

CD4: Asociaciones moleculares y papel en la respuesta a antígeno

G. CRIADO, J. M. ROJO

Departamento de Inmunología. Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C. Madrid

CD4: MOLECULAR ASSOCIATIONS AND ROLE IN ANTIGEN ACTIVATION

RESUMEN

Se resumen a continuación los datos más recientes acerca de las interacciones de CD4 con distintas moléculas externas a la célula T (MHC, IL-16, gp120 de HIV), en la misma membrana (CD81, CD82), o en la región citoplásmica (Lck, LAT) y las consecuencias que estas asociaciones tienen en cuanto a los mecanismos de activación de linfocitos, con particular énfasis en los datos acerca de la aportación de CD4 a la actividad cinasa y las vías de activación de los linfocitos T CD4⁺ normales y de líneas CD4⁺ de fenotipo Th2. En conjunto, los datos indican que, al menos en ciertas células, la interacción entre el TCR y las cadenas de CD3 es estabilizada por CD4 independientemente de la asociación entre CD4 y la cinasa lck. Esto permite una activación más eficiente de las cinasas asociadas a CD3 y una modificación de la cinética de la señalización intracelular, manteniendo durante más tiempo la fosforilación en tirosinas y la activación de rutas como la de la MAP cinasa Erk. La asociación de lck a la región intracelular de CD4 acelera esta cinética y permite que se completen los pasos de activación antes de que cese la interacción del TCR con su ligando. En el caso de que la interacción TCR-ligando sea débil, la aportación de la lck asociada a CD4 puede ser limitante, mientras que si la interacción es fuerte la secuencia de activación se puede completar sin la intervención de la lck aportada por CD4.

PALABRAS CLAVE: CD4/ lck/ TCR/ CD3/ MAPK.

ABSTRACT

Recent data on the interactions between CD4 and other molecules, including molecules external to T cells (like MHC, IL-16, or HIV gp120), on the same cell surface (i.e., CD81, CD82), or in the cytoplasmic region (Lck, LAT), as well as the functional consequences of these interactions on T cell activation mechanisms will be summarized in the present review. Particularly, the data on the role of CD4 in TCR-associated kinase activity and several activation pathways in normal CD4⁺ T cells and Th2 CD4⁺ cell lines. In all, the data considered indicate that, at least in certain T cells, CD4 helps in stabilizing TCR-CD3 interactions independently on CD4-Lck association. As a consequence, CD3 associated kinases can be more efficiently activated upon TCR ligation, and intracellular signaling kinetics is modified, in the sense that events like early tyrosine phosphorylation or activation of the MAP kinase Erk are maintained for longer. CD4-Lck association further favours this effect, and allows a faster completion of activation steps before TCR-ligand interaction ceases. If this interaction is weak, the role of CD4-associated Lck can be limiting, whereas if it is strong enough, the sequence of activation can be completed in the absence of the Lck kinase brought by CD4.

KEY WORDS: CD4/ lck/ TCR/ CD3/ MAPK.

INTRODUCCIÓN

CD4 es una glicoproteína de la superficie celular expresada en una subpoblación de linfocitos T maduros (los linfocitos T cooperadores) y en la mayoría de los timocitos (1). Es una molécula de 55 kD con cuatro

dominios extracelulares (D1-D4), homólogos a los de las inmunoglobulinas, una zona transmembrana y una región intracitoplásmica de unos 40 aminoácidos (2). Los 100 residuos del dominio aminoterminal tienen una secuencia similar al dominio variable de las inmunoglobulinas, mientras que en los tres restantes la similitud es menor.



A lo largo de su secuencia, CD4 presenta diferentes motivos mediante los cuales se puede asociar a distintas proteínas, incluyendo el propio CD4 (3-13) (Fig. 1). Esta capacidad de interacción le permite cumplir una labor de primer orden como regulador de diferentes funciones del linfocito T. En este trabajo resumiremos los datos conocidos acerca de estas asociaciones y las relaciones funcionales entre ellas y con la activación por antígeno, con especial referencia a nuestros datos acerca del papel de CD4 en la activación de linfocitos T CD4⁺ de fenotipo Th2.

INTERACCIÓN CON MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El principal ligando de CD4 es la molécula del Complejo Principal de Histocompatibilidad de Clase II (MHC II), según se pudo comprobar en sistemas carentes de TCR, en los cuales células que expresaban altos niveles de CD4 se adherían específicamente a células que expresaban moléculas de MHC (14). Basándose en este sistema, Reinherz

y cols. identificaron por mutagénesis dirigida varios aminoácidos situados en la cara lateral de los dos dominios aminoterminales de CD4 (D1 y D2) que eran clave para la adhesión, lo que sugería la interacción de CD4 con una gran superficie de contacto de la cara lateral de MHC (6,15). Además, se pudo identificar mediante ensayos funcionales una segunda superficie de CD4 que era importante para la unión a MHC II, formada por los giros FG (CDR3) y C'C'' del dominio D1 (7,16). Puesto que estas dos regiones se encuentran en caras opuestas de CD4 (17,18), y puesto que la coexpresión del mutante F⁴³I junto con CD4 salvaje produce una inhibición de la unión a MHC II, se ha sugerido que existe un proceso de oligomerización en el curso de la asociación de CD4 a MHC (19,20).

Por otra parte, distintos datos indican que también en MHC II hay dos sitios implicados en la unión a CD4, uno en el dominio 2 y otro en el dominio 2 (21). La disposición de estas regiones en el heterodímero de MHC hace que sea imposible que la misma molécula de CD4 se una al mismo tiempo a una sola molécula de MHC II por las

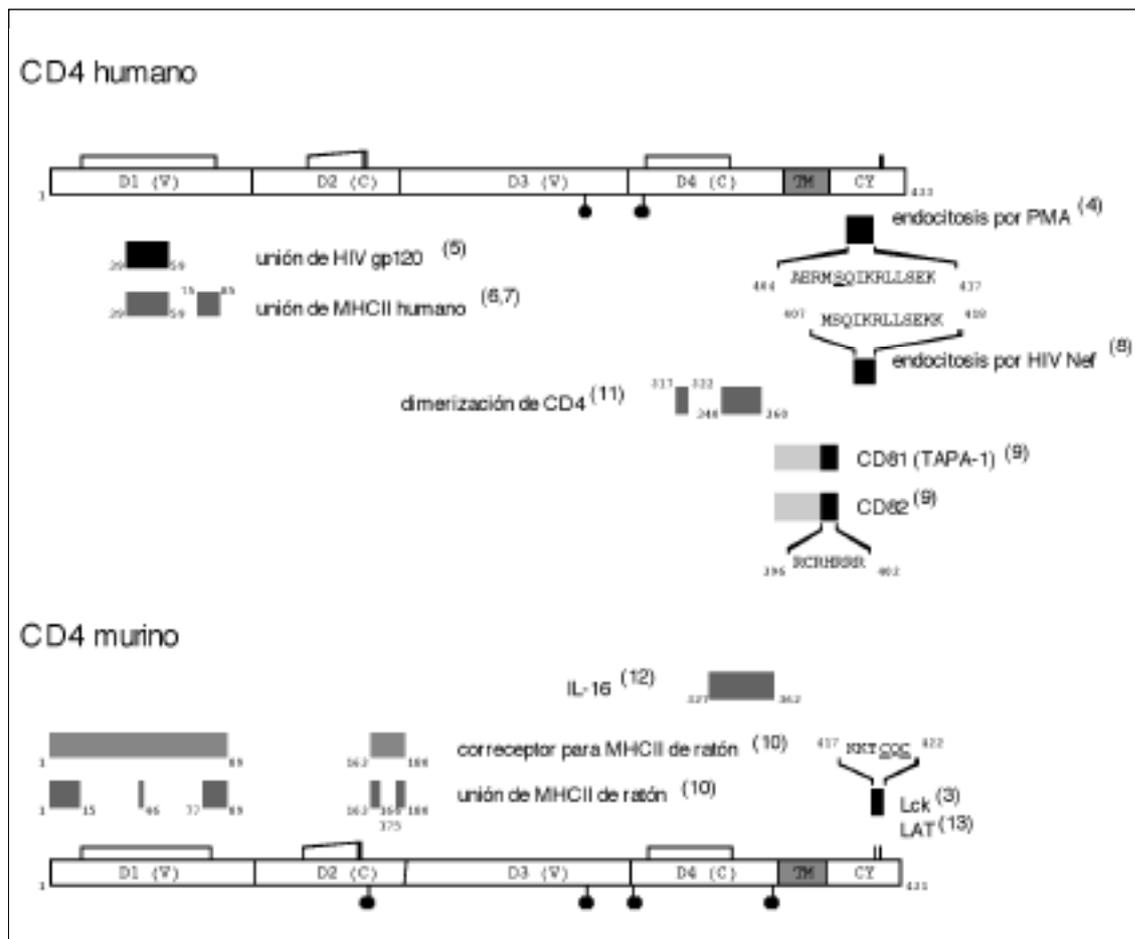


Figura 1. Representación esquemática de CD4, con indicación de las regiones y secuencias implicadas en asociaciones con relevancia funcional.



dos regiones. Sin embargo, de acuerdo con la estructura cristalográfica de MHC II, las moléculas pueden formar un dímero de dímeros, que se ha llamado "superdímero", en el cual los dominios 2 de un heterodímero y 2 del otro están próximos (22), y podrían interactuar con la misma cara de CD4. Teniendo en cuenta el conjunto de estos datos, se ha propuesto un modelo de interacción secuencial de CD4 con MHC II, en el que se produciría un primer contacto del TCR con el complejo MHC-antígeno seguido de una interacción posterior de CD4 con la molécula de MHC reconocida por el TCR, lo que induciría una dimerización de CD4 a través de sus dominios D4 y, posteriormente, una oligomerización con otros complejos mediada por el dominio D1 de CD4 (23).

OTRAS ASOCIACIONES MOLECULARES DE CD4

Además de su importancia en la asociación de CD4 a MHC II, la protrusión formada por los giros CC' y C'C'' es el sitio de unión a la proteína gp120 del virus VIH (6). En CD4 el residuo fundamental en este reconocimiento es F⁴³, rodeada por aminoácidos cargados positivamente (5), mientras que en gp120 la unión depende de aminoácidos cargados negativamente (24). Por último, la región extracelular de CD4 es el ligando de la interleucina 16 (IL-16), una citocina proinflamatoria que induce la migración de linfocitos T CD4⁺ (revisado en (25)). La IL-16 tiene una estructura tetramérica que es necesaria para el mantenimiento de su actividad. El sitio de unión de IL-16 a CD4 ha sido recientemente localizado en la proximidad de la región implicada en la dimerización del dominio D4 (12).

La región citoplásmica de CD4 está implicada en diferentes asociaciones moleculares directas, de una gran importancia funcional. Entre las moléculas que se asocian a la región intracelular de CD4 se encuentran las moléculas coestimuladoras CD81 y CD82 y la proteína reguladora *nef* del virus VIH (8,9). Sin embargo, funcionalmente, la asociación más importante de CD4, y una de las primeras en conocerse, es la que se establece a través de un par de cisteínas citoplásmicas (C⁴²⁰ y C⁴²² en CD4 humano y C⁴¹⁸ y C⁴²⁰ en CD4 de ratón) con las cisteínas 20 y 22 de la región aminoterminal de la tirosina cinasa lck (3, 26). Recientemente, Bosselut y cols. (13) han mostrado que estos mismos residuos de cisteína también están implicados en la asociación de CD4 con la proteína adaptadora LAT, uno de los principales sustratos de la tirosina cinasa ZAP-70 y un importante intermediario en la activación mediada por el TCR.

CONTRIBUCIÓN DE CD4 A LA ASOCIACIÓN DE TIROSINA-CINASAS AL COMPLEJO TCR/CD3

El primer efecto detectable en la activación de los linfocitos T a través del receptor para antígeno (TCR) es la fosforilación de las tirosinas de los ITAMs de las cadenas de CD3 y (27). Aunque no hay evidencias directas que identifiquen las cinasas responsables de esta fosforilación, diferentes datos indican que éstas son lck y fyn, dos tirosina-cinasas de la familia Src expresadas por los linfocitos T (28,29). La naturaleza de la asociación de estas cinasas al TCR y la contribución de CD4/lck a esta asociación varían en distintos sistemas celulares. En hibridomas T y en líneas transformadas, fyn parece la fuente principal de actividad tirosina-cinasa asociada al complejo TCR/CD3 (30), mientras que en linfocitos T CD4 normales hemos encontrado que la mayor parte de la actividad cinasa asociada a CD3 procede de lck (31), de forma similar a lo que ocurre en la línea de fenotipo Th2 SR.D10. En esta línea de linfocitos, la asociación de lck al TCR es muy dependiente de la expresión de CD4, como lo demuestra la pérdida de la actividad cinasa en los mutantes CD4⁻ de SR.D10 y su recuperación en transfectantes de CD4 (32). En cambio, en los linfocitos T CD4 normales, aunque hay CD4 asociado al complejo TCR/CD3, lck se puede asociar a CD3 de forma independiente de CD4, y, de hecho, la eliminación del correceptor produce un aumento paradójico de la actividad cinasa de lck, tanto de la total como de la asociada a CD3 (31).

Un punto importante en cuanto a la funcionalidad de la asociación CD4-lck, es el de la proporción de co-receptor y de cinasa que se encuentran asociados en un momento determinado. Los estudios realizados en ciertas líneas celulares han evaluado en cerca del 100% la proporción de lck asociada a CD4, llegando a proponerse un "secuestro" de la lck celular por parte de CD4 (33). Otras valoraciones, en linfocitos de nódulos linfáticos de rata, dan valores por encima del 75% (34). Nosotros hemos abordado recientemente este problema en lisados de linfocitos T CD4 aislados de bazo de ratón. En estas células, la eliminación selectiva de CD4 de los lisados celulares con anticuerpos específicos anti-CD4 permitió determinar que la cantidad de lck libre, no asociada a CD4, supone aproximadamente el 50% de la lck total de la célula (35). Estas diferencias podrían explicar que la actividad cinasa asociada al TCR dependa de CD4 en las líneas en cultivo, mientras que en linfocitos T CD4⁺ aislados de órganos linfoides hay más lck "disponible" para asociarse a otras moléculas independientemente de CD4. Así, lck estaría disponible para asociarse a CD3, y a CD2, así como también a moléculas responsables de otras vías de activación, como el receptor de IL-2



(36) y proteínas ancladas a la membrana por uniones GPI (37,38).

La presencia de cantidades significativas de lck y fyn en los lisados celulares tras la inmunodepleción de CD4 no explica, sin embargo, el aumento que hemos observado en la actividad de las tirosina-cinasas, tanto de lck como de fyn, asociada a los inmunoprecipitados de CD3 en ausencia de CD4 (31). Una explicación posible para este efecto sería que CD4:lck regulara negativamente la actividad de las tirosina-cinasas asociadas al complejo TCR/CD3 o, lo que parece más probable, que en su ausencia se pusieran de manifiesto mecanismos de regulación positiva. La actividad de las tirosina-cinasas relacionadas con Src está regulada a través de la fosforilación del residuo de tirosina del extremo carboxilo terminal (Y⁵⁰⁵ en lck) por parte de p50^{ck} (39). Esta fosforilación reduce la actividad de las tirosina-cinasas al favorecer una conformación "cerrada" de las mismas y, en el caso de lck, requiere la asociación del dominio SH2 de csk con la Y³⁹⁴ fosforilada de lck (40). Por otro lado, la fosfotirosina-fosfatasa CD45 defosforila la Y⁵⁰⁵ de lck, lo que regula positivamente su actividad al favorecer una conformación "abierta" de la cinasa (41). Se ha descrito que CD45 se asocia a lck de forma independiente de CD4 en líneas celulares y en linfocitos T CD4⁺ (42), y, recientemente, también se ha observado, en linfocitos T CD4⁺ aislados de órganos linfoides, la coprecipitación de las isoformas CD45R0 y CD45RB con el TCR en condiciones basales, para lo cual tampoco es necesaria la presencia de CD4 (43). En conjunto, estos datos sugieren que el aumento de actividad de la cinasa asociada al TCR en ausencia de CD4 puede ser mediado por la asociación de CD45 a lck, que facilitaría la acción de la fosfatasa sobre su sustrato y contribuiría al mantenimiento de la cinasa en una conformación "abierta". A este respecto, hay que considerar que la población de linfocitos T CD4⁺ utilizada para nuestro análisis comprende principalmente células "vírgenes" CD45RB⁺. Las células de fenotipo Th2 también expresan gran cantidad de isoformas de CD45 de alto peso molecular CD45RB, por lo que podrían resultar sorprendentes las diferencias en la dependencia/independencia de CD4 de la cinasa asociada al TCR entre linfocitos T y las células de la línea Th2 SR.D10. Sin embargo, existe una importante diferencia entre ambos tipos celulares en cuanto a la asociación de CD45: en los clones Th2 hay una isoforma de bajo peso molecular (CD45R0) que colocaliza junto con CD4 de forma independiente del TCR, mientras que en las células "vírgenes" no se detecta la colocalización de estos dos marcadores (44,45). Estas diferencias en las asociaciones moleculares pueden ser el reflejo de las diferencias funcionales entre las líneas celulares mantenidas en cultivo, estimuladas repetida y periódicamente,

y los linfocitos CD4⁺ "vírgenes" aislados de bazo, que no han sufrido una estimulación antigénica previa.

LA ASOCIACIÓN CD4/LCK EN LA RESPUESTA A ANTÍGENO

Para analizar la contribución de la región citoplásmica de CD4 a la señalización a través del TCR hemos estudiado la estimulación con antígeno de células SR.D10 carentes de CD4 o transfectadas con distintas formas de CD4, incluyendo formas deficientes para la asociación de lck. En estas células hemos evaluado las cinéticas de la fosforilación en tirosinas y de la activación de la MAP-cinasa Erk como fenómenos indicadores de la activación del linfocito T.

El análisis de la cinética de fosforilación en tirosinas en respuesta a antígeno en SR.D10 ha mostrado que, en las células que expresan CD4 se acelera la fosforilación de sustratos de 75 y 95 kDa correspondientes a SLP-76 y Vav (Fig. 2). Para observar este fenómeno basta la región extracelular de CD4, aunque es más acentuado cuando lck se encuentra asociada a CD4. Además, esta asociación es imprescindible para la fosforilación de otros sustratos de 40-50 kDa. Estas diferencias sugieren que CD4 tiene un doble papel en la fosforilación de tirosinas mediada por ligandos del TCR: por un lado, la región extracelular de CD4 contribuye a la interacción TCR/péptido-MHC II y, de esta forma, potencia la activación de cinasas ligadas al complejo TCR/CD3 y, por otra parte, la región citoplásmica aumenta la respuesta aportando tirosina-cinasas adicionales, con sustratos específicos, y otros mediadores intracelulares.

El efecto de potenciación de la fosforilación en tirosina por parte de la región extracelular de CD4 en ausencia de la asociación de lck podría resultar sorprendente, aunque hay diferentes factores que podrían contribuir al mismo. En primer lugar, la unión de CD4 al mismo ligando que el TCR podría aumentar la afinidad de éste por el complejo péptido-MHC II. Los datos publicados por diferentes autores indican que la potenciación de la respuesta a través del TCR mediada por CD8 se debe a un gran aumento en la afinidad del TCR por el complejo péptido-MHC I (46, 47). Sin embargo, este no parece ser el caso de CD4, pues distintos trabajos han mostrado que CD4 tiene una baja afinidad por MHC II (48) y su expresión no aumenta la afinidad del TCR por el complejo péptido-MHC II (49-51). Otro mecanismo para explicar esta aceleración de la fosforilación en tirosinas mediada por CD4 en ausencia de cinasas asociadas es que la unión de CD4 al complejo TCR/péptido-MHC II mediara un cambio en la disposición del complejo que per-



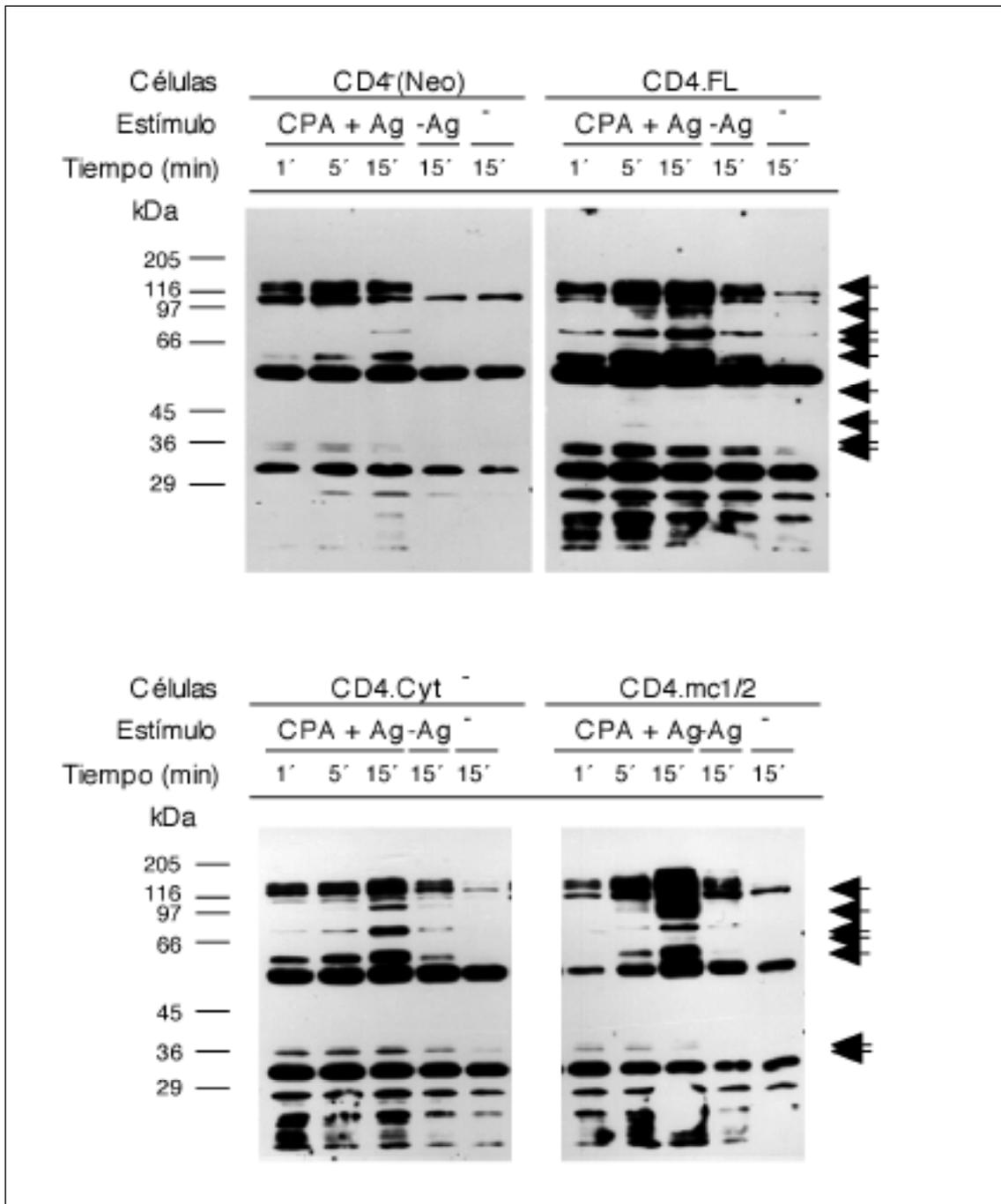


Figura 2. Cinética de fosforilación en tirosinas de proteínas celulares durante la respuesta a antígeno en transfectantes de CD4 de la línea Th2 murina SR.D10. Los transfectantes de vector solo (CD4-) o de construcciones de CD4 completo (FL), carentes de dominio citoplásmico (Cyt-), o con mutaciones en las cisteínas implicadas en la asociación con lck (mc1/2) fueron estimulados con células presentadoras (CPA) con o sin antígeno a los tiempos indicados. Los lisados celulares fueron separados en un gel de poliacrilamida al 10%, transferidos a membrana de PVDF y determinada la presencia de fosfotirosina con el anticuerpo 4G10. En el margen derecho se señala con flechas la posición de las principales proteínas fosforiladas.

mitiera una activación más eficiente de las tirosina-quinasas asociadas al TCR. Los resultados obtenidos en los ensayos de cinasa *in vitro* realizados en inmunoprecipitados de TCR y CD3 de SR.D10

apoyan un mecanismo de este tipo, ya que la ausencia de CD4 en estas células produce que las cadenas de CD3 y de la cinasa asociada a las mismas dejen de co-precipitar con el TCR (32). Este

cambio bien podría ser la multimerización del TCR dependiente de la oligomerización de CD4, tal como ha sido propuesto por Li y cols. (23). Para que se produzca esta oligomerización es necesario el reconocimiento del complejo péptido-MHC II por parte del TCR y la unión de CD4 a esa misma molécula de MHC II. A su vez, esta unión parece necesaria para una respuesta completa: así, en líneas linfocitarias Th1, donde la unión de CD4 al complejo TCR-péptido-MHC II genera un patrón de fosforilación en tirosina de tipo agonista, éste se transforma en agonista parcial cuando se impide esta unión utilizando moléculas de MHC II incapaces de unirse a CD4 (52). De forma similar, tras el tratamiento de SR.D10 con anticuerpo, sólo detectamos fosforilación en tirosina en cadenas de CD3 en células que expresan CD4 (53). Además, sólo la coagregación de CD3 y CD4 nos permite detectar la fosforilación de ζ en los precipitados de ZAP-70, tanto en células Th1 como en células Th2 (35).

Por último, CD4 se asocia con otras moléculas que pueden aportar tirosina-cinasas o que tienen capacidad de regular positivamente la actividad de las mismas. Una de las moléculas que se asocian a CD4 y pueden aportar actividad tirosina-cinasa es CD2 (54). En el proceso de fosforilación en tirosinas también podría jugar un papel importante CD45, puesto que en SR.D10 hay un alto nivel de expresión de la isoforma CD45RO (55) que, como se ha citado más arriba, colocaliza junto con CD4 (44). De esta forma, el reclutamiento de CD4 al complejo TCR-péptido-MHC II arrastraría CD45 que contribuiría a activar las tirosina-cinasas asociadas al TCR, tanto directamente como a través de la coagregación de CD4. La implicación de la región citoplásmica de CD4 en la asociación con CD45 ha sido intensamente estudiada por Bottomly y cols. con resultados variables, dependientes del sistema analizado: por ejemplo, en el timoma BW5147 AKR la colocalización de CD4 con CD45RO es independiente del dominio citoplásmico y de la asociación de lck a CD4, ya que sigue detectándose en transfectantes que expresan CD4Ti y CD4MCA (56), equivalentes a las construcciones CD4T1 y CD4mc1/2 utilizados en este trabajo. Este resultado apoyaría la idea de que, tras la estimulación antigénica, el reclutamiento de CD45 al TCR a través de CD4 depende exclusivamente de la región extracelular de ambas moléculas. Sin embargo, en linfocitos T CD4⁺ de ratón hay una asociación basal de CD45RO y CD45RB con el TCR, que aumenta tras la estimulación por antígeno. Este aumento es dependiente tanto de la expresión de CD4 como de su región citoplásmica, ya que no se produce en los linfocitos T CD4⁺ de ratones CD4⁻ o transgénicos para CD4d, que no asocia lck (43).

LA REGIÓN CITOPLÁSMICA DE CD4 EN LA FOSFORILACIÓN DE TIROSINAS

Parece evidente que la asociación de CD4 con lck contribuye decisivamente a los cambios en la fosforilación de tirosinas mediada por CD4. Esta asociación aporta una actividad tirosina-cinasa con muy buenos sustratos entre los componentes del complejo TCR/CD3, como son los ITAMs del dominio citoplásmico de las cadenas ζ y η , y posteriormente, ZAP-70 (29,57-60). Las consideraciones del apartado anterior acerca de la regulación de la cinasa asociada al TCR por la región extracelular de CD4 serían igualmente aplicables a la cinasa aportada por el propio CD4, en particular las referidas al papel de CD45 y a la oligomerización de CD4. Se sabe desde hace tiempo que el entrecruzamiento de CD4 por anticuerpos aumenta la actividad cinasa de la lck asociada (33) y, de igual forma, podría ocurrir tras la oligomerización inducida por antígeno. La coagregación CD4 con el TCR en respuesta al antígeno provocaría un aumento de la cinasa asociada al receptor, lo que podría explicar el adelantamiento que hemos observado en la fosforilación en tirosinas de las proteínas de 70, 75 y 95 kDa, posiblemente correspondientes a la cinasa ZAP-70, su sustrato el adaptador SLP-76 y el adaptador de nucleótidos de guanina Vav. En cambio, la fosforilación de los sustratos de 40-50 kDa es exclusivamente dependiente de la asociación de lck a CD4. Estas moléculas fosforiladas podrían corresponder a las diferentes isoformas de la molécula adaptadora Shc, que se asocia a ζ tras la activación del TCR y cuya fosforilación se ha mostrado dependiente de lck y ZAP-70 y de la coagregación del TCR con CD4 en el hibridoma By155.16 (61, 62).

La actividad cinasa de lck también es regulada por la unión de su dominio SH2 a otras proteínas fosforiladas. Así, en mutantes R¹⁵⁴K del dominio SH2 de lck, que pierden la capacidad de unirse a fosfoproteínas, se observan deficiencias en la fosforilación de proteínas totales y, en particular, de ζ y ZAP-70, ambas buenos sustratos de lck (63). Además, deja de observarse la coprecipitación de ZAP-70 con lck que se produce tras la activación del TCR (64-66). Acuto y cols. han identificado la Y³¹⁹ de ZAP-70 como la tirosina fosforilada que es reconocida por el dominio SH2 de lck, y han demostrado que el cambio de la secuencia que rodea a esta tirosina, (Y³¹⁹SDP), por la secuencia Y³¹⁹EEL, óptima para la unión de los dominios SH2 de las cinasas Src (67), aumenta la afinidad de la interacción y potencia la señalización del TCR (68). Basándose en estos hallazgos, Acuto propone un modelo de reclutamiento de CD4 al TCR de "dentro hacia afuera", dirigido por la interacción lck-ZAP-70, en el que la fosforilación de ZAP-70 serviría como anclaje para lck y situaría el CD4 asociado a la misma en la proximidad del TCR



(65). Nosotros hemos utilizado el mutante Y³¹⁹EEl de ZAP-70 para comprobar esta hipótesis en la línea SR.D10 (35). Hemos encontrado que, efectivamente, ZAP-70 coprecipita con CD4 en las células que expresan Y³¹⁹EEl. Sin embargo, la estimulación con antígeno no supone un gran aumento en la cantidad de cinasa coprecipitada. En ningún caso hemos podido detectar la coprecipitación en células infectadas con ZAP-70WT. Esto indica que el aumento de afinidad del dominio SH2 de lck por la secuencia YEEl introducida en ZAP-70 es suficiente para el "preacoplamiento" indirecto de CD4 al TCR, pero éste no aumenta tras la estimulación. La causa de que no se produzca este aumento puede ser que tras la estimulación entran en juego otras moléculas que interfieren en la interacción ZAP-70/lck/CD4, como pueden ser PLC, cuyo dominio SH2 también se ha descrito asociado a la Y³¹⁹ de ZAP-70 (69) o Erk, que se une a lck (70) e incluso, la lck no asociada a CD4, o la saturación del sistema, dadas las características de la secuencia utilizada (la de afinidad más alta por el dominio SH2 de lck). Por otro lado, este "preacoplamiento" tiene importantes consecuencias en los mecanismos efectores de los linfocitos T, como lo demuestra la potenciación que se produce en la producción de IL-4 en respuesta a antígeno en las células infectadas con ZAP-70YEEl (35).

Recientemente ha sido descrita una nueva interacción con la que CD4 contribuye a la señalización a través del TCR. Se trata de la asociación de la proteína adaptadora p36 LAT (*Linker of Activated T cells*) a la región citoplásmica de CD4 y CD8, en la que interviene el mismo par de cisteínas que están implicadas en la asociación de lck (13), por lo que la asociación CD4-LAT es excluyente con la interacción CD4-lck. Esta asociación facilita un mecanismo por el que el reconocimiento antigénico permite la localización en el mismo entorno de la cinasa ZAP-70 y su sustrato LAT.

CD4 EN LA ACTIVACIÓN DE MAP CINASAS

La otra señal intracelular que hemos analizado en transfectantes de CD4 ha sido la cinética de activación de las isoformas de la MAP cinasa Erk. Las MAP cinasas intervienen en la regulación de múltiples procesos de diferenciación y activación de los seres vivos. La importancia de Erk en la activación de los linfocitos T se ha demostrado claramente en modelos de diferenciación tímica, en los cuales la manipulación genética de las proteínas que preceden a Erk en la cascada de activación altera los procesos de selección positiva en el timo (71-74). Estos resultados han sido confirmados recientemente en los ratones *knock-out* para Erk1 (75). Por otra parte, el estudio de los mecanismos de inducción de anergia ha revelado que en células anérgicas se produce un bloqueo de la vía de

activación de Ras-MAP cinasas (76,77). Por último, el análisis de las respuestas a ligandos agonistas y agonistas parciales ha mostrado que, aunque en ambos casos se produce la activación de Erk, ésta se mantiene durante más tiempo en el caso de los ligandos agonistas (78). Sin embargo, recientemente Germain y cols. han propuesto un modelo en el que la cinética de activación de Erk para los ligandos agonistas es más rápida que para los agonistas parciales o antagonistas (79). En este modelo está implicada lck y se basa en la competición entre el reclutamiento de la fosfotirosina-fosfatasa SHP-1 al dominio SH2 de lck tras la activación y la fosforilación por Erk de la S⁵⁹ de lck (80), que modificaría el sitio de unión de SHP-1 a lck e impediría su interacción.

En el sistema de SR.D10, la estimulación con antígeno de células CD4⁻ produce una rápida activación de Erk que decae a partir de los 5 min de estimulación, mientras que en las que expresan CD4 la activación es más lenta, pero se produce una acumulación de las formas activas durante más tiempo, independientemente de la forma de CD4 expresada (Fig. 3). Esta acumulación se debe sobre todo a la isoforma Erk1. Estas diferencias en la cinética de activación de Erk se asemejan a lo observado por Madrenas y cols. en la respuesta a ligandos agonis-

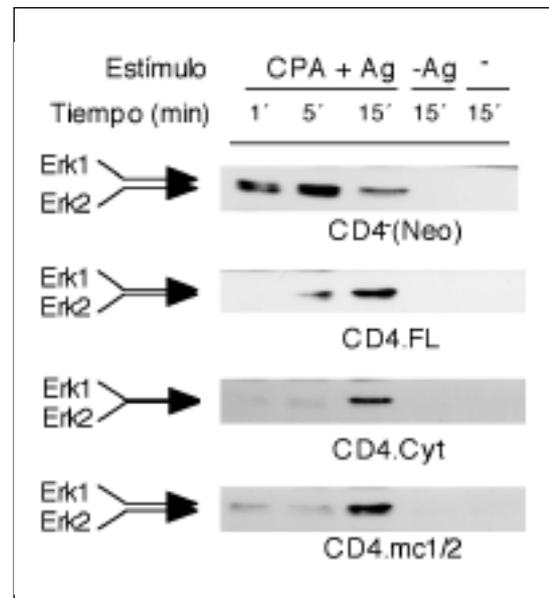


Figura 3. Cinética de activación de Erk en transfectantes de CD4 en respuesta a antígeno. Los distintos transfectantes de CD4 descritos en la Figura 2 fueron estimulados con células presentadoras (CPA) con o sin antígeno a los tiempos indicados. Los lisados de las células así estimuladas se separaron en un gel de poliacrilamida al 10%, se transfirieron a PVDF y se determinó la presencia de Erk activado con anticuerpos específicos frente a formas activas, fosforiladas, de Erk (anti-activa MAPK, Promega).

tas y agonistas parciales de un clon Th1. En este sistema, la respuesta de tipo agonista es dependiente de la proximidad de CD4 y el TCR (52), y genera una cinética de activación de Erk en la que la relación entre las formas activas de Erk1 y Erk2 decrece más lentamente que en la respuesta a ligandos agonistas parciales (78). Recientemente, hemos analizado la cinética de activación de Jun cinasa (JNK), implicada en otra importante vía de transducción de señales en linfocitos T, con resultados muy semejantes a los obtenidos en la activación de Erk; es decir, una activación temprana y limitada en células CD4⁻ y una activación más prolongada en células que expresan CD4 (Rojo y cols., datos no publicados).

Por último, hemos estudiado la participación de CD4 en las funciones efectoras de SR.D10 analizando la producción de IL-4 de los distintos mutantes de CD4 en respuesta a antígeno. La producción de IL-4 depende en gran medida de la asociación CD4/lck, aunque los defectos son parcialmente compensados por un alto nivel de expresión de CD4 (Fig. 4). El requerimiento de la asociación CD4/lck para una respuesta óptima a antígeno ha sido confirmado en las células infectadas con ZAP-70 modificado, en las que se produce una pre-asociación de CD4 a ZAP-70. Esta asociación está mediada por lck y potencia fuertemente la producción de IL-4 (35).

Los análisis previos de otros laboratorios acerca de la asociación CD4/lck realizados en distintos

hibridomas T y líneas transformadas, cuya proliferación es independiente de antígeno, han basado la valoración de la activación a través del TCR en respuesta a antígeno en la producción de IL-2. Estos estudios han proporcionado resultados diferentes, de acuerdo con el hibridoma utilizado: así, los primeros datos obtenidos en el hibridoma 171 mostraron una dependencia de la asociación de CD4 a la cinasa (81) mientras que en estudios posteriores en los hibridomas KR3 y BI83 la producción de IL-2 era independiente de tal asociación (82). Estas diferencias han sido explicadas en función de la distinta naturaleza del TCR y de la afinidad del TCR por su ligando, de modo que la asociación de lck a CD4 sería necesaria en caso de que la afinidad del TCR por su ligando fuese baja, mientras que en los casos con una afinidad mayor bastaría la región extracelular para inducir una conformación más activa del TCR (82). En nuestro caso, la comparación entre los resultados obtenidos con un ligando de alta afinidad por el TCR, como el anticuerpo 3D3 (la producción de IL-4 es independiente de la asociación CD4/lck) (35), con los obtenidos con el ligando natural de mucha menor afinidad (la producción de IL-4 es dependiente de la asociación), parece confirmar esta hipótesis. En cuanto a la naturaleza de los cambios conformacionales aludidos, son aplicables los argumentos expuestos anteriormente relativos al efecto de la presencia de CD4 sobre la cinética de activación de la cinasa asociada al TCR. De esta forma, el adelantamiento de la cinética se reflejaría en una potenciación de la producción de IL-4. A este respecto, son interesantes los datos aportados por Sleckman y cols. (83) sobre el defecto en la producción de IL-2 que se produce en células que expresan un CD4 que carece de región citoplásmica. En el hibridoma murino utilizado en dicho estudio, la respuesta al antígeno expresado en células presentadoras no depende de la asociación CD4/lck sino de la cantidad de CD4 expresada (83), al igual que ocurre en nuestro sistema con la estimulación con anticuerpo. Sin embargo, la respuesta al antígeno presentado sobre liposomas, un sistema menos eficaz de estimulación, depende de la asociación de lck a CD4 aunque se compensa en parte en las células con alto nivel de expresión de CD4, de forma similar a lo observado en nuestros mutantes de CD4 en la respuesta a antígeno.

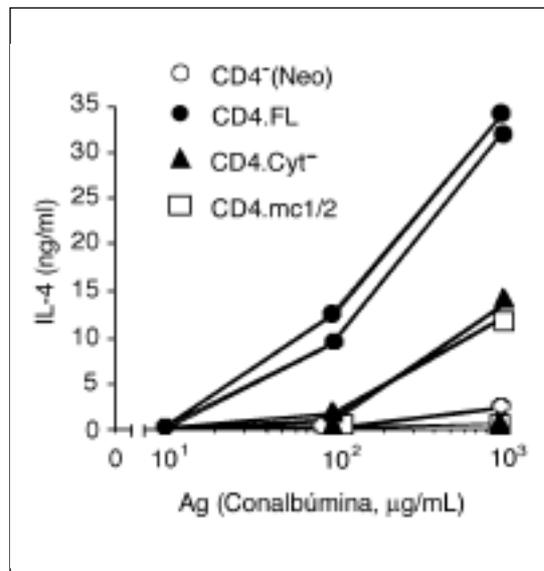


Figura 4. Producción de IL-4 por transfectantes de CD4 en respuesta a antígeno. Las células de los clones evaluados se incubaron con células presentadoras de antígeno de la línea TAK y antígeno (Ag, conalbúmina) a las concentraciones indicadas. A las 24 h de cultivo se recogió el sobrenadante y se cuantificó el contenido en IL-4 de los sobrenadantes de los cultivos mediante ELISA.

CONTRIBUCIÓN DE CD4 A LA INTERACCIÓN TCR-LIGANDO

Para explicar la señalización inducida por el reconocimiento de un ligando por el TCR se han propuesto dos tipos de modelos. Por un lado, los modelos basados en cambios conformacionales del receptor, según los cuales la señalización sería debida al cambio conformacional provocado en el receptor por el reconocimiento antigénico (84,



85). Dentro de este grupo se incluirían también aquellos que proponen la agregación de los receptores como mecanismo iniciador de la señalización (23,86,87). Por otro lado, los modelos cinéticos propugnan que la activación del receptor se produciría una vez que se completan una serie de pasos, principalmente ligados a la acumulación de intermediarios fosforilados (88, 89). Los resultados mostrados aquí y los de diferentes trabajos muestran que estos dos grupos de modelos no son excluyentes sino complementarios.

¿Cuál sería la contribución de las distintas formas de CD4 a la señalización del TCR según estos modelos? (Fig. 5). La región extracelular de CD4

es suficiente para mantener el cambio conformacional del TCR mediado por el reconocimiento antigénico. Este cambio conformacional estaría referido, más que a la transmisión de un cambio en la región de reconocimiento antigénico del TCR, a la disposición de los componentes del complejo TCR/CD3, como hemos propuesto recientemente para explicar las diferencias de reconocimiento por anticuerpos anti-CD3 en distintas líneas CD4⁺ murinas (90), y sugieren los datos que indican que la interacción entre el TCR y las cadenas de CD3 es más fuerte en las células que expresan CD4. Esta disposición del complejo permite que los ligandos del TCR puedan activar de forma más eficiente las

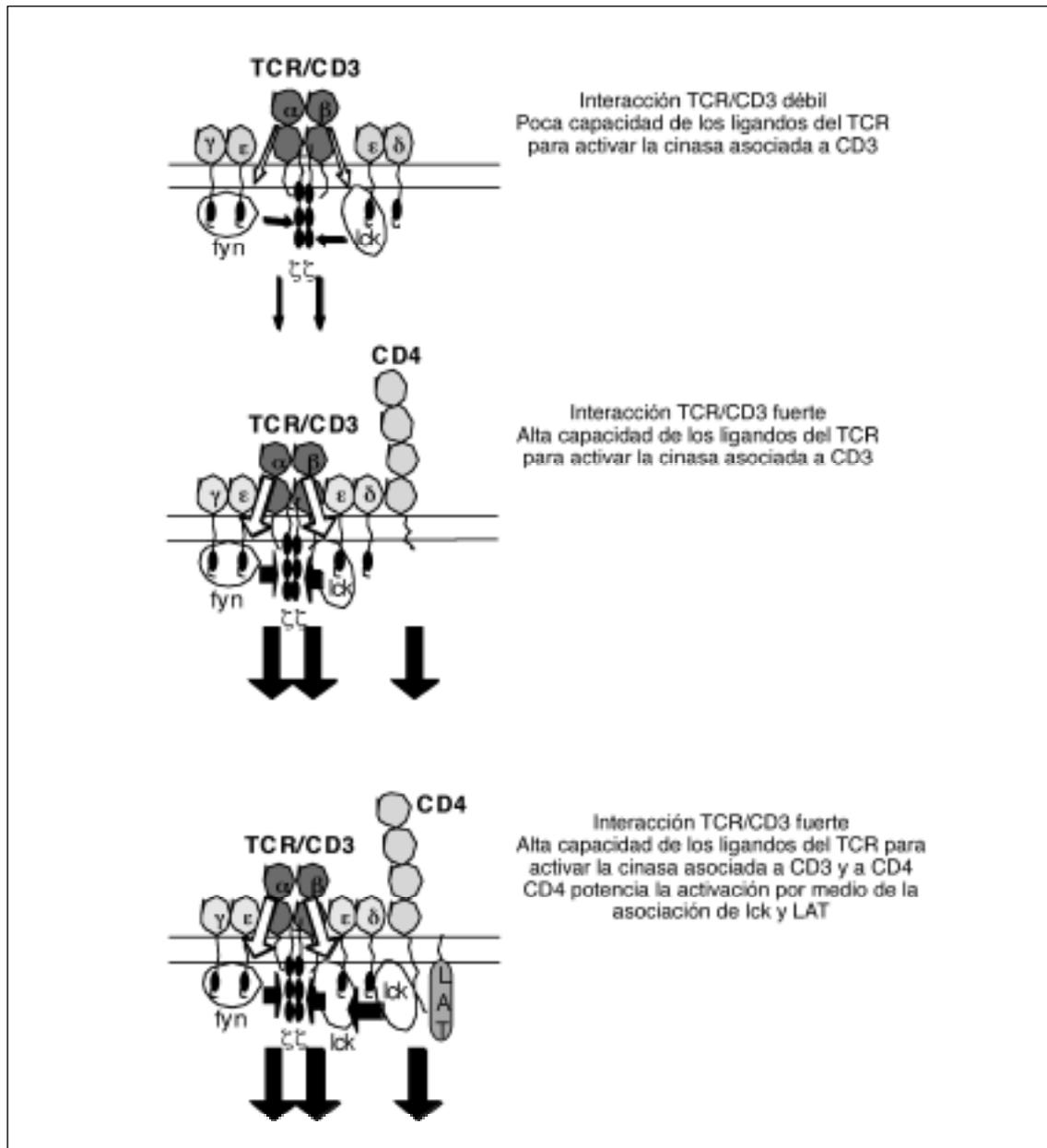


Figura 5. Representación esquemática de la contribución diferencial de las distintas regiones de CD4 a la activación a través del TCR.



cinastas asociadas a CD3 y modifiquen la cinética de la señalización intracelular, manteniendo durante más tiempo la fosforilación en tirosinas y la activación de rutas como la de la MAP cinasa Erk. De esta forma, aumenta el intervalo de tiempo en el que se acoplan los distintos pasos de la activación propuestos por los modelos cinéticos. La asociación de lck a la región intracelular de CD4 actúa de forma sinérgica con la región extracelular, acelerando dicha cinética y permitiendo que se completen los pasos de activación antes de que cese la interacción del TCR con su ligando, responsable del cambio conformacional. En el caso de que esta interacción sea débil la aportación de la lck asociada a CD4 puede ser limitante, mientras que si la interacción es lo suficientemente fuerte podría mantenerse el tiempo suficiente para completar la secuencia de activación sin la intervención de la lck aportada por CD4.

En resumen, los datos presentados aquí y los de trabajos anteriores demuestran que CD4 potencia la activación a través del TCR. La aportación de las distintas regiones de CD4 a esta potenciación depende de las diferencias en la eficiencia de los sistemas de activación. Estas diferencias son debidas a distintos parámetros, como la afinidad del TCR por el ligando (anticuerpo frente a antígeno), el reconocimiento de ligandos peptídicos alterados o no (agonistas frente a agonistas parciales), la presencia de otras moléculas coestimuladoras adicionales (células completas frente a liposomas) o la densidad del antígeno (alta frente a baja). Cuando la eficiencia del sistema activador es alta, como en el caso del anticuerpo 3D3, basta la aportación de la región extracelular de CD4 para potenciar la respuesta. En sistemas con menor eficacia activadora, como en el caso del antígeno, es necesaria la asociación de lck a CD4.

AGRADECIMIENTOS

Gabriel Criado ha sido Becario predoctoral del Ministerio de Educación y Cultura y del Fondo de Investigación Sanitaria. Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Sanidad y Consumo a través del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (proyecto FIS 98/0037-CO2-01).

CORRESPONDENCIA

José María Rojo
Departamento de Inmunología
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC
Velázquez, 144, E
28006 Madrid.
Tel: 91-561 18 00 (Ext. 4217)
e-mail: jmrojo@cib.csic.es

Bibliografía

1. Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Schlossman SF. Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 4061-4065.
2. Maddon PJ, Molineaux SM, Maddon DE, Zimmerman KA, Godfrey M, Alt FW, Chess L, Axel R. Structure and expression of the human and mouse T4 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 9155.
3. Turner JM, Brodsky MH, Irving BA, Levin SD, Perlmutter RM, Littman DR. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* 1990; 60: 755-765.
4. Shin J, Dunbrack RL, Lee S, Strominger JL. Phosphorylation-dependent down-modulation of CD4 requires a specific structure within the cytoplasmic domain of CD4. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 10658-10665.
5. Moebius U, Clayton LK, Abraham S, Harrison SC, Reinherz EL. The human immunodeficiency virus gp120 binding site on CD4: Delineation by quantitative equilibrium and kinetic binding studies of mutants in conjunction with a high-resolution CD4 atomic structure. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 507-517.
6. Moebius U, Clayton LK, Abraham S, et al. Human immunodeficiency virus gp120 C' ridge of CD4 domain 1 is also involved in interaction with class II major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 12008-12112.
7. Fleury S, Lamarre D, Meloche S, Ryu SE, Cantin C, Hendrickson WA, Sekaly RP. Mutational analysis of the interaction between CD4 and class II MHC: Class II antigens contact CD4 on a surface opposite the gp120-binding site. *Cell* 1991; 66: 1037-1049.
8. Salghetti S, Mariani R, Skowronski J. Human immunodeficiency virus type 1 Nef and p56lck protein tyrosine kinase interact with a common element in CD4 cytoplasmic tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 349-353.
9. Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, Yoshie O. Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82. *J. Immunol.* 1995; 155: 1229-1239.
10. Huang B, Yachou A, Fleury S, Hendrickson WA, Sekaly R-P. Analysis of the contact sites on the CD4 molecule with class II MHC molecule. Co-ligand versus co-receptor function. *J. Immunol.* 1997; 158: 216-225.
11. Wu H, Kwong PD, Hendrickson WA. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* 1997; 387: 527-530.
12. Liu Y, Cruikshank WW, O'Loughlin T, et al. Identification of a CD4 domain required for IL-16 binding and lymphocyte activation. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 23387-23395.
13. Bosselut R, Zhang W, Ashe JM, et al. Association of the adaptor molecule LAT with CD4 and CD8 coreceptor identifies a new coreceptor function in T cell receptor signal transduction. *J. Exp. Med.* 1999; 190: 1517-1525.
14. Doyle C, Strominger JL. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 1987; 330: 256-259.
15. Clayton LK, Sieh M, Pious DA, Reinherz EL. Identification of human CD4 residues affecting class II MHC versus HIV-1 gp120 binding. *Nature* 1989; 339: 548-551.
16. Lamarre D, Ashkenazi A, Fleury S, et al. The MHC-binding and gp120-binding functions of CD4 are separable. *Science* 1989; 245: 743-746.
17. Ryu SE, Kwong PD, Truneh A, Porter TG, Arthos J, Rosenberg M, Dai X, Xuong N, Axel R, Sweet RW, Hendrickson WA. Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4. *Nature* 1990; 348: 419-426.



18. Wang J, Yan Y, T.P.J. G, Liu J, Rodgers DW, Garlick RL, Tarr GE, Husain Y, Reinherz E, Harrison SC. Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature* 1990; 348: 411-418.
19. Sakihama T, Smolyar A, Reinherz EL. Oligomerization of CD4 is required for stable binding to class II major histocompatibility complex proteins but not for interaction with human immunodeficiency virus gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 6444-6448.
20. Sakihama T, Smolyar A, Reinherz EL. Molecular recognition of antigen involves lattice formation between CD4, MHC class II and TCR molecules. *Immunol. Today* 1995; 16: 581-587.
21. König R, Shen X, Germain RN. Involvement of both major histocompatibility complex class II a and b chains in CD4 function indicates a role for ordered oligomerization in T cell activation. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 779-787.
22. Brown JR, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364: 33-39.
23. Li S, Satoh T, Korngold R, Huang Z. CD4 dimerization and oligomerization: implications for T-cell function and structure-based drug design. *Immunol. Today* 1998; 19: 455-462.
24. Olshevsky U, Helseth E, Furman C, et al. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 aminoacids important for CD4 binding. *J. Virol.* 1990; 64: 5701-5707.
25. Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol. Today* 1996; 17: 476-481.
26. Shaw AS, Chalupny JA, Whitney C, et al. Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the aminoterminal domain of the p56lck tyrosin protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 1990; 10: 1853-1862.
27. June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA, Samelson LE. Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J. Immunol.* 1990; 144: 1591-1599.
28. Gauen LKT, Zhu Y, Letourneur F, Hu Q, Bolen JB, Matis LA, Klausner RD, Shaw AS. Interactions of p59fyn and ZAP-70 with T-cell receptor activation motifs: Defining the nature of a signalling motif. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14: 3729-3741.
29. van Oers NSC, Killeen N, Weiss A. Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 1053-1062.
30. Samelson L, Phillips AF, Luong ET, Klausner RD. Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 4358-4362.
31. Criado G, Feito MJ, Rojo JM. CD4-dependent and -independent association of protein tyrosine kinases to the TcR/CD3 complex of CD4+ mouse T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 1228-1234.
32. Díez-Orejas R, Ballester S, Feito MJ, Ronda M, Ojeda G, Criado G, Portolés P, Rojo JM. Genetic and immunochemical evidence for CD4-dependent association of p56lck with the ab T-cell receptor (TCR): regulation of TCR-induced activation. *EMBO J.* 1994; 13: 90-99.
33. Luo K, Sefton BM. Cross-linking of T-cell surface molecules CD4 and CD8 stimulates phosphorylation of the lck tyrosine protein kinase at the autophosphorylation site. *Mol. Cell. Biol.* 1990; 10: 5305-5313.
34. Julius M, Maroun CR, Haughn L. Distinct roles for CD4 and CD8 as co-receptors in antigen receptor signalling. *Immunol. Today* 1993; 14: 177-183.
35. Criado G. Análisis del papel de CD4 murino en la activación de los linfocitos T: Funciones dependientes e independientes de tirosina-cinasas. Tesis Doctoral, Universidad. Complutense de Madrid. 2000.
36. Hatakeyama M, Kono T, Kobayashi N, Kawahara A, Levin SD, Perlmutter RM, Taniguchi T. Interaction of the IL-2 receptor with the src-family kinase p56lck: Identification of novel intermolecular association. *Science* 1991; 252: 1523-1528.
37. Stefanová I, Horejsí V, Ansotegui Ij, Knapp W, Stockinger H. GPI-Anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science* 1991; 254: 1016-1019.
38. Cerny J, Stockinger H, Horejsi V. Noncovalent associations of T lymphocyte surface proteins. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 2335-2343.
39. Okada M, Nada S, Yamanashi NY, Yamamoto T, Nakagawa H. CSK: A protein-tyrosine kinase involved in regulation of Src family kinases. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 24249-24252.
40. Bougeret C, Delaunay T, Romero F, Jullien P, Sabe H, Hanafusa H, Benarous R, Fischer S. Detection of a physical and functional interaction between Csk and Lck which involves the SH2 domain of Csk and is mediated by autophosphorylation of Lck on tyrosine 394. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 7465-7472.
41. Mustelin T, Coggeshall KM, Altman A. Rapid activation of the T-cell tyrosine protein kinase pp56lck by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 6302-6306.
42. Ross SE, Schraven B, Goldman FD, Crabtree J, Koretzky GA. The association between CD45 and lck does not require CD4 or CD8 and is independent of T cell receptor stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1994; 198: 88-96.
43. Leitenberg D, Boutin Y, Lu DD, Bottomly K. Biochemical association of CD45 with the T cell receptor complex: Regulation by CD45 isoform and during T cell activation. *Immunity* 1999; 10: 701-711.
44. Dianzani U, Luqman M, Rojo J, Yagi J, Baron JL, Woods A, Janeway CA, Bottomly K. Molecular associations on the T cell surface correlate with immunological memory. *Eur. J. Immunol.* 1990; 20: 2249-2257.
45. Janeway Jr. CA. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 Co-receptors and CD45 in T cell activation. *Ann. Rev. Immunol.* 1992; 10: 645-674.
46. Luescher IF, Vivier E, Layer A, Mablou J, Godeau F, Malissen B, Romero P. CD8 modulation of T cell receptor ligand interactions on living cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1995; 373: 353-356.
47. García KC, Scott CA, Brunmark A, Carbone FR, Peterson PA, Wilson IA, Teyton L. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* 1996; 384: 577-581.
48. Weber S, Karjalainen K. CD4 binds MHC class II with extremely low affinity. *Int. Immunol.* 1992; 5: 695-698.
49. Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, Chien Y. Ligand recognition by ab T cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16: 523-544.
50. Crawford F, Kozono H, White J, Marrack P, Kappler J. Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II MHC covalent peptide complexes. *Immunity* 1998; 8: 675-682.
51. Hamad ARA, O'Herrin SM, Lebowitz MS, Srikrishnan A, Bieler J, Schneck J, Pardoll D. Potent T cell activation with dimeric peptide-major histocompatibility complex class II ligand: The role of CD4 coreceptor. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 1633-1640.
52. Madrenas J, Chau LA, Smith J, Bluestone JA, Germain RN. The efficiency of CD4 recruitment to ligand-engaged TCR controls the agonist/partial agonist properties of peptide-MHC molecule ligands. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 219-229.
53. Feito MJ, Ballester S, Díez-Orejas R, Ojeda G, Criado G, Portolés P, Rojo JM. CD4 dependence of activation



- threshold and TcR signaling in mouse T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 1997; 45: 166-174.
54. Feito MJ, Criado G, Rojo JM. Aspectos cuantitativos y cualitativos de la coestimulación mediada por CD2. *An. Real Acad. Farmacia* 1998; 64: 469-498.
 55. Ojeda G, Ronda M, Ballester S, Díez-Orejas R, Feito MJ, García-Albert L, Rojo JM, Portolés P. A hyperreactive variant of a CD4+ T cell line is activated by syngeneic antigen presenting cells in the absence of antigen. *Cell. Immunol.* 1995; 164: 265-278.
 56. Leitenberg D, Novak TJ, Farber D, Smith BR, Bottomly K. The extracellular domain of CD45 controls association with the CD4-T cell receptor complex and the response to antigen-specific stimulation. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 249-259.
 57. Watts JD, Affolter M, Krebs DL, Wange RL, Samelson LE, Aebersold R. Identification by electrospray ionization mass spectroscopy of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 29520-29529.
 58. Iwashima M, Irving BA, van Oers NSC, Chan AC, Weiss A. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 1994; 263: 1136-1139.
 59. Letourneur F, Klausner RD. Activation of cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 e. *Science* 1992; 255: 79-82.
 60. Chan AC, Dalton M, Johnson R, Kong G, Wang T, Thoma R, Kurosaki T. Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* 1995; 14: 2499-2508.
 61. Ravichandran KS, Lee KK, Songyang Z, Cantley LC, Burn P, Burakoff SJ. Interaction of Shc with the z chain of the T cell receptor upon T cell activation. *Science* 1993; 262: 902-905.
 62. Walk SF, March ME, Ravichandran KS. Roles of Lck, Syk and ZAP-70 tyrosine kinases in TCR-mediated phosphorylation of the adapter protein Shc. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 2265-2275.
 63. Xu H, Littman DR. A kinase-independent function of Lck in potentiating antigen-specific T cell activation. *Cell* 1993; 74: 633-643.
 64. Straus DB, Chan AC, Patai B, Weiss A. SH2 domain function is essential for the role of the Lck tyrosine kinase in T cell receptor signal transduction. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 9976-9981.
 65. Thome M, Duplay P, Guttinger M, Acuto O. Syk and ZAP-70 mediate recruitment of p56lck/CD4 to the activated T cell receptor/CD3/z complex. *J. Exp. Med.* 1995; 181: 1997-2006.
 66. Duplay P, Thome M, Hervé F, Acuto O. p56lck interacts via its src homology 2 domain with the ZAP-70 kinase. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 1163-1172.
 67. Songyang Z, Shoelson SE, McGlade J, Olivier P, Pawson T, Bustelo XR, Barbacid M, Sabe H, Hanafusa H, Yi T, Ren R, Baltimore D, Ratnofsky S, Feldman RA, Cantley LC. Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, Syk, and Vav. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14: 2777-2785.
 68. Pelosi M, Di Bartolo V, Mounier V, Mège D, Pascucci J-M, Dufour E, Blondel A, Acuto O. Tyrosine 319 in the interdomain B of ZAP-70 is a binding site for the Src homology 2 domain of Lck. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 14229-14237.
 69. Williams BL, Irving BJ, Sutor SL, Chini CSC, Yacyshyn E, Bubeck-Wandenburg J, Dalton M, Chan AC, Abraham RT. Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for antigen receptor dependent phospholipase C-g1 and Ras activation. *EMBO J.* 1999; 18: 1832-1844.
 70. August A, Dupont B. Association between Mitogen-Activated Protein kinase and the z chain of the T cell receptor (TcR) with the SH2, 3 domain of p56lck. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 10054-10059.
 71. Alberola-Ila J, Forbush KA, Seger R, Krebs EG, Perlmutter RM. Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* 1995; 373: 620-623.
 72. Alberola-Ila J, Hogquist KA, Swan KA, Bevan MJ, Perlmutter RA. Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 9-18.
 73. Crompton T, Gilmour KC, Owen MJ. The MAP kinase controls differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. *Cell* 1996; 86: 243-251.
 74. Swan KA, Alberola-Ila J, Gross JA, Appleby MW, Forbush KA, Thomas JF, Perlmutter RM. Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes. *EMBO J.* 1995; 14: 276-285.
 75. Pagès G, Guèrin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auburger P, Poyssegès J. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) Knockout mice. *Science* 1999; 286: 1374-1377.
 76. Li W, Whaley CD, Mondino A, Mueller DL. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4+ T cells. *Science* 1996; 271: 1272-1276.
 77. Fields PE, Gajewski TE, Fitch FW. Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells. *Science* 1996; 271: 1276-1278.
 78. Chau LA, Bluestone JA, Madrenas J. Dissociation of intracellular signaling pathways in response to partial agonist ligands of the T cell receptor. *J. Exp. Med.* 1998; 187: 1699-1709.
 79. Germain RN, Stefanová I. The dynamics of T cell receptor signaling: Complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17: 467-522.
 80. Winkler DG, Park I, Kim T, Payne NS, Walsh CT, Strominger JL, Shin J. Phosphorylation of Ser-42 and Ser-59 in the N-terminal region of the tyrosine kinase p56lck. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 5176-5180.
 81. Glaichenhaus N, Shastri N, Littman DR, Turner JM. Requirement for association of p56lck with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells. *Cell* 1991; 64: 511-520.
 82. Zerbib AC, Reske-Kunz AB, Lock P, Sékaly R-P. CD4-mediated enhancement or inhibition of T cell activation does not require the CD4:p56lck association. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 1973-1983.
 83. Sleckman BP, Peterson A, Foran JA, Gorga JC, Kara CJ, Strominger JL, Burakoff SJ, Greenstein JL. Functional analysis of a cytoplasmic domain-deleted mutant of the CD4 molecule. *J. Immunol.* 1988; 141: 49-54.
 84. Janeway Jr. CA, Rojo J, Saizawa K, Dianzani U, Portolés P, Tite J, Haque S, Jones B. The co-receptor function of murine CD4. *Immunol. Rev.* 1989; 109: 77-92.
 85. Janeway Jr. CA. Ligands for the T-cell receptor: hard times for avidity models. *Immunol. Today* 1995; 16: 223-225.
 86. Boniface JJ, Rabinowitz JD, Wülfing C, Hampl J, Reich Z, Altman JD, Kantor RM, Beeson C, McConnel HM, Davis MM. Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the peptide multivalent engagement of MHC ligands. *Immunity* 1998; 9: 459-466.
 87. Reich Z, Boniface JJ, Lyons DS, Borochoy N, Wachtel EJ, Davis MM. Ligand-specific oligomerization of T-cell receptor molecules. *Nature* 1997; 387: 617-620.
 88. Lanzavecchia A, Iezzi G, Viola A. From TCR engagement to T cell activation: A kinetic view of T cell behavior. *Cell* 1999; 96: 1-4.
 89. McKeithan TW. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 5042-5046.
 90. Criado G, Feito MJ, Ojeda G, Sánchez A, Janeway Jr CA, Portolés P, Rojo JM. Variability of invariant mouse CD3e chains detected by anti-CD3 antibodies. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30: 1469-1479.

