. Part I: The role of MHC antigens, antigen-presenting cells, and lymphocytes in alloantigen recognition; two-signal activation of T cells

Mariusz Kusztal, Dominika Jezior, Wacław Weyde, Magdalena Krajewska, Marian Klinger

Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej, Akademii Medycznej we Wrocławiu

Streszczenie

Przeszczepienie narządu wywołuje reakcję zwaną odrzucaniem. Jest to odpowiedź immunologiczna na aloantygeny wynikająca z różnic genetycznych występujących między dawcą a biorcą przeszczepu. W odpowiedzi tej można wyróżnić trzy etapy: rozpoznanie aloantygeny, aktywację limfocytów T i fazę efektorową – odrzucanie przeszczepu.

Alogeniczne antygeny głównego układu zgodności tkanek (MHC) klasy I i klasy II wywołują silną odpowiedź ze strony limfocytów T. Odpowiedź komórek T (CD4+) następuje po bezpośredniej prezentacji antygenów lub pośrednio, z udziałem komórek prezentujących antygen (APC). Większość aloreaktywnych limfocytów T bezpośrednio rozpoznaje alogeniczne antygeny MHC, które są ekspozowane na obcych komórkach. Interakcja między receptorem antygenowym komórek T (TCR) a kompleksem MHC/peptyd na APC nadaje swoistość odpowiedzi immunologicznej. Pełna aktywacja limfocyta T jest możliwa dopiero po dostarczeniu do jądra komórkowego dwóch sygnałów: pierwszego z TCR, a drugiego, sygnału kostymulującego, z cząsteczek pomocniczych.

Słowa kluczowe:

alop przeszczep nerki • odrzucanie • limfocyt T • komórki prezentujące antygen • kostymulacja

Summary

Kidney transplantation causes an immune response to non-self antigens called allograft rejection. The response to a kidney allograft can be divided into three phases: recognition of the alloantigen, activation of antigen-specific lymphocytes, and the effector phase of graft rejection.

Allogeneic major histocompatibility complex (MHC) class I and class II molecules elicit a vigorous T-cell response. The alloresponse comprises CD4+ T cells that recognize allogeneic MHC

indirectly after processing the molecules into peptide fragments. The majority of alloreactive T cells directly recognize intact allogeneic MHC molecules expressed on foreign cells. The interaction between the TCR of a T cell and the MHC/peptide complex on an antigen-presenting cell (APC) determines the specificity of the immune response. Two distinct signals are required for T-cell activation: one signal through the TCR and a second costimulatory signal through accessory molecules.

Key words: kidney allograft • rejection • T cell • antigen-presenting cells • costimulation

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10046.pdf

Word count: 3376

Tables: –

Figures: 3

References: 36

Adres autora: dr n. med. Mariusz Kuszta, Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej AM, ul. Traugutta 57/59, 50-417 Wrocław; e-mail: mariok@tlen.pl

WSTĘP

Przeszczepienie narządu wywołuje reakcję zwaną odrzucaniem. Jest to odpowiedź immunologiczna na aloantygeny wynikająca z różnic genetycznych występujących między dawcą a biorcą przeszczepu. Odrzucanie może być natychmiastowe (nadostre), może wystąpić po kilku/kilkunastu dniach (ostre) lub nawet miesiącach (późne ostre odrzucanie), może też rozwinąć się powoli w ciągu miesięcy lub lat i prowadzić do niewydolności przeszczepu (przewlekłe). Odrzucanie nadostre powoduje natychmiastową utratę przeszczepu. Ponad 90% epizodów ostrego odrzucania ulega odwróceniu w wyniku odpowiedniego leczenia. W zapobieganiu i leczeniu epizodów ostrego odrzucania, a także w zapobieganiu odrzucania przewlekłego stosuje się immunosupresję farmakologiczną.

Odpowiedź układu immunologicznego biorcy na obce antygeny dawcy składa się z trzech etapów: I – rozpoznanie aloantygeny przez limfocyty T biorcy, II – aktywacja i proliferacja aloreaktywnych limfocytów, oraz III – faza efektorowa reakcji odrzucania, odpowiedzialna za zniszczenie komórek przeszczepionego narządu. Głównymi komórkami układu immunologicznego biorcy przeszczepu nerki, uczestniczącymi w odpowiedzi na obcy antygen, są limfocyty oraz komórki prezentujące antygeny (antigen presenting cells – APC).

ROLA ANTYPENÓW ZGODNOŚCI TKANKOWEJ W ODRZUCANIU ALOPRZESZCZEPU

Geny determinujące reakcję odrzucania lub akceptację tkanek przeszczepu znajdują się w *locus* na chromosomie 6 i zostały nazwane głównym układem zgodności tkankowej, MHC (major histocompatibility complex). Produktem tych genów, charakteryzujących się znacznym polimorfizmem, są antygeny MHC. Jeśli biorca i dawca różnią się w zakresie antygenów MHC, przeszczep alogeniczny jest odrzucany. Istnieją dwa typy antygenów MHC: klasy I i klasy II. U ludzi antygeny MHC nazywane są HLA (human leucocyte antigen) i należą do nich w klasie I: HLA-A, HLA-B, HLA-C oraz w klasie II: HLA-DP, HLA-DQ

i HLA-DR. Antygeny należące do HLA klasy I znajdują się w błonach komórkowych większości komórek organizmu człowieka, natomiast HLA klasy II można znaleźć na powierzchni limfocytów B, makrofagów, monocytów i komórek dendrytycznych [19]. Antygeny inne niż MHC odgrywają mniejszą rolę w procesie odrzucania i zwane są mniejszym układem zgodności tkankowej (minor histocompatibility antigens).

Natychmiastową odpowiedź układu immunologicznego biorcy przeszczepu wywołują, oprócz niezgodnych antygenów MHC, także niezgodne antygeny grup krwi.

Niezgodność w zakresie MHC wiedzie do bardziej nasilonego odrzucania niż niezgodność w mniejszym układzie zgodności tkankowej: im większa liczba niezgodności MHC, tym gwałtowniejsze odrzucanie. Dotyczy to szczególnie niezgodności w *locus* DR oraz AB antygenów HLA – istotnie rośnie wówczas częstość wystąpienia procesu odrzucania, co pogarsza funkcjonowanie przeszczepionej nerki [11].

Rola antygenów mniejszego układu zgodności tkankowej w wyzwalaniu procesu odrzucania jest wciąż badana. Należą one do powierzchniowych antygenów komórkowych. Odpowiedź immunologiczna organizmu biorcy na pojawienie się nieznanych, obcych antygenów mniejszego układu zgodności tkankowej, zależy głównie od limfocytów T cytotoksycznych. Uważa się, że są to antygeny odpowiedzialne głównie za powolny proces przewlekłego odrzucania. U chorych otrzymujących przeszczepiony narząd od żywych, spokrewnionych dawców, w pełni zgodnych pod względem antygenów HLA, niezgodność antygenów mniejszego układu zgodności tkankowej uważa się za czynnik inicjujący proces odrzucania [17].

KOMÓRKI PREZENTUJĄCE ANTYPEN I ICH LIGANDY UCZESTNICZĄCE W KOSTYMULACJI

Komórki prezentujące antygen (APC) stanowią w organizmie populację heterogenną. Antygen może być prezentowany przez wiele komórek, w zależności od tego jak



i gdzie styka się on po raz pierwszy z układem immunologicznym. Głównymi APC, które najefektywniej aktywują spoczynkowe limfocyty T CD4 są komórki dendrytyczne. Znajdują się one w strefach T-zależnych węzłów chłonnych i śledziony. Funkcję komórek APC spełniają także makrofagi i limfocyty B, zawierające na swojej powierzchni antygeny zgodności tkankowej klasy II.

Rolą komórki prezentującej antygen jest internalizacja antygeny, jego przetwarzanie i pocięcie na fragmenty peptydowe. Produkty trawienia antygeny wiążą się z antygenami MHC klasy I lub II w retikulum endoplazmatycznym, skąd są przenoszone w postaci kompleksu na powierzchnię komórki. Związanie peptydu antygenowego z antygenem zgodności tkankowej przez swoiste ugrupowanie aminokwasowe zapewnia odpowiednią orientację przestrzenną sprzyjającą ekspozycji epitopów, wiążących się z receptorem limfocytów T – TCR. Część MHC tworzy kompleks z obcym antygenem, który po związaniu się z TCR/CD3 przekazuje pierwszy sygnał aktywujący limfocyt T [6].

W przekazaniu drugiego sygnału, niezbędnego do pełnej aktywacji komórki T, uczestniczą następujące ligandy obecne na APC: cząsteczki z rodziny B7, PD-L, CD40, OX40L. Białka z rodziny B7: B7.1 (CD80) i B7.2 (CD86), poprzez interakcję z receptorem CD28 potęgują i podtrzymują aktywację limfocytu T, natomiast interakcja z receptorem CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) dostarcza sygnału hamującego tę aktywację [5].

B7RP-1 (ICOSL) jest ligandem ICOS (inducible costimulator) i konstytutywnie występuje na limfocytach B, makrofażach i komórkach dendrytycznych. W sytuacji wytwarzania niewielkiego stężenia IL-2 interakcja ICOS/B7RP-1 jest w stanie powodować wytwarzanie tej interleukiny w większym stężeniu. Interakcja ta może także zwiększać proliferację limfocytów Th2, aczkolwiek znacznie słabiej niż za pośrednictwem CD28 [28,35].

Ligandy PD-L1 i PD-L2 nie są ekspozycjonowane na spoczynkowych APC, ale ulegają ekspresji w wyniku stymulacji - podobnie jak B7. Związanie PD-L z PD-1 skutkuje hamowaniem odpowiedzi ze strony limfocytów T i B [1].

CD40 jest glikoproteinowym ligandem CD154 (CD40L) należącym do nadrodziny receptorów TNF. Oprócz obecności na APC, występuje również na komórkach śródbłonna. Związanie CD40 na APC prowadzi do sekrecji prozapalnych cytokin (np. TNF- α , IL-12) i zwiększenia ekspresji cząsteczek B7 na ich powierzchni. Z kolei związanie CD40 na komórce śródbłonna skutkuje zwiększoną ekspresją cząsteczek adhezyjnych, niezbędnych do rekrutacji leukocytów w miejscu zapalenia. Interakcja CD154/CD40 promuje przeżycie komórek T i ich różnicowanie do typu Th1 [16,21]. CD40 jest ważną cząsteczką kostymulującą niezbędną limfocytom B do wytwarzania przeciwciał oraz dającą sygnał do zmiany klasy wytwarzanych przeciwciał [2].

OX40L jest ekspozycjonowany na APC i komórkach śródbłonna, które otrzymały sygnał do aktywacji albo dojrzewania (maturation) lub obydwa sygnały (np. poprzez CD40). W badaniach *in vitro* i *in vivo* połączenie OX40/OX40L istotnie zwiększało klonalną ekspansję komórek T CD4.

Sygnalizacja przez OX40 nie wpływa znacząco na wydzielanie IL-2 i aktywację komórek, ale przyczynia się raczej do przeżycia komórek T dzięki indukowaniu genów hamujących apoptozę *bcl-x* i *bcl-2* [31,29].

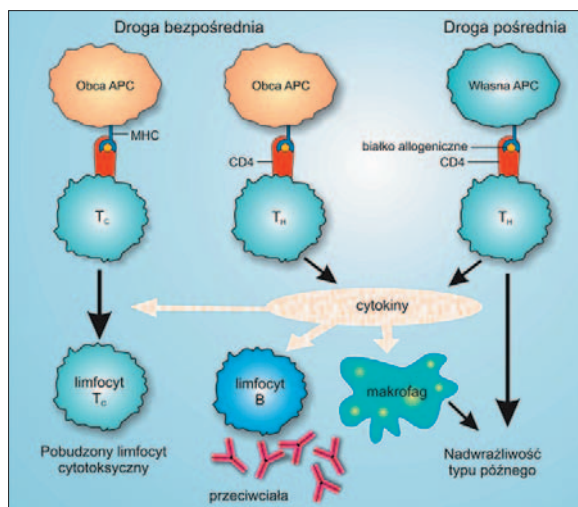
ROLA LIMFOCYTÓW W ALOREAKTYWNEJ ODPOWIEDZI ORGANIZMU

Zasadnicze znaczenie komórek T w odrzucaniu przeszczepów alogenicznych jest znane od dawna dzięki różnorodnym modelom, w których występuje genetyczny brak lub upośledzenie komórek T. Rozpoznawanie aloantygeny przez komórki T zapoczątkowuje aktywację, proliferację i różnicowanie się limfocytów oraz proces odrzucania zależny od komórek T. Alternatywnym następstwem reakcji na antygen może być powstanie tolerancji immunologicznej.

Receptor antygenowy komórek T (T-cell receptor, TCR) jest podstawowym elementem w komunikacji z komórkami układu immunologicznego, a jego stymulacja stanowi pierwszy krok we wzbudzeniu czynności limfocytu. TCR jest heterodimerem złożonym z łańcuchów polipeptydowych α i β , z których każdy ma domenę zmienną (V) i stałą (C). Receptory TCR na powierzchni komórki T są związane z kompleksem CD3, zbudowanym z kilku łańcuchów polipeptydowych, które odgrywają ważną rolę w ekspresji TCR oraz w przekazywaniu sygnałów do komórki T [6]. O krytycznym znaczeniu komórek CD3+ świadczy to, iż jednym z najsilniejszych środków immunosupresyjnych stosowanych w transplantologii klinicznej jest przeciwciało monoklonalne anti-CD3: OKT3, które wiążąc się z komórkami T wyklucza je z uczestnictwa w dalszej odpowiedzi na aloantygen [22].

Większość dojrzałych limfocytów T ma na swojej powierzchni białko CD4 lub CD8. Cząsteczki CD4 są obecne w subpopulacji limfocytów pomocniczych - Th (helper) i wiążą się bezpośrednio z cząsteczkami MHC klasy II. Cząsteczki CD8 są z kolei charakterystyczne dla subpopulacji limfocytów cytotoksycznych – Tc i wiążą się bezpośrednio z cząsteczkami MHC klasy I. Od tego podziału funkcjonalnego komórek T istnieją jednak wyjątki. Na przykład, komórki CD4 ograniczone do MHC klasy II pełnią w pewnych układach funkcję cytotoxiczną, a komórki CD8 wydzielają wiele, chociaż nie wszystkie, z cytokin regulatorowych wytwarzanych przez komórki CD4. Uważa się, iż komórki CD4 pośredniczą we wstępnym rozpoznaniu alograftu, regulują nasilenie i koordynują odpowiedź immunologiczną, podczas gdy limfocyty CD8 pełnią wraz z limfocytami CD4 Th1 i komórkami NK (natural killers) rolę komórek odpowiedzialnych za podtrzymanie fazy efektorowej procesu odrzucania [6,7].

W mysim modelu przeszczepu serca, zwierzęta pozbawione komórek CD4 nie są zdolne do odrzucania przeszczepu, natomiast pozbawione komórek CD8 odrzucają przeszczepione narządy. W innych modelach eksperymentalnych blokada antygenowa komórek CD8 zapobiega odrzucaniu, sugerując konieczność udziału komórek CD8 w niszczeniu przeszczepionego narządu. Dane te świadczą o nakładających się na siebie funkcjach lub o nadmiarze różnorodnych składowych odpowiedzi na aloantygen, oraz o zdolności układu immunologicznego do kompensowania swoistych niedoborów i mimo wszystko niszczenia przeszczepionego narządu [3].



Ryc. 1. Drogi rozpoznawania i prezentowania aloantygeny: bezpośrednia i pośrednia; zmodyfikowano wg [21]

Limfocyty T po aktywacji wytwarzają różnorodne cytokiny regulujące odpowiedź immunologiczną. Uporczywa stymulacja antygenowa powoduje często różnicowanie komórek T w jeden z dwóch odrębnych typów, z odmiennymi profilami wytwarzanych cytokin. Komórki Th typu 1 (zwane komórkami Th1) wydzielają cytokiny, do których należy IL-2, IFN- γ , IL-12 oraz czynnik martwicy nowotworów (TNF- α). Cytokiny te stymulują reakcje nadwrażliwości typu późnego (delayed-type hypersensitivity; DTH), aktywność cytolityczną oraz wytwarzanie opsonizujących i unieruchamiających dopełniaczy przeciwciała klasy IgG.

Komórki Th typu 2 (komórki Th2) wydzielają cytokiny, do których należą IL-4, -5, -10 oraz IL-13, które aktywują eozynofile i stymulują wytwarzanie przeciwciała klasy IgE. Regulacja tych dwóch typów odpowiedzi została najszerzej przebadana w komórkach Th, ale polaryzacja odpowiedzi wydaje się również dotyczyć cytolitycznych komórek CD8. IFN- γ i IL-12 wspomagają odchylenie w kierunku odpowiedzi typu 1, zaś IL-4 sprzyja odpowiedziom typu 2. Dodatkowo IFN- γ hamuje odpowiedzi typu 2, natomiast IL-4 hamuje odpowiedzi typu 1, tak, że po ich zainicjowaniu odpowiedzi stają się coraz bardziej spolaryzowane [7].

W ostatnich latach obserwuje się ogromne zainteresowanie rolą cytokin w odrzucaniu przeszczepów w związku z hipotezą, iż odpowiedzi typu 1 prowadzą do odrzucania przeszczepionych narządów, natomiast odpowiedzi typu 2 mogą pośredniczyć w ich tolerancji. Hipoteza ta rozwinęła się częściowo na podstawie obserwacji, iż typ 1 cytokin wspomaga funkcje efektorowe, takie jak reakcje nadwrażliwości typu późnego i aktywność cytolityczną, natomiast cytokiny typu 2 działają antagonistycznie do wymienionych rodzajów aktywności [30]. W badaniach eksperymentalnych wykazano, iż proces ostrego odrzucania jest związany ze zwiększeniem ilości cytokin typu 1, natomiast wydłużone przeżycie narządu wiąże się ze zredukowanym stężeniem tych cytokin. Jeszcze inne badania wykazały, iż proces odrzucania jest uwarunkowany wytwarzaniem obu typów cytokin, natomiast tolerancja jest związana ze zmniejszeniem ich syntezy. Ponadto, próby wpływania na

odrzućcie przeszczepionego narządu poprzez manipulowanie cytokinami okazały się w większości nieskuteczne, co wskazuje, iż hipotezy typu 1 lub typu 2 mają ograniczone zastosowanie terapeutyczne w odpowiedzi na aloantygenu. Na przykład, IL-4 nie powoduje indukcji tolerancji u myszy, a myszy z niedoborem IL-2 i IFN- γ są nadal zdolne do odrzucania przeszczepu [18]. Wydaje się więc, iż odpowiedzi typu 2 nie mają wpływu wyłącznie immunosupresyjnego, a związane z nimi funkcje efektorowe mogą się również przyczyniać do odrzucania przeszczepu.

Aktywacja limfocytów B z wytwarzaniem przeciwciała zachodzi po związaniu swoistych dla aloantygenu receptorów immunoglobulinowych (BCR), których ekspresję wykrywa się u limfocytów B opuszczających szpik. Aktywacja ta wiedzie do rozwinięcia się fazy efektorowej procesu odrzucania: uczynnienia układu dopełniacza, aktywacji komórek NK, fagocytów i mastocytów. Odpowiedź humoralna odgrywa istotną rolę w procesie odrzucania narządu [20].

Na dojrzewanie i przekształcanie się limfocytów B mają wpływ następujące cytokiny i czynniki wzrostu: IL-4 – kontrolująca powstanie IgG1, TGF- β 1 – wpływający na przekształcanie się IgG2a w IgG2b oraz IFN- γ – kontrolujący przełączanie się powstających przeciwciała w IgG3. TGF- β 1 wraz z IL-5 powoduje zwiększenie wytwarzania IgA, hamując wytwarzanie IgG oraz IgM [13].

PREZENTACJA ANTYGENU

Aby mogło dojść do pierwszego etapu odpowiedzi immunologicznej, aloantygenu wraz z cząsteczką MHC klasy I lub II musi zostać zaprezentowany limfocytowi przez komórkę APC. Ważnym elementem prezentacji aloantygenu jest połączenie się antygenu z cząsteczką MHC i ekspresja tego kompleksu na powierzchni APC dla TCR limfocyty.

Teoretycznie aloantygenu może być rozpoznany przez TCR limfocyty T biorcy na dwa różne sposoby: rozpoznawania bezpośredniego i pośredniego (ryc.1).

W bezpośredniej prezentacji czynny udział biorą komórki APC dawcy (głównie komórki dendrytyczne), które pobudzone w wyniku zmian niedokrwiennie-reperfuzyjnych, przedostają się z przeszczepionego narządu do regionalnych węzłów chłonnych prezentując limfocytom T biorcy aloantygenu połączone z cząsteczkami MHC dawcy [9,26]. Bezpośrednia stymulacja limfocytów T wymaga ciągłej obecności komórek prezentujących antygen pochodzący od dawcy.

Związanie aloantygenu z cząsteczką MHC klasy II bądź klasy I, pobudza odpowiednio limfocyty pomocnicze (CD4) oraz cytotoksyczne (CD8), wpływając na indukcję i/lub podtrzymanie procesu odrzucania.

Rozpoznawanie pośrednie odbywa się z udziałem limfocytów T biorcy, którym prezentowany jest aloantygenu wraz z cząsteczkami MHC na własnych komórkach APC [9,26].

Bezpośrednie rozpoznawanie może aktywować znacznie większy odsetek komórek T z ich puli i może powodować intensyw-



ną odpowiedź immunologiczną – ostre odrzucanie. Pośrednie rozpoznawanie skutkuje powstaniem małej liczby aloreaktywnych klonów komórek T, a niektóre dowody sugerują, że ta droga może prowadzić do „cichej” odpowiedzi immunologicznej, która występuje w odrzucaniu przewlekłym.

POBUDZENIE LIMFOCYTU

Rozpoznawanie aloantygeny przez komórki T zapoczątkowuje aktywację, proliferację i różnicowanie się komórek T oraz proces odrzucania zależny od komórek T.

Swoistość odpowiedzi immunologicznej jest zdeterminowana przez interakcję między receptorem limfocytu T (TCR) a kompleksem MHC/peptyd obecnym na APC. Jednakże dla pełnej aktywacji limfocytu zasadnicze znaczenie ma kilka innych interakcji między komórkami T a komórkami prezentującymi antygen (APC) – wymagane jest połączenie się powierzchniowych receptorów limfocytu z komplementarnymi ligandami na APC.

Ponad 30 lat temu zaproponowano teorię, iż do aktywacji limfocytów wymagane są dwa odrębne sygnały. Od tego czasu wykazano, iż aktywacja komórek T wymaga jednego sygnału za pośrednictwem TCR oraz drugiego sygnału kostymulującego za pośrednictwem cząsteczek pomocniczych.

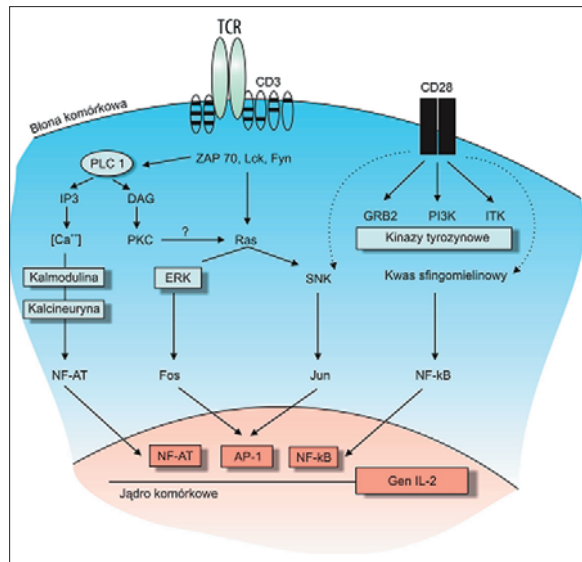
SYGNAŁ I

Połączenie aloantygen/cząsteczka MHC z receptorem TCR limfocytu biorcy (synapsa immunologiczna) daje pierwszy sygnał pobudzenia limfocytu. Synapsa immunologiczna jest miejscem wykazującym swoistą budowę i jest ona zdolna do wzmocnienia sygnału aktywacji limfocytu. Synapsa tworzą wielkość cząsteczkowe agregaty odgrywające rolę w adhezji i przekazywaniu sygnału pobudzenia do wnętrza komórki (supramolecular activation clusters; SMACs) [8,24]. W strukturze synapsy można wyróżnić część centralną i obwodową. Centrum SMACs tworzą skupione układy receptorów TCR, kompleksów peptyd-cząsteczka MHC, cząsteczek kostymulujących, ich ligandów oraz białka przekaźnikowe. Obwód synapsy składa się z pierścienia receptorów cząsteczek adhezyjnych i ich ligandów (LFA-1/ICAM-1) oraz białka taliny. Taki układ elementów w obrębie synapsy, po rozpoznaniu przez receptor TCR komplementarnego kompleksu aloantygen/cząsteczka MHC, zapewnia wzmocnienie sygnału pobudzenia, co istotnie zwiększa prawdopodobieństwo dalszego przekazania go do wnętrza komórki T.

TRANSMISJA SYGNAŁÓW WEWNĄTRZ KOMÓRKI T

Aby mogło dojść do transdukcji procesów zachodzących na powierzchni komórki do jej jądra oraz modyfikacji ekspresji genów regulujących funkcje komórki konieczne są złożone mechanizmy. Dotąd zidentyfikowano w limfocytach wiele szlaków sygnałowych, z których kilka stało się szlakami docelowymi blokowania odpowiedzi na aloantygen.

Następstwem związania liganda przez kompleks TCR/CD3 jest kaskadowa aktywacja białkowych kinaz tyrozynowych. Sekwencja włączania kinaz w szlaku sygnałowym TCR/CD3 rozpoczyna się od kinaz tyrozynowych rodziny Src (Lck i Fyn) – dochodzi do związania ich domen SH2 i SH3



Ryc. 2. Uproszczony schemat transmisji sygnałów wewnątrz komórki po związaniu TCR i kostymulującego receptora CD28 na limfocycie T

ze swoistymi sekwencjami w obrębie łańcuchów cytoplazmatycznych kompleksu TCR/CD3 i aktywacji ZAP-70 (zeta associated protein-70) [15,23]. W procesie transdukcji sygnału jest uruchamianych wiele innych białkowych kinaz tyrozynowych zmieniających poziom fosforylacji substratów, takich jak łańcuch ζ kompleksu CD3, ZAP-70, fosfolipaza C-gamma 1 (PLC-gamma 1), białka adaptorowe, także o funkcji negatywnej, na przykład Csk [4,14].

Fosforylacja ta prowadzi do aktywacji kilku szlaków biochemicznych, włączając szlak kalcineuryny, kinazy białkowej C oraz kinazy Ras, Rac i MAP (mitogen activated protein). Na ryc. 2 przedstawiono uproszczony schemat kaskadowej aktywacji kinaz i drogi przekazania sygnałów wewnątrz komórki po związaniu TCR i CD28.

Aktywacja kinazy Lck niekonwalencyjnie związanej z receptorem CD4 lub CD8 powoduje fosforylację tyrozyny obecnej w motywie ITAM, do którego następnie przyłącza się kinaza ZAP-70, ufosforylowana przez kinazę Lck. W wyniku aktywacji kinaz tyrozynowych dochodzi do uruchomienia kaskady białek adaptorowych (cząsteczka Lat, białko SLP-76), które pośredniczą w przekazaniu sygnału pobudzenia do wnętrza komórki limfocytu (kaskady kinaz serynowo-tyrozynowych) [14,25]. W wyniku ich działania powstają przekaźniki drugiego rzędu (1,4,5-trifosforan inozytolu IP3 oraz diacyloglicerol DAG) pod wpływem fosfolipazy C gamma. IP3 indukuje otwarcie kanałów wapniowych, aktywując następnie fosfatazę serynową, kalcineurynę i doprowadzając do przedostania się czynników transkrypcyjnych z NF-AT (nuclear factor of activated T cells) do wnętrza jądra limfocytu. Wraz z czynnikiem AP-1 (c-Fos/c-Jun) IP3 wpływa na transkrypcję genów IL-2, IL-4, IFN- γ , GM-CSF, IL-3, IL-13, TNF- α oraz receptorów powierzchniowych (CD25 α , CD95L, CD40L, CD69).

Drugi przekaźnik sygnału pobudzenia limfocytu: DAG – aktywuje białko kinazy C (PKC), pobudzając czynnik transkrypcyjny NF-kappaB.

Ligand (APC)	Receptor (limfocyt T)	Wynik interakcji
CD80 (B7.1)	CD28	aktywacja (↑ IL-2, ↑ IL-4, ↑ proliferacja)
CD86 (B7.2)		
B7RP1	ICOS	aktywacja (↑ IL-4, ↑ IL-10, ↑ TNF α)
PDL 1	PD1	hamowanie aktywacji (↓ IL-2, ↓ IL-10, ↓ IFN γ , ↓ proliferacja)
PDL 2		
OX40L	CD134	podtrzymanie aktywacji (hamowanie apoptozy – indukcja <i>bcl-x</i> i <i>bcl-2</i>)
CD40	CD154 (CD40L)	aktywacja (↑ TNF α , ↑ IL-12, ↑ proliferacja)

Ryc. 3. Częsteczki pomocnicze i kostymulujące biorące udział w aktywacji/hamowaniu aktywacji limfocytu

Najlepiej scharakteryzowanym szlakiem jest szlak kalcineuryny, ponieważ stanowi on miejsce działania silnych środków immunosupresyjnych (inhibitorów kalcineuryny): cyklosporyny i takrolimusu. Kalcineuryna (fosfataza serynowo-treoninowa) defosforyluje czynnik jądrowy aktywowanych limfocytów (NF-AT), pozwalając mu na przemieszczenie się z cytoplazmy do jądra. Po znalezieniu się w jądrze NF-AT wiąże się z sekwencjami regulatorowymi (promotorem) i rozpoczyna transkrypcję genu IL-2, głównej cytokiny biorącej udział w aktywacji limfocytów oraz kilku innych cytokin [4].

Transmisja pierwszego sygnału skutkuje powiększeniem się limfocyta i wydzielaniem niewielkiej ilości IL-2, bez stanu pełnej aktywacji. Dziewiczny limfocyt, który rozpoznał antygen, a nie otrzymał kolejnego sygnału od cząsteczek kostymulujących, osiąga stan anergii. Z kolei limfocytowi będącemu w stanie aktywacji (także w przypadku limfocytów pamięci) do rozpoczęcia proliferacji brakuje jedynie pierwszego sygnału.

Jak wspomniano wcześniej, połączenie się receptora TCR z cząsteczką MHC, nie wystarcza do pełnej aktywacji limfocytów dziewicznych. Drugim sygnałem dla limfocyta jest połączenie się jego cząsteczek pomocniczych i kostymulujących (ryc. 3).

SYGNAŁ II – CZĄSTECZKI POMOCCNICZE I KOSTYMULACJA

Cząsteczki pomocnicze (ryc. 3) spełniają dwie ważne role. Pierwszym zadaniem jest dostarczenie siły adhezyjnej pozwalającej na utrzymanie kontaktu między komórkami T i APC, dzięki czemu receptory TCR mają czas na zbadanie antygenów na komórkach APC. Integryny, szczególnie LFA-1 na komórkach T wiążące się z ICAM na APC są prawdopodobnie najważniejszymi cząsteczkami adhezyjnymi biorącymi udział w aktywacji komórek T. Najsilniejszym

drugim sygnałem regulującym klonalną ekspansję komórek T oraz ich różnicowanie się jest rodzina cząsteczek B7/CD28 [10,12].

CD28 ulega ekspresji na większości limfocytów T, a udział CD28 zwiększa proliferację komórek T za pośrednictwem różnorodnych mechanizmów, włączając wytwarzanie IL-2 i innych cytokin. Na komórkach APC dochodzi do ekspresji dwóch ligandów CD28: B7.1 (CD80) oraz B7.2 (CD86). Ekspresja obu cząsteczek B7 jest zwiększona na komórkach APC, które zostały zaktywowane różnorodnymi bodźcami zapalnymi, włączając zakażenie mikroorganizmami oraz działanie cytokiny. Zarówno B7.1, jak i B7.2 mogą powodować kostymulację komórek T za pośrednictwem CD28, a w wielu modelach eksperymentalnych wykazują one działanie wzajemnie nakładające się na siebie. B7.1 i B7.2 mają jednakże odrębne wzorce ekspresji i kinetykę wiązania z CD28, co sugeruje znaczące różnice w zadaniach, jakie te cząsteczki odgrywają. B7.1 i B7.2 regulują również komórki T poprzez wiązanie receptora CTLA-4, który hamuje proliferację komórek T.

Obecnie stosowane leki immunosupresyjne niezwykle silnie blokują odrzucanie przeszczepu, ale żaden z nich nie jest swoisty antygenowo, a więc powodują one równie silne zahamowanie odpowiedzi immunologicznej na zakażenie. Dlatego też celem immunologii transplantacyjnej jest swoiste zablokowanie odpowiedzi na antygeny transplantacyjne, bez powodowania uogólnionej immunosupresji. Jednym ze sposobów osiągnięcia tego celu jest wywołanie anergii komórek T, lub swoistego antygenowo „nieodpowiadania”. Modele *in vitro* wykazują, iż jednym ze sposobów indukowania anergii jest dostarczenie komórkom T sygnału swoistego antygenowo za pośrednictwem ich receptora TCR przy braku zaangażowania CD28. W modelach tych kolejne narażenie komórki zarówno na sygnał TCR, jak i CD28 nie może już prowadzić do aktywacji komórki T.

Celowe hamowanie szlaku B7/CD28 jest ogromnie obiecujące w osiągnięciu swoistego antygenowo „nieodpowiadania”, ponieważ czas przeprowadzenia transplantacji może być kontrolowany tak, aby zbiegała się ona z podaniem środków blokujących udział CD28. Jeżeli blokada CD28 wymagana byłaby jedynie w czasie początkowego narażenia na antygen, biorca przeszczepu nie byłby obciążony ryzykiem zakażeń związanym z długotrwałą immunosupresją. Dodatkowo można by zapobiec odpowiedzi komórek T na antygeny pochodzące z przeszczepu, bez potrzeby identyfikowania swoistych antygenów [27].

W wielu różnorodnych zwierzęcych modelach eksperymentalnych oraz we wstępnych badaniach na ludziach blokada cząsteczek B7 okazała się znacząco wydłużać przeżycie przeszczepionego narządu [34]. Jednakże w większości modeli blokady B7 *in vivo* anergia ograniczona do swoistych antygenów okazała się trudna do wykazania. Jednym z powodów tych trudności może być złożoność kostymulacji. Istnieje np. coraz więcej dowodów na to, iż udział CTLA-4 jest ważny w indukowaniu tolerancji. Ponieważ blokada B7 ma wpływ zarówno na sygnały przekazywane za pośrednictwem CD28, jak i CTLA-4, a działanie tych cząsteczek ma przeciwne efekty, całkowity wynik jest w dużym stopniu zależny od układu eksperymentalnego. Manipulacja w obrębie tego szlaku może być również utrudniona ze względu na obecność cząsteczek pomocniczych, homologicznych z B7 lub CD28, które zostały niedawno odkryte. Powyższe cząsteczki z nadrodziny CD28

przewodzą do komórek T zarówno sygnały stymulujące, jak i hamujące. Na przykład B7h na komórkach APC stymuluje komórki T przez wiązanie się z ICOS, natomiast ligandy PD-L1 i PD-L2 hamują komórki T przez wiązanie się z PD-1 (programmed death-1). Interakcja między tymi szlakami jest w dalszym ciągu definiowana, ale zrozumienie ich regulacji prawdopodobnie poprawi metody leczenia ukierunkowane na kostymulację.

Innym rodzajem interakcji cząsteczkowej mającej krytyczne znaczenie w odpowiedzi immunologicznej jest interakcja występująca między cząsteczką CD40 na komórkach APC a ligandem CD40 (CD154, CD40L) na komórkach T. Działanie CD40 odgrywa zasadniczą rolę w aktywacji komórek B, komórek dendrytycznych i monocytów, a także zwiększa ekspresję cząsteczek B7 [32]. Istnieją również pewne dowody na to, że cząsteczki CD154 biorą udział w bezpośredniej stymulacji komórek T. Szlak CD40/CD154 jest przedmiotem ogromnego zainteresowania ze względu na swoje znaczenie w aktywacji zarówno komórek APC, jak i T, a blokada tego szlaku w eksperymentalnych modelach transplantacyjnych okazała się wyjątkowo skuteczna [34,36]. Poza tym, w interakcjach między komórkami T a APC ważne są również pewne inne szlaki w rodzinie, do której należy CD40/CD154 oraz TNF/TNFR (czynnik martwicy nowotworu i jego receptor). W modelach eksperymentalnych blokada szlaków TNF i CD28 prawdopodobnie ma działanie synergistyczne. Blokada ta w badaniach na ssakach naczelnych, wydaje się mieć potencjalne zastosowanie kliniczne [33].

PIŚMIENNICTWO

- [1] Agata Y., Kawasaki A., Nishimura H., Ishida Y., Tsubata T., Yagita H., Honjo T.: Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.*, 1996; 8: 765–772
- [2] Bennett S.R., Carbone F.R., Karamalis F., Flavell R.A., Miller J.F., Heath W.R.: Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*, 1998; 393: 478–480
- [3] Calne R.Y.: Prope tolerance: the future of organ transplantation - from the laboratory to the clinic. *Transplantation*, 2004; 77: 930–932
- [4] Cantrell D.A.: T-cell antigen receptor signal transduction. *Immunology*, 2002; 105: 369–374
- [5] Chambers C.A., Allison J.P.: Costimulatory regulation of T cell function. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1999; 11: 203–210
- [6] Delves P.J., Roitt I.M.: The immune system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.*, 2000; 343: 37–49
- [7] Delves P.J., Roitt I.M.: The immune system. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.*, 2000; 343: 108–117
- [8] Freiberg B.A., Kupfer H., Maslanik W., Delli J., Kappler J., Zaller D.M., Kupfer A.: Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat. Immunol.* 2002; 3: 911–917
- [9] Gould D.S., Auchincloss H.Jr.: Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol. Today*, 1999; 20: 77–82
- [10] Greenwald R.J., Freeman G.J., Sharpe A.H.: The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.*, 2005; 23: 515–548
- [11] Halloran P.F., Broski A.P., Batiuk T.D., Madrenas J.: The molecular immunology of acute rejection: an overview. *Transpl. Immunol.*, 1993; 1: 3–27
- [12] Harris N.L., Ronchese F.: The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol. Cell. Biol.*: 1999; 77: 304–311
- [13] Horikawa K., Takatsu K.: Interleukin-5 regulates genes involved in B-cell terminal maturation. *Immunology*, 2006; 118: 497–508
- [14] Houtman J.C., Houghtling R.A., Barda-Saad M., Toda Y., Samelson L.E.: Early phosphorylation kinetics of proteins involved in proximal TCR-mediated signaling pathways. *J Immunol.*, 2005; 175: 2449–2458
- [15] Howe L.R., Weiss A.: Multiple kinases mediate T-cell-receptor signaling. *Trends Biochem. Sci.*, 1995; 20: 59–64
- [16] Howland K.C., Ausubel L.J., London C.A., Abbas A.K.: The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance. *J. Immunol.*, 2000; 164: 4465–4470
- [17] Koulack J., McAlister V.C., MacAulay M.A., Bitter-Suermann H., MacDonald A.S., Lee T.D.: Importance of minor histocompatibility antigens in the development of allograft arteriosclerosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1996; 80: 273–277
- [18] Lakkis F.G.: Role of cytokines in transplantation tolerance: lessons learned from gene-knockout mice. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1998; 9: 2361–2367
- [19] Marrack P., Kappler J.: The antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted receptor on T cells. *Adv. Immunol.*, 1986; 38: 1–30
- [20] Mauviyyedi S., Colvin R.B.: Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 2002; 11: 609–618
- [21] Maxwell J.R., Weinberg A., Prell R.A., Vella A.T.: Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion. *J. Immunol.*, 2000; 164: 107–112
- [22] Opelz G.: Efficacy of rejection prophylaxis with OKT3 in renal transplantation. *Collaborative Transplant Study. Transplantation*, 1995; 60: 1220–1224
- [23] Palacios E.H., Weiss A.: Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene*, 2004; 23: 7990–8000
- [24] Qi S.Y., Groves J.T., Chakraborty A.K.: Synaptic pattern formation during cellular recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 6548–6553
- [25] Samelson L.E.: Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002; 20: 371–394
- [26] Sayegh M.H.: Why do we reject a graft? Role of indirect allorecognition in graft rejection. *Kidney Int.*, 1999; 56: 1967–1979
- [27] Sayegh M.H., Turka L.A.: The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.*, 1998; 338: 1813–1821

- [28] Sharpe A.H., Freeman G.J.: The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002; 2: 116–126
- [29] Soroosh P., Ine S., Sugamura K., Ishii N.: OX40-OX40 ligand interaction through T cell-T cell contact contributes to CD4 T cell longevity. *J Immunol.*, 2006; 176: 5975–5987
- [30] Strom T.B., Roy-Chaudhury P., Manfro R., Zheng X.X., Nickerson P.W., Wood K., Bushell A.: The Th1/Th2 paradigm and the allograft response. *Curr Opin Immunol.*, 1996; 8: 688–693
- [31] Sugamura K., Ishii N., Weinberg A.D.: Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004; 4: 420–431
- [32] van Kooten C., Banchereau J.: Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol.*, 1997; 9: 330–337
- [33] Wekerle T., Kurtz J., Bigenzahn S., Takeuchi Y., Sykes M.: Mechanisms of transplant tolerance induction using costimulatory blockade. *Curr Opin. Immunol.*, 2002; 14: 592–600
- [34] Yamada A., Salama A.D., Sayegh M.H.: The role of novel T cell costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2002; 13: 559–575
- [35] Yoshinaga S.K., Whoriskey J.S., Khare S.D., Sarmiento U., Guo J., Horan T., Shih G., Zhang M., Coccia M.A., Kohno T., Tafuri-Bladt A., Brankow D., Campbell P., Chang D., Chiu L., Dai T., Duncan G., Elliott G.S., Hui A., McCabe S.M., Scully S., Shahinian A., Shaklee C.L., Van G., Mak T.W., Senaldi G.: T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*, 1999; 402: 827–832
- [36] Yuan Z., Kupiec-Węgliński J.W.: The CD154-CD40 costimulation pathway in organ transplantation. *Transpl. Rev.*, 2004; 18: 10–19

