

10 Activación linfocitos T

E. Muñoz y J. Peña

►Interacción celular ►Transmisión señales ►CD45 ►PKC ►PLC ►Otras cinasas ►Factores transcripción

INTRODUCCIÓN

La activación de los linfocitos T se produce tras el reconocimiento por parte del TCR/CD3 de la molécula HLA y el péptido presentado por la misma junto con otros procesos, como son la activación de ciertas moléculas accesorias presentes en su membrana. También en este proceso de activación se hace más eficiente si los linfocitos reciben el estímulo de ciertas citocinas mediante su unión a los receptores específicos presentes también en la membrana de estos linfocitos.

Una vez activados los linfocitos T, estos prioritariamente producirán citocinas o factores citotóxicos, según se trate de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺. De esta manera se desarrollará la respuesta inmune. Los linfocitos T CD4⁺ colaborarán en la posterior activación de otras células, tales como NK, T CD8⁺, linfocitos B o macrófagos. A su vez los linfocitos T CD8⁺ tras su activación ejercerán su función citotóxica destruyendo células blanco (Figura 10.1).

Fenómenos de interacción celular.

El proceso de reconocimiento varía si el receptor de la célula T está formado por el heterodímero alfa/beta (células T alfa/beta CD4⁺ o CD8⁺) o si es del tipo gamma/delta (células T gamma/delta CD4⁻/CD8⁻), ya que en estas últimas no existe función coestimuladora por parte de las moléculas accesorias CD4 y CD8 (no se puede producir la unión MHC-CD4 o MHC-CD8). Como se dijo anteriormente, las moléculas de histocompatibilidad "no clásicas" pueden presentar péptidos antigénicos a los receptores gamma/delta.

En muchos casos la unión del antígeno con el TCR no es suficiente para dar lugar a una respuesta inmune eficaz. Para que esta respuesta se lleve a cabo se requiere la participación de una serie de moléculas conocidas globalmente como accesorias, y cuya función es precisamente la de contribuir al desarrollo de una respuesta inmune efectiva facilitando la interacción entre las distintas células. Se forma así lo que se viene en denominar sinapsis entre linfocitos T y célula presentadora de antígeno (Figura 10.2). Las principales moléculas que están implicadas en este fenómeno de reconocimiento son el CD4, CD8, CD2, CD45 y CD28 y sus ligandos respectivos. Todas estas moléculas de adhesión también juegan un importante papel en la transducción de señales y activación de la célula T. En la Figura 10.3 se recoge un esquema de las distintas posibilidades de activación de los linfocitos T según las moléculas que intervienen en los procesos de reconocimiento y adhesión intercelular.

Moléculas CD4 y CD8.

Las moléculas CD4 y CD8 son glicoproteínas cuyos ligandos naturales son las moléculas del MHC de clase II y de clase I respectivamente. La molécula CD4 pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y esta formada por una sola cadena. La molécula CD8 pertenece también a la superfamilia de las Igs, pero su estructura difiere considerablemente de la anterior, al estar formada por dos cadenas homólogas, alfa y beta, que pueden formar heterodímeros o, en menor proporción, homodímeros (alfa/alfa).

Las interacciones de estas moléculas con el HLA, juegan un papel esencial en la maduración tímica de los linfocitos. De hecho, el fenotipo CD4/CD8 de un determinado linfocito T determina su función efectora. Así, mientras el CD4 se expresa en la mayoría de los linfocitos T

cooperadores, la molécula CD8 se presenta, principalmente, en aquellos linfocitos T con función citotóxica. Es lógico que las células T con fenotipo CD8⁺ reconozcan antígenos en el contexto de moléculas MHC de clase I, ya que éstas tienen una distribución tisular universal, pudiéndose realizar así la función citotóxica, reconocimiento y lisis, de cualquier célula del organismo que se encuentre infectada por virus.

Moléculas CD2

Las moléculas CD2 junto con el CD11a/CD18 (LFA-1) son las moléculas de adhesión primaria que contribuyen a potenciar la afinidad de unión del linfocito T a la célula presentadora. Sus ligandos naturales que son el CD58 (LFA-3) y CD54 (ICAM-1) respectivamente, se expresan en la superficie de todas las células que realizan la función de APC. El CD2 es una glicoproteína presente en la superficie de timocitos y linfocitos T, organizada en dos dominios globulares extracitoplasmáticos, una región transmembrana y una larga región intracitoplasmática. Esta molécula es la primera molécula que se expresa en el linaje T durante su diferenciación y se encuentra en todos los timocitos y células T maduras. Además de su papel en la interacción entre células, está implicado en una vía alternativa de activación T antígeno-independiente. Otras moléculas de membrana que intervienen en el proceso de adhesión son CD5 y CD40, cuyos ligandos en la APC son, respectivamente, CD72 y CD40L.

Moléculas CD28

Las moléculas CD28 son también de especial importancia en los mecanismos de adhesión celular. El CD28 se expresa en todos los linfocitos CD4 y aproximadamente en el 50% de los linfocitos CD8, sus ligandos naturales pertenecen a la familia B7 (B7-1, CD80; B7-2, CD86). CD28, además de su papel en el proceso de adhesión, también participa en el mecanismo de transducción de señal y activación de la célula T ya que el CD28 induce la denominada segunda señal de activación celular (la primera está generada por el TCR/CD3). En ausencia de esta segunda señal, los linfocitos T pueden anergizarse por la primera señal de activación dependiente TCR/CD3. Esta segunda señal parece ser regulada negativamente por la molécula CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4).

Solo un número muy pequeño de moléculas MHC con el péptido apropiado están presente en un área dada del contacto célula-célula establecido con el proceso de adhesión. Gracias a la habilidad del TCR/CD3 de formar estructuras ordenadas, los *complejos MHC* con el péptido correcto migran dentro de la interfase. Esto provoca una alta densidad local de *complejos TCR/CD3* cooperando en la unión antigénica.

Transmisión de señales

Todas las células eucariotas incluidos los linfocitos T, B y NK poseen mecanismos a través de los cuales los estímulos externos son procesados y enviados al núcleo a través de una serie de cambios bioquímicos que conocemos genéricamente como *señales de activación intracelulares* o de *transducción de señales*. Estos mecanismos implican la formación de los denominados *segundos mensajeros* que son capaces de regular la transcripción específica de un amplio número de genes, los cuales participan en los procesos de crecimiento, división y diferenciación celular. En la activación de esta cadena de segundos mensajeros intervienen señales procedentes tanto del TCR/CD3 como de las moléculas accesorias y receptores de citocinas presentes en la membrana de los linfocitos (Figura 10.4).

Un mecanismo fundamental en la regulación de la actividad y la función de numerosas proteínas en las células eucarióticas son los ciclos de fosforilación y defosforilación mediados por *quinasas* y *fosfatasa*s. Básicamente existen dos tipos de quinasas, dependiendo de su actividad fosfotransferasa la cual se manifiesta fosforilando proteínas en aminoácidos *serina* y *treonina* (serina/treonina quinasas) o bien en aminoácidos *tirosina* (tirosina quinasas). Igualmente hay fosfatasa que defosforilan específicamente proteínas fosforiladas bien en serina/treonina o en tirosina.

Una propiedad general de los linfocitos es la necesidad de generar dos señales distintas para inducir la proliferación hacia células efectoras. Como se ha comentado anteriormente la primera señal la proporciona la unión del complejo péptido-MHC al TCR (y a los co-receptores CD4 y CD8), esta señal está potenciada por moléculas de adhesión (CD2, el LFA-1, el CD26, etc.). La segunda señal es suministrada por moléculas co-estimuladoras del tipo CD28, que de alguna manera complementan las señales de activación inducidas por el TCR permitiendo una activación celular completa (Figura 10.5). Estas señales coestimuladoras son necesarias para la activación del linfocito, ya que en su ausencia la señal mediada por el TCR puede conducir al linfocito a la muerte celular o a un estado de anergia (en la que el linfocito no responde a nuevas estimulaciones).

Después de la ocupación de los receptores T por el antígeno, se produce la activación de los linfocitos y la iniciación de eventos tempranos de traducción de señales que finalmente conducen a la reprogramación génica y a la adquisición de funciones efectoras. Para que el linfocito T pueda llevar a cabo estas funciones se requiere un complejo sistema responsable de la transmisión de señales de activación desde la superficie al interior de la célula. En esta última década se está realizando un gran esfuerzo para identificar los componentes celulares y moleculares que están involucrados en dicha activación celular y determinar la secuencia de eventos bioquímicos que ocurren después del reconocimiento del antígeno.

ESTÍMULOS INICIADOS POR EL TCR.

Uno de los primeros eventos bioquímicos que ocurren en linfocitos T después de la interacción Ag-TCR, es el incremento de fosforilación en tirosina de las cadenas no polimórficas del CD3. Estas cadenas poseen en sus dominios intracitoplasmáticos unas regiones denominadas ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*) que se fosforilan por la acción de las tirosina cinasas *c-lck* o *c-fyn*.

La tirosina cinasa *c-lck* se encuentra localizada en la parte intracelular de la membrana plasmática unida a la bicapa lipídica por un proceso de miristilación de su región aminoterminal (Figura 10.6). La asociación física y funcional del CD4 y del CD8 con el TCR/CD3, hace que la *c-lck* asociada a estas moléculas se aproxime a la porción citoplásmica de las proteínas del complejo CD3, donde puede fosforilar en tirosina a sus regiones ITAM. Además del CD3 esta cinasa puede también fosforilar otros sustratos como es el caso de PLC-gamma-1 (fosfolipasa C-gamma-1) que participa en la regulación del *sistema inositol fosfato* que se describirá más adelante. *C-fyn*, al igual que *c-lck* es otra tirosina cinasa que pertenece a la familia de cinasas *Src*. También está anclada a la cara interna de la membrana celular por miristilación de su porción aminoterminal. Esta cinasa está físicamente asociada al TCR y su actividad está regulada por la ocupación y activación del mismo.

Una vez que los ITAM son fosforilados en residuos tirosinas, se convierten en sitios específicos de acoplamiento que se unen a proteínas citoplásmicas con dominios SH2. La función de los dominios SH2 es interactuar con algunas proteínas que se encuentran fosforiladas en residuos tirosina, así su función esta regulada por procesos fosforilación-desfosforilación de estos aminoácidos. Por este motivo, un dominio SH2 puede interactuar con una fosfotirosina adyacente en la misma o en otra molécula. Cuando es sobre la misma molécula contribuye al control de su propia actividad enzimática. En otras ocasiones, la enzima con el dominio SH2 interacciona a través de dicho motivo con otras proteínas previamente fosforiladas en tirosina por otra cinasa. Esta interacción es responsable de su activación y de la de otros sustratos. Este es el caso de la enzima ZAP-70 que se activa cuando a través de sus dominios SH2 se une a las cadenas que han sido previamente fosforiladas por *c-fyn* o *c-lck*. ZAP-70 desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la cascada de señales que se pone en marcha tras el reconocimiento del antígeno por el TCR. En este sentido, esta enzima es un acoplador de señales desde la superficie celular al núcleo por fosforilación de los adaptadores Lat y SLP-76. Lat es una proteína transmembrana cuya función, una vez fosforilada, es organizar complejos multimoleculares en determinados subdominios lipídicos de la membrana plasmática. Estos complejos contienen proteínas claves en la señalización al interior de la célula como son la PLC-gamma1 (fosfolipasa C), el Grb-2 (growth factor binding protein), SLP-76, la PI3K y Vav-1

FOSFATASA CD45

El CD45, LCA (*Antígeno común leucocitario*) o T200 es una de las glicoproteínas más abundantemente expresadas en la superficie de células hematopoyéticas, pudiéndose detectar hasta un millón de moléculas por célula. El CD45 presenta una larga región citoplasmática que contiene dos dominios catalíticos con actividad fosfatasa, una región intra-membrana y una región aminoterminal extracelular que se encuentra glicosilada y que varía en su estructura. Esta variedad ha sido explicada después del clonaje e identificación del gen que, codificada dicha proteína, el cual gracias a que puede transcribir de forma alternativa los tres exones (A, B y C) que codifican la porción aminoterminal de la proteína. Esta transcripción alternativa puede generar hasta ocho diferentes ARN mensajeros que traducen al menos seis diferentes isoformas del CD45 en la membrana celular ([Figura 10.7](#)).

El ligando del CD45 no se conoce y la existencia de estas diferentes isoformas pueden indicar que los ligandos del CD45 sean múltiples y medien diferentes funciones en diferentes subpoblaciones de linfocitos T.

Diferentes sistemas experimentales han demostrado que el CD45 juega un papel predominante en los procesos de activación celular mediados por la ocupación del TCR. Aunque teórica, la función que más frecuentemente se atribuye al CD45 es la de defosforilar la tirosina de regulación negativa de *c-lck* y *c-fyn*, con lo que estas cinasas se activarían autofosforilándose y fosforilando con toda probabilidad otros substratos próximos (como la cadena ζ del CD3). No obstante, el CD45 podría defosforilar también a la tirosina de *c-lck* y *c-fyn* previamente autofosforilada conduciendo a una inhibición de estas cinasas.

Aunque estos modelos son hipotéticos, se acumulan continuamente evidencias de que el CD45 puede regular positiva o negativamente los procesos de activación celular. En este último caso es importante destacar que la región citoplasmática del CD45 puede ser fosforilada vía *Proteína Cinasa C* (PKC) en residuos serina y como se verá a continuación en el tiempo es posterior a los procesos de fosforilación en tirosina descritos anteriormente por lo que es posible que esta fosforilación de CD45 sea necesaria para inducir su actividad fosfatasa de regulación negativa. En la [Figura 10.8](#) se muestra la estructura de una tirosin cinasa p56.

PLC-gamma-1

Después del reconocimiento antigénico por parte del TCR esta PLC-gamma-1, se fosforila en tirosina y se activa dentro de los complejos multimoleculares lipídicos de la membrana plasmática donde induce la hidrólisis de su substrato específico, el *fosfatidilinositol bifosfato* (PIP₂), generándose los metabolitos *inositol trifosfato* (IP₃) y *diacilglicerol* (DAG) ([Figura 10.9](#)). El IP₃ se une a un receptor específico (IP₃R) localizado en unas estructuras específicas del retículo endoplásmico facilitando la liberación del calcio intracelular de sus compartimentos y aumentando la concentración de estos iones en el espacio libre intracelular. El IP₃, posiblemente en conjunción con su metabolito, el IP₄, puede regular los canales de calcio de la membrana plasmática permitiendo la entrada de calcio del exterior al interior celular.

El calcio intracelular puede estimular la enzima *calmodulina*, que es una serina/treonina cinasa que puede activar a su vez a la fosfatasa *calcineurina*. Además de la activación del sistema calmodulina/calcineurina, los niveles altos de calcio intracelular también ayudan a la activación de otras cinasas como son algunas isoenzimas de las proteína cinasas C (PKC) y posiblemente algunas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). El otro metabolito de la hidrólisis del PIP₂, el *diacilglicerol* es el principal responsable de la activación de las *enzimas proteína cinasas C*.

PROTEINA CINASAS C

Las proteína cinasas C (PKCs) son una familia de isoenzimas que están ampliamente distribuida en tejidos y órganos de mamíferos. Esta familia de serina/treonina proteína cinasas está constituida por varias subfamilias que engloban distintas isoformas. Hasta el momento, se conocen 11 isoenzimas de PKC diferentes, clasificadas según su estructura y necesidad de

cofactores para su activación. Aunque todas las isoformas de PKC se activan mediante fosfolípidos, estas isoenzimas en particular se diferencian marcadamente en su sensibilidad hacia el calcio. Teniendo en cuenta este factor, podemos clasificar estos 11 genes de PKC de mamíferos conocidos hasta ahora en las siguientes subfamilias:

1. PKC convencionales (cPKC): su activación es dependiente de Ca^{++} y diacilglicerol (DAG). Esta subfamilia engloba las siguientes isoformas: alfa, beta (1 y 2) y gamma.
2. PKC novel (nPKC): su activación es dependiente de diacilglicerol e independiente de Ca^{++} . Esta subfamilia engloba distintas isoformas: delta, epsilon, etc.
3. PKC atípica (aPKC): pertenecen estructuralmente a esta familia de enzimas, pero no se activan mediante ésteres de forbol o diacilglicerol. Esta subfamilia engloba varias isoformas.

Las PKCs en condiciones de reposo celular se encuentra localizada en el citosol donde es inactiva, una vez que recibe el estímulo del DAG conjuntamente con iones Ca^{++} (dependiendo del isotipo enzimático) se transloca a la membrana celular donde en presencia de fosfolípidos (fundamentalmente fosfatidilserina) ejerce su función de cinasa de proteínas en aminoácidos *serina* y *treonina*. La implicación de las PKCs en el transcurso de activación de células T ha sido bien establecida desde finales de los años 70. Así, las células T expresan múltiples isotipos de PKC, incluyendo PKC-alfa,-beta1 y otros; sin embargo, el papel de los diferentes isotipos de PKC en la regulación de la señalización celular y la transcripción génica no está aún establecido definitivamente. La activación de linfocitos T implica una compleja cascada de respuestas celulares, que incluye la entrada en el ciclo celular y la liberación de citocinas. La estimulación de células T resulta en la transcripción de varios genes y en la expresión de una determinada variedad de moléculas, incluyendo las citocinas y sus receptores específicos (como es el caso de IL-2 y su receptor). Las PKCs regulan la activación de genes de células T mediante el control de varios factores de transcripción.

GAP-RAS

La familia de los proto-oncogenes Ras comprende al menos tres genes que codifican otras tantas proteínas denominadas Ha⁻, Ki⁻ y N-Ras, que juegan un papel crítico en el control de la proliferación celular.

Las tirosinas cinasas activadas por la ocupación del TCR no solamente inducen la hidrólisis de fosfolípidos, sino que también activan vías de señalización a través de Ras y mediadas por Lat. Este adaptador fosforilado por ZAP-70 se une a otro adaptador intermediario (Grb-2) que contiene dominios SH2 y SH3. Este último se une a proteínas específicas fosforiladas en tirosina a través de su dominio SH2 y a una proteína de intercambio de nucleótidos de guanina (Sos) mediante su dominio SH3. La proteína de intercambio actúa entonces sobre la forma inactiva de Ras (ras-GDP) convirtiéndola en su forma activa (Ras-GTP), el cual se une y retiene a c-Raf cerca de la membrana plasmática. Esta acción mediada por Ras, hace que Raf se active y actúe como una cinasa de MAPK (MAPKK) que a su vez activa y fosforila una o más MAPKs, incluyendo a ERK-1 y ERK-2, las cuales tras dicha activación migran al núcleo donde regulan por fosforilación a determinados factores de transcripción involucrados en la proliferación y diferenciación celular. La inactivación de Ras (Ras-GTP) se debe a la acción de la proteína p120^{GAP} o proteína activadora de GTPasa que es la responsable de hidrolizar el GTP unido a Ras y convertirlo en GDP (Ras-GDP) por lo que se la puede considerar como un regulador negativo de Ras. Esta cascada de señalización termina con la fosforilación de determinados factores de transcripción que participan en la activación y funcionalidad de los linfocitos T ([Fig. 10.9](#)).

FOSFATIDILINOSITOL-3' CINASA (PI3K).

Además de la PLCgamma₁, otras enzimas presentes en las células T que participa en el metabolismo de fosfolípidos son las denominadas *fosfatidilinositol-3' cinasas* (PI3Ks), que fosforilan el PIP₂ generando cuatro especies de inositoles específicos que son; i) el fosfatidilinositol 3-fosfato; ii) el fosfatidilinositol 3,4-bifosfato; iii) el fosfatidilinositol 3,5-bifosfato y iv) el

fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato.. Una de las dianas mejor caracterizadas de la acción de estos lípidos fosforilados es la proteína cinasa B. En respuesta a estímulos externos, la Akt citosólica (inactiva) se transloca a la membrana plasmática por los estos inositoles fosfatos y se fosforila y activa. Una vez que Akt está activa es capaz de fosforilar y activar a su vez una gran variedad de sustratos (BAD, CREB, factores de transcripción de la familia *forhead*, la cinasa IκB, la procaspasa-9, etc.), explicando el por qué de la importancia de esta cinasa como elemento clave en los procesos de proliferación y diferenciación celular.

PROTEINA CINASA ACTIVADA POR MITOGENOS (MAP-CINASAS).

En los últimos años se ha identificado y caracterizado parcialmente un sistema de transmisión de señales crucial no solo para la activación de células T sino también para todas las células eucariotas. Este sistema de traducción de señales está regulado por las MAPKs (*mitogen activated protein kinases*) que de alguna manera actúan como puente entre tirosinas cinasas próximas a la membrana con otras cinasas que fosforilan en aminoácidos serina/treonina una serie de factores de transcripción regulando así su actividad transactivadora. Estas MAPKs engloban a una familia de serina/treonina cinasas, que son activadas cuando a su vez se fosforilan en serina/treonina o tirosina. Al menos tres subfamilias de MAPKs han sido bien identificadas, 1) las ERK1 y 2 (*Extracellular Regulated Kinases*), 2) la subfamilia de c-Jun cinasas, JNK1, JNK2 y JNK3 (también llamadas SAPK), y 3) la subfamilia p38 (p38, p38b, p38g, y p38d). Las ERKs activadas migran al núcleo donde regulan la transcripción de c-fos, que forma dímeros con c-jun para formar el complejo AP-1, que es fosforilado por las JNK en la subunidad c-jun, regulando su actividad transcripcional. La p38 también participa en la activación de AP-1 y recientemente se ha descrito que en linfocitos T actúa como limitador de la regulación transcripcional mediada por el factor de transcripción NF-AT.

Las MAPKs son reguladas a su vez por otras cinasas denominadas MAPKK, y estas a su vez por otro grupo de cinasas que por inercia han sido llamadas MAPKKK (ej. Raf). Estas últimas actuarían como integradores de las señales inducidas por la ocupación de receptores de activación (ej. el TCR), fosforilando a las MAPKK, y estas a su vez fosforilando a las MAPKs en residuos treonina y tirosina.

FACTORES DE TRANSCRIPCION.

Tras la activación de las células T se transcriben alrededor de 100 genes (conocidos). La activación de esta plétora de genes ocurre de una manera secuencial, de manera que alguno de ellos se transcriben inmediatamente después del reconocimiento antigénico y otros incluso días después. Por este motivo se pueden clasificar de manera didáctica en genes *inmediatos* (su transcripción ocurre entre diez y treinta minutos después de la activación), *tempranos* (transcritos entre treinta minutos y dos días) y *tardíos* (transcripción entre dos días e incluso hasta dos semanas). Entre los primeros tenemos los genes c-fos, c-jun, c-myc, NF-KB/rel, etc., entre los segundos están la mayoría de las interleucinas producidas por células T así como alguno de sus receptores y entre los terceros podemos destacar moléculas como el CTLA-4 y los genes VLA (*very late antigen*) (Figura 10.9)..

En general, la transcripción de genes inmediatos ocurre en ausencia de síntesis *de novo* de proteínas, lo cual indica que estos genes son activados por factores de transcripción preexistentes en la célula. Estos factores después de la cascada activación de cinasas y fosfatasa originada por el reconocimiento antigénico son fosforilados o defosforilados y de esta manera activados. En este estado se unen a regiones reguladoras de la transcripción situadas generalmente en los promotores de determinados genes permitiendo su transcripción o a veces incluso su represión.

Así, la primera etapa de su respuesta celular culmina con la expresión en el núcleo de proteínas trans-activadoras que regulan la transcripción de una serie de genes involucrados en los procesos de *proliferación, diferenciación y adquisición* de funciones en los linfocitos T.

Una de las funciones más importantes de los linfocitos T es la producción de linfocinas, las cuales, en última instancia, junto a los procesos de interacción e celulares, van a modular el tipo de respuesta inmune producida. Los mejores ejemplos de regulación genética de linfocinas lo

encontramos en la regulación de la IL-2, así como de su receptor (principalmente la cadena alfa). En la parte 5' del gen de la IL-2 se encuentra una región de aproximadamente trescientos pares de bases (entre las bases -319 y -52) que contiene los sitios de unión para factores como, NF- κ B, NF-AT, factores octaméricos, AP-1 y además un sitio de unión conocido como CD28RE (*CD28 responsive element*). Estudios moleculares han demostrado que la acción conjunta de estos factores es necesaria para conseguir una activación completa del gen de la IL-2. La expresión de alguno de estos factores está restringida a determinados tipos celulares, como es el caso de NF-AT, mientras que otros como AP-1 y NF- κ B están expresados en una gran variedad de tipos celulares.

Factor nuclear de la cadena K de células B (NF- κ B/rel).

NF- κ B (*factor nuclear de la cadena Kappa en células B*) fue caracterizado por primera vez, en 1986, como un factor específico de células B y que se unía a una secuencia localizada en el promotor de la cadena ligera de las inmunoglobulinas. NF- κ B se encuentra fundamentalmente en todos los tipos celulares y está implicado en la activación de multitud de genes en respuesta a inflamación, infección y otras situaciones de *stress* que requieren una rápida reprogramación de la expresión génica..

Este factor de transcripción está formado por una familia de proteínas que presentan una alta homología entre ellas y que está compuesta principalmente por las proteínas p50, p52, p65, RelB, y c-rel. Estas proteínas pueden estar formando distintos complejos entre ellas siendo los más comunes p50/p50 y p50/p65. Los distintos complejos tienen distintas afinidades por los sitios de unión al DNA y posiblemente tengan diferentes actividades transactivadoras. Esto se puede entender por el hecho de que la región de DNA que se une a NF- κ B es GGGRNNYYCC, este decámero palindrómico no es exactamente igual en todos los genes que contienen una región NF- κ B y así, estas pequeñas diferencias pueden ser las responsables de las diferentes afinidades de los complejos NF- κ B/rel por el DNA.

Los complejos de NF- κ B se encuentran retenidos en el citoplasma por moléculas llamadas *inhibidores de NF- κ B* o *I κ B*. Dos de las más estudiadas en linfocitos T son I κ B-a e I κ B-b que en condiciones de reposo están unidas a los dímeros de NF- κ B enmascarando así su señal de localización nuclear (NLS), previniendo de esta forma el desplazamiento de NF- κ B al núcleo. La activación de linfocitos T vía TCR/CD3, IL-1 o TNF entre otros estímulos extracelulares inducen una cascada de cinasas y proteasas que median la degradación de I κ B por un proceso combinado de fosforilación, ubiquitinación y proteólisis, como consecuencia del cual se producen la liberación de NF- κ B/rel y su translocación al núcleo (Figura 10.9).

Además de participar en la transcripción de la IL-2 y de su receptor se ha demostrado que NF- κ B puede trans-activar también un amplio número de genes en linfocitos T como son la cadena beta del TCR, genes HLA de clase I y clase II, beta-2-microglobulina, moléculas de adhesión como ICAM-1, otras linfocinas como IL-6, IL-8 y el G-CSF, proto-oncogenes como c-myc y también se une a las regiones promotoras (LTR) de virus como el HIV y HTLV-1.

La activación de NF- κ B representa el paradigma del control de proteínas mediante un proceso de ubiquitinación y degradación en el proteasoma integrado a la cascada de fosforilaciones. Recientemente, ha habido un gran progreso en lo que concierne a la ruta de señales de NF- κ B, especialmente las relacionadas con las citocinas proinflamatorias, IL-1 y tumor necrosis factor alfa.

Activador de proteína 1 (AP-1)

A diferencia de NF- κ B, AP-1 (*Activador protein 1*) es un factor de transcripción exclusivamente nuclear que se activa por fosforilación mediada por determinadas cinasas que se translocan al núcleo e inducen en este factor una modificación postranslacional que le hace activo.

El factor de transcripción AP-1 (Activator Protein 1) está formado por proteínas ubicuas pertenecientes a las familias Jun (c-Jun, v-Jun, JunB y JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra1 y Fra2) o

ATF (ATF2 y ATF3) capaces de unirse a una secuencia consenso de ADN denominada TRE (TPA response element, TGAACA) regulando la transcripción de alto número de genes que incluye genes de citocinas proinflamatorias entre otros. Los miembros de las familias Jun o ATF forman homodímeros o heterodímeros con los miembros de las otras dos familias, pero en el caso de las proteínas Fos, éstas solo forman heterodímeros. La integración de las señales transmitidas por las distintas MAPKs (ERK, p38, JNK) activadas tras la activación del receptor TCR provoca la unión de determinados factores de transcripción (TCF, SRF) a los genes que codifican para Fos y Jun, aumentando su presencia en el núcleo. Posteriormente, Fos y Jun son fosforilados por FRK y JNK respectivamente (quinasas reguladoras de Fos y Jun). De este modo, ambos factores de transcripción activados, dimerizan y se unen a regiones específicas de los promotores de genes como la IL-2 y otros genes que participan en la respuesta inmune e inflamatoria (Figura 10.9).

Factor nuclear de células T activadas (NF-AT).

La familia de proteínas NF-AT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) está constituida al menos por cuatro miembros NF-AT1/p, NF-AT2/c, NF-AT3, y NF-AT4/x, presentando cada uno de ellos, excepto NF-AT3, varias isoformas probablemente derivadas de *splicing* (corte y empalme) alternativo del mismo gen. Todas las isoformas presentan dos regiones de secuencia homólogas entre ellas, el dominio de unión al ADN (DBD) y la región homóloga para NF-AT (NHR). El DBD, comprendido aproximadamente entre los aminoácidos 400 y 700, es la zona más conservada entre los miembros de la familia NFAT. La región NHR constituye el dominio principal de transactivación de la proteína y es el sitio de anclaje donde se une la fosfatasa calcineurina, que cuando se activa defosforila múltiples residuos fosforilados de esta zona, controlando así la translocación nuclear de NF-AT. En un principio NF-AT se identificó en células T como un complejo rápidamente inducible que se unía al elemento distal de respuesta a antígeno en el promotor del gen de la IL-2. Su inducción requiere la señalización por calcio y se inhibe con drogas inmunosupresoras como CsA y FK506, que inhiben la actividad fosfatasa de la calcineurina. El complejo NF-AT activo unido al ADN está formado por un componente citosólico presente en células T y por un componente nuclear ubicuo. El componente citosólico está constituido por los miembros de la familia NF-AT mientras que el componente nuclear está formado por miembros de la familia Fos y Jun que constituyen el factor de transcripción AP-1. En los últimos años se ha identificado la existencia de miembros de la familia NF-AT en otras células del sistema inmune distintas a los linfocitos T y donde también regulan la expresión de numerosos genes de citocinas (IL-4, TNFalfa y GM-CSF) y de receptores de superficie (FasL, CD40L). La expresión de NF-AT3 y NF-AT4 también ha sido descrita en células fuera del sistema inmune, lo que explicaría en parte los efectos secundarios de la CsA fuera del sistema inmune.

Como se ha comentado anteriormente, la activación fisiológica del TCR da lugar a la movilización de Ca^{++} y con ello la activación de la fosfatasa calcineurina que defosforila a NFAT, altamente fosforilado en células T en reposo. La translocación al núcleo, el aumento de afinidad para unirse al ADN y la inducción de la actividad transcripcional de NF-AT están regulados por esta defosforilación. La asociación física entre la calcineurina y NFAT sigue incluso en el núcleo donde la calcineurina sigue defosforilando al factor mientras los niveles de calcio intracelulares sigan altos. En gran parte las secuencias de reconocimiento para NF-AT necesita de la cooperación de proteínas AP-1 para transactivar dichos genes. Además, esta interacción entre AP-1 y NFAT con el ADN, confiere al complejo NFAT/AP1:ADN una estabilidad 20 veces superior a la que presentan los complejos NFAT:ADN. Por tanto las rutas de señalización que convergen en la activación de AP-1 van a afectar la actividad transcripcional mediada por los complejos NFAT/AP-1

INMUNOPATOLOGIA

Se han descrito alteraciones de muchas de las cinasas que intervienen en la activación de los linfocitos T. Así, se ha descrito el déficit de Zap-70 en individuos que tenían en común valores muy bajos o ausentes de linfocitos T CD8+ en sangre periférica. Los linfocitos de los pacientes no proliferan en respuesta a lectinas, a anticuerpos monoclonales anti-CD3, a antígenos o a

células alogénicas. Los análisis de laboratorio revelaron la ausencia de Zap 70 en los linfocitos T de los pacientes.

BIBLIOGRAFIA

1. Isakov,N. and Altman,A.: Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu.Rev.Immunol* 2002, 20:761-794.
2. Lewis,R.S.: Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu. Rev.Immunol.* 2001, 19:497-521.
3. Myung,P.S., Boerthe,N.J., and Koretzky,G.A.: Adapter proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 2000, 12:256-266.
4. Nakanishi,K.: Innate and acquired activation pathways in T cells. *Nat.Immunol.*2001, 2:140-142.
5. Nemeč,M.: Web alert. Lymphocyte activation and effector functions. *Curr.Opin.Immunol.* 2001, 265., 13:265
6. Samelson,L.E.: Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: The Role of Adapter Proteins. *Annu.Rev.Immunol* 2002, 20:371-394.
7. Schatz,D.G. and Malissen,B.: Lymphocyte development. *Curr. Opin. Immunol.* 2002, 14:183-185.
8. Quintana A, Griesemer D, Schwarz EC, Hoth M.: Calcium-dependent activation of T-lymphocytes. *Pflugers* 2005, Arch. 450: 1-12.
9. Weil R, Israel A. T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF-kappaB in lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 2004, 16: 374-81.
10. Dahlke MH, Larsen SR, Rasko JE, Schlitt HJ. The biology of CD45 and its use as a therapeutic target. *Leuk Lymphoma.* 2004, 45: 229-36.