

## 领域前沿·中国



2004年中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学与生物化学专业研究生毕业, 获理学博士学位。博士期间主要研究 $K^+$ 离子通道的抑制机制, 科研成果作为主要部分申请获得2005年上海市科学技术进步一等奖。2004~2009年在美国哈佛大学医学院Dana-Farber肿瘤研究所从事免疫学研究, 先后为博士后、Instructor。主要研究领域为T淋巴细胞的信号转导, 特别是T细胞中关键免疫受体T细胞抗原受体(TCR)的活化机制, 发现酸性磷脂调控TCR活化的新机制(Xu C, *et al.* 2008, *Cell*)。2009年11月起至今担任中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所研究员和课题组长, 继续研究TCR和其他关键免疫受体的活化机制(Shi X, *et al.* 2013, *Nature*)。2010年入选中科院百人计划及上海市浦江人才计划。现任《中国细胞生物学学报》编委。

## “小离子的大功能”——钙离子调控T细胞抗原受体活化的机制研究

施小山 许琛琦\*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室  
/国家蛋白质科学中心(上海), 上海 200031)

众所周知, 脂质同蛋白质及核酸一样是生命体必需的组分之一, 由其组成的细胞质膜不仅保证着细胞的完整性, 同时也调控着许多生理过程<sup>[1]</sup>。伴随着生命科学研究技术的发展, 关于脂质调控蛋白质功能的工作越来越多地被报道出来<sup>[2-3]</sup>。总体来说, 脂质同蛋白质的相互作用可分成特异性及非特异性相互作用两种形式, 二者分别对各类信号事件进行精细的调控。作为脂质-蛋白质非特异性相互作用的主要体现形式, 二者的静电相互作用(富含碱性残基的蛋白质与酸性磷脂之间的静电相互作用)被发现广泛存在于膜蛋白受体、离子通道、黏附分子及许多其他蛋白同脂质的相互作用中, 它们控制着受体的活化、离子通道的开关、细胞的黏附及其他生命过程<sup>[4-7]</sup>。然而, 关于这种静电相互作用的解除机制迄今却仍未被揭示。最近, 我们针对T细胞抗原受体(TCR)的研究发现: TCR胞内区的酪氨酸磷酸化受细胞质膜中的酸性磷脂调控。在TCR未识别抗原前, 其酪氨酸信号模体(ITAM)与酸性磷脂结合从而插入到膜脂双层中, 处于被“屏蔽”的状态<sup>[4]</sup>。而在T细胞

被抗原活化后, 我们发现TCR周围的钙离子浓度迅速上升, 这些二价阳离子可以通过静电相互作用与酸性磷脂结合, 从而打破ITAM与脂质之间的静电相互作用, 帮助ITAM磷酸化, 并最终扩大T细胞受体的激活信号, 提高T细胞对抗原的敏感性<sup>[8]</sup>。

T细胞抗原受体是T淋巴细胞(简称T细胞)识别抗原并最终发挥其适应性免疫功能的基础, 它是由配体识别亚基TCR $\alpha\beta$ 及信号亚基CD3 $\epsilon\gamma$ 、 $\epsilon\delta$ 与 $\zeta\zeta$ 共同组成的一个四亚基复合物<sup>[9]</sup>。TCR $\alpha\beta$ 通过基因重排的方式, 利用有限的DNA序列转录并翻译成庞大的TCR受体库, 从而识别机体和环境中的各式各样的抗原<sup>[10]</sup>。而另一方面, 保守的信号亚基(包括一条CD3 $\gamma$ 链、一条CD3 $\delta$ 链、两条CD3 $\epsilon$ 链及两条CD3 $\zeta$ 链)则通过特定的免疫受体酪氨酸激活模体(ITAM)来行使其传递信号的功能<sup>[9]</sup>。更为有趣的是, 不同CD3链带有的ITAM个数并不是完全一致。CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 及CD3 $\epsilon$ 链的胞内段各带有一个ITAM, 而CD3 $\zeta$ 链的胞内段则带有三个ITAM。一个TCR中共有十个ITAM, 可以组成多种多样的磷酸化组合, 进而适应不同程

度的刺激信号, 传导不同程度的活化信号<sup>[11]</sup>。

迄今关于TCR的胞内信号通路已经得到了比较广泛的研究<sup>[9]</sup>。当TCR $\alpha\beta$ 识别抗原递呈细胞表面的主要组织相容性抗原分子MHC所递呈的多肽抗原(peptide-MHC复合物, 简称pMHC)后, 信号亚基CD3上的ITAM将被激酶Lck或Fyn磷酸化, 而这种ITAM磷酸化将启动一系列的信号级联放大反应, 最终调控T细胞的增殖、分化及杀伤等功能。这样一系列传统的信号级联放大反应可能有助于解释T细胞可以识别甚至单个抗原而发挥功能的超敏感性<sup>[12-13]</sup>。值得一提的是, 在这一系列的信号级联放大反应中, 第二信使浓度的上升(比如IP<sub>3</sub>、DAG及Ca<sup>2+</sup>)起着至关重要的作用<sup>[9]</sup>。

同胞内信号转导过程的详尽研究不同, TCR的跨膜信号转导过程由于研究难度更大一直是困扰科学家们的大问题。换言之, TCR $\alpha\beta$ 在接受pMHC的刺激后, 如何引起CD3胞内段ITAM的磷酸化一直是不甚清楚的过程。同所有的磷酸化过程一样, CD3胞内段ITAM磷酸化水平会被激酶(如Lck及Fyn)及磷酸水解酶(如CD45、SHP1及SHP2)调控<sup>[14-15]</sup>。目前, TCR的活化机制主要有三种假说: 受体聚集、结构形变以及磷酸酶排挤模型<sup>[16-17]</sup>。而所有的模型最终都通过改变TCR磷酸化平衡来启动TCR活化过程。在受体聚集假说中, pMHC的刺激会诱导TCR和共受体(CD4与CD8)产生聚集现象。共受体的胞外段可以同pMHC结合, 而胞内段可以与Lck相互作用。这就使得pMHC结合TCR时, 它还通过共受体把Lck招募到了TCR周围, 从而增加ITAM磷酸化的可能性。另一方面, pMHC与TCR的结合会诱导TCR分子形成聚集体, 这种聚集体有利于Lck分子克服空间位阻效应将TCR彻底磷酸化。在结构形变假说中, pMHC的刺激会引起TCR分子产生结构形变。初步的结构生物学研究表明, 这些结构形变存在于胞外区和胞内区, 可能帮助TCR分子形成聚集体及下游信号分子的招募从而促进TCR的活化。在磷酸酶排挤假说中, pMHC的刺激在引起受体聚集的同时会排挤磷酸水解酶CD45。CD45是广泛存在于淋巴系细胞中的去磷酸化水解酶, 它有着体积庞大的胞外段。当pMHC与TCR结合时, 抗原递呈细胞及T细胞之间的间隙将无法容纳庞大的CD45, 从而把它排挤出去进而降低ITAM去磷酸化的可能性。这三种基于蛋白质-蛋白质相互作用的模型揭示了TCR活化

是被一个多层面的复杂机制所调控的, 然而仍然留下一些难以解释的问题。比如, 最新研究表明, 在静息T淋巴细胞中活化型的Lck就已经大量存在<sup>[18]</sup>, 那么T细胞是否需要浪费能量来维系低水平的TCR磷酸化? 另外, 在生理条件下抗原递呈细胞表面递呈激动性多肽的MHC密度是很低的, 那么被如此少量的pMHC激活的TCR是否足够激活整个T细胞的免疫反应呢?

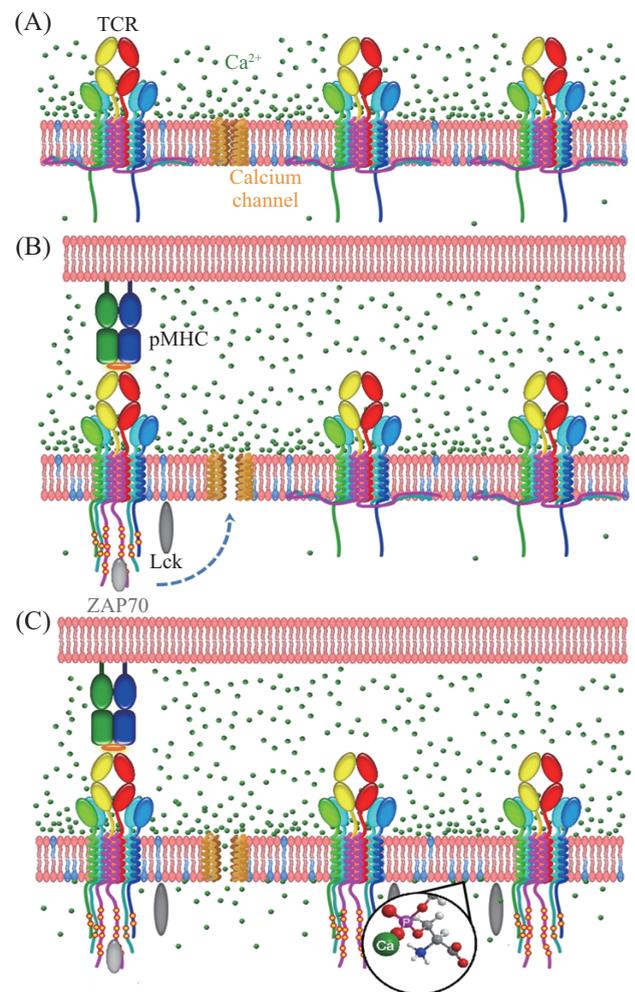
带着这样的问题, 我们尝试从另外一个角度来研究TCR活化的过程, 并提出如下科学问题: 作为一个庞大的细胞质膜表面受体, TCR的活化是如何受细胞质膜环境调控的呢? 2008年, 我们利用生物化学及生物物理学技术手段发现, 富含碱性残基的信号亚基CD3 $\epsilon$ 胞内段, 在静息T淋巴细胞内可以同细胞质膜内层的酸性磷脂相互作用, 进而使得ITAM中的关键酪氨酸残基侧链插入并被屏蔽在细胞膜的疏水核心, 从而防止其被Lck自动磷酸化<sup>[4]</sup>。这一结果很好地呼应了前人关于CD3 $\zeta$ 胞内段同质膜相互作用的生化分析研究<sup>[19]</sup>, 并共同为TCR的活化机制研究提供了新的思路。正是通过质膜的保护, 静息T淋巴细胞不需要浪费额外的能量来维持低水平的ITAM磷酸化。

那么在TCR同pMHC结合之后, 是什么导致被细胞质膜内层酸性磷脂保护的酪氨酸从质膜疏水核心暴露出来呢? 这个问题就成为解决TCR活化机制的关键问题, 因为少量pMHC激活的TCR可能通过解除质膜的保护来激活其余的TCR进而扩大TCR活化信号。如前所述, 细胞质膜内层酸性磷脂是通过静电相互作用进而保护CD3中的关键酪氨酸残基的, 那么以静电相互作用的方式来调控这一过程将会是一个简单而有效的方式。通过分析T细胞信号转导通路, 我们发现第二信使钙离子的内流也许可以成为打破这种蛋白脂质相互作用的关键事件。有趣的是, 在T细胞激活时, 钙离子通道CRAC将会同T细胞受体有很好的共定位<sup>[20]</sup>。这将大大提高TCR周围的钙离子浓度, 并使其同CD3竞争酸性磷脂成为可能。

为了验证钙离子同CD3 $\epsilon/\zeta$ 竞争酸性磷脂的能力, 我们在以前蛋白质-磷脂反应体系的基础上引入了钙离子, 并进行了微平衡透析、荧光偏振、活细胞荧光共振能量转移及多维溶液核磁共振等实验<sup>[4]</sup>。结果确实证明钙离子在体外及T细胞内均可以打破带正电的CD3 $\epsilon/\zeta$ 胞内段同酸性磷脂的相互作用, 帮

助ITAM从膜上解离同时暴露其关键的酪氨酸残基。进一步,我们又利用核磁共振一维磷谱方法从原子水平上证明了钙离子能与酸性磷脂头部区的磷酸根直接结合,中和其负电荷,由此可以打破CD3 $\epsilon$ 胞内段与酸性磷脂之间的静电作用。为了验证这种机制的生理相关性,我们分别进行了体外磷酸化实验及T细胞(包括细胞系及小鼠原代细胞)刺激实验。首先,我们模拟生理条件在体外重构了受体信号模体(CD3 $\epsilon$ 胞内段)、磷脂双分子层、钙离子及Lck激酶这一多元反应体系。实验结果表明,钙离子可以有效地促使CD3 $\epsilon$ 胞内段被Lck激酶磷酸化。接下来,我们利用低浓度CD3抗体交联刺激来模拟T细胞在生理上被微量抗原活化的过程。我们发现,在刺激体系中加入钙离子能大大提高CD3 $\epsilon$ 与 $\zeta$ 被抗体刺激后的磷酸化程度。这一现象是由活化的T细胞中胞内钙离子浓度上升所介导的,因为钙离子螯合剂预处理或T细胞上钙离子通道缺失均会减弱钙的作用。由于钙离子是很重要的细胞内第二信使,调控许多信号通路。所以我们必须要用实验证明钙离子促进CD3磷酸化这一效应不是由钙离子信号通路介导的,而是钙离子作为二价离子中和了酸性磷脂的电荷后产生的效应。因为CD3在T细胞中是被Lck激酶所磷酸化,而被CD45等磷酸酶去磷酸化,我们首先要验证钙离子不会直接影响Lck和CD45等磷酸酶的活性。我们先在T细胞中过表达了活化型的Lck,让Lck的活性在T细胞中达到饱和。在这种情况下,钙离子还是能促进CD3磷酸化。另外,我们用各类小分子抑制剂在T细胞中抑制了CD45等主要磷酸酶的活性,发现钙离子还是能促进CD3磷酸化。这两个实验表明,钙离子对CD3的帮助作用与Lck和CD45等磷酸酶的活性改变无关。为了彻底排除钙离子信号通路在钙离子对CD3帮助作用中的贡献,我们使用非生理的碱土金属锶离子代替钙离子来重复T细胞活化实验。锶离子能够像钙离子一样通过钙离子通道CRAC流入T细胞,但是它却不能激活钙离子介导的信号通路,因此锶离子是一个理想的对照物。我们的实验发现锶离子跟钙离子一样能够引起CD3胞内段从膜上解离并促进CD3磷酸化。综合以上的实验,我们认为钙离子能中和酸性磷脂的负电荷,由此打破CD3与磷脂的静电相互作用,引起CD3从膜上解离以及酪氨酸位点的暴露,从而促进CD3的磷酸化。

在这个工作中,我们发现了一种新颖的钙离子对蛋白质-磷脂静电相互作用调控机制。这一新机制揭示了TCR活化过程中存在着一个正反馈的过程:在静息状态下,TCR的活化位点通过CD3-酸性磷脂静电作用被屏蔽在细胞膜中;微量pMHC可以激活几个TCR引起初始活化信号,导致钙离子从胞外流入T细胞内;TCR周围局部钙离子浓度的提高可以打破CD3与酸性磷脂的静电作用,帮助未接触抗原刺激的TCR分子的磷酸化,从而将初始的TCR活化信号放大(图1)。这种钙离子介导的TCR信号放大



A: 在静息状态下, TCR中的CD3 $\epsilon$ 链及 $\zeta$ 链胞内段同细胞质膜内层酸性磷脂相互作用,其酪氨酸磷酸化位点被保护在膜脂双层中,从而免受激酶Lck或Fyn的磷酸化; B: 当少量的pMHC同TCR结合时,这些TCR中的CD3 $\epsilon$ 链及 $\zeta$ 链胞内段从细胞质膜内层解离并被激酶Lck或Fyn磷酸化,引发初始TCR活化信号,激活细胞质膜上的钙离子通道CRAC; C: 钙离子通道的打开使得钙离子大量内流,内流的钙离子可以与CD3 $\epsilon$ 链及 $\zeta$ 链胞内段竞争细胞质膜内层酸性磷脂,并促进CD3 $\epsilon$ 链及 $\zeta$ 链胞内段从细胞质膜内层解离。解离的CD3 $\epsilon$ 链及 $\zeta$ 链胞内段将被激酶Lck或Fyn磷酸化,从而放大TCR活化信号。

图1 TCR活化机制模型

机制有助于解释为什么T淋巴细胞对外来抗原是如此高的敏感性<sup>[12-13]</sup>。同时,这一机制将为研究其他磷脂调控的蛋白质信号通路提供新的思路。当然,这一新机制也引发了一系列新的问题。除了钙离子以外,其余的二价金属离子是否也具有如此功能?这些二价金属离子的效果是否有很大差异?在功能上,这一膜调控机制是否影响着各种T细胞亚型对外界抗原的敏感性?随着越来越多研究的进行,我们相信这些问题将会得到完满的解答。

### 参考文献 (References)

- 1 van Meer G., Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(2): 112-24.
- 2 Cho H, Wu M, Bilgin B, Walton SP, Chan C. Latest developments in experimental and computational approaches to characterize protein-lipid interactions. *Proteomics* 2012; 12(22): 3273-85.
- 3 Scott JL, Musselman CA, Adu-Gyamfi E, Kutateladze TG, Stahelin RV. Emerging methodologies to investigate lipid-protein interactions. *Integr Biol (Camb)* 2012; 4(3): 247-58.
- 4 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 CD3epsilon cytoplasmic tyrosine-based motif. *Cell* 2008; 135(4): 702-13.
- 5 Hansen SB, Tao X, MacKinnon R. Structural basis of PIP2 activation of the classical inward rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.2. *Nature* 2011; 477(7365): 495-8.
- 6 Heo WD, Inoue T, Park WS, Kim ML, Park BO, Wandless TJ, *et al.* PI(3,4,5)P-3 and PI(4,5)P-2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science* 2006; 314(5804): 1458-61.
- 7 Kim C, Schmidt T, Cho EG, Ye F, Ulmer TS, Ginsberg MH. Basic amino-acid side chains regulate transmembrane integrin signalling. *Nature* 2011; 481(7380): 209-13.
- 8 Shi X, Bi Y, Yang W, Guo X, Jiang Y, Wan C, *et al.* Ca<sup>2+</sup> regulates T-cell receptor activation by modulating the charge property of lipids. *Nature* 2013; 493(7430): 111-5.
- 9 Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 591-619.
- 10 Krangel MS. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Curr Opin in Immunol* 2009; 21(2): 133-9.
- 11 Holst J, Wang H, Eder KD, Workman CJ, Boyd KL, Baquet Z, *et al.* Scalable signaling mediated by T cell antigen receptor-CD3 ITAMs ensures effective negative selection and prevents autoimmunity. *Nat Immunol* 2008; 9(6): 658-66.
- 12 Irvine DJ, Purbhoo MA, Krogsgaard M, Davis MM. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* 2002; 419(6909): 845-9.
- 13 Purbhoo MA, Irvine DJ, Huppa JB, Davis MM. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol* 2004; 5(5): 524-30.
- 14 Palacios EH, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* 2004; 23(48): 7990-8000.
- 15 Stanford SM, Rapini N, Bottini N. Regulation of TCR signalling by tyrosine phosphatases: From immune homeostasis to autoimmunity. *Immunology* 2012; 137(1): 1-19.
- 16 van der Merwe PA, Dushek O. Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(1): 47-55.
- 17 Kuhns MS, Davis MM. TCR Signaling Emerges from the Sum of Many Parts. *Front Immunol* 2012; 3: 159.
- 18 Nika K, Soldani C, Salek M, Paster W, Gray A, Etzensperger R, *et al.* Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity* 2010; 32(6): 766-77.
- 19 Aivazian D, Stern LJ. Phosphorylation of T cell receptor zeta is regulated by a lipid dependent folding transition. *Nat Struct Biol* 2000; 7(11): 1023-6.
- 20 Lioudyno MI, Kozak JA, Penna A, Safrina O, Zhang SL, Sen D, *et al.* Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(6): 2011-6.