

特约综述



人体免疫系统的功能主要是识别“非自体物质”(外来的病原体以及肿瘤细胞)并将之清除以保护机体的健康。整个免疫功能的发挥在很大程度上依赖于免疫受体来感受环境的变化从而让免疫细胞做出正确的反应。本课题组利用生物化学、免疫学、结构生物学以及显微成像技术研究各类关键免疫受体(如TCR、CD28等)的活化机制以及它们在各种生理病理情况下的功能。

<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=128>

T细胞抗原受体的结构与功能研究进展

施小山 李伦乙 郭兴东 许琛琦*

(分子生物学国家重点实验室, 中国科学院上海生命科学研究院上海生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 T细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)是T细胞表面关键的受体分子。TCR特异性地识别各种多肽抗原并通过胞内区ITAM磷酸化传递抗原刺激信号, 进而引发T细胞的免疫效应。TCR的活性异常将会导致自身免疫病和免疫缺陷病的发生。对于TCR结构和功能的深入研究有助于我们更好地理解免疫反应的分子机理, 从而为相关免疫疾病的预防和治疗提供重要的理论依据。该文对TCR的分类、基因重排机制、受体组装方式及其结构基础、TCR对抗原的识别以及活化机制等方面的研究成果进行了总结, 综述了近年来的最新研究进展。

关键词 T细胞抗原受体; 结构; 基因重排; 抗原识别; 受体磷酸化

1 简介

T细胞是获得性免疫系统中主要的功能细胞, 负责识别抗原, 并指挥其他免疫细胞进行免疫应答。在抗原识别中起关键作用的是T细胞表面的T细胞抗原受体(TCR)。根据其表达的TCR的不同, T细胞可分为两大类: $\alpha\beta$ T细胞以及 $\gamma\delta$ T细胞。 $\alpha\beta$ T细胞在外周淋巴组织以及外周血中占T细胞总数中的绝大多数, 而 $\gamma\delta$ T细胞相对比较少, 比较集中地分布于上皮组织以及粘膜相关的淋巴组织中^[1]。本文将详细综述 $\alpha\beta$ TCR的一些最新研究进展。

2 T细胞抗原受体的分类

脊椎动物中共有三种不同的T细胞抗原受体: $\alpha\beta$ TCR、 $\gamma\delta$ TCR以及pre-TCR。其中pre-TCR只表达于未成熟的 $\alpha\beta$ T细胞表面, $\alpha\beta$ TCR表达于成熟的 $\alpha\beta$ T细胞和NKT细胞表面, 而 $\gamma\delta$ TCR则表达于 $\gamma\delta$ T细胞的表面。位于T细胞表面的 $\alpha\beta$ TCR识别MHC I/II递呈的

多肽抗原; NKT细胞表面的 $\alpha\beta$ TCR识别CD1递呈的脂质抗原; $\gamma\delta$ TCR的配体目前仍然不是非常清楚, 它可以识别MHC或MHC类似分子(如小鼠的T22、T10, 人的CD1c), 也可以识别非MHC分子(如病毒糖蛋白、ATPase复合物)^[2]。 $\alpha\beta$ TCR与 $\gamma\delta$ TCR在识别配体后会传递活化信号, 刺激T细胞增殖并分泌相应的细胞因子; 而pre-TCR的信号传递则不依赖于配体, 它在细胞表面自发形成二聚体, 由此向细胞传递活化信号, 调控T细胞在胸腺中的发育过程^[3]。

3 T细胞抗原受体的基因重排

免疫系统的主要功能是识别非自体物质并将之清除。然而非自体物质成万上亿地存在, 这便给

科技部蛋白质重大研究计划(No.2011CB910901)、国家自然科学基金(No.31070738)、中国科学院百人计划和上海市浦江人才计划(No.10PJ1411500)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-54921317, E-mail: [cxqu@sibs.ac.cn](mailto:cqxu@sibs.ac.cn)

了免疫系统一个大难题: 如何利用有限的DNA序列来产生如此多样的受体, 以特异性地应对这些抗原呢? 经过亿万年的进化, 哺乳动物的适应性免疫系统获得了基因重排的能力, 从而得以解决这个问题。TCR基因的V(D)J重排主要由淋巴细胞特异的重组酶RAG (包括RAG1和RAG2)及广泛表达的DNA修复蛋白来介导完成, 该过程对T淋巴细胞的正常发育成熟起着十分重要的作用^[4]。

T细胞是由造血干细胞在胸腺中发育成熟的, 成熟后的T细胞表达 $\alpha\beta$ TCR或 $\gamma\delta$ TCR。整个发育的过程分为DN期(CD4/CD8双阴性)、DP期(CD4/CD8双阳性)以及SP期(CD4/CD8单阳性)。其中DN期又分为DN1、DN2、DN3以及DN4, 代表发育的不同阶段。在DN3期, *Tcrd*、*Tcrg*和*Tcrb*便在初始表达的重组酶作用下进行重排。T细胞开始分化成 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ 细胞^[5]。以下, 我们将着重介绍产生 $\alpha\beta$ T细胞的*Tcra*和*Tcrb*的V(D)J重排过程。

在DN2期首先进行的是 β 链的V(D)J重排, 整个 β 链的重排过程需要增强子 E_β 的激活^[6]。激活的 E_β 可以与D区的启动子PD特异性地相互作用^[7-8], 该相互作用可招募SWI-SNF染色质重组复合物从而促进重排反应的进行^[9]。重排反应的进行可以分成特异性断裂和非特异性连接两个步骤^[4,10]。

首先, RAG蛋白将特异性地识别重组信号序列(RSS)并引起DNA双链断裂。这种RSS含有一个7 bp的回文序列、一个9 bp富含AT碱基的序列以及中间非保守的12 bp或23 bp的间隔序列, 而只有带不同长度间隔序列的RSS才能促进重排反应的产生(12/23准则)。在这个准则下, β 链内可以发生三种重排反应: 3'D β 23RSS和J β 12RSS介导的重排反应、V β 23RSS和5'D β 12RSS介导的重排反应以及V β 23RSS和J β 12-RSS介导的重排反应。然而事实上, 第三种反应在体内是不发生的(B12/23)^[11], 这是由RSS序列及侧翼序列所决定的。如果用3'D β 23RSS替换V β 23RSS, 或用5'D β 12RSS替换J β 12RSS, VJ重排将可能直接发生^[11-12]。此外, AP-1等转录因子可以招募RAG蛋白至3'D β 23RSS, 这种招募可能促使DJ重排优先发生于VD重排^[13]。

最后, 非同源DNA末端连接蛋白(nonhomologous DNA end-joining proteins, NHEJ)可以非特异性连接两个DNA片段来实现DNA最终重排。RAG作用形成的编码端会被Artemis等蛋白作用而产生一

些回文末端^[14], 但是这些粘性末端往往不能相互匹配。因此, 体内的DNA修复机制会随机地加入或删除一些碱基来配对两个粘性末端, 这使得*Tcr*基因呈现出更大的多样性^[15]。

一条染色体上*Tcrb*的成功重排可以抑制同源染色体上另一个*Tcrb*的重排, 这一现象称为等位排斥(allelic exclusion)^[16]。*Tcrb*的等位排斥仅仅针对于V-DJ的重排过程, 这可能是由于D片段与J片段相距较近使得其重排反应发生较快, 而V片段同DJ片段相距十分远, 容易调控其重排。至今, 等位排斥的具体调控机制仍研究得不是很清楚, 但也取得了一定的成果。在DN期, *Tcrb*高频率地同核纤层及异染色质相互作用而抑制重排反应^[17-18], 这可能使得两个*Tcrb*同时发生重排几乎不可能实现。而当第一个*Tcrb*重排完成后, 其产生的pre-TCR信号可以下调RAG的表达并促使细胞进行分化从而进入DP期^[19]。在DN期, RAG的下调可以阻止第二个*Tcrb*的重排。而进入DP期后, 细胞必须上调RAG来实现*Tcra*的重排, 这时*Tcrb*基因两端的分离则可能起着等位排斥的作用^[17]。近年来, 研究人员还发现一些转录因子如E2A和Ets-1可以调节 E_β 的活性, 并可能调节等位排斥反应^[20-21]。需要指出的是, 尽管细胞内存在着等位排斥作用, 依然有些T细胞可以逃避这一过程, 从而产生两种不同的TCR^[22]。

了解了 β 链的重排反应及其调控, 便不难理解 α 链的重排过程了。然而由于编码 α 链和 δ 链的基因在同一个染色体上, 并且二者序列部分共用并相互穿插, 因此其调控机制更加复杂, 有待更多的研究来解释。与 β 链重排一样, α 链的重排也需要特定增强子 E_α 的激活。在DN期主要进行的是 E_δ 激活所介导的 δ 链的重排。而进入DP期后, pre-TCR信号等将促使 E_α 激活并促进 α 链的重排反应^[23]。 E_α 的激活可能可以使其特异性同TEA及J α 49启动子相互作用而激活这两个启动子。TEA的激活可以使得J α 区染色质重构, 组蛋白被甲基化, 这最终将招募重组酶介导第一次的VJ重排^[24-27]。与 β 链不同, α 链还会进行多次的VJ重排。TEA及J α 49介导的第一次VJ重排会使得这两个启动子被切除, 但同时会把V α 启动子引入到J区的5'端从而介导第二次VJ重排^[28]。同样第二次的重排会引起新的V α 启动子进入J区的5'而介导下一次的VJ重排。 α 链同 β 链的另一个不同在于, α 链的重排没有等位排斥现象, 因此一个T细胞可以进行多轮重

排。这种多轮的重排将保证阳性选择过程, 进行到阳性选择结束或者T细胞死亡^[29-30]。

4 T细胞抗原受体的组装

如前所述, T细胞通过TCR $\alpha\beta$ 链或 $\gamma\delta$ 链识别外界抗原, 但这四条链的胞内段均较短而难以传递下游信号。成熟T细胞表面的 $\alpha\beta$ TCR含四个亚基: 抗原识别亚基 $\alpha\beta$ 异源二聚体, 信号亚基CD3 $\epsilon\delta$ 异源二聚体, 信号亚基CD3 $\epsilon\gamma$ 异源二聚体, 信号亚基 $\zeta\zeta$ 同源二聚体。而 $\gamma\delta$ TCR以及pre-TCR在组成上与 $\alpha\beta$ TCR有一定差别。与 $\alpha\beta$ TCR一样, $\gamma\delta$ TCR以及pre-TCR也需要CD3 ϵ 、CD3 γ 以及 ζ 。但是CD3 δ 缺失的小鼠中pre-TCR与 $\gamma\delta$ TCR的功能没有受到影响^[31]。近期的研究表明, 小鼠的 $\gamma\delta$ TCR的组成为TCR $\gamma\delta$: CD3 $\epsilon\gamma$: CD3 $\epsilon\gamma$: $\zeta\zeta$, 而人的 $\gamma\delta$ TCR的组成却为TCR $\gamma\delta$: CD3 $\epsilon\delta$: CD3 $\epsilon\gamma$: $\zeta\zeta$ ^[32-33]。

TCR的各个亚基序列特征基本包括胞外免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)结构域、茎部区(stalk region)、跨膜区与胞内区。TCR α 及TCR β 链含两个Ig结构域, 可以识别各类多肽抗原。但是它们的胞内区却很短, 没有转导信号的序列, 因此TCR $\alpha\beta$ 需要与另外三个信号亚基结合来转导抗原刺激信号。CD3分子都含一个Ig结构域, 胞内区中含一个免疫受体酪氨酸激活模体(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)。 ζ 链的胞外区只含9个氨基酸残基, 但其胞内区却含3个ITAM。在TCR $\alpha\beta$ 亚基识别pMHC后, 抗原刺激信号会被转导到CD3和 ζ 分子的胞内ITAM区, 引起酪氨酸的磷酸化, 从而激活下游信号通路。

TCR的四个亚基在内质网上组装, 只有组装完整的受体复合物才被运输到质膜上发挥功能。组装过程严格按照顺序进行: (1) TCR $\alpha\beta$ 与CD3 $\epsilon\delta$ 形成四聚体; (2) TCR $\alpha\beta$: CD3 $\epsilon\delta$ 与CD3 $\epsilon\gamma$ 形成六聚体; (3) TCR $\alpha\beta$: CD3 $\epsilon\delta$: CD3 $\epsilon\gamma$ 与 $\zeta\zeta$ 形成八聚体。决定亚基组装的主要是跨膜区中的酸碱残基之间的静电作用^[34](图1)。这种静电作用的方式比较有趣, 是一个碱性残基与两个酸性残基结合: Lys(TCR α): Asp(CD3 ϵ)/Asp(CD3 δ); Lys(TCR β): Asp(CD3 ϵ)/Glu(CD3 γ); Arg(TCR α): Asp(ζ)/Asp(ζ)。这种不对称的静电结合不光出现于TCR, 同时还主导了其他Fc受体、NK受体及KIR等许多免疫受体的组装^[35]。

虽然静电作用是TCR组装必需的作用力, 但是静电作用力本身并不能决定各个亚基的组装顺序,

应该有其他区段的作用力来保证组装的有序完成。各个亚基的Ig结构域之间的结合力很弱, 胞内区对受体的组装也影响甚小。但各个亚基的茎部区已被证明对TCR的组装和功能至关重要^[36-37], 其中CD3亚基茎部区含有CxxC基序, 对受体组装很重要。这些半胱氨酸虽然靠得很近, 但却并不形成二硫键, 彼此可能通过氢键相互作用。值得一提的是, TCR α 及TCR β 链的茎部区(19~26 a.a.)要长于CD3的茎部区(5~10 a.a.), 所以有模型提出CD3的Ig结构域可能与TCR $\alpha\beta$ 的Ig结构域底部及其茎部区结合^[38]。突变数据的确表明, 位于TCR $\alpha\beta$ 亚基Ig结构域底部的C α DE环以及C β CC'环分别与CD3 $\epsilon\delta$ 及CD3 $\epsilon\gamma$ 结合来介导受体组装^[39]。DE环与CC'环位于一个面上, 所以两个CD3亚基可能结合于TCR $\alpha\beta$ 的一个面上, 而其对立面则可能是TCR受体二聚化的表面^[40]。这一新的TCR二聚化模型还有待于进一步的验证。

5 T细胞抗原受体的结构

由于TCR组成上的复杂性, 目前还没有整个TCR复合物的三维结构信息。TCR亚基以及CD3亚基的胞外Ig结构域的三维结构都已经被解析^[41], 它们都属于免疫球蛋白超家族(IgSF), 构象上和其他IgSF的成员比较相似(图1), 所以这里就不再赘述。而对TCR组装最关键的跨膜区结构却研究甚少。前文中已提到TCR组装的最关键作用力是疏水膜环境中的静电作用力, 而且这种静电作用是1个正电荷对应2个负电荷, 这种作用方式非常独特。结构生物学的研究能够让我们了解这种罕见的作用方式背后的化学机制。2006年, Kai Wucherpfennig实验室^[42]报道了 $\zeta\zeta$ 同源二聚体的跨膜区结构(图1), 详细研究了在这个亚基中两个Asp残基如何协同的机制。这个亚基结构能首先被成功解析的关键是 $\zeta\zeta$ 形成的是共价二聚体, 而且 ζ 的二聚化主要是通过跨膜区的相互作用来介导, 因此 $\zeta\zeta$ 的跨膜二聚体比较稳定。其他CD3亚基以及TCR亚基的二聚化主要通过胞外Ig结构域的相互作用来完成, 而且CD3 $\epsilon\delta$ 与CD3 $\epsilon\gamma$ 形成的是非共价二聚体, 因此这些亚基跨膜区二聚体的结合非常松散, 很难进行结构分析。

$\zeta\zeta$ 跨膜区结构揭示许多有趣的信息。(1) 这个二聚体的形成主要是通过亲水作用力来介导的, 相反疏水作用力却并不重要, 这有别于许多其他跨膜蛋白相互作用的方式。二聚体形成的主要亲水作用

力是Thr与Tyr之间的氢键作用以及两个Asp之间的氢键作用; (2) 两个Asp之间通过氢键作用成为一个整体, 在它们中间还检测到了微弱的水信号, 暗示着水分子可能在 ζ 的两个Asp与TCR α 链上的一个Lys作用时起到中介的作用。这种假说需要通过解析 ζ 亚基与TCR α 的三聚体或者CD3亚基与TCR的三聚体结构才能真正验证。目前还缺少有关三聚体结构信息, 但是James Chou实验室^[43]最新报道的NKG2C-DAP12/DAP12三聚体结构能让我们推测TCR中跨膜区相互作用的模式。与TCR一样, NKG2C也是一类活化型的免疫受体, 通过其跨膜区的Lys与信号转导亚基DAP12同源二聚体中的两个Asp相互作用进行组装。NKG2C-DAP12/DAP12三聚体的结构表明在DAP12的Asp残基后+4位的Thr残基对DAP12与NKG2C的组装至关重要。作者提出NKG2C上的Lys与DAP12上的两个Asp以及两个Thr形成了一个电子云网络, 由此来稳定不对称的正负电荷结合。有趣的是, DxxxT模式在CD3 ϵ 以及CD3 δ 上也存在, CD3 γ 含的是ExxS模式。所以这种亲水残基电子云网络模式可能也适用于TCR的组装。实验表明, 将CD3链上的Thr或Ser突变都将严重影响CD3亚基与TCR亚基的组装。

目前, 最新的TCR结构研究还只停留在三聚体水平。我们期待在不远的将来, 生物化学与生物物理技术上的突破能够让我们能真正解析整个TCR复合物的三维结构, 这将能使我们真正了解TCR的抗原应答过程。

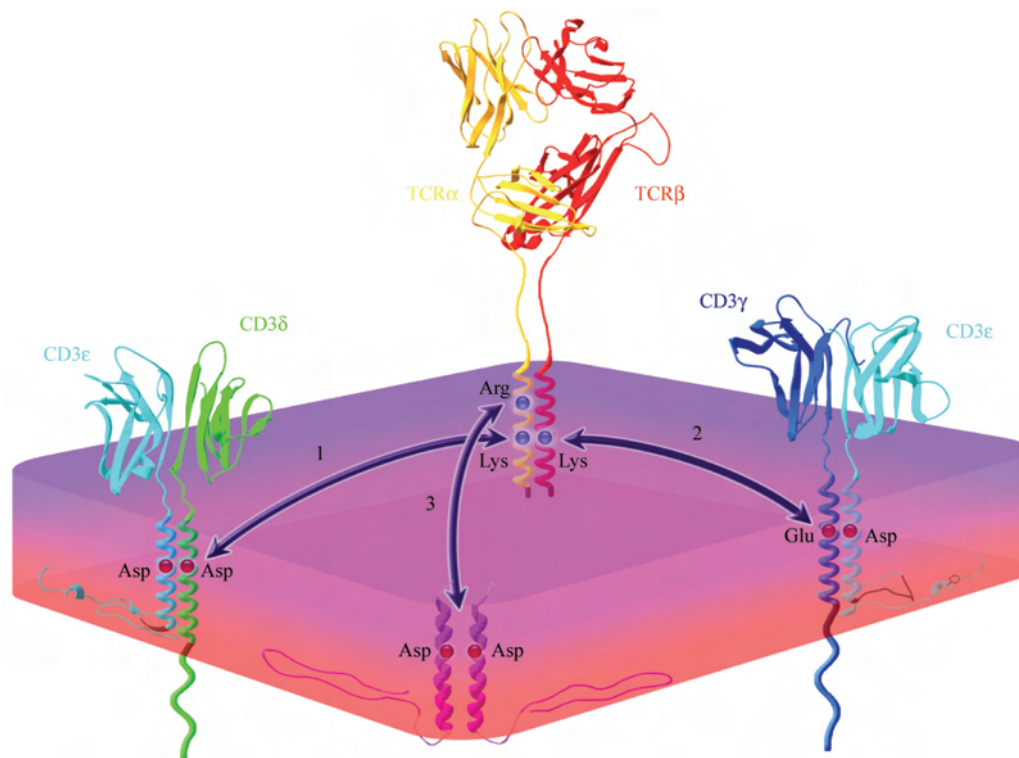
6 T细胞抗原受体对抗原的识别

$\alpha\beta$ TCR主要识别MHC所递呈的多肽抗原(peptide-MHC, pMHC)。多肽抗原千差万别, 而TCR也通过基因重排产生多种多样的TCR来特异性地识别这些抗原。MHC分子在其顶部形成一个抗原结合腔, 两周由两个 α 螺旋来构成边框(MHCI中的 α 1及 α 2螺旋, MHCII中 α 1及 β 1螺旋), 底部由多个 β 折叠构成。这样的抗原递呈腔可以结合各种各样的抗原多肽。 $\alpha\beta$ TCR对pMHC的识别涉及到两种结合: TCR与MHC分子的结合以及TCR与多肽抗原的结合。TCR上的结合面来自6个区域: TCR α 、 β 链上各自的CDR1、CDR2以及CDR3 (complementarity-determining region)。CDR1与CDR2由TCR上的V区编码, 序列相对保守; 而CDR3由重组的V(D)J编码, 具有超变性。

CDR1与CDR2主要结合相对保守的MHC分子, CDR3则主要结合多变的抗原多肽。这种结合模式可以很好地保证TCR特异地结合MHC分子, 并能识别多变的抗原^[44]。

那TCR为什么会有MHC特异性呢? 从蛋白质相互作用的角度上看, TCR-MHC之间并没有很好的结构互补性, 因此亲和力也不高^[45]。但是这种结合肯定是特异性的, 而且承载了重要的生理功能。虽然也有文献报道在没有MHCI、MHCII、CD4以及CD8的情况下, TCR能识别非MHC分子^[46]。但这可能是因为在没有MHC的情况下, 具有多变CDR3区的TCR能够随机识别许多其他蛋白质。既然TCR有MHC特异性, 那这种特异性是TCR与生俱来的, 还是TCR一开始没有MHC特异性, 而是在胸腺中通过阴阳选择筛选出MHC特异性的TCR? 目前的实验数据支持第一种可能性, 即TCR的MHC特异性是先天性的。在TCR的 β 链上已发现了几个重要的位点Y46、Y48及E54, 它们在多种TCR-MHC结合中都起着重要的作用^[47-49]。而且将它们分别突变成Ala的话, 会严重影响T细胞的发育, 导致胸腺中的CD4单阳性和CD8单阳性细胞数量大大减少^[48]。既然TCR上可能存在着与MHC结合的“通用”位点, 那么MHC上是否也存在着这些位点? MHC基因是人类基因组中最复杂的基因之一。目前已发现了>800个MHCI等位基因, 以及>600个MHCII等位基因。虽然这些等位基因之间的序列差异非常大, 但是它们还是在某些位点上有一定保守性, 而且这些位点位于TCR的结合区上^[44]。另外从结合模式上看, $\alpha\beta$ TCR结合MHC的位置比较固定, 基本是对角线的结合模式。TCR β 链总是结合在MHC分子 α 1螺旋上, 而TCR α 链总是结合在MHCI分子的 α 2螺旋或MHCII分子的 β 1螺旋。以上这些证据都支持TCR具有先天性MHC特异性这一观点。同时这些证据还暗示, TCR中的V基因可能与MHC存在着共进化, 在TCR上含有识别MHC的“密码”。同一个TCR上可能同时存在多套“密码”来识别不同的MHC分子^[50], 另外同一MHC分子上递呈的不同多肽也会对TCR使用哪套“密码”起到重要影响^[51-52]。总而言之, TCR与MHC的总体结合模式是固定的, 但是具体结合于哪个特定的位点取决于TCR、MHC以及抗原多肽的序列, 并遵循结合能量最小化原则^[53]。

对个体来说, 他/她只表达特定的MHC等位基



TCR-CD3复合物由TCR $\alpha\beta$ (或TCR $\gamma\delta$)、CD3 $\epsilon\delta$ 、CD3 $\epsilon\gamma$ 和 $\zeta\zeta$ 四个二聚体亚单位组成。这四个亚单位主要通过跨膜区氨基酸的静电相互作用结合在一起。图中各亚基结构从PDB获得: LC13 $\alpha\beta$ TCR胞外区结构(PDB 1MI5), CD3 $\epsilon\delta$ 胞外区结构(PDB 1XMW), CD3 $\epsilon\gamma$ 胞外区结构(PDB 1SY6), $\zeta\zeta$ 跨膜区结构(PDB 2HAC)以及CD3 ϵ 胞内区结构(PDB 2K4F)。

TCR-CD3 complex is composed of four dimeric modules (TCR $\alpha\beta$ /TCR $\gamma\delta$, CD3 $\epsilon\delta$, CD3 $\epsilon\gamma$ and $\zeta\zeta$) assembled mainly through charge-charge interactions within transmembrane regions. TCR assembly model was generated from reported TCR subunit structures: LC13 $\alpha\beta$ TCR extracellular domain structure (PDB 1MI5), CD3 $\epsilon\delta$ extracellular domain structure (PDB 1XMW), CD3 $\epsilon\gamma$ extracellular domain structure (PDB 1SY6), $\zeta\zeta$ transmembrane domain structure (PDB 2HAC) and CD3 ϵ cytoplasmic tail structure (PDB 2K4F).

图1 T细胞抗原受体的组装

Fig.1 Assembly of TCR-CD3 complex

因, T细胞的阴性选择保证了该个体产生的成熟T细胞具有个体MHC特异性, 对其它个体的MHC的亲合力则比较低。John Kappler实验室^[53]发现在阴性选择缺陷的小鼠所产生的T细胞对多种MHC同时有高亲和力, 有的TCR甚至可以同时识别MHCI与MHCII。

综合以上的观点, 目前的实验数据支持TCR具有先天性的MHC特异性这一观点, 而在个体中的T细胞发育过程中, 阴性选择可以筛选出个体MHC特异性的TCR。当然, 在筛选出的TCR中有部分会对其他MHC有交叉反应, 这也是器官移植中产生免疫排斥的主要原因之一。

7 T细胞抗原受体的活化机制

如前所述, $\alpha\beta$ T细胞抗原受体通过TCR $\alpha\beta$ 链来

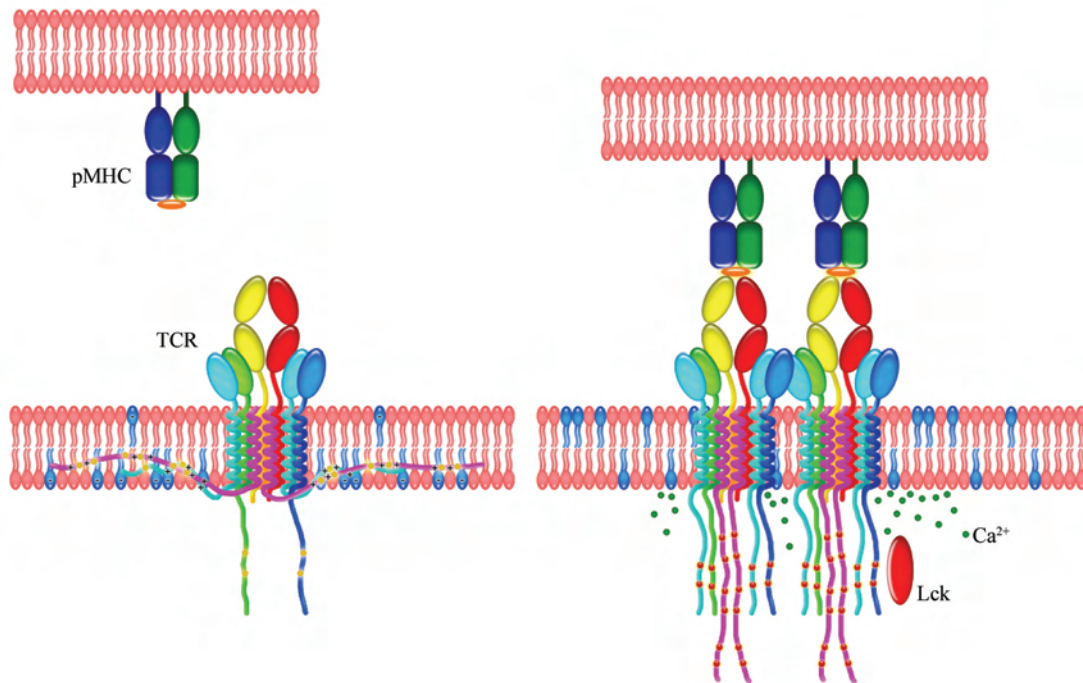
识别pMHC, 而通过CD3链来传递下游信号。关于T细胞信号转导通路的研究已经开展了很多^[54]。当TCR识别抗原呈递细胞的MHC呈递的特异性抗原肽段后, MHC-peptide-TCR三元复合物可以把信号传递至T细胞内部。这个信号起初可以使得CD3胞内区ITAM中的酪氨酸被Lck或Fyn磷酸化, 而磷酸化的ITAM可招募Zap-70, 之后Zap-70被Lck磷酸化。磷酸化的Zap-70又可以活化接合蛋白LAT。LAT被磷酸化后激活其作为接合蛋白的功能, 招募一系列蛋白把信号往下游传递, 包括PI3K、PLC- γ 及Vav1等。这些蛋白在那里被磷酸化并开始介导一些经典的信号通路, 调控细胞的增殖分化等过程。以PLC- γ 为例, 被活化的PLC- γ 可以水解细胞内膜的PIP2而生成IP3和DAG两种第二信使。IP3可以和内质网的IP3R相结合, 而使其活化并释放钙离子进入细胞质。

而内质网钙离子的泄露又可以激活CRAC通道,使得钙离子从细胞外流进细胞内。钙离子浓度的增高可以激活许许多多的钙离子结合蛋白,如钙调蛋白,最终可以促进NFAT及NF- κ B转录因子的激活。另一方面,DAG可激活Ras及PKC θ 并在最终也起到激活AP-1及NF- κ B等转录因子的作用。

尽管T细胞受体信号在细胞内的转导途径已经研究得比较清楚,但是pMHC结合TCR后如何引起ITAM磷酸化这一关键步骤的分子机制仍然是一个谜,这也是当今科学研究的热点之一。在细胞膜表面许多其它的受体与配体结合后会发​​生构象变化,这种构象的变化使得信号从胞外传至胞内,那么TCR是否也运用了这种机制呢?迄今为止,通过结构生物学以及生物化学等方法发现pMHC-TCR相互作用对TCR胞外区构象影响很小^[44],并且对于各信

号亚基的胞内区而言,仅CD3 ϵ 链的胞内proline rich domain被发现​​在TCR活化后有略微的暴露^[55]。尽管这种暴露可以在Jurkat T细胞内帮助其招募Nck而促进T细胞激活,但是在动物模型上CD3-Nck相互作用对T细胞的发育及功能并不是必需的^[56]。由此可见,通过构象变化来转导抗原刺激信号在TCR上并没有得到验证。

2008年,许琛琦等^[57]发表了ITAM的酪氨酸磷酸化可以被细胞质膜动态调控的成果。他们发现CD3 ϵ 的ITAM模体富含带正电的碱性残基,而在静息状态下细胞质膜内层正好富含酸性磷脂^[58-60],包括磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰甘油(PG)及磷脂酰肌醇(PI、PIP、PIP₂或PIP₃),因而两者可以通过静电结合来调控酪氨酸的磷酸化(图2)。在TCR静息状态下,CD3 ϵ 的ITAM完全被包埋于膜中,从而保证酪氨酸残基不



TCR复合物由TCR α (黄色)、TCR β (红色)、CD3 δ (绿色)、CD3 γ (蓝色)、CD3 ϵ (青色)及 ζ (粉色)组成。在静息状态下,CD3 ϵ 链及 ζ 链的胞内区同细胞质膜内层相互作用从而使得这些链上的酪氨酸残基免受Lck或Fyn自动磷酸化。当TCR被抗原递呈细胞所递呈的多肽抗原所激活后,CD3 ϵ 以及 ζ 胞内区均从膜上解离而被Lck或Fyn磷酸化。受体聚集, Ca²⁺浓度提高以及磷脂环境变化可能是引起ITAM从质膜上解离的原因。

TCR complex is composed of TCR α (yellow), TCR β (red), CD3 δ (green), CD3 γ (blue), CD3 ϵ (cyan) and ζ (pink) chain. Cytoplasmic domains of CD3 ϵ and ζ chains are enriched of basic residues, which interact with the negatively charged inner leaflet of the plasma membrane. Such an interaction protects ITAM tyrosine residues from spontaneous phosphorylation by Lck or Fyn at TCR quiescent stage. When TCR is activated by pMHC, CD3 ϵ and ζ cytoplasmic domains dissociate from plasma membrane and their ITAMs become accessible for Lck/Fyn phosphorylation. Receptor clustering, Ca²⁺ concentration increase and phospholipid environment change might all lead to the dissociation of ITAM from the plasma membrane.

图2 T细胞抗原受体的活化机制模型

Fig.2 The activation model of TCR-CD3 complex

被Lck/Fyn自动磷酸化。这个模型所引发的科学问题是: pMHC激活TCR后如何导致ITAM从膜上解离, 从而使得其酪氨酸残基暴露并被Lck/Fyn磷酸化。ITAM从质膜上的解离可能被多种因素调节: 受体周围离子浓度的变化、脂质环境的变化以及pMHC结合引起的TCR聚集(图2)。T细胞活化后一个早期的信号事件就是CRAC通道开放引起膜周围Ca²⁺浓度的迅速提高, 由于ITAM与膜的结合主要通过静电作用, 所以Ca²⁺浓度的提高可能会直接影响这种静电结合, 从而促进ITAM从膜上解离; Ca²⁺浓度的提高同时会激活质膜上的磷脂双向转运酶的活性, 将酸性磷脂PS从膜内层翻转至外层, 从而降低质膜内表面的负电荷含量, 这可能也会促进ITAM从膜上解离; 另外TCR在识别抗原后会迅速发生聚集, 这种聚集所引起的空间位阻效应以及ITAM对有限酸性磷脂的竞争效应也可能会引起ITAM从膜上解离。以上的几种因素之间并不相互排斥, 有可能通过协调效应来调控ITAM的磷酸化。

8 小结

TCR作为免疫系统最关键的功能蛋白之一, 其研究已经进行了很多年, 但是我们对其结构与功能却仍不清楚。虽然目前各个亚基的结构正在被逐个解析, 但是彻底弄清这个受体复合物的空间构象却还是一个很大的挑战。关于TCR的活化机制, 传统的观点认为ITAM的磷酸化仅受激酶-磷酸酶的动态调控, 但最新的研究进展表明受体周围的微环境如质膜磷脂组分对ITAM的磷酸化也至关重要。这些新的发现只是照亮了冰山一角, 让我们更加意识到TCR在结构与功能上的复杂性和精密性。如前文所述, 了解TCR对认识免疫系统正常的生理功能以及各种相关疾病有着重要的意义, 因此TCR领域仍将吸引很多免疫学家来进行研究。希望在不远的将来, 我们能够彻底解析TCR的三维结构及其功能机制。

参考文献 (References)

- Ciofani M, Zuniga-Pflucker JC. Determining gamma delta versus alpha beta T cell development. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(9): 657-63.
- Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gamma delta T cell effector functions: A blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(7): 467-78.
- Pang SS, Berry R, Chen ZJ, Kjer-Nielsen L, Perugini MA, King GF, *et al.* The structural basis for autonomous dimerization of the pre-T-cell antigen receptor. *Nature* 2010; 467(7317): 844-8.
- Bassing CH, Swat W, Alt FW. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 2002; 109: S45-S55.
- Krangel MS. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol* 2009; 21(2): 133-9.
- Mathieu N HW, Spicuglia S, Verthuy C, Ferrier P. Chromatin remodeling by the T cell receptor (TCR)-beta gene enhancer during early T cell development: Implications for the control of TCR-beta locus recombination. *J Exp Med* 2000; 192(5): 625-36.
- Spicuglia S, Kumar S, Yeh JH, Vachez E, Chasson L, Gorbach S, *et al.* Promoter activation by enhancer-dependent and -independent loading of activator and coactivator complexes. *Mol Cell* 2002; 10(6): 1479-87.
- Oestreich KJ, Cobb RM, Pierce S, Chen JZ, Ferrier P, Oltz EM. Regulation of TCR beta gene assembly by a promoter/enhancer holocomplex. *Immunity* 2006; 24(4): 381-91.
- Osipovich O, Cobb RM, Oestreich KJ, Pierce S, Ferrier P, Oltz EM. Essential function for SWI-SNF chromatin-remodeling complexes in the promoter-directed assembly. *Nat Immunol* 2007; 8(8): 809-16.
- Gellert M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* 2002; 71: 101-32.
- Bassing CH, Alt FW, Hughes MM, D'Auteuil M, Wehrly TD, Woodman BB, *et al.* Recombination signal sequences restrict chromosomal V(D)J recombination beyond the 12/23 rule. *Nature* 2000; 405(6786): 583-6.
- Wu C, Bassing CH, Jung D, Woodman BB, Foy D, Alt FW. Dramatically increased rearrangement and peripheral representation of V beta 14 driven by the 3' D beta 1 recombination signal sequence. *Immunity* 2003; 18(1): 75-85.
- Wang XM, Xiao G, Zhang YF, Wen XM, Gao X, Okada S, *et al.* Regulation of Tcrb recombination ordering by c-Fos-dependent RAG deposition. *Nat Immunol* 2008; 9(7): 794-801.
- Ma YM, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 2002; 108(6): 781-94.
- Lewis SM. The mechanism of V(D)J joining-lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv Immunol* 1994; 56: 27-150.
- Khor B, Sleckman BP. Allelic exclusion at the TCR beta locus. *Curr Opin Immunol* 2002; 14(2): 230-4.
- Skok JA, Gisler R, Novatchkova M, Farmer D, de Laat W, Buslinger M. Reversible contraction by looping of the Tcra and Tcrb loci in rearranging thymocytes. *Nat Immunol* 2007; 8(4): 378-87.
- Schlimgen RJ, Reddy KL, Singh H, Krangel MS. Initiation of allelic exclusion by stochastic interaction of Tcrb alleles with repressive nuclear compartments. *Nat Immunol* 2008; 9(7): 802-9.
- Michie AM, Zuniga-Pflucker JC. Regulation of thymocyte differentiation: Pre-TCR signals and beta-selection. *Semin Immunol*

- 2002; 14(5): 311-23.
- 20 Agata Y, Tamaki N, Sakamoto S, Ikawa T, Masuda K, Kawamoto H, *et al*. Regulation of T cell receptor beta gene rearrangements and allelic exclusion by the helix-loop-helix protein, E47. *Immunity* 2007; 27(6): 871-84.
- 21 Eyquem S, Chemin K, Fasseu M, Bories JC. The Ets-1 transcription factor is required for complete pre-T cell receptor function and allelic exclusion at the T cell receptor beta locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(44): 15712-7.
- 22 Brady BL, Steinel NC, Bassing CH. Antigen receptor allelic exclusion: An update and reappraisal. *J Immunol* 2010; 185(7): 3801-8.
- 23 Krangel MS, Carabana J, Abbarategui I, Schlimgen R, Hawwari A. Enforcing order within a complex locus: Current perspectives on the control of V(D)J recombination at the murine T-cell receptor alpha/delta locus. *Immunol Rev* 2004; 200: 224-32.
- 24 Abarrategui I, Krangel MS. Regulation of T cell receptor-alpha gene recombination by transcription. *Nat Immunol* 2006; 7(10): 1109-15.
- 25 Abarrategui I, Krangel MS. Noncoding transcription controls downstream promoters to regulate T-cell receptor alpha recombination. *Embo Journal* 2007; 26(20): 4380-90.
- 26 Matthews AGW, Kuo AJ, Ramon-Maiques S, Han SM, Champagne KS, Ivanov D, *et al*. RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature* 2007; 450(7172): 1106-10.
- 27 Liu Y, Subrahmanyam R, Chakraborty T, Sen R, Desiderio S. A plant homeodomain in Rag-2 that binds hypermethylated lysine 4 of histone H3 is necessary for efficient antigen-receptor-gene rearrangement. *Immunity* 2007; 27(4): 561-71.
- 28 Hawwari A, Krangel MS. Role for rearranged variable gene segments in directing secondary T cell receptor alpha recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(3): 903-7.
- 29 Huang CY, Sleckman BP, Kanagawa S. Revision of T cell receptor alpha chain genes is required for normal T lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(40): 14356-61.
- 30 Wang FP, Huang CY, Kanagawa O. Rapid deletion of rearranged T cell antigen receptor (TCR) V alpha-J alpha segment by secondary rearrangement in the thymus: Role of continuous rearrangement of TCR alpha chain gene and positive selection in the T cell repertoire formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(20): 11834-9.
- 31 Dave VP, Cao ZS, Browne C, Alarcon B, FernandezMiguel G, Lafaille J, *et al*. CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. *EMBO J* 1997; 16(6): 1360-70.
- 32 Hayes SM, Love PE. Stoichiometry of the murine gamma delta T cell receptor. *J Exp Med* 2006; 203(1): 47-52.
- 33 Siegers GM, Swamy M, Fernández-Malavé E, Minguet S, Rathmann S, Guardo AC, *et al*. Different composition of the human and the mouse gamma delta T cell receptor explains different phenotypes of CD3 gamma and CD3 delta immunodeficiencies. *J Exp Med* 2007; 204(11): 2537-44.
- 34 Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 2002; 111(7): 967-79.
- 35 Feng JW, Call ME, Wucherpfennig KW. The assembly of diverse immune receptors is focused on a polar membrane-embedded interaction site. *PLoS Biol* 2006; 4(5): 768-79.
- 36 Xu CQ, Call ME, Wucherpfennig KW. A membrane-proximal tetracysteine motif contributes to assembly of CD3 delta epsilon and CD3 gamma epsilon dimers with the T cell receptor. *J Biol Chem* 2006; 281(48): 36977-84.
- 37 Werlen G, Hausmann B, Palmer E. A motif in the alpha beta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* 2000; 406(6794): 422-6.
- 38 Arnett KL, Harrison SC, Wiley DC. Crystal structure of a human CD-epsilon/delta dimer in complex with a UCHT1 single-chain antibody fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(46): 16268-73.
- 39 Kuhns MS, Davis MM. Disruption of extracellular interactions impairs T cell receptor-CD3 complex stability and signaling. *Immunity* 2007; 26(3): 357-69.
- 40 Kuhns MS, Girvin AT, Klein LO, Chen R, Jensen KD, Newell EW, *et al*. Evidence for a functional sidedness to the alpha beta TCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(11): 5094-9.
- 41 Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 2006; 24(2): 133-9.
- 42 Call ME, Schnell JR, Xu CQ, Lutz RA, Chou JJ, Wucherpfennig KW. The structure of the zeta zeta transmembrane dimer reveals features essential for its assembly with the T cell receptor. *Cell* 2006; 127(2): 355-68.
- 43 Call ME, Wucherpfennig KW, Chou JJ. The structural basis for intramembrane assembly of an activating immunoreceptor complex. *Nat Immunol* 2010; 11(11): 1023-9.
- 44 Wucherpfennig KW, Gagnon E, Call MJ, Huseby ES, Call ME. Structural biology of the T-cell receptor: Insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2(4): a005140.
- 45 Garcia KC, Adams JJ, Feng D, Ely LK. The molecular basis of TCR germline bias for MHC is surprisingly simple. *Nat Immunol* 2009; 10(2): 143-7.
- 46 Van Laethem F, Sarafova SD, Park JH, Tai X, Pobezinsky L, Guinter TI, *et al*. Deletion of CD4 and CD8 coreceptors permits generation of alpha beta T cells that recognize antigens independently of the MHC. *Immunity* 2007; 27(5): 735-50.
- 47 Marrack P, Scott-Browne JP, Dai S, Gapin L, Kappler JW. Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 171-203.
- 48 Scott-Browne JP, White J, Kappler JW, Gapin L, Marrack P. Germline-encoded amino acids in the alpha beta T-cell receptor

- control thymic selection. *Nature* 2009; 458(7241): 1043-6.
- 49 Feng D, Bond CJ, Ely LK, Maynard J, Garcia KC. Structural evidence for a germline-encoded T cell receptor-major histocompatibility complex interaction "codon". *Nat Immunol* 2007; 8(9): 975-83.
- 50 Colf LA, Bankovich AJ, Hanick NA, Bowerman NA, Jones LL, Kranz DM, *et al.* How a single T cell receptor recognizes both self and foreign MHC. *Cell* 2007; 129(1): 135-46.
- 51 Reiser JB, Darnault C, Gregoire C, Mosser T, Mazza G, Kearney A, *et al.* CDR3 loop flexibility contributes to the degeneracy of TCR recognition. *Nat Immunol* 2003; 4(3): 241-7.
- 52 Reiser JB, Darnault C, Guimezanes A, Gregoire C, Mosser T, Schmitt-Verhulst AM, *et al.* Crystal structure of a T cell receptor bound to an allogeneic MHC molecule. *Nat Immunol* 2000; 1(4): 291-7.
- 53 Huseby ES, White J, Crawford F, Vass T, Becker D, Pinilla C, *et al.* How the T cell repertoire becomes peptide and MHC specific. *Cell* 2005; 122(2): 247-60.
- 54 Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 591-619.
- 55 Gil D, Schamel WWA, Montoya M, Sanchez-Madrid F, Alarcon B. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* 2002; 109(7): 901-12.
- 56 Szymczak AL, Workman CJ, Gil D, Dilioglou S, Vignali KM, Palmer E, *et al.* The CD3 epsilon proline-rich sequence, and its interaction with Nck, is not required for T cell development and function. *J Immunol* 2005; 175(1): 270-5.
- 57 Xu CQ, Gagnon E, Call ME, Schnell JR, Schwieters CD, Carman CV, *et al.* Regulation of T cell receptor activation by dynamic membrane binding of the CD3 epsilon cytoplasmic tyrosine-based motif. *Cell* 2008; 135(4): 702-13.
- 58 Yeung T, Gilbert GE, Shi J, Silvius J, Kapus A, Grinstein S. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* 2008; 319(5860): 210-3.
- 59 Stace CL, Ktistakis NT. Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761(8): 913-26.
- 60 Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 2006; 443(7112): 651-7.

Structural and Functional Studies of T Cell Receptor

Shi Xiaoshan, Li Lunyi, Guo Xingdong, Xu Chenqi*

(State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract T cell receptor (TCR) is a critical immunoreceptor expressed on the T cell surface, which specifically recognizes peptide antigen-MHC (pMHC) complex and triggers T cell immune responses. Abnormal TCR function will cause autoimmunity or immunodeficiency. Unveiling TCR structure and function will help us to understand the molecular basis for immune response and might lead to better design of clinical therapies for T cell related human diseases. In this paper, we reviewed recent studies on TCR structure and function, including TCR classification, gene rearrangement, receptor assembly and structure, antigen recognition and activation mechanism.

Key words T cell receptor; structure; gene rearrangement; antigen recognition; receptor phosphorylation

This work was supported by Grants from the Ministry of Science and Technology of China (No.2011CB910901), the National Natural Science Foundation of China (No.31070738), the Chinese Academy of Sciences Hundred Talent Project and Shanghai Pujiang Talent Project (No.10PJ1411500)

*Corresponding author. Tel: 86-21-54921317, E-mail: cqxu@sibs.ac.cn