

## TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL MITJANÇANT EL RECEPTOR DE LA CÈL·LULA T

RAFAEL FRANCO,<sup>1</sup> JAIME SANCHO,<sup>2</sup> MARCUS PETER<sup>3</sup> I COX TERHORST<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departament de Bioquímica i Fisiologia. Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular A. Facultat de Química. Universitat de Barcelona.

<sup>2</sup>Instituto López Neyra de Parasitología y Biomedicina. CSIC Granada.

<sup>3</sup>Divisió d'Immunogenètica. Centre Alemany de Recerca del Càncer. Alemanya.

<sup>4</sup>Divisió d'Immunologia Molecular. Beth Israel Hospital. Harvard Medical School. Boston. EUA.

### RESUM

Els mecanismes que es posen en marxa quan els lligands extracel·lulars interactuen amb els receptors de la membrana han estat darrerament objecte de recerca intensa. Un dels més estudiats és el receptor per a l'antigen de la cèl·lula T (*T cell receptor*; TCR) per les implicacions en la diagnosi i en el tractament de malalties del sistema immune i de càncers. El receptor és un complex multiproteic format per un mínim de sis cadenes polipeptídiques codificades per gens que han estat clonats recentment. L'activació dels limfòcits T mitjançant el TCR dona lloc a múltiples modificacions cel·lulars amb la producció, en darrer terme, d'interleucina 2 i l'expressió de llur receptor. La combinació de tècniques de fosforilació, de detecció de proteïnes G i de construccions de tipus mutant o quimèric han permès avançar en el coneixement dels mecanismes de traducció mitjançant TCR. En aquest article es presenta l'estat actual de la qüestió, que es pot centrar en les interaccions de proteïnes quinases amb les cues citoplasmàtiques dels components del TCR, fonamentalment de les cadenes  $\epsilon$  i  $\zeta$ . És molt notable el fet que, mitjançant la tècnica del GTPoxi, s'ha pogut identificar la cadena  $\zeta$  com a proteïna capaç d'unir GTP. Existeixen indicis que aquesta capacitat d'unir GTP fa possible que un canvi conformacional de  $\zeta$  sigui el factor determinant del començament de la cascada de fosforilacions i interaccions proteïna-proteïna que té lloc en els limfòcits T activats.

**MOTS CLAU:** limfòcit, receptor de la cèl·lula T, transducció del senyal, quinases, fosfatases, proteïnes G.

### SUMMARY

T cell receptors (TCR) which recognize antigens on the surface of antigen-presenting cells are on the surface of T lymphocytes in the form of TCR/CD3 complexes. The study of the signal transduction mechanisms upon engagement of the TCR are important from the point of view of diagnosis and treatment

of immune diseases and of cancer. The TCR/CD3 complex is a multimeric protein structure formed by the products of, at least, six different genes. It contains the clonally derived heterodimeric antigen recognition elements (TCR- $\alpha/\beta$  or TCR- $\gamma/\delta$ ), the invariant chains of the CD3 complex ( $\gamma$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$ ) and the  $\zeta$  chain, present as a S-S linked homodimer. Engagement of TCR leads to activation of T cells with the ultimate production of interleukin 2 and the expression of its receptor. The combination of the techniques of phosphorylation, identification of G proteins and of construction of mutants and chimeric proteins have led to an important improvement in the understanding of TCR-mediated signal transduction. In this report the interactions of protein kinases with the cytoplasmic tails of the chains of the TCR/CD3 are summarized and the characteristics of the proteins involved are briefly outlined. It is remarkable the fact that, by means of the use of the GTPoxi technique, it has been possible to demonstrate that  $\zeta$  itself is able to bind GTP. Data are presented that support the hypothesis that upon T cell activation via TCR, a GTP-dependent conformational change leads this chain to be more susceptible of phosphorylation. This would be the initiation of the activation cascade by promoting further phosphorylations and protein-protein interactions.

**KEYWORDS:** *lymphocytes, T cell receptor (TCR), signal transduction mechanisms, kinases, phosphatases, G proteins.*

Els mecanismes que es posen en marxa quan els lligands extracel·lulars interactuen amb els receptors de la membrana han estat objecte d'una recerca intensa. Hi ha hagut un progrés considerable per tal d'esbrinar com fan la seva funció els factors de creixement mitjançant l'activitat proteïna tirosina quinasa de llur receptors. El receptor de la cèl·lula T (*T cell receptor*, TCR) és un sistema molt complex que actua mitjançant proteïnes tirosina quinases que no formen part del receptor i, que a més, té moltes peculiaritats addicionals que fan que sigui un atractiu motiu de recerca.

## **FUNCIÓ DEL RECEPTOR DE LA CÈL·LULA T**

El receptor del limfòcit T (TCR) és un complex multiproteic situat a la membrana citoplasmàtica de la cèl·lula T que té la funció de reconèixer antígens que es presenten en combinació amb molècules MHC a la superfície de les cèl·lules presentadores de l'antigen. L'antigen interactua amb el TCR i les molècules de MHC interactua amb molècules accessòries de la superfície del limfòcit com ara CD3 i CD4 o CD8. La interacció produeix l'activació del limfòcit T, que finalment dóna com a resultat la secreció d'interleucina 2

(IL-2) i l'expressió del receptor d'IL-2. El receptor està constituït pels elements de reconeixement de l'antigen, seleccionats clònicament (heterodímers TCR-ab o TCR-gd), i un conjunt de cadenes invariants. Aquestes cadenes invariants inclouen els membres del complex CD3 ( $\delta$ ,  $\epsilon$  i  $\gamma$ ) i la subunitat  $\zeta$  (Clevers *et al.*, 1988, Exley *et al.*, 1991). La subunitat  $\zeta$  existeix com un homodímer amb les dues subunitats de 16-17 kD unides per un pont disulfur. Una estructura aproximada basada en estudis de síntesi i encaix de les diferents cadenes proteïques es presenta a la figura 1. Totes les cadenes tenen tres parts ben diferenciades: una d'extracel·lular, una d'intramembrana i una altra intracel·lular. El conjunt de molècules s'anomena *complex TCR/CD3* o simplement *TCR*.

El complex TCR/CD3 s'activa quan reconeix l'antigen forà en el context de molècules MHC. Aquest contacte cèl·lula-cèl·lula es pot mimetitzar *in vitro* emprant anticossos específics contra la part extracel·lular de les cadenes proteïques que constitueixen el complex. Així, per exemple, el tractament de cèl·lules T en cultiu amb un anticòs monoclonal dirigit contra la cadena  $\epsilon$  és molt emprat per a la activació del TCR. En aquestes condicions, no cal la participació de molècules accessòries si bé el lligatge (entrecruament) conjunt amb anticossos contra el TCR/CD3 i contra el CD4 (o el CD8) dóna com a resultat una amplificació en la resposta d'activació.



## SÍNTESI I DEGRADACIÓ DEL COMPLEX TCR/CD3

Els sis components del complex TCR/CD3 s'engalzen al reticle endoplasmàtic abans d'ésser transportats cap a la superfície de la cèl·lula. L'expressió del TCR/CD3 requereix l'encaix de les sis cadenes amb la disposició adient. L'encaix segueix un ordre preestablert i la cadena  $\zeta$  és l'última d'afegir-se al complex. L'encaix parcial dona lloc a l'aparició de cadenes senzilles o complexes incompletes que són retinudes al reticle endoplasmàtic. Quan aquestes cadenes són assajades en els vectors d'expressió adients, es pot demostrar que tres d'elles ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\delta$ ) són susceptibles d'ésser degradades per proteolisi. Les altres tres ( $\gamma$ ,  $\epsilon$  i  $\zeta$ ) són metabòlicament estables i poden romandre al reticle endoplasmàtic per períodes de temps molt perllongats. Tant l'encaix com la degradació ocorren al reticle endoplasmàtic, on es troben proteases i també els enzims que contribueixen al plegament correcte. Hi ha hagut un seguit d'estudis que demostren que l'estructura primària (la seqüència) de les cadenes determina la seva susceptibilitat a la proteòlisi i/o retenció al reticle. Per posar un exemple, Wileman *et al.* (1990) han demostrat que la cadena  $\beta$  conté, en el seu fragment de transmembrana, un determinant estructural de proteòlisi pre-Golgi. És molt interessant el fet que els enzims que participen en la degradació de la cadena  $\beta$  són cisteïna proteases. En un excel·lent article, Mallabiabarrena *et al.* (1992) demostren que el CD3- $\epsilon$  té un senyal de retenció al reticle que en amagar-se quan es produeix l'encaix correcte de totes les cadenes, permet l'expressió del TCR en la superfície. Tots els aspectes més interessants de la degradació proteica en el reticle endoplasmàtic han estat recollits en una magnífica revisió de Klausner i Sitia (1990).

Les molècules del CD3 i  $\zeta$ , són necessàries per a l'encaix correcte del complex TCR/CD3 i el seu transport a la superfície. Això ha estat demostrat amb construccions quimèriques que contenen, per exemple, el domini citoplasmàtic de  $\zeta$  i la part intramembrana i extracel·lular d'altres

receptors com el d'interleucina 2 (IL-2) o bé de CD8, CD4 o CD16. Aquestes quimeres apareixen en la superfície de les cèl·lules, independentment de l'expressió del TCR.

## TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL: UN JOC D'INTERACCIONS ENTRE PROTEÏNES QUINASES, PROTEÏNES FOSFATASES I PROTEÏNES G

L'activació del limfòcit T mitjançant el receptor TCR pot ésser mimetitzada per construccions del tipus quimera, en les quals es construeix una molècula proteica que té la part extracel·lular d'una de les cadenes, la  $\beta$  per exemple, i la part citoplasmàtica de l'altra. Tanmateix, construccions de les indicades més amunt, és a dir, que contenen la part extracel·lular de CD4, CD8, CD16 o del receptor de IL-2 i la part citoplasmàtica de  $\zeta$  són funcionals quant a la possibilitat d'activació de cèl·lules T. L'activació d'aquestes quimeres amb anticossos monoclonals o amb la IL-2 dona lloc a molts dels esdeveniments inicials i posteriors característics de la activació mitjançada per TCR/CD3 (Irving i Weiss, 1991, Letourneur i Klausner, 1991, Romeo i Seed, 1991). Això suggereix que  $\zeta$  serveix per a l'acoblament del TCR a la maquinària intracel·lular de transducció del senyal. Aquest fet sembla lògic, atès que la cadena  $\zeta$  és la que té la cua més llarga de totes (vegeu la fig. 1).

Sorprenentment, un seguit d'experiments en diferents laboratoris han demostrat que la cadena CD3- $\epsilon$  té funcions molt similars a la de  $\zeta$ . La reconstitució de la expressió del TCR en un híbridoma T ha demostrat que poden existir complexos TCR/CD3 funcionals amb una  $\zeta$  sense la part citoplasmàtica (Wegener *et al.*, 1992, Hermans i Malissen, 1993). També receptors quimèrics amb la part intracel·lular de CD3- $\epsilon$  expressats en híbridomes T han estat capaços de transmetre el senyal (Letourneur i Klausner, 1992). Si bé la utilitat de  $\zeta$  per a la expressió del complex a la superfície és clara, els esmentats experiments han qüestionat la utilitat de  $\zeta$  en els mecanismes

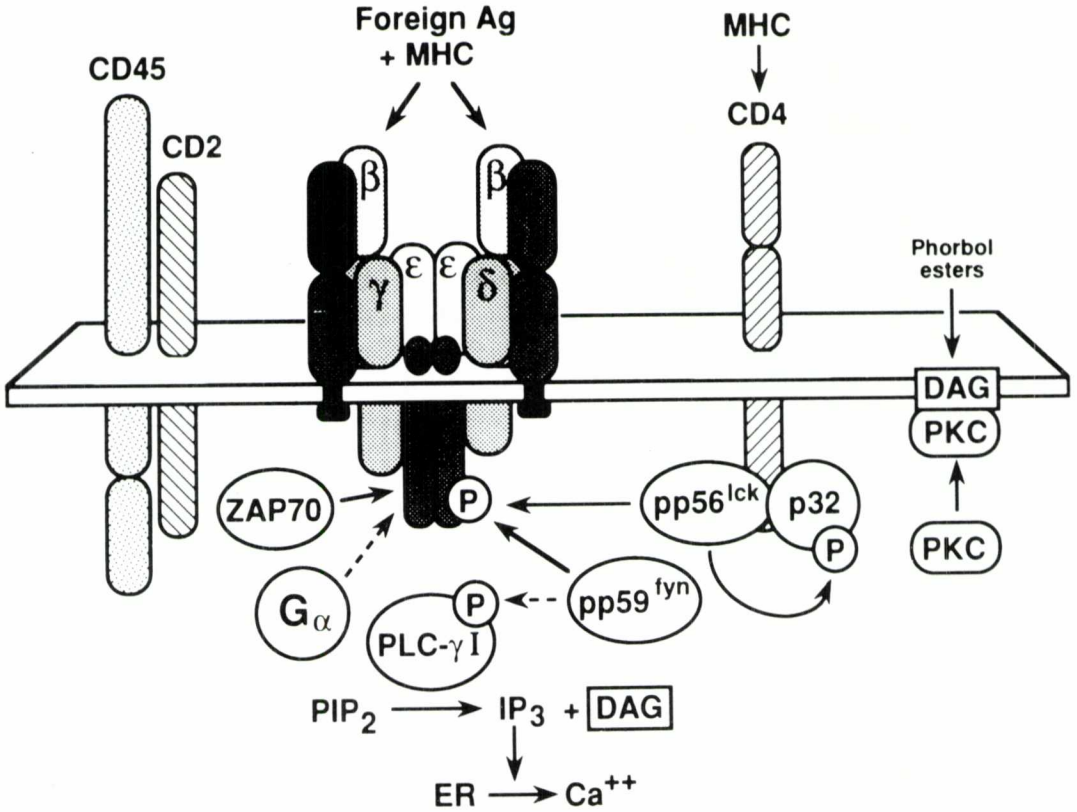


FIGURA 1. Esquema de les proteïnes involucrades en els mecanismes de transducció del senyal mitjançats pel complex TCR/CD3.

de la transducció del senyal. La identificació de dominis funcionals similars en ζ i CD3-ε, que són molècules estructuralment diferents, han demostrat que hi ha redundància en la funció de ζ i ε (Letourneur i Klausner, 1992; Romeo *et al.*, 1992, Irving *et al.*, 1993). En un futur serà possible trobar funcions mitjançades per ζ o per CD3-ε, però a hores d'ara totes les funcions assajades poden ésser mitjançades indistintament per ζ o per CD3, tant en el cas de l'entorn TCR/CD3 com amb construccions quimèriques.

Una seqüència que va trobar Reth (1989) està present en CD3-γ, CD3-δ i ζ i sembla responsable de la capacitat de transducció del senyal d'aquestes cadenes. La seqüència té sis aminoàcids molt acuradament espaiats (D/E[X]<sub>7</sub>D/

EXXYXXL[X]<sub>7</sub>YXXL/I) i està present en altres unitats de transducció com el receptor del limfòcit B dins la part citoplasmàtica de les cadenes Ig-a i Ig-b. La seqüència existeix com a còpia senzilla en CD3-γ, CD3-δ, i per triplicat a ζ. La cadena CD3-ε té part de la seqüència Reth amb una substitució Leu per Ile (YXXI[X]<sub>7</sub>YXXL).

A la seqüència Reth hi ha dues tirosines espaiades deu posicions que són imprescindibles per la seva funció. La mutagènesi dirigida de qualsevol de les dues tirosines a la quimera Taq-ε abolix la secreció d'IL-2, i la mutació conservativa Tyr per Phe a la primera seqüència Reth de ζ elimina la funció citolítica i la resposta de calci en limfòcits T activats. La susceptibilitat de les tirosines citoplasmàtiques a ésser



fosforilades per les tirosina quinases condueix, d'una manera natural, a la hipòtesi que la transducció del senyal a través del TCR/CD3 comença amb l'activació d'una (o més) tirosina quinasa[es]. Cal afegir que la mutació de les leucines o isoleucines fa perdre la funcionalitat, per la qual cosa la seqüència s'anomena *motiu d'activació basat en tirosines i leucines* (o isoleucines) (TAM). En aquest article utilitzarem l'abreviació ARAM, que prové de l'expressió anglesa *antigen recognition activation motif* (Samelson i Klausner, 1992, Weiss, 1993).

### FOSFORILACIÓ DE $\zeta$ I DE CD3

La fosforilació en tirosines de la cadena  $\zeta$  ha estat àmpliament estudiada. Mitjançant la tècnica de fosforilació en cèl·lula permeabilitzada, desenvolupada per Sancho *et al.* (i també per transferència Western i detecció amb anticossos antifos-fotirosina), és possible mesurar un increment notable de fosforilació de  $\zeta$  quan la cèl·lula Ts'activa. L'activació per antigen i cèl·lula presentadora de l'antigen o emprant anticossos monoclonals contra cadenes del TCR o CD3 dóna resultats semblants. La fosforilació en tirosines de  $\zeta$  condueix d'una manera immediata a preguntar-se quina és la tirosina quinasa que fosforila la molècula. A hores d'ara hi ha tres candidates: p59<sup>fyn</sup>, p56<sup>lck</sup> i ZAP-70.

Els estudis de fosforilació de CD3 són encara molt preliminars si bé recentment s'ha indicat la fosforilació *in vivo* de CD3- $\epsilon$  treballant amb limfòcits T de sang perifèrica (Sancho *et al.* 1993b). La activació mitjançada pel TCR induïx fosforilació en tirosina de CD3- $\epsilon$  amb una cinètica similar a la de  $\zeta$ , si bé un fet diferencial és que depèn de l'expressió en la superfície de CD3- $\epsilon$ , la qual cosa no cal per a la fosforilació de  $\zeta$ . La fosforilació es du a terme en el domini similar a Reth que té la cua citoplasmàtica de CD3- $\epsilon$  i encara no es coneixen quines poden ésser les quinases responsables. Aquestes dades indiquen que la fosforilació de CD3- $\epsilon$  serveix, conjuntament

amb la de  $\zeta$ , per a l'acoblament del TRC-CD3 amb les molècules efectores de la cascada de transducció i transmissió del senyal en la cèl·lula T.

### FYN

Anomenem *fyn* a un membre de la família *src* de les tirosina quinases. La primera prova directa de la participació de *fyn* en la transducció del senyal ha estat la coprecipitació amb el TCR (Samelson *et al.* 1990). Tanmateix la transfecció conjunta del cDNA de CD3- $\zeta$  i *fyn* en cèl·lules COS-1 ha produït, en entrecreuar la part extracel·lular de les quimeres amb anticossos monoclonals, nivells notables de fosforilació de  $\zeta$ , i de PLC-g1 i també la mobilització de calci (Hall *et al.* 1993). L'activació de cèl·lules T dóna lloc a l'increment de l'activitat quinasa de *fyn* i, al contrari, l'absència de *fyn* dóna lloc a una transducció del senyal disminuïda. Sembla doncs que p59<sup>fyn</sup> fa comunicar  $\zeta$  amb el camí que condueix a l'activació de la fosfolipasa C gamma-1 (PLC-g1). Com és ben sabut, la PLC-g1 hidrolitza els fosfolípids i dóna fosfatidilcolina i diacilglicerol, que condueixen cap a la mobilització de calci. Cal assenyalar que amb experiments fets amb ratolins deficients del gen (*fyn knockout*) sembla que la quinasa és més important en subpoblacions de timòcits madurs, com els trobats a la sang circulant, que són CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> (*single positives*) (Appleby *et al.* 1992, Stein *et al.* 1992).

### LCK

Anomenem *lck* a un altre també membre de *src* i, força específic de cèl·lules T. Té tendència a associar-se amb els correceptors, o molècules auxiliars, CD4 o CD8. Estudiant l'activació de cèl·lules T, s'ha demostrat que hi ha una resposta sinèrgica quan es fa conjuntament per via TCR i CD4 (o CD8). De fet, aquesta és la manera més

fisiològica, atès que CD4 o CD8 reconeixen part de les molècules MHC expres-sades en la superfície de la cèl·lula presentadora de l'antigen. Hi ha dues hipòtesis per explicar aquest fet. Una és que les molècules auxiliars augmenten l'afinitat TCR-antigen, i l'altra que es facilita l'aproximació de *lck* (ancorat a CD4 o CD8) als dominis citoplasmàtics del TCR/CD3. L'aproximació física pot facilitar la fosforilació de cadenes del TCR/CD3 per *lck*, que, a la vegada, augmenta la seva activitat quan el limfòcit s'activa.

Els estudis genètics han donat la prova definitiva de la importància de *lck* en els mecanismes d'activació dels limfòcits T. En dos models experimentals de cèl·lules mutants que no responen per via TCR, s'ha demostrat que el defecte està en el gen de *lck* (Molina *et al.* 1992; Karnitz *et al.* 1992).

### ZAP-70

Respecte a ZAP-70 val a dir que és una proteïna que, en experiments de fosforilació de  $\zeta$  en cèl·lules T activades, coprecipita amb  $\zeta$ , i és possible la seva detecció perquè també experimenta fosforilació en tirosina. De fet, el nom ZAP-70 prové de la seva associació amb  $\zeta$  (*zeta associated protein*) i del seu pes molecular (70 kD). Recentment, ZAP-70 ha estat clonada, i la seva capacitat de fosforilar en tirosines ha estat demostrada (Chan *et al.* 1992). La proteïna és molt específica de cèl·lules limfoides perquè només es troba en quantitats apreciables en limfòcits T i en cèl·lules NK (de *natural killer*). S'ha demostrat, treballant amb construccions quimèriques, que ZAP-70 es pot associar a fragments ARAM fosforilats en tirosina i la seva activitat com a quinasa s'incrementa quan les cèl·lules s'activen (Irving *et al.* 1992). Sembla que la interacció de ZAP-70 amb  $\zeta$  depèn de la coexpressió de *lck* o de *fyn*, per la qual cosa aquestes dues tirosina quinases poden modular tant la interacció de ZAP-70 i  $\zeta$  com la activitat quinasa de ZAP-70 (Weiss, 1993).

### CD45

Va passar molt de temps des del descobriment de CD45 a la superfície del limfòcit fins a saber que era una proteïna amb activitat tirosina fosfatasa (Tonks *et al.*, 1988; Charbonneau *et al.*, 1988). La seva participació important en els mecanismes d'activació dels limfòcits T ha estat àmpliament demostrada (Ledbetter *et al.*, 1988; Pingel i Thomas, 1989; Koretzky *et al.*, 1991). En particular, Koretzky *et al.* (1990) han demostrat que CD45 és essencial per a l'acoblament del TCR/CD3 amb la ruta del fosfatidilinositol. És probable que CD45 actuï sobre diversos substrats, *fyn* i *lck* entre d'altres. Sembla que tant *fyn* com *lck* tenen una forma fosforilada inactiva que es converteix en activa per l'acció fosfatasa de CD45 (Mustelin i Altman, 1990). La fosforilació d'una tirosina a l'extrem C terminal fa que la molècula es plegui sobre si mateixa i amagui el centre actiu. Així es postula que, quan la cèl·lula T s'activa la desfosforilació d'aquesta tirosina fosfat, dona lloc a la forma quinasa (de *fyn* o *lck*) activa. Aquest pot ésser el motiu pel qual la cotransfecció de CD45 amb  $\zeta$  i *fyn* incrementa més la fosforilació de  $\zeta$  i la mobilització de calci en els experiments de Hall *et al.* (1993) descrits abans. És possible que CD45 no sigui l'única fosfatasa que actuï en els mecanismes de transducció del senyal mitjançades pel TCR.

### PAPER DE LES PROTEÏNES G

La unió d'agonistes al TCR indueix una ràpida hidròlisi de fosfatidilinositols i dona fosfatidil inositol trisfosfat (IP<sub>3</sub>), que mobilitza el calci intracel·lular, i diacilglicerol, que activa la proteïna quinasa C (Berry i Nishizuka, 1990). La hidròlisi es du a terme quan la fosfolipasa C-g1 que es troba a limfòcits T s'activa. En aquest procés estan involucrades proteïnes G heterotrimeriques, que estan compostes per les subunitats  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  (vegeu la revisió de Gukovskaya, 1991). A més del fet que aquesta mobilització és possible per



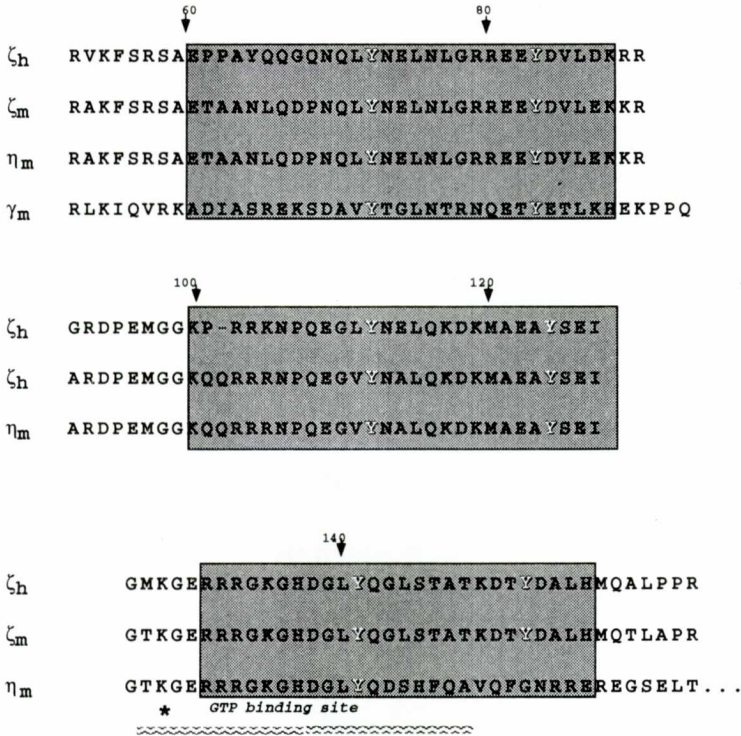


FIGURA 2. Comparació de la part citoplasmàtica de les seqüències de  $\zeta$  humana amb  $\zeta$  de ratolí. També es mostren les seqüències d'altres membres d'una mateixa família, com ara la cadena  $\eta$  (substitueix  $\zeta$  en alguns tipus cel·lulars) i la Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  (part del receptor d'alta afinitat per IgE), ambdós de ratolí (amb el subíndex *m* de *mouse*). Hi ha un asterisc a la posició lisina 128 de  $\zeta$  humana que forma un enllaç amb el GTPoxi (Peter *et al.*, 1992). Les àrees ombrejades corresponen (de dalt a baix) a les seqüències A, B i C descrits per Romeo *et al.* (1992), i que es denominen ARAM (per *antigen recognition activation motif*) per Weiss (1992). Les seqüències han estat extretes de: Weissman *et al.* (1988a) ( $\zeta$  humana), Weissman *et al.* (1988b) ( $\zeta$  de ratolí), Jin *et al.* (1990) ( $\eta$  de ratolí) i Blank *et al.* (1989) (Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  de ratolí). La part C-terminal de la cadena  $\eta$  es mostra incompleta.

mecanismes que semblen independents d'aquests proteïnes G clàssiques, hi ha tot un camp d'investigació que relaciona la transducció del senyal a través del TCR/CD3 amb altres tipus de proteïnes G.

El producte de l'oncogen *ras*, l'anomenat p21<sup>ras</sup>, difereix estructuralment de les proteïnes G heterotrimeriques però té en comú amb elles el fet que uneix GTP, i la seva funció és objecte d'una intensa investigació. La transmissió del senyal per via TCR, amb l'activació de la proteïna quinasa C, produeix la fosforilació en la serina de diversos substrats que, alhora, activen mecanismes

de transducció dependents de p21<sup>ras</sup> (Downward *et al.*, 1990).

Molt recentment, Peter, al laboratori de Terhorst, ha desenvolupat una tècnica per a la identificació de proteïnes G amb capacitat d'interactuar amb el TCR/CD3. La tècnica consisteix en la unió covalent d'una forma modificada de GDP o GTP a la proteïna en estudi, i es va denominar *tècnica del GTPoxi* (Peter *et al.*, 1992). El marcatge amb GTPoxi es va emprar amb èxit per a la identificació de la pròpia cadena  $\zeta$  com a proteïna capaç d'unir GTP. Això va sorprendre molt, atès que  $\zeta$  no és anàloga a cap

altra proteïna G coneguda. Per aquest motiu, la regió d'interacció amb GTP es va esbrinar mitjançant un mapa fet per mutagènesi dirigida, i es va concloure que el GTP s'uneix molt a prop de l'últim ARAM present en la molècula de  $\zeta$  (vegeu la fig. 2). El paper fisiològic d'aquesta interacció no es coneix a hores d'ara, però tot fa suposar que aquest tercer ARAM present en la cua citoplasmàtica de  $\zeta$  fa funcions úniques que difereixen de les que fan els altres dos ARAM de  $\zeta$  i els similars trobats en altres cadenes del TCR/CD3. No hi ha cap motiu similar d'unió de GTP a cap altra de les cadenes del complex TCR/CD3.

Hi ha la possibilitat que el paper de  $\zeta$  com a proteïna G sigui la d'interactuar i, fins i tot, activar la fosfolipasa C o la fosfatidilinositol 3 ( $PI_3$ ) quinasa. Aquesta possibilitat deriva de la demostració, que tant la fosfolipasa C (Dasgupta *et al.*, 1992) com la quinasa  $PI_3$  (Exley *et al.*, dades en preparació) coprecipiten amb  $\zeta$ . La confirmació d'aquesta hipòtesi es molt difícil, i fins i tot no es pot garantir que aquestes coprecipitacions no siguin directes però amb el concurs d'altres proteïnes, com ara quinases i proteïnes G.

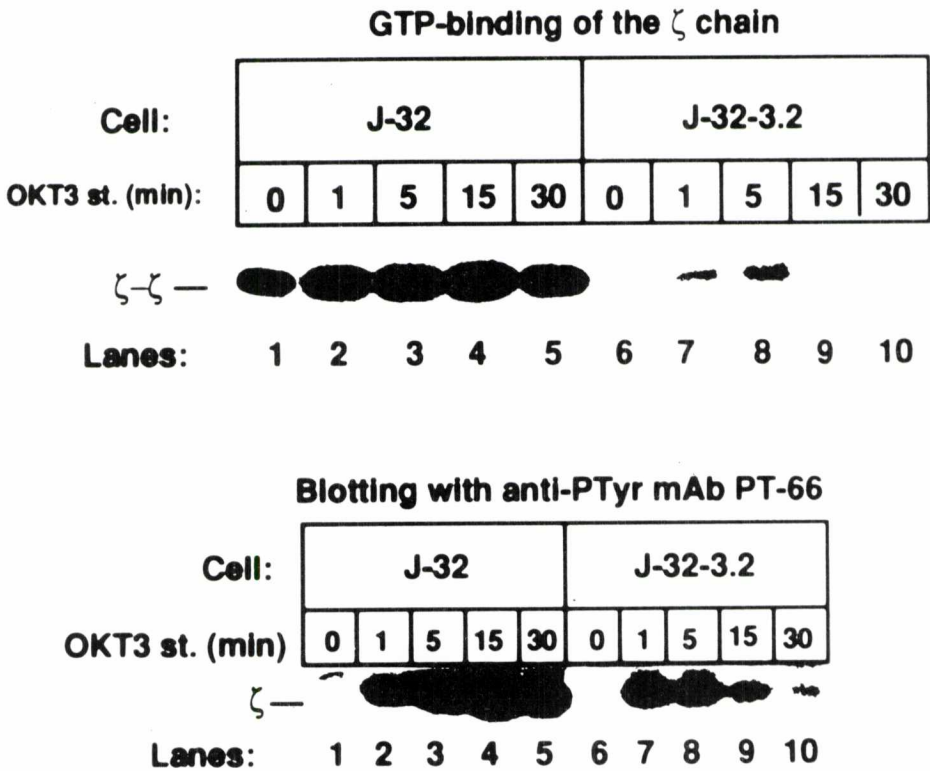


FIGURA 3. Fosforilació (quadre inferior) i marcatge amb GTPoxi (quadre superior) de  $\zeta$  en cèl·lules humanes T salvatges Jurkat J32 i en mutants J32.3.2. Les cèl·lules foren activades per incubació amb l'anticòs monoclonal anti-CD3 (OKT3) per diferents intervals de temps. Es mostra la banda de  $\zeta$  fosforilada o marcada amb [ $^{32}$ P]GTPoxi obtinguda per electroforesi. Figura presa de Sancho *et al.* (1993a), amb permís de J. Immunol.



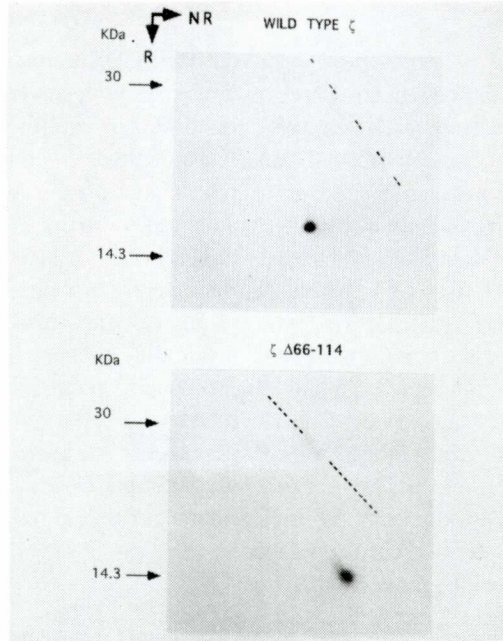


FIGURA 4. Marcatge amb GTP $\gamma$ S de cèl·lules T de ratolí que manifesten la cadena  $\zeta$  sencera (quadre superior) o  $\zeta$  truncada:  $\zeta\Delta 66-114$  (quadre inferior). La resolució de les bandes marcades ha estat feta per electroforesi bidimensional en els gels de poliacrilamida. La taca que apareix per sota de la diagonal correspon a la cadena  $\zeta$  sencera (quadre superior) o truncada (quadre inferior).

Ha estat molt interessant descobrir que el marcatge amb GTP $\gamma$ S augmenta quan la cèl·lula T s'activa. Això vol dir que l'intercanvi entre el GTP endogen unit a la molècula de  $\zeta$  i el [ $^{32}$ P]GTP afegit s'incrementa amb l'activació per via TCR. La cinètica d'increment de marcatge amb GTP $\gamma$ S amb el temps d'activació es dona paral·lelament a la fosforilació en la tirosina de  $\zeta$ , amb un màxim, per a ambdós processos, entre 5 i 15 minuts. En cap experiment no ha estat possible esbrinar si la fosforilació és prèvia a l'augment d'intercanvi amb [ $^{32}$ P]GTP o si és a l'inrevés. Per la mateixa raó, no es coneix de moment si la fosforilació de  $\zeta$  és una conseqüència de la hidròlisi del GTP o si aquesta és conseqüència de la fosforilació. En el mutant J32.3.2 de la línia leucèmica Jurkat, tant la fosforilació com el marcatge amb GTP $\gamma$ S estan disminuïts per la qual cosa se suposa que un procés és conseqüència de l'altre o que ambdós depenen de l'activació mitjançant una tercera molècula (vegeu la fig. 3) (Sancho *et al.*, 1993 a).

Una altra correlació de la capacitat de  $\zeta$  per unir GTP i la seva capacitat de transduir el senyal s'ha trobat treballant amb cèl·lules derivades de limfoma i transfectades amb diferents versions de  $\zeta$ : la salvatge, la  $\zeta\Delta 66-114$  (escindida entre els aminoàcids 66 i 114) i la  $\zeta\Delta 66-157$  (truncació entre els aminoàcids 66 i 157). La construcció salvatge té els tres ARAMS intactes, la  $\zeta\Delta 66-114$  té un ARAM i mig (el sencer és el tercer, amb el domini d'unió a GTP intacte) i la  $\zeta\Delta 66-157$  no en té cap (vegeu la fig. 2). Si s'estudia la transducció del senyal, tenim que és més eficaç la construcció salvatge de  $\zeta$ , però el mutant  $\zeta\Delta 66-114$  té encara la capacitat de transduir el senyal, la qual cosa es perd en el mutant  $\zeta\Delta 66-157$ . Pel que fa al marcatge amb [ $^{32}$ P]GTP $\gamma$ S, es va trobar la banda característica de 17 kD corresponent a la  $\zeta$  salvatge i la de 12 kD corresponent al mutant  $\zeta\Delta 66-114$  (vegeu la fig. 4), però no es va trobar cap quan es va treballar amb el mutant  $\zeta\Delta 66-157$  (Franco *et al.*, 1994).

## MODEL

Amb totes les dades a l'abast és encara d'hora per establir una hipòtesi definitiva de com es produeix l'activació mitjançant el TCR/CD3. Weiss (1993) ha postulat que, en la cascada d'activació, *fyn* i *lck* estan més amunt que ZAP-70. Així, quan la cèl·lula T s'activa, s'activen *lck* i/o *fyn*, que fosforilen  $\zeta$  (i potser  $\epsilon$ ) en residus tirosina dels ARAM. Aleshores, les fosfotirosines serveixen d'ancoratge per als dominis SH2 de ZAP-70, que ara, per proximitat espacial, és susceptible de fosforilació (i d'activació concomitant) per *lck* (o *fyn*). La cascada de fosforilacions, interaccions mitjançant dominis SH2 i SH3 i activacions s'amplifica i produeix el seguit d'esdeveniments propis de les cèl·lules T activades: mobilització de calci, producció d'IL-2, expressió de receptors d'IL-2, etc.

En aquesta seqüència en què participen les cues de les cadenes del TCR/CD3, algunes quinases, alguna fosfatasa, com CD45 i un munt de proteïnes efectores, les proteïnes G poden participar en molts llocs. La dificultat de treballar amb proteïnes G fa que no es conegui amb exactitud quins són aquests llocs. Una possibilitat molt factible és que  $\zeta$  i la seva capacitat per unir GTP siguin molt importants en les etapes inicials de l'activació. Cenciarelli *et al.* (1992) han descrit que, en el procés d'activació de les tirosina quinases que fosforilen  $\zeta$ , hi participen proteïnes d'unió de GTP. Cal destacar que el marcatge amb GTPoxi de la cadena  $\zeta$  ha permès establir que la seva capacitat d'unió a GTP es correlaciona amb la fosforilació en tirosines de  $\zeta$ . En cap experiment no ha estat possible separar els dos fenòmens: a més fosforilació, més unió a GTP. Fins i tot treballant amb el mutant J32.3.2 de la línia leucèmica Jurkat, es produeix una important reducció tant de la fosforilació en tirosina de  $\zeta$  com del marcatge amb GTPoxi. Aquest fenomen no es degut a una mutació en *lck* o *fyn* ja que aquestes dues quinases s'activen normalment si la cèl·lula J32.3.2 s'activa per mecanismes alternatius que circumval·len el TCR. Una hipòtesi molt atractiva ha estat emesa molt recentment per

Franco *et al.* (1994), que postulen que el lligatge del TCR/CD3 produeix un canvi conformacional de  $\zeta$  que és dependent de GTP, i dóna com a resultat una major susceptibilitat per a la fosforilació de  $\zeta$  per quinases. Si això fos cert, el mecanisme de transducció del senyal començaria amb una proteïna G ( $\zeta$ ) i continuaria amb la cascada de fosforilacions, activacions i interaccions proteïna-proteïna. D'alguna manera el mecanisme seria similar al d'activacions d'adenilat ciclase mitjançant el concurs de proteïnes G heterotrimèriques clàssiques. Un fet diferencial seria que la proteïna G no clàssica pertanyeria al mateix receptor i seria susceptible de participar en les cascades de fosforilacions i interacció amb altres proteïnes.

## AGRAÏMENTS

R. F. va rebre ajuts de la Direcció General d'Investigació Científica i Tècnica (Secretaria d'Estat d'Universitats i Investigació) i de la CIRIT (Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològiques) per desenvolupar la seva estada a la Harvard Medical School. Volem agrair el Dr. Enric I. Canela els comentaris crítics durant la preparació del present article.

## BIBLIOGRAFIA

- APPLEBY, M. W., J. A. GROSS, M. P. COOKE, S. D. LEVIN, X. QUAN i R. M. PERLMUTTER (1992). Defective T cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of p59<sup>lck</sup>. *Cell* **70**: 751-763.
- BERRY, N. i Y. NISHIZUKA (1990). Protein kinase C and T cell activation. *Eur. J. Biochem.* **189**: 205-214.
- BLANK, U., C. RA, L. MILLER, K. WHITE, H. METZGER i J. P. KINET (1989). Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature* **337**: 187-189.
- CENCIARELLI, C., R. J. HOHMAN, T. P. ATKINSON, F. GUSOVSKY i A. M. WEISSMAN (1992). Evidence for GTP-binding protein involvement in the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor  $\zeta$  chain. *J. Biol. Chem.* **267**: 14527-14530.
- CHAN, A. C., M. IWASHIMA, C. W. TURCK i A. WEISS (1992). ZAP-70: A 70 kd protein-tyrosine kinase that associates



- with the TCR  $\zeta$  chain. *Cell* **71**: 649-662.
- CHARBONNEAU, H., N. K. TONKS, K. A. WALSH i E. H. FISCHER (1988). The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7182-7186.
- CLEVERS, H. B., B. ALARCÓN, T. WILEMAN i C. TERHORST (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Ann. Rev. Immunol.* **6**: 629-662.
- DASGUPTA, J. D., C. GRANJA, B. DRUKER, L. L. LIN, E. J. YUNIS i V. RELIAS (1992). Phospholipase C-gamma 1 association with CD3 structure in T cells. *J. Exp. Med.* **175**: 285-288.
- DAVIDSON, H. W., C. H. MCGOWAN i W. E. BALCH (1992). Evidence for the regulation of exocytic transport by protein phosphorylation. *J. Cell Biol.* **116**: 1343-1355.
- DOWNWARD, J., J. D. GRAVES, P. H. WARNE, S. RAYTER i D. A. CANTRELL (1990). Stimulation of p21<sup>ras</sup> upon T cell activation. *Nature* **346**: 719-723.
- EICHMANN, K. (1993). Transmembrane signaling of T lymphocytes by ligand-induced receptor complex assembly. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**: 54-63.
- EXLEY, M. C., C. TERHORST i T. WILEMAN (1991). Structure, assembly and intracellular transport of the T cell receptor for antigen. *Semin. Immunol.* **3**: 283-297.
- FRANCO, R., M. E. PETER, M.-S. CHOI, J. SANCHO, B. MALISSEN i C. TERHORST (1994). Characterization of the GTP/GDP binding site of the  $\zeta$  chain in the T-cell receptor in murine cells. Submitted.
- GUKOVSKAYA, A. S. (1991). G proteins in T cell signal transduction. *Immunol. Letters* **31**: 1-10.
- HALL, C. G., J. SANCHO i C. TERHORST (1993). Reconstitution of T-cell receptor  $\zeta$ -mediated calcium mobilization in nonlymphoid cells. *Science* **261**: 915-918.
- HERMANS, M. H. A. i B. MALISSEN (1993). The cytoplasmic tail of the T cell receptor  $\zeta$  chain is dispensable for antigen-mediated T cell activation. *Eur. J. Immunol.* **23**: 2257-2262.
- IRVING, B. A. i A. WEISS (1991). The cytoplasmic domain of the T cell receptor  $\zeta$  chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* **64**: 891-901.
- IRVING, B. A., A. C. CHAN i A. WEISS (1993). Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor  $\zeta$  chain. *J. Exp. Med.* **177**: 1093-1103.
- JIN, Y.-J., L. K. CLAYTON, F. D. HOWARD, S. KOYASU, M. SIEH, R. STEINBRICH, G. E. TARR i E. L. REINHERZ (1990). Molecular cloning of the CD3 $\beta$  subunit identifies a CD3 $\zeta$ -related product in thymus-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3319-3323.
- KARNITZ, L., S. L. SUTOR, T. TORIGOE, J. C. REED, M. P. BELL, D. J. MCKEAN, P. J. LEIBSON i R. T. ABRAHAM (1992). Effects of p56<sup>lck</sup> deficiency on the growth and cytotoxic effector function of an interleukin-2-dependent cytotoxic T-cell line. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4521-4530.
- KLAUSNER, R. D. i R. SITIA (1990). Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell* **62**: 611-614.
- KORETZKY, G., J. PICUS, M. L. THOMAS i A. WEISS (1990). Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidylinositol pathway. *Nature* **346**: 66-68.
- KORETZKY, G., J. PICUS, T. SCHULTZ i A. WEISS (1991). Tyrosine phosphatase CD45 is required for T-cell antigen receptor and CD2-mediated activation of a protein tyrosine kinase and interleukin 2 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2037-2041.
- LEDBETTER, J. A., N. K. TONKS, E. H. FISCHER i E. A. CLARK (1988). CD45 regulates signal transduction and lymphocyte activation by specific association with receptor molecules on T or B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8628-8632.
- LETOURNEUR, F. i R. D. KLAUSNER (1991). T-cell and basophil activation through the cytoplasmic tail of T-cell-receptor  $\zeta$  family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8905-8909.
- LETOURNEUR, F. i R. D. KLAUSNER (1992). Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3  $\epsilon$ . *Science* **255**: 79-82.
- MALLABIABARRERA, A., M. FRESNO i B. ALARCÓN (1993). An endoplasmic reticulum retention signal in the CD3 $\epsilon$  chain of the T-cell receptor. *Nature* **357**: 593-596.
- MITTLER, R. S., B. M. RANKIN i P. A. KIENER (1991). Physical associations between CD45 and CD4 or CD8 occur as late activation events in antigen receptor-stimulated human T cells. *J. Immunol.* **147**: 3434-3440.
- MOLINA, T. J., K. KISHIHARA, D. P. SIDEROVSKI, W. VAN EWIJK, A. NARENDHAN, E. TIMMS, A. WAKEHAM, C. J. PAIGE, K.-U. HARTMANN, A. VEILLETTE, D. DAVIDSON i T. W. MAK (1992). Profound block in thymocyte development in mice lacking p56<sup>lck</sup>. *Nature* **357**: 161-164.
- MUSTELIN, T. i A. ALTMAN (1990). Dephosphorylation and activation of the T-cell tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> by the leukocyte common antigen (CD45). *Oncogene* **5**: 809-817.
- OETTGEN, H. C., C. L. PETTEY, W. L. MALOY i C. TERHORST (1986). A T3-like protein complex associated with the antigen receptor on murine T cells. *Nature* **320**: 272-275.
- PESSA-MORIKAWA, T. MUSTELIN i L. C. ANDERSSON (1990). Functional maturation of human T lymphocytes is accompanied by changes in the G-protein pattern. *J. Immunol.* **144**: 2690-2695.
- PETER, M. E., C. HALL, A. RÜHLMAN, J. SANCHO i C. TERHORST (1992). The T-cell receptor  $\zeta$  chain contains a GTP/GDP binding site. *EMBO J.* **11**: 933-941.
- PINGEL, J. T. i M. T. THOMAS (1989). Evidence that the common leukocyte antigen is required for antigen-induced T cell proliferation. *Cell* **58**: 1055-1065.
- RETH, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**: 383-384.



- ROMEO, C. i B. SEED (1991). Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell of Fc receptor polypeptides. **Cell** 64: 1037-1046.
- ROMEO, C., M. AMIOT i B. SEED (1992). Sequence requirements for induction of cytolysis by the T cell antigen/Fc receptor  $\zeta$  chain. **Cell** 68: 889-897.
- SAMELSON, L. E., A. F. PHILLIPS, E. T. LUONG i R. D. KLAUSNER (1990). Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 87: 4358-4362.
- SAMELSON, L. E. i R. D. KLAUSNER (1992). Tyrosine kinases and tyrosine-based activation motifs. **J. Biol. Chem.** 267: 24913-24916.
- STEIN, P. L., H-M. LEE, S. RICH i P. SORIANO (1992). pp59<sup>lyn</sup> mutant mice display differential signaling in thymocytes and peripheral T cells. **Cell** 70: 741-750.
- SANCHO, J., M. E. PETER, R. FRANCO, S. DANIELIAN, J. S. KANG, R. FAGARD, J. WOODS, J. C. REED, M. KAMOUN i C. TERHORST (1993 a). Coupling of GTP-binding to the T cell receptor (TCR)  $\zeta$ -chain with TCR-mediated signal transduction. **J. Immunol.** 150: 3230-3242.
- SANCHO, J., R. FRANCO, T. CHATILA, C. HALL i C. TERHORST (1993 b). The T cell receptor associated CD3- $\epsilon$  protein is phosphorylated upon T cell activation in the two tyrosine residues of a conserved signal transduction motif. **Eur. J. Immunol.** 23: 1636-1642.
- TELFER, J. C. i C. E. RUDD (1991). A 32 kD GTP-binding protein associated with the CD4-p56<sup>lck</sup> and CD8-p56<sup>lck</sup> T cell receptor complexes. **Science** 254: 439-441.
- TONKS, N. K., H. CHARBONNEAU, C. D. DILTZ, E. H. FISCHER i K. A. WALSH (1988). Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. **Biochemistry** 27: 8695-8701.
- WEGENER, A-M.K., F. LETOURNEUR, A. HOEVELER, T. BROCKER, F. LUTON i B. MALISSEN (1992). The T-cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. **Cell** 68: 83-95.
- WEISS, A (1993). T cell antigen receptor signal transduction: A tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. **Cell** 73: 209-212.
- WEISSMAN, A. M., M. BANAYASH, D. HOU, L. E. SAMELSON, W. H. BURGESS i R. D. KLAUSNER (1988a). Molecular cloning of the zeta chain of the T cell antigen receptor. **Science** 239: 1018-1021.
- WEISSMAN, A. M., D. HOU, D. G. ORLOFF, W. S. MODI, H. SEUANEZ, S. J. O'BRIEN i R. D. KLAUSNER (1988b). Molecular cloning and chromosomal localization of the human T-cell receptor  $\zeta$  chain: Distinction from the molecular CD3 complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85: 9709-9713.
- WILEMAN, T., G. R. CARSON, F. F. SHIH, M. F. CONCINO i C. TERHORST (1990). The transmembrane anchor of the T-cell antigen receptor *b* chain contains a structural determinant of pre-Golgi proteolysis. **Cell Regulation** 1: 907-919.
- WILEMAN, T., L. P. KANE i C. TERHORST (1991). Degradation of T-cell receptor chains in the endoplasmic reticulum is inhibited by inhibitors of cysteine proteases. **Cell Regulation** 2: 753-765.