

Mikołaj Kłossowicz

Tytuł:

Ograniczona proteoliza białka adaptorowego LAT: nowy mechanizm regulacji sygnalizacji wewnątrzkomórkowej limfocytów T

STRESZCZENIE

Białko LAT stanowi jeden z głównych mediatorów przekazywania sygnałów środowiskowych do wnętrza limfocytów T w czasie ich aktywacji. Badania nad tą cząsteczką, zapoczątkowane w latach 90-tych XX wieku, pozwoliły na określenie jej kluczowego znaczenia w procesie dojrzewania limfocytów T. Nokaut genu LAT u myszy powoduje zahamowanie rozwoju tymocytów w stadium komórek podwójnie negatywnych (CD4-CD8-), co skutkuje znacznym upośledzeniem działania swoistej odpowiedzi immunologicznej tych zwierząt z powodu braku dojrzałych limfocytów T w obwodowych narządach limfatycznych. Wśród wielu badań nad cząsteczką LAT niewielką uwagę skupiono jednak na dwóch fenomenach, którym ona podlega: występowaniu alternatywnej, utrwalonej ewolucyjnie izoformy oraz procesowi jej częściowej degradacji proteolitycznej. Wyjaśnieniu tych dwóch zjawisk poświęcono niniejszą pracę.

W toku prowadzonych badań określono, iż stanowiąca znikomy procent transkryptu genu LAT u człowieka izoforma LATi6 (z zachowanym intronem 6) ulega translacji, a powstające na jej matrycy białko posiada pełną funkcjonalność kanonicznej cząsteczki LAT. Dowiedziono również, że ekspresja tej izoformy w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej wybranych gatunków ssaków znacząco się między sobą różni – od braku występowaniu u myszy domowej do stanowienia jedynej izoformy mRNA genu LAT u bydła domowego. Przy pomocy mutacji punktowych usuwających lub wprowadzających powtórzenia poliguanidynowe w obręb sekwencji intronu 6 genu LAT u człowieka wykazano, że właśnie te elementy cis-regulatorowe są odpowiedzialne za kontrolę wycięcia a tym samym pozostawienie intronu 6 w dojrzałym mRNA genu LAT. Białko LATi6 charakteryzuje się identycznym profilem lokalizacji w obrębie przedziałów subkomórkowych a także równie skutecznie pośredniczy w przekazywaniu sygnałów w pierwszym etapie aktywacji limfocytów T co kanoniczna forma białka LAT. Cechuje się jednak znacznie krótszym okresem półtrwania.

Może mieć to wpływ na dalszy etap kształtowania się odpowiedzi immunologicznej limfocytu T, a zwłaszcza jej wzmocnienie, co zaobserwowano na drodze zwiększonego wydzielania interleukiny 2 w komórkach JCaM2 ekspresjonujących izoformę LATi6 (w odniesieniu do komórek JCaM2 LAT). Otrzymane wyniki sugerują, że obecność izoformy LATi6 z punktu widzenia ewolucji jest uzasadniona a wzmożony stopień jej degradacji może prowadzić do zwiększenia skuteczności kontroli nad odpowiedzią odpornościową limfocytów T.

W drugim etapie badań skupiono się na poznaniu biologicznej funkcji oraz molekularnego mechanizmu ograniczonej proteolizy białka LAT w limfocytach T i ich prekursorach. Stosując technikę Western blot określono dokładny wzór degradacji białka LAT w lizatach z limfocytów T (i ich prekursorów) poddanych działaniu czynników proapoptotycznych. Ustalono, że jeden z produktów degradacji białka LAT – N-końcowy fragment o wielkości ok. 17 kDa – pozostaje zakotwiczony w błonie nawet po całkowitym zdegradowaniu pozostałych części białka LAT. Fragment ten mimo braku możliwości tworzenia funkcjonalnego sygnałosu zachowuje wybiórczą zdolność do oddziaływania z białkami inicjującymi kaskady przekazywania sygnałów (TRAF6, kinaza LCK), co może przekładać się na jego aktywność immunosupresyjną. Wykazano również, że za proces proteolizy adaptora LAT odpowiedzialne są kaspaza 8 i/lub granzym B. W dalszym etapie badań dowiedziono, iż fosforylacja reszt tyrozyn regulatorowych adaptora LAT w sposób skuteczny hamuje jego degradację. Ze względu na ograniczenia techniki Western blot, na potrzeby pracy opracowano oryginalną metodę identyfikacji degradacji białka LAT na poziomie pojedynczych komórek z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Stosując tę technikę określono kinetykę degradacji adaptora LAT, potwierdzono udział w tym procesie białek z rodziny kaspaz, a także wykazano, że zjawisko to wyprzedza w czasie przemieszczenie się fosfatydyloseryny na zewnątrz błony cytoplazmatycznej podczas inicjacji procesu apoptozy. Przy jej użyciu stwierdzono ponadto, że tymocyty o fenotypie $CD4^+CD8^{low}FoxP3^+$ są odporne na proteolizę białka LAT wywołaną silną stymulacją poprzez receptor TCR. Degradacja białka LAT, określona za pomocą opracowanej metody cyofluorometrycznej, może być zatem z powodzeniem zastosowana jako wczesny marker apoptozy limfocytów T a oporność na nią jako dodatkowy marker charakteryzujący subpopulację limfocytów T regulatorowych.