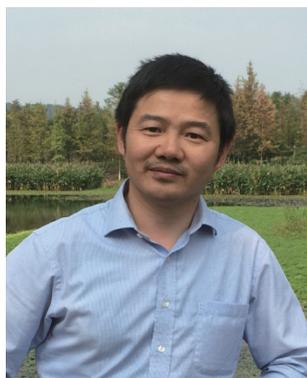


DOI: 10.13376/j.cbls/2016022

文章编号: 1004-0374(2016)02-0153-09



鲁林荣, 浙江大学求是特聘教授, 国家杰出青年科学基金获得者, 科技部中青年科技创新领军人才。现任中国免疫学会感染免疫学分会常委委员、浙江大学学术委员会青年委员,《中国免疫学杂志》和 *AJCEI* 等杂志编委。致力于 T 细胞发育分化和免疫调节的分子机制研究, 主要研究工作包括: (1) NK 细胞调节 CD4⁺ T 细胞活化和适应性免疫反应; (2) Qa1- 限制性 CD8⁺ 调节性 T 细胞的调控机制及其在维持免疫耐受中的作用; (3) *Tespa1* 在 T 细胞受体信号转导和 T 细胞阳性选择中的调控作用。研究成果发表在 *Nat Immunol*、*Immunity* 和 *J Exp Med* 等免疫学顶尖杂志。研究工作受到了 Faculty 1000、*Nat Immunol* 和 *Immunity* 杂志社专刊的正面评价, 成果入围“浙江大学 2012 年十大学术进展”。

T 细胞受体(TCR)信号传递的调控及其功能

梁静静, 吕俊, 鲁林荣*

(浙江大学医学院免疫学研究所, 杭州 310058)

摘要: T 细胞受体介导的 T 细胞活化在胸腺 T 细胞发育、T 细胞亚群分化以及效应 T 细胞功能发挥过程中均起着至关重要的作用。TCR 能特异性识别抗原提呈细胞表面 MHC 提呈的抗原肽 (peptide), 并将胞外识别转化成可向细胞内部传递的信号, 通过诱导 TCR 邻近酪氨酸激酶活化, 促进信号传递复合物组装, 活化下游 MAPK、PKC 以及钙离子等信号途径, 最终活化相应的转录因子, 调控效应蛋白分子的表达, 完成 T 细胞的活化。TCR 信号传递过程受到不同类型调控分子的调控, 这些具有调控功能的分子形成了一个复杂的调控网络来精细调控 TCR 信号的起始、强度及终止。

关键词: TCR 信号; 调控; 机制; 细胞效应

中图分类号: Q257; R392 **文献标志码:** A

The regulation and function of TCR signaling pathway

LIANG Jing-Jing, LV Jun, LU Lin-Rong*

(Institute of Immunology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Activation of T cells through the T cell antigen receptor (TCR) is essential for thymocyte development, T cells differentiation and the effector function of T cell. TCR associates with the MHC-peptide complex on the surface of antigen presenting cells, and transfer the signals into T cells, which includes the activation of proximal tyrosine kinases, the assembly of signaling complexes, and the induction of downstream MAPK, PKC and calcium signaling pathways. These signals activate transcription factors such as NFAT, NF- κ B and AP-1, which induce the expression of important cytokines and proteins, essential for the activation of T cells. TCR signaling pathway is deliberately regulated by a complicated network which consist a spectrum of regulatory molecules. In this review,

收稿日期: 2015-02-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31325009)

*通信作者: E-mail: lu_linrong@zju.edu.cn, lu.linrong@gmail.com; Tel: 0571-88981173

we focus on the latest research progresses in the regulation of TCR signaling and different cellular effector function mediated by this signaling pathway.

Key words: TCR signaling; regulation; mechanism; effector function

1 TCR信号起始及传递

TCR(T 细胞受体, T cell receptor) 是 T 细胞表面受体, 负责识别由 APC (抗原提呈细胞, antigen presenting cell) 表面 MHC (主要组织相容性复合物, major histocompatibility complex) 所提呈的特异性抗原肽, 形成 TCR-pMHC complex (TCR-抗原肽-MHC 复合物, TCR-peptide-MHC complex)。APC 表面的 MHC 分子包括 MHC II 类和 MHC I 类分子, 分别被 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞表面相应的辅助受体 CD4 和 CD8 分子特异性识别^[1-2]。这些分子间相互特异性的结合, 以及随后发生的共刺激分子、整合素等介导的细胞-细胞间相互作用, 在 T 细胞和 APC 之间形成 immune synapse (免疫突触), 引起下游信号通路的活化。TCR 活化的典型胞内信号包括 MAPK (丝裂原活化蛋白激酶, mitogen-activated protein kinases)、PKC (蛋白激酶 C, protein kinase C) 以及 calcium (钙离子) 等信号通路。这些信号的活化最终激活 T 细胞的特异性基因表达, 引起细胞的增殖, 并使得 T 细胞分化成效应 T 细胞^[3]。

TCR 是由两条不同肽链构成的异二聚体: 约 95% 的 T 细胞为 $\alpha\beta$ T 细胞, 其 TCR 由 alpha(α) 和 beta(β) 链构成; 其余 5% 的 T 细胞为 $\gamma\delta$ T 细胞, 表面表达 gamma(γ) 和 delta(δ) 链组成的 TCR。TCR 每条肽链都分为 4 个区域: 可变区 (V 区)、恒定区 (C 区)、跨膜区和胞质区。TCR 的胞质区很短, 无法独立传递信号, 因此, 以非共价形式与 CD3 形成复合物。每个 TCR/CD3 复合物, 包括 1 条 CD3 γ 链、1 条 CD3 δ 链、2 条 CD3 ϵ 链和 2 条 CD3 ζ 链。TCR α 与 CD3 δ -CD3 ϵ 二聚体非共价连接, TCR β 与 CD3 γ -CD3 ϵ 二聚体非共价连接, 2 条 CD3 ζ 链形成二聚体^[4-6]。CD3 的胞质区含有多个 ITAM (免疫受体酪氨酸激活基序, immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 位点, 其中 γ 、 δ 和 ϵ 胞质区分别含有 1 个 ITAM, 而 ζ 链含有 3 个 ITAMs。ITAM 是一段约 18 个氨基酸组成的比较保守的序列 (YXXL/IX_{6,8}YXXL/I), 序列中的两个酪氨酸 (Y) 的磷酸化在 TCR 信号传递中起着不可或缺的作用^[5]。

TCR 诱导的胞内信号起始于 CD3 分子 ITAM 序列中酪氨酸的磷酸化。TCR-pMHC complex 形成之

后, 能导致 PTKs (蛋白酪氨酸激酶, protein tyrosine kinases) 活化, 包括 Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase)、Fyn (proto-oncogene tyrosine-protein kinase)、ZAP-70 (ζ chain associated protein kinase of 70 kDa)、ITK (IL2-inducible T-cell kinase) 等。其中 Lck 是最先活化的激酶。Lck 结合在 T 细胞内 CD4 和 CD8 分子的胞质区, 且在静息 T 细胞内就处于持续磷酸化 (活化) 的状态^[7], 并随着 CD4 或者 CD8 被招募到 TCR-pMHC complex 从而磷酸化 CD3 分子胞质区内 ITAM 中的酪氨酸^[8]。磷酸化的 CD3 ζ ITAM 位点随后招募 ZAP-70, 并使之被 Lck 磷酸化而活化。ZAP-70 能磷酸化接头蛋白 LAT(linker for activation of T cells)^[8]。

LAT 是 TCR 信号转导中关键的支架蛋白, 在被 ZAP-70 磷酸化之后, 能与下游多个信号蛋白结合, 如 Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2)、GADS (GRB2-related adapter protein 2)、PLC- γ 1 (磷脂酶 C, phospholipase C, γ 1) 等, 从而将这些蛋白募集到一起形成 LAT signalosome (LAT 信号转导复合物)^[9]。LAT signalosome 中的 GADS 能进一步招募 SLP-76 和 ITK, ITK 磷酸化激活磷脂酶 PLC- γ 1, 活化后的 PLC- γ 1 能够分解细胞膜上的 PIP2 (磷脂酰肌醇 4,5-双磷酸, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate or PtdIns(4,5)P2), 产生第二信使 IP3 (三磷酸肌醇, inositol trisphosphate or inositol 1,4,5-trisphosphate) 和 DAG (甘油二酯, diacylglycerol)。IP3 结合 IP3Rs (IP3 受体, inositol trisphosphate receptors (InsP3Rs)) 活化内质网钙离子通道, 使内质网钙离子释放入胞内, 内质网钙离子浓度的降低进一步促使胞膜上的钙离子通道开放, 导致胞外钙离子内流。胞内 Ca²⁺ 浓度的升高可活化 calcineurin (钙调磷酸酶), 催化转录因子 NFAT (nuclear factor of activated T cell) 的去磷酸化和入核, 介导下游基因的表达, 如 IL-2 等; DAG 能够激活 MAPK 信号通路而活化转录因子 AP1 (activator protein 1), 还可以通过 PKC 活化转录因子 NF- κ B (nuclear factor- κ B), 从而调控靶基因的表达^[3, 10]。

2 TCR信号调控机制研究进展

虽然 TCR 信号转导的主要通路早在十几年前

就已经得到了比较全面深入的阐明, 但是对 TCR 信号起始以及传递的精细调控机制尚缺乏完整全面的认识。而近几年的研究进展正在逐步填补原先认识上的空白, 帮助人们全面了解 TCR 活化过程中信号传递的精细调控机制^[11]。

2.1 免疫突触的形成及可视化研究

TCR-pMHC complex 形成之后, T 细胞与 APC 接触的界面能形成免疫突触, 成熟的免疫突触包括由 TCR 聚集组成的 cSMAC (中心超分子活化复合物, central supra molecular activation cluster)、外围由 T 细胞表面的 LFA-1 (淋巴细胞功能相关抗原 1, lymphocyte function-associated antigen 1) 和 APC 表面的 ICAM-1 (细胞间黏附分子 1, intercellular adhesion molecule 1) 组成的环形 pSMAC (外周超分子活化复合物, peripheral SMAC), 以及在免疫突触的外围环绕着的由大量蛋白形成的 dSMAC (远端超分子活化复合物, distal SMAC)^[12-13]。

虽然参与突触形成的受体和信号分子成份在早期的研究中已得到阐明, 但这些分子在突触形成前和突触中的详细分布研究则依赖最近几年发展起来的超分辨率显微成像技术。最新发展的超分辨率显微成像技术, 如 PALM (光激活定位显微技术, photo-activatable localization microscopy)、hsPALM (高速光激活定位显微技术, high speed photo-activatable localization microscopy) 以及 STORM (随机光学重建显微技术, direct stochastic optical reconstruction microscopy) 可以实现在分辨率约 20 nm 的单分子层面拍摄 TCR 及其信号分子^[14], 使得观察 TCR 及关键信号分子在细胞膜上的分布和聚集成为可能^[15]。

Schamel 等^[16]采用 PLAM 技术, 发现 TCR 在静息的 T 细胞表面形成 200 nm 大小的 nanocluster (纳米团簇), 大约由 20 个 TCR complex 组成。同样, Lillemeier 等^[17]采用 hsPALM 技术发现, TCR 和 LAT 均可在静息的 T 细胞表面形成相互独立的 nanoclusters; 而当 TCR 刺激之后, TCR nanoclusters 融合到一起形成更大的 TCR microcluster (微小分子簇); 同时, 招募 LAT nanoclusters, 起始 TCR 信号的传递。Sherman 等^[18]则用改进的 PLAM 技术发现, 在静息的 T 细胞表面还存在更小的 LAT dimers (二聚体), 这些 dimers 在静息 T 细胞中就已经与 TCR 分子形成串联在一起的复合物。随着 TCR 的刺激, 这些 LAT dimers 会聚集并参与起始信号的传递。Sherman 等^[15]、Purbhoo 等^[19]和 Williamson 等^[20]三个研究组的研究则发现, LAT 除了定位在胞膜上之

外, 还在静息 T 细胞中大量存在于亚突触的囊泡中, TCR 刺激之后, 导致其被磷酸化活化, 从而暴露 GADS 的结合位点, 与定位在胞膜上的 GADS-SLP76 复合物结合, 从而使其重定位在胞膜上。

单分子成像技术虽然使得这些分子聚集到细胞膜表面上的途径得以展现, 但是仍然不能回答所有的问题, 如上述 TCR 和 LAT 的聚集活化如何依赖脂筏募集^[21], 这些技术是否能解析胞内蛋白的相互作用^[22]。

在 TCR 信号起始相关的分子构象研究中, 许琛琦课题组开创了离子-蛋白质-脂质相互作用调控细胞信号起始机制研究的新领域^[23]。其在先前的研究中发现, CD3 ϵ 和 ζ 链的胞质区富含碱性氨基酸, 因此, 能与细胞内膜的酸性磷脂结合, 这一结合使 ITAM 中的酪氨酸位点隐藏于细胞膜内部, 处于被“屏蔽”的状态, 这种屏蔽对防止 TCR 的自发活化有着重要的意义^[24]。

他们在最新的工作中, 采用活细胞 FRET (荧光共振能量转移, fluorescence resonance energy transfer) 和 NMR (磁共振, nuclear magnetic resonance) 以及活细胞 Ca^{2+} 成像等技术来研究 Ca^{2+} 在 TCR 信号起始中的作用, 发现胞内 Ca^{2+} 能通过中和负电荷脂质来调节 CD3 ITAM 位点的释放: 当 TCR 结合抗原后, 下游 Ca^{2+} 信号通路先会被初步激活, 导致内质网中的 Ca^{2+} 释放和细胞膜上的 Ca^{2+} 通道 (ORAI) 开启^[25], 胞内 Ca^{2+} 浓度瞬时增高, 而这些二价阳离子可以通过静电相互作用中和酸性磷脂中的负电荷, 从而打破 CD3 ITAM 与脂质之间的相互作用, 使 CD3 ITAM 释放到胞质内, 从而能被 Lck 和 Fyn 激酶磷酸化。这一调控, 在 CD3 ITAM 的磷酸化以及初始 TCR 信号放大和维持中起到正反馈调控作用。这一发现, 不仅解释了 T 细胞对外来抗原高敏感性的原因^[26], 也为磷脂和金属离子调控的蛋白质信号通路的研究提供了新的思路。

2.2 TCR信号转导新分子的发现

早在 10 多年前, 参与 TCR 信号转导的分子, 包括上游的激酶 (Lck、Fyn、ZAP-70、Itk 等)、支架蛋白 (LAT、Gads、SLP-76、Grb2 等)、磷脂酶 (PLC- γ 1)、磷酸酶等, 均已基本确定^[3]。人们对 TCR 信号转导调控机制的原有认识也是基于对这些信号分子的研究。但是, 最近几年发现了一些新的 TCR 信号调控分子, 揭示了一些更复杂、尚未被阐明的调控机制的存在。

2009 年, 包括美国 NIH 在内的四个课题组同

时报道了一个调控 T 细胞发育的新分子 Themis (thymocyte-expressed molecule involved in selection)^[27-30]。有趣的是, Themis 缺陷对传统 TCR 信号途径的活化影响甚微^[31]。虽然后续的研究表明, Themis 可能通过与 Grb2 直接结合参与 LAT 信号转导体的组装^[32], 或是通过招募磷酸酶 SHP1 负向调控 TCR 信号, 但 SHP1 敲除的表型与 Themis 缺失并不完全一致, 因此, 这些研究并没有最终阐明 Themis 调控 TCR 信号的机制^[33]。Themis 的发现表明, 现有对 TCR 信号活化的了解是不完整的, 依然存在其他重要的信号途径有待进一步发现和阐明。另一个例子来源于本实验室的发现。本实验室在 2012 年发现了另一个参与 TCR 信号转导的新调控蛋白 Tesp1 (thymocyte-expressed, positive selection-associated 1)。研究发现, Tesp1 参与了 TCR 所介导的 LAT 信号转导体组装, 从而在下游 TCR 信号转导和 T 细胞阳性选择中起到关键的作用^[34-35]。在后续的研究中, 本实验室(文章未发表)和其他实验室同时在小鼠和人的 T 细胞中发现, Tesp1 能结合内质网上的钙离子通道 IP3Rs^[36]。这提示了一条 LAT 信号转导体通过 Tesp1 直接调控内质网钙信号的全新信号调控通路。

近年来, 全基因组关联分析^[37]、蛋白质组学^[38]等方法的引入, 使得更多可能参与 TCR 信号调控的分子被发现, 推动了对 TCR 信号调控机制的新一轮研究。

Roncagalli 等^[38]利用亲和纯化偶联质谱法 (affinity purification coupled with mass spectrometry, AP-MS) 系统分析了 TCR 信号转导体的蛋白质作用图谱。他们首先利用转基因的方法在小鼠 T 细胞中表达了带有纯化标签的 ZAP-70、LAT 和 SLP76 蛋白, 然后, 利用纯化标签在小鼠原代 CD4⁺ T 细胞中亲和纯化分离了这 3 个信号蛋白的蛋白相互作用复合物, 用质谱鉴定这些复合物中的蛋白组成。利用这一方法, 他们不仅较为全面地验证了已知的 LAT 互作蛋白, 如鸟苷酸交换因子 (Sos1、Vav1、ARHGEF6、DOCK10、DOCK2)、丝/苏氨酸激酶 (p85A、Itk、Fyn、MAP4K1)、E3 泛素连接酶 (Cbl-b、Cbl)、磷酸酶 (SHIP-1、UBASH3A、RASAL3)、磷脂酶 (PLC- γ 1)、GTP 酶偶联蛋白等, 而且发现了许多其他分子, 包括信号分子、接头蛋白、离子通道蛋白、跨膜受体的转运蛋白等。这些分子在 TCR 信号传递和调节中的功能尚待阐明, 而针对这些分子的研究, 必然对全面阐明 TCR 的调控机制有巨

大帮助。

近年来, 针对与免疫相关疾病的全基因组关联研究 (GWAS), 也揭示了一些参与 TCR 信号和 T 细胞功能调控的分子。其中最典型的是 PTPN22 (非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 22, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22)。PTPN22 最早于 2004 年通过 SNP 研究被发现。针对自身免疫疾病的患者, 如 1 型糖尿病、多发性硬化症、系统性红斑狼疮的基因筛查发现, PTPN22-C1858T 的突变和这些疾病相关^[39-40], 随后, 更大规模的 GWAS 分析也证实了携带这一突变的人易发以上几种自身免疫疾病^[41]。后续的研究表明, PTPN22 可协同 CSK (C-Src kinase or C-terminal Src kinase) 参与负向调控 TCR 信号。在与疾病的相关性方面, PTPN22-C1858T 是常见突变。这一突变可导致其第 620 位精氨酸突变为色氨酸, 这一突变导致其与 CSK 的结合能力下降^[42]。动物水平实验也证实, PTPN22 缺陷的小鼠体内效应性 T 细胞的数目增加^[43], 并使得小鼠对自身免疫性疾病易感^[44]。

不断发现的参与 TCR 信号的新调控蛋白促进了 TCR 信号调控图谱的不断完善。同时, 也为人类免疫相关疾病的发病机制提供了帮助, 并为这些疾病的治疗提供了潜在的靶点。

2.3 TCR 信号的反馈调节

TCR 信号的起始以及传递都受到精细的调控, 包括正向以及负向调控方式。这种双向的调控既保证了 T 细胞的有效活化, 又能将 T 细胞的活化程度维持在合理的范围。这种平衡一旦被破坏, 将会影响免疫反应的效应或诱发自身免疫性^[45]。目前, 研究最多的负向调控机制是由抑制性受体介导的调控, 如 CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4)、PD1 (programmed cell death 1, also known as PCD1) 和 CD5 等, 都能负向调控 TCR 信号和 T 细胞活化。CTLA4 和 PD1 早已作为抗肿瘤治疗的靶点在这几年炙手可热。抑制性受体主要通过招募蛋白酪氨酸磷酸酶来参与负反馈调控^[46-47]。

近年来, SHP1 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1, also known as PTPN6) 和 PTPN22 这两个磷酸酶在负向调控 TCR 信号中的作用得到了深入的研究^[48]。SHP1 缺陷导致小鼠胸腺细胞阳性和阴性选择增强, 以及外周 T 细胞活化亢进, 致使小鼠产生自身免疫性症状。研究表明, 初始 T 细胞活化时, SHP1 的两个 SH2 结构域能与 ITIM (抑制型膜受体胞内的免疫受体酪氨酸抑制基

序, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) 结合, 使其被招募到细胞膜上并被活化^[49]。SHP1 可以组成性地与 Themis 结合, 并通过 Themis 和 Grb2 被募集到 TCR 复合物中, 并被 Lck 磷酸化^[11, 33], 但是 SHP1 调节 TCR 信号的具体机制尚无定论。Stefanova 等^[50] 研究表明, 活化的 SHP1 能够抑制 Lck 的活性, 从而调控 TCR 信号复合物的活性; 但也有研究证据显示, TCR 刺激后 Themis-SHP1 复合物并不能与 Lck 相互作用, Themis 的缺失也不影响 Lck 的磷酸化水平, 但却导致 CD3 ζ 链的磷酸化水平明显上调, 因此, SHP1 可能是通过直接去磷酸化 CD3 上的 ITAM 位点起作用的^[33]。

因其与自身免疫性疾病的密切相关性, PTPN22 在 TCR 信号调控中的作用日益为研究者所重视。如上所述, PTPN22 能与 CSK 相互结合并协同参与负向调控 TCR 信号: CSK 能够磷酸化 Lck 的第 505 位酪氨酸, 而 PTPN22 能去磷酸化 Lck 的第 394 位酪氨酸, 两者共同完成对 Lck 激酶活性的抑制^[42]。同时, PTPN22 也能够通过去磷酸化 CD3 ζ 链、ZAP-70 和 SLP-76 等分子负向调控 TCR 信号^[51]。针对一些和自身免疫性疾病相关的 PTPN22 突变体功能的研究也在进一步展开。

参与 TCR 负反馈调控的另一种机制是泛素化途径, 包括 E3 泛素连接酶 c-Cbl 和 Cbl-B, 以及 STS (suppressor of T-cell signalling) 在内的许多泛素连接酶均能介导 TCR 信号通路中关键蛋白的降解^[52]。这些 TCR 活化所诱导的上游负反馈调控机制为了解 TCR 信号复合物如何设置活化阈值提供了更多的线索, 进一步解释了 TCR 信号如何控制细胞对抗原的特异性和灵敏性之间的平衡^[52]。

3 TCR信号的效应

TCR 信号的活化, 不仅诱导 T 细胞的增殖和细胞因子的产生, 同时还促使 T 细胞分化成效应 T 细胞并行行使功能。所以, 必须促使细胞机能的相应变化, 包括细胞的迁移能力、代谢方式等。这方面的研究在近几年也取得了相当的进展。

3.1 TCR信号与T细胞增殖和细胞因子的产生

TCR 经配体刺激之后, CD3 ζ 链的 ITAM 能够被顺序磷酸化。这些位点磷酸化的程度则取决于 TCR 配体的特性。因此, CD3 ζ 链 ITAM 磷酸化的程度确立了 TCR 活化的不同层级。同时, CD3 ζ 链的多样顺序磷酸化帮助 TCR 从模糊的抗原信号中剔除高背景的非特异性信号, 从而保证了 TCR 识

别配体的高特异性^[53]。

最新研究表明, T 细胞内不同的效应活化对 CD3 ζ 链 ITAM 的活化强度要求不同^[54]。2008 年, Holst 等^[55] 构建了 25 组表达不同的野生型 CD3 ITAM 和突变型 CD3 ITAM 组合的小鼠, 发现 T 细胞细胞因子的产生并不受 CD3 ITAM 多样性的影响, 但是 T 细胞的增殖却与 CD3 ITAM 多样性呈现线性的相关性。2013 年, Guy 等^[54] 发现 CD3 ITAM 多样性 (即其可被磷酸化的酪氨酸残基的多少) 的差异可导致 TCR 刺激产生不同的效应: 增殖或者产生细胞因子。他们指出, TCR 刺激之后, 只需要少数的 CD3 ITAM 磷酸化激活即可达到产生细胞因子的效应, 然而, 只有全部的 CD3 ITAM 被磷酸化激活才能诱导细胞的增殖。同时研究还发现, 免疫突触形成的起始, 以及下游 Zap-70、Erk (extracellular-signal-regulated kinases) 和钙离子信号通路的活化均无需全体 ITAM 磷酸化。而免疫突触成熟则必须依赖 CD3 ITAM 的高度磷酸化, 以促进支架蛋白 Vav1 (细胞骨架运动相关蛋白) 与磷酸化的 CD3 ζ 链的 ITAM 的结合。Vav1 又能将转录因子 Notch1 (notch homolog 1, translocation-associated) 招募到免疫突触中并将其活化, Notch1 的活化能促进细胞周期调控蛋白 c-Myc 的表达, 最终诱导细胞增殖。因此, 低的 CD3 ITAM 多样性虽然可以诱导形成免疫突触, 诱发细胞因子的产生, 却不能介导免疫突触的成熟, 而且不能促进 TCR-Vav1-Notch1 复合物的形成, 因此, 无法介导 T 细胞的增殖^[54]。

以上研究第一次表明: 参与细胞增殖和细胞因子产生的 TCR 信号通路是相互独立的, 而且受到 CD3 ITAM 的多样性调控。CD3 ITAM 的多样性的高低, 其实也对应地反应了 TCR 刺激的强弱, 即弱的 TCR 刺激便可以诱导细胞因子的产生, 但细胞增殖则必须有足够强的 TCR 刺激。与此相关, 2013 年, Huang 等^[56] 研究发现, 单个 MHC-多肽复合物的刺激就可以诱导 T 细胞表达细胞因子, 表明细胞因子诱导仅依赖数字化的信号。有趣的是, Holst 等^[55] 还发现, 在小鼠表达少于 7 个 ITAM 的突变 CD3 分子, 会造成小鼠中心耐受的损伤, 并诱发致死性多器官自身免疫性疾病。表明 T 细胞在发育时期和在外周发挥效应时, TCR 活化所依赖的 ITAM 酪氨酸磷酸化的数目或程度有所不同。

3.2 细胞骨架重排与TCR信号的传递

细胞骨架重排在 TCR 信号转导中起到关键的作用。大量早期的研究表明, 在 T 细胞 TCR 刺激

活化的过程中, 细胞骨架参与了 SMAC 的形成^[57]。在 cSMAC 形成的过程中, actin (肌动蛋白丝) 不仅可以调节复合物中 TCR 簇的流动, 也参与调控 TCR 信号的起始与下调。肌动蛋白丝 actin 的去聚合可以影响一些支架蛋白对一些信号转导因子的招募从而终止 TCR 信号转导^[58-59]。

与此同时, TCR 信号反过来活化细胞骨架重排。例如, F-actin (F-肌动蛋白丝) 重塑与 TCR 信号传递关联的机制目前已经被阐明^[60]: 当 TCR 与 APC 表面的 MHC-抗原肽复合物识别后, 活化的 Zap-70 磷酸化活化下游的 SLP-76 及 LAT, SLP-76 招募 Vav1, Vav1 通过激活 Rac (GTP 酶, Rho family of GTPases) 和 Cdc42 (cell division control protein 42 homolog) 促进 F-actin 的聚合, 进而激活 WASp (Wiskott-Aldrich syndrome protein) 和 WAVE (WASp-family verprolin homologous protein)。WAVE 和 WASp 招募 Arp2/3 复合物, 促使其发挥起始肌动蛋白丝聚合的作用^[61]。

细胞骨架重排也参与了 T 细胞活化的另一个关键事件——钙流的运动。钙离子信号的起始和转导可概括为两个阶段: 在第一个阶段, 肌动蛋白丝细胞骨架的聚合发挥了其对信号的机械转导能力, 诸如 WASp、HS1 (hematopoietic lineage cell-specific protein 1) 等蛋白能作为动态的“脚手架”促进 PLC- γ 1 的招募活化、IP₃ 的产生以及内质网钙流的释放; 在第二阶段, WAVE 复合体及微管蛋白骨架可直接通过二型肌球蛋白和 L 型透明质促进 STIM1 (stromal interaction molecule 1) 成簇, 活化并开放胞膜上的 Orai 钙离子通道, 从而促使胞外钙离子内流^[62-63]。

以上种种发现表明, TCR 信号一方面激活了细胞骨架重排, 另一方面又受到细胞骨架重排的调控, 两者共同完成了 TCR 信号的传递以及后续由 TCR 信号所介导的 T 细胞细胞骨架重排, 促进了 T 细胞的迁移和侵袭能力。

3.3 TCR信号与细胞代谢

T 淋巴细胞的免疫活化是一个能量需求的过程, 因此, TCR 信号如何影响 T 细胞代谢得到重视和研究。在静息 T 细胞及记忆性 T 细胞中, 细胞主要通过线粒体依赖的分解代谢模式, 包括通过 TCA (三羧酸循环, tricarboxylic acid cycle) 的葡萄糖氧化过程以及脂肪酸的 β -氧化过程, 来提供行使基本细胞功能所必需的代谢需求。但当 T 细胞活化之后, 细胞的代谢过程将经历重新规划, 以产生更多的碳和 ATP 来满足细胞快速生长和增殖的需求, 如脂肪酸的 β -氧化过程迅速减弱, 其他的代谢途径

增强, 包括糖酵解以及谷氨酰胺代谢^[64]。

越来越多的证据显示, 丝/苏氨酸激酶及其产物能协同 TCR 调控 T 细胞自身新陈代谢, 从而满足 T 细胞参与免疫反应所需的代谢需求^[65]。有研究表明, TCR 信号所活化的 ERK1 和 ERK2 可以通过调控 c-Myc 的表达来起始糖酵解^[66-68]。此外, mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1 or mechanistic target of rapamycin complex 1) 是 T 细胞新陈代谢中关键的丝/苏氨酸激酶, TCR 刺激之后激活 mTORC1, 活化的 mTORC1 磷酸化调控 p70S6-激酶 1 以及 eIF4E-BP1 (eIF4E-结合蛋白, eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1) 的功能, 前者调控 mRNA 的转录, 后者调控蛋白质的合成以及核糖体生成^[69-70]。mTORC1 信号途径还能够活化转录因子 SREBP-1 和 SREBP-2 (sterol regulatory element-binding protein), 这两者又可以诱导参与脂肪酸和甾醇合成酶的表达^[71]。此外, mTORC1 还可以协同 HIF-1 (低氧诱导因子 1, hypoxia-inducible factors 1) 来调节葡萄糖转运蛋白以及糖酵解相关限速酶的表达水平, 从而参与维持活化的 T 细胞内的葡萄糖代谢以及糖酵解过程^[72]。另外, T 细胞的活化还能够上调胞内氨基酸的吸收来满足高水平的蛋白质合成过程^[73]。

另一方面, 调控代谢过程的丝/苏氨酸激酶自身又会受到细胞的营养条件及细胞因子环境的调控^[65]。AMPK- α 1 (腺苷酸活化蛋白激酶, 5' AMP-activated protein kinase) 能够感应细胞内能量缺陷 AMP/ATP 比例上调, 促进细胞产生和储备 ATP 来维持能量供应^[74-75]。而 TCR 活化时胞内 Ca^{2+} 浓度的上调能够快速活化 AMPK- α 1, 说明 T 细胞在进化的过程中, 很可能通过活化 AMPK- α 1 来协同调控细胞能量代谢。这一活化途径都依赖于 CaMKKs (钙离子-钙调磷酸酶依赖的蛋白激酶激酶, calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase), 表明钙离子信号在细胞代谢中起到了关键的作用^[75]。此外, 活化的 AMPK- α 1 能够负向调控 mTORC1 的活性, mTORC1 的活性也受到 T 细胞胞内可用的葡萄糖和氨基酸水平的调控^[72-73]。

4 结语

综上所述, 随着大规模组学、蛋白质分离鉴定及高分辨率成像等现代生物研究技术的发展, 人们对 TCR 信号的研究取得了长足的进步。其中包括新的信号转导和调控分子被发现, 新的调控机制被

进一步阐明。与此同时,人们对 TCR 信号效应的了解也从单纯的增殖扩展到其代谢和细胞骨架重排等方面。这些研究将有利于更好地从全局层面了解 T 细胞活化这一免疫反应的核心过程。

[参 考 文 献]

- [1] Garcia KC, Adams JJ, Feng D, et al. The molecular basis of TCR germline bias for MHC is surprisingly simple. *Nat Immunol*, 2009, 10: 143-7
- [2] Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 419-66
- [3] Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 591-619
- [4] Germain RN, Stefanova 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
- [5] Samelson LE. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 371-94
- [6] Call ME, Wucherpfennig KW. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23: 101-25
- [7] Nika K, Soldani C, Salek M, et al. Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity*, 2010, 32(6): 766-77
- [8] van der Merwe PA, Dushek O. Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11: 47-55
- [9] Balagopalan L, Coussens NP, Sherman E, et al. The LAT story: a tale of cooperativity, coordination, and choreography. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, 2010, 2: a005512
- [10] Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 139-76
- [11] Fu G, Rybakina V, Brzostek J, et al. Fine-tuning T cell receptor signaling to control T cell development. *Trends Immunol*, 2014, 35: 311-8
- [12] Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, et al. The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 1999, 285: 221-7
- [13] Monks CRF, Freiberg BA, Kupfer H, et al. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, 1998, 395: 82-6
- [14] Dustin ML, Depoil D. New insights into the T cell synapse from single molecule techniques. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11: 672-84
- [15] Sherman E, Barr V, Samelson LE. Super-resolution characterization of TCR-dependent signaling clusters. *Immunol Rev*, 2013, 251: 21-35
- [16] Schamel WW, Arechaga I, Risueno RM, et al. Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *J Exp Med*, 2005, 202: 493-503
- [17] Lillemeier BF, Mortelmaier MA, Forstner MB, et al. TCR and Lat are expressed on separate protein islands on T cell membranes and concatenate during activation. *Nat Immunol*, 2010, 11: 90-6
- [18] Sherman E, Barr V, Manley S, et al. Functional nanoscale organization of signaling molecules downstream of the T cell antigen receptor. *Immunity*, 2011, 35: 705-20
- [19] Purbhoo MA, Liu H, Oddos S, et al. Dynamics of subsynaptic vesicles and surface microclusters at the immunological synapse. *Sci Signal*, 2010, 3: ra36
- [20] Williamson DJ, Owen DM, Rossy J, et al. Pre-existing clusters of the adaptor Lat do not participate in early T cell signaling events. *Nat Immunol*, 2011, 12: 655-62
- [21] Zhang W, Tribble RP, Samelson LE. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*, 1998, 9: 239-46
- [22] Douglass AD, Vale RD. Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell*, 2005, 121: 937-50
- [23] Shi XS, Bi YC, Yang W, et al. Ca²⁺ regulates T-cell receptor activation by modulating the charge property of lipids. *Nature*, 2013, 493: 111
- [24] Xu CQ, Gagnon E, Call ME, et al. Regulation of T cell receptor activation by dynamic membrane binding of the CD3 epsilon cytoplasmic tyrosine-based motif. *Cell*, 2008, 135: 702-13
- [25] Hogan PG, Lewis RS, Rao A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28: 491-533
- [26] Li LY, Shi XS, Guo XD, et al. Ionic protein lipid interaction at the plasma membrane: what can the charge do? *Trends Biochem Sci*, 2014, 39: 130-40
- [27] Fu G, Vallee S, Rybakina V, et al. Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nat Immunol*, 2009, 10: 848-56
- [28] Johnson AL, Aravind L, Shulzhenko N, et al. Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nat Immunol*, 2009, 10: 831-9
- [29] Lesourne R, Uehara S, Lee J, et al. Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat Immunol*, 2010, 11: 97
- [30] Patrick MS, Oda H, Hayakawa K, et al. Gasp, a Grb2-associated protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(38): 16345-50
- [31] Fu G, Casas J, Rigaud S, et al. Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature*, 2013, 504: 441-5
- [32] Paster W, Brockmeyer C, Fu G, et al. GRB2-mediated recruitment of THEMIS to LAT is essential for thymocyte development. *J Immunol*, 2013, 190: 3749-56
- [33] Paster W, Bruger AM, Katsch K, et al. A THEMIS:SHP1 complex promotes T-cell survival. *EMBO J*, 2015, 30: 393-409

- [34] Wang D, Zheng MZ, Lei L, et al. *Tespa1* is involved in late thymocyte development through the regulation of TCR-mediated signaling. *Nat Immunol*, 2012, 13: 560-8
- [35] Wang D, Zheng M, Qiu Y, et al. *Tespa1* negatively regulates *FcεpsilonR1*-mediated signaling and the mast cell-mediated allergic response. *J Exp Med*, 2014, 211: 2635-49
- [36] Matsuzaki H, Fujimoto T, Ota T, et al. *Tespa1* is a novel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding protein in T and B lymphocytes. *FEBS Open Biol*, 2012, 2: 255-9
- [37] Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, et al. Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet*, 2011, 43: 1066-73
- [38] Roncagalli R, Hauri S, Fiore F, et al. Quantitative proteomics analysis of signalosome dynamics in primary T cells identifies the surface receptor CD6 as a Lat adaptor-independent TCR signaling hub. *Nat Immunol*, 2014, 15: 384
- [39] Begovich AB, Carlton VEH, Honigberg LA, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, 2004, 75: 330-7
- [40] Vang T, Congia M, Macis MD, et al. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet*, 2005, 37: 1317-9
- [41] Burton PR, Clayton DG, Cardon L. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 2007, 447: 661-78
- [42] Bottini N, Peterson EJ. Tyrosine phosphatase PTPN22: multifunctional regulator of immune signaling, development, and disease. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 83-119
- [43] Hasegawa K, Martin F, Huang GM, et al. PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells. *Science*, 2004, 303: 685-9
- [44] Brownlie RJ, Miosge LA, Vassilakos D, et al. Lack of the phosphatase PTPN22 increases adhesion of murine regulatory T cells to improve their immunosuppressive function. *Sci Signal*, 2012, 5: Ra87
- [45] Goodnow CC. Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell*, 2007, 130: 25-35
- [46] Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 9543-53
- [47] Tarakhovsky A, Kanner SB, Hombach J, et al. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science*, 1995, 269: 535-7
- [48] Kilgore NE, Carter JD, Lorenz U, et al. Dependence of TCR antagonism on Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase activity. *J Immunol*, 2003, 170: 4891-5
- [49] Pao LI, Badour K, Siminovitch KA, et al. Nonreceptor protein-tyrosine phosphatases in immune cell signaling. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 473-523
- [50] Stefanova I, Hemmer B, Vergelli M, et al. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat Immunol*, 2003, 4: 248-54
- [51] Cloutier JF, Veillette A. Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. *J Exp Med*, 1999, 189: 111-21
- [52] Acuto O, Di Bartolo V, Michel F. Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8: 699-712
- [53] Kersh EN, Shaw AS, Allen PM. Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation. *Science*, 1998, 281: 572-5
- [54] Guy CS, Vignali KM, Temirov J, et al. Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. *Nat Immunol*, 2013, 14: 262-70
- [55] Holst J, Wang HP, Eder KD, et al. Scalable signaling mediated by T cell antigen receptor-CD3 ITAMs ensures effective negative selection and prevents autoimmunity. *Nat Immunol*, 2008, 9: 658-66
- [56] Huang J, Brameshuber M, Zeng X, et al. A single peptide-major histocompatibility complex ligand triggers digital cytokine secretion in CD4⁺ T cells. *Immunity*, 2013, 39: 846-57
- [57] Beemiller P, Krummel MF. Regulation of T-cell receptor signaling by the actin cytoskeleton and poroelastic cytoplasm. *Immunol Rev*, 2013, 256: 148-59
- [58] Beemiller P, Jacobelli J, Krummel MF. Integration of the movement of signaling microclusters with cellular motility in immunological synapses. *Nat Immunol*, 2012, 13: 787-95
- [59] Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML, et al. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science*, 2002, 295: 1539-42
- [60] Zeng R, Cannon JL, Abraham RT, et al. SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J Immunol*, 2003, 171: 1360-8
- [61] Matalon O, Reicher B, Barda-Saad M. Wiskott-Aldrich syndrome protein--dynamic regulation of actin homeostasis: from activation through function and signal termination in T lymphocytes. *Immunol Rev*, 2013, 256: 10-29
- [62] Babich A, Burkhardt JK. Coordinate control of cytoskeletal remodeling and calcium mobilization during T-cell activation. *Immunol Rev*, 2013, 256: 80-94
- [63] Oh-hora M. Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells. *Immunol Rev*, 2009, 231: 210-24
- [64] Wang R, Green DR. Metabolic checkpoints in activated T cells. *Nat Immunol*, 2012, 13: 907-15
- [65] Navarro MN, Cantrell DA. Serine-threonine kinases in TCR signaling. *Nat Immunol*, 2014, 15: 808-14
- [66] Carr EL, Kelman A, Wu GS, et al. Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *J Immunol*, 2010, 185:

- 1037-44
- [67] Marko AJ, Miller RA, Kelman A, et al. Induction of glucose metabolism in stimulated T lymphocytes is regulated by mitogen-activated protein kinase signaling. *PLoS One*, 2010, 5: e15425
- [68] Wang R, Dillon CP, Shi LZ, et al. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity*, 2011, 35: 871-82
- [69] Powell JD, Delgoffe GM. The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. *Immunity*, 2010, 33: 301-11
- [70] Ricoult SJ, Manning BD. The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. *EMBO Rep*, 2013, 14: 242-51
- [71] Kidani Y, Elsaesser H, Hock MB, et al. Sterol regulatory element-binding proteins are essential for the metabolic programming of effector T cells and adaptive immunity. *Nat Immunol*, 2013, 14: 489-99
- [72] Waickman AT, Powell JD. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. *Immunol Rev*, 2012, 249: 43-58
- [73] Sinclair LV, Rolf J, Emslie E, et al. Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation. *Nat Immunol*, 2013, 14: 500
- [74] Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: A target for drugs both ancient and modern. *Chem Biol*, 2012, 19: 1222-6
- [75] Tamas P, Hawley SA, Clarke RG, et al. Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase by antigen receptor and Ca^{2+} in T lymphocytes. *J Exp Med*, 2006, 203: 1665-70