

T 细胞受体信号转导机制

徐晓敏^{1,2}, 李华^{1*}

(1. 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031; 2. 国科大杭州高等研究院, 浙江 杭州 310000)

[摘要] T 细胞作为机体适应性免疫的主力军, 可以攻击病原体感染细胞和肿瘤细胞, 在维持机体稳态中发挥作用。其表面存在的 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 能够识别主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 呈递的抗原多肽, 并将抗原结合信号转换为胞内酪氨酸磷酸化信号, 引发下游信号通路来激活 T 细胞。在临床上, T 细胞受体工程化 T 细胞 (T cell receptor-engineered T cell, TCR-T) 疗法有望在实体瘤的治疗中取得突破。简要阐述 TCR 的信号转导机制及其与嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) 的异同, 以便更好地理解 TCR-T 的工作原理, 从而为设计更好的 T 细胞治疗产品提出新的策略, 以求其在实体瘤临床治疗中得到进一步应用。

[关键词] T 细胞受体; 嵌合抗原受体; 信号转导

[中图分类号] Q789

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2021) 08-0563-11

Signal Transduction Mechanisms of T Cell Receptor

XU Xiaomin^{1,2}, LI Hua¹

(1. Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 2. Hangzhou Institute for Advanced Study, UCAS, Hangzhou 310000, China)

[Abstract] As the main force of adaptive immunity, T cells can attack pathogen-infected cells and tumor cells, playing their roles in maintaining body homeostasis. T cell receptor (TCR) expressed on the surface of T cells can recognize the antigen peptides presented by the major histocompatibility complex (MHC), converting the antigen binding signal into intracellular tyrosine phosphorylation signal, and triggering downstream signaling pathways to activate T cells. Clinically, T cell receptor-engineered T cell (TCR-T) therapy is expected to make a breakthrough in the treatment of solid tumors. This review briefly elaborates on the signal transduction mechanism of TCR and compares the differences and similarities between TCR and chimeric antigen receptor (CAR) in order to help us better understand the working principle of TCR-T and to propose new strategies for designing better T cell therapy products, seeking to further expand its clinical application in solid tumor treatment.

[Key words] T cell receptor; chimeric antigen receptor; signal transduction

目前, 以 T 细胞受体工程化 T 细胞 (T cell receptor-engineered T cell, TCR-T) 和嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T cell, CAR-T) 疗法为主流的过继性 T 细胞免疫疗法成为肿瘤免疫治疗的一大热点。通过向天然的 T 细胞中转入识别肿瘤抗原的 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) $\alpha\beta$ 异二聚体或嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR), T 细胞便能够高效地识别靶抗原, 在体内发挥抗肿瘤免疫功能。CAR-T 疗法是过继性免疫疗法中研究较为火热的一员, 目前已上市的产品以及处于临床阶段的 CAR-T 产品多针对于血液瘤, 对于实体瘤的治疗效果较差。分析其中原因, 主要在于实体瘤

的细胞疗法存在不少难点, 例如不同类型实体瘤的异质性大、缺乏独特的肿瘤相关抗原作为治疗靶点、T 细胞无法定向迁移到肿瘤部位、CAR-T 的增殖能力和抗凋亡能力等持续性不够以及肿瘤内复杂的微环境对 TCR 有抑制作用等。虽然 CAR-T 与 TCR-T 都与通用的细胞治疗兼容, 并且能够诱导有效的抗肿瘤反应, 但 TCR-T 显示出一些独特的特性, 使其在治疗具有挑战性的实体瘤时具有独特的优势, 但这种优势背后具体的分子机制尚不完全清楚。因此本文主要针对现有的文献报道, 从 TCR 和 CAR 本身结构和信号转导差异等方面出发来理解这种临床治疗上的差异, 这对于理解 TCR-T 针对实体瘤的治疗优势具有重要意义。

1 T 细胞受体的结构

TCR 是所有 T 细胞表面表达的由基因重排产生

接受日期: 2021-08-02

*** 通信作者:** 李华, 副研究员;

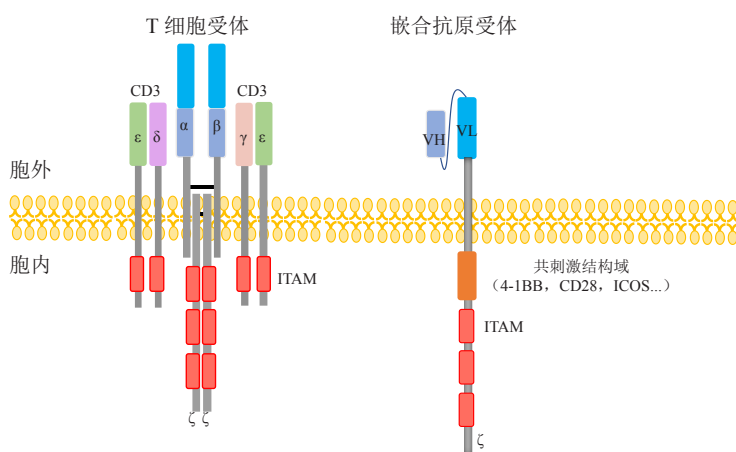
研究方向: 关键免疫受体分子活化机制的结构生物学研究;

Tel: 021-54921318; **E-mail:** lihua@sibcb.ac.cn

的天然抗原受体, 它与 CAR 之间存在许多不同。与 CAR 的单链结构不同, TCR 由 2 条高度可变肽链组成异二聚体, 包括 TCR2 (α/β) 和 TCR1 (γ/δ)。由于携带 $\alpha\beta$ 肽链的 T 细胞占了绝大多数 (98%), 所以接下来提及的 TCR 都默认为 TCR2 ($\alpha\beta$)。TCR α 链和 β 链均各有 1 个可变抗原结合区、1 个恒定区和 1 个跨膜结构域。但 TCR 链并不具备独立传递信号的能力, 这是由于 TCR 的 2 条肽链 ($\alpha\beta$) 胞内区很短, 无法独立传递信号 (见图 1)。这种结构特性使得其必须通过跨膜区 (带正电荷) 与分化簇 3 (cluster of differentiation 3, CD3) 分子带负电的跨膜区非共价结合, 形成 TCR-CD3 复合物, 进而将 TCR 识别抗原的信号传递到胞内, 将抗原特异性识别与效应反应结合起来, 启动一系列信号反应。TCR 通过 1 个抗原识别亚基 (TCR $\alpha\beta$) 和 3 个 CD3 信号亚基 (CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ 和 CD3 $\zeta\zeta$) 形成八聚体, 而 CD3 γ , CD3 δ 和 CD3 ϵ 链各含有 1 个免疫受体酪氨酸活化基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 基序, CD3 ζ 链含有 3 个 ITAM 基序, 因此 1 个 TCR-CD3 复合物共含有 10 个 ITAM 基序和 20 个关键的酪氨酸磷酸化位点^[1] (见图 1)。这些 ITAM 基序中的酪氨酸磷酸化在 TCR 信号转导过程中发挥重要作用。2019 年, Dong 等^[2] 报道了配体未结合状态下人 TCR-CD3 复合物的冷冻电镜 (cryo-EM) 结构, 分辨率为 3.7 Å,

并以 TCR $\alpha\beta$ /CD3 $\delta\epsilon$ /CD3 $\gamma\epsilon$ /CD3 $\zeta\zeta$ 的化学计量 1:1:1:1 进行组装, 这与生化实验所得结果相呼应, 进一步证实了 TCR-CD3 复合物的结构组成。

与 TCR-CD3 复合物相比, 1 个 CAR 分子通常由 1 个包含轻重链可变区域的单链可变区片段 (single-chain variable fragment, scFv) 抗体的胞外抗原识别结构域、跨膜区和胞内区组成 (见图 1)。CAR 的跨膜区与 T 细胞的跨膜区功能一样, 具有锚定作用, 可以将 CAR 固定在 T 细胞膜上, 使其稳定地发挥信号转导功能。CAR 的胞内区则由 1 个 (二代 CAR) 或 2 个 (三代 CAR) 共刺激受体和 CD3 ζ 胞内结构域构成。与 TCR 一样, CAR 信号序列上同样具有多个 ITAM, 能将 CAR 接收到的抗原信号转化为活化信号, 激活 T 细胞, 使其增殖并分化为效应性的 T 细胞, 发挥抗肿瘤等免疫应答功效。但是与天然的 TCR 相比, CAR 仅含有 3 个 ITAM。一项对小鼠 TCR 信号转导的研究表明, 低多样性的 ITAM 足以诱导细胞因子的产生, 但 TCR 驱动的细胞增殖需要高多样性 ITAM, 从而揭示了 TCR 信号转导具有分级性质^[3]。此外, 更大的 ITAM 多样性能够介导更强的下游信号转导^[4], 以确保更高比例的细胞在抗原刺激下被激活, 而不是简单地放大单个 T 细胞的信号强度。因此, 合适的 ITAM 数量也许在 T 细胞功能发挥中具有重要作用。表 1 对 TCR 与 CAR 的特性做了比较。



CD3: cluster of differentiation 3 (分化簇 3); ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif (免疫受体酪氨酸活化基序); VH: variable region of the heavy chain (重链可变区); VL: variable region of the light chain (轻链可变区); 4-1BB: 4-1BB 因子, 肿瘤坏死因子超家族成员; CD28: cluster of differentiation 28 (分化簇 28); ICOS: inducible co-stimulator (可诱导共刺激分子)

图 1 T 细胞受体和嵌合抗原受体的结构示意图

Figure 1 Structure diagrams of T cell receptor and chimeric antigen receptor

表 1 T 细胞受体和嵌合抗原受体的特性对比

Table 1 Comparison of characteristics between T cell receptor and chimeric antigen receptor

特性	受体类型	
	T 细胞受体	嵌合抗原受体
抗原识别域	TCR2 (α/β)	scFv
MHC 依赖性	依赖	非依赖
抗原亲和力 (K_D) ^[5-6]	$10^{-4} \sim 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$10^{-6} \sim 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
CD3 种类	CD3 $\epsilon, \delta, \gamma, \zeta$	CD3 ζ
ITAM 的数量	10 个	3 个
共刺激结构域	无	CD28 或 4-1BB (二代 CAR)
激活靶细胞所需的最低抗原数 ^[7-8]	1 个	1 000 个
识别的抗原类型	细胞表面以及胞内的分子	细胞表面分子
形成的免疫突触 ^[9]	稳定、有序	杂乱、无序
近端信号 ^[10]	LAT 依赖性	LAT 非依赖
基底信号	自身抗原介导	CAR 分子聚集介导
肿瘤浸润性 ^[11]	强	较弱
不良反应	毒性较低	细胞因子风暴、神经毒性等

TCR: T cell receptor (T 细胞受体); scFv: single-chain variable fragment (单链可变区片段); MHC: major histocompatibility complex (主要组织相容性复合物); CD3: cluster of differentiation 3 (分化簇 3); ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif (免疫受体酪氨酸活化基序); CD28: cluster of differentiation 28 (分化簇 28); 4-1BB: 4-1BB 因子, 肿瘤坏死因子超家族成员; LAT: the linker of active T cells (T 细胞活化衔接因子)

2 T 细胞受体的抗原识别

TCR 和 CAR 识别的抗原类型不同。TCR 能够识别由主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 呈递的抗原, CAR 则利用其 scFv 识别细胞表面分子。目前的生物信息学预测表明, 大约 27% 的人类蛋白质组包含膜整合结构, 这些结构可能在细胞表面表达, 因此这些蛋白质能够被 CAR 识别^[12-13]。这同时也意味着有很大一部分表达在癌细胞内的潜在靶点因不能被 CAR 有效识别而不适用于 CAR-T 疗法。相比之下, TCR 可以识别来自整个蛋白质组的抗原表位, 包括位于细胞表面、细胞质和细胞核内的靶标分子。因此, 相对于 CAR, TCR 可以识别更为广泛的抗原类型, 不仅仅局限于细胞表面分子。这也许正是 TCR-T 在治疗实体瘤方面具有更好疗效的原因之一。

TCR 和 CAR 对抗原的亲和力不同。在工程化的 T 细胞中, TCR 对抗原的亲和力至关重要, 能够决定 T 细胞治疗的安全性和有效性^[6]。使用 scFv 识别域的 CAR 对抗原的亲和力通常在纳摩尔 ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 级别^[5]。相比之下, 天然 TCR 的亲和力的数量级通常在微摩尔 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 级别^[14]。基于此, 许多学术界和工业界研究人员想利用 CAR-T 对抗原的高亲和性来获得良好的抗肿瘤功效。然而许多实验结果显示, 与

高亲和力的 CAR 相比, 具备低亲和力 CAR 结构的 CAR-T 显示出更强的增殖能力和抗凋亡等持续性和抗肿瘤能力^[15-16]。因此, 抗原亲和力是否与抗肿瘤功能呈现正相关仍是一个有待商榷的问题。

TCR 和 CAR 在抗原识别的敏感性方面也不尽相同。虽然基于 scFv 的 CAR 相对于 TCR 对其目标抗原具有更高的内在亲和力, 但 TCR-T 可以感受并响应靶细胞上更少的分子, 即能够对极少的抗原肽-MHC 复合物 (peptide-major histocompatibility complex, pMHC) 产生反应, 甚至单一抗原 pMHC 即可将其激活^[17]。相反, CAR 修饰的 T 细胞需要高好几倍数量级的抗原刺激才能实现与 TCR-T 同等水平的细胞因子释放。Harris 等^[18]通过将传统的 α/β 异二聚体或 CAR 与 CAR 胞内信号基序结合, 比较了 TCR 和 CAR 在相同靶抗原的刺激下两者信号的差异, 结果表明尽管 TCR 在膜表面的水平低于 CAR, 但 TCR 信号对抗原的敏感度是 CAR 信号的 10 ~ 100 倍; 另外, 定量的单分子活细胞成像结果显示 TCR 的敏感性是 CAR 的 1 000 倍^[7]。这种敏感性数量级上的差异的内在机制尚不完全清楚, 其中一种解释为相对低亲和力的 TCR 比相对高亲和力的 scFv 拥有更快的抗原解离速率 (off-rate), 因而能够连续不断地与单个 pMHC 进行反应从而扩大下

游信号^[19]。这种快速的抗原识别可能对实体瘤的杀伤更有利。

3 T 细胞受体的信号启动

尽管关于 TCR 信号转导的机制方面的研究层出不穷, 但 TCR 的触发机制仍不完全清楚, 目前主要有以下几种机制 (不一定相互排斥) 被提出。

3.1 动态隔离模型

当 TCR 复合物与 pMHC 复合物结合后, 会与抗原提呈细胞之间形成免疫突触。动态隔离模型 (kinetic segregation model) 可描述为在免疫突触中, TCR 处于中心位置并形成“紧密结合区域” (close contact zones), 进而排斥一些大分子蛋白, 如磷酸酶 CD45 分子^[20]。这种机制最终导致的结果即为 TCR/CD3 近端的激酶和磷酸酶平衡失调, 从而使得 CD3 被磷酸化, 促进 T 细胞活化和信号转导。在 CAR 与靶细胞特异性表达抗原结合的表面, CD45 同样处于被排除状态以促进信号转导。因此, 动态隔离模型在 CAR 信号中也许同样重要^[21]。

3.2 动力校对机制

动力校对机制 (kinetic proofreading mechanism) 是指 pMHC 和不同的 TCR 相互作用过程中, 不停地结合和解离, 进行动力校对; 当 TCR 与 pMHC 相互作用的半衰期 ($t_{1/2}$) 可以维持足够长的时间, 便可以引发下游信号事件的发生。近年来利用光遗传学技术的研究也支持 TCR 的动力校对机制, 该项研究利用光来调控 TCR 或 CAR 与抗原的相互作用时间。研究表明, CAR 具有类似于 TCR 的校对机制, 因此 TCR 与 CAR 仅在其以足够的强度与配体结合时才响应, 以确保有足够的时间与抗原接触^[22]。这种可能性对于优化 CAR 设计的灵敏度和特异性具有重要意义。

3.3 串行参与模型

串行参与模型 (serial engagement model) 常与动力校对机制并列提及。该模型阐述 TCR 与 pMHC 达成紧密结合就像接力一样, 即单个 pMHC 可与多个 TCR 进行连续性的接触, 而这些连续性接触积累起来的结果, 使得 TCR 与 pMHC 达到紧密结合, 最终导致 T 细胞的完全活化^[23-24]。

3.4 构象形变模型

TCR 属于精巧组装的复合物。构象形变模型指出, pMHC 的刺激会引起 TCR 分子产生构象形变, 而微小的构象改变都可引发不同的功能。TCR 的构象改变发生在其胞外区、跨膜区和胞内区。越来越多的证据表明, TCR 作为机械传感器, 当相应配体与其特异性结合后, TCR-CD3 复合物在其胞外区发生依赖于力的结构改变^[25]。这种机械力来源于细胞外和细胞内。关于细胞外机械力 (external force), 一方面, 位于细胞表面的 TCR 能够受到血液剪切力的影响; 另一方面, 细胞极化会使得 T 细胞接收来自细胞前沿产生机械外力^[25]。另外, 在 T 细胞与抗原呈递细胞 (antigen presenting cell, APC) 或靶细胞形成免疫突触时, 细胞骨架重组导致的逆行流动则会对 TCR 施加大量内在机械力 (internal force)^[26]。TCR 可以利用机械力引发 pMHC 构象变化, 多步级联放大激动型和非激动型抗原的差别, 从而在面临多样性的抗原时, 保持与特定 pMHC 紧密的锚定, 实现精准的抗原识别^[27]。对于 CAR 而言, 目前尚不清楚是否存在同样的机制。但是, CAR 分子结构是支持其进行力依赖的分子内结构改变的。TCR 跨膜区的构象改变涉及 CD3 ζ , TCR α 以及 TCR β 跨膜区。CAR 的跨膜区由 CD8 α 或 CD28 的跨膜区构成, 目前关于 CAR 跨膜区构象形变引发其功能改变的研究尚未见报道。

在 TCR-CD3 复合物中, CD3 ϵ 的胞内区含有 1 个富含碱性氨基酸的区域 (basic residue rich sequence, BRS)、1 个富含脯氨酸的区域 (proline rich sequence, PRS) 和 1 个 ITAM; CD3 ζ 的胞内区含有 3 个 ITAM, 以及 2 个夹在其间的 BRS; CD3 γ 和 CD3 δ 的胞内区各含 1 个 ITAM。研究表明, 带正电的 CD3 ϵ 和 CD3 ζ 的 BRS 可以与质膜内叶中带负电的酸性磷脂相结合, 暗示两者能够在 pMHC 结合时进行动态的结合与释放, 并且这种动态化的变化与 CD3 ϵ 和 CD3 ζ 的 ITAM 基序的磷酸化机制密切相关。在 T 细胞静息状态下, CD3 ϵ 的 BRS 区域可以与细胞质膜上的酸性磷脂发生静电相互作用, 从而使得整个 CD3 ϵ 的胞内区被屏蔽在膜脂双层中。这种膜屏蔽机制既屏蔽了 CD3 ϵ 的酪氨酸位点, 同

时也阻止了 BRS 区与淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶 (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, Lck) 的相互作用, 达到抑制 TCR 整体磷酸化的效果^[28]。当 TCR 与特异性的抗原肽-MHC 复合物结合后, 会使得 TCR 发生形变, CD3 ϵ 胞内区从膜上解离下来, 暴露其中的酪氨酸磷酸化位点。此外, 由于 T 细胞活化导致细胞内钙离子浓度的上升, 内流的钙离子可以通过中和酸性磷脂负电荷的方式使得未直接接触抗原的 TCR 中的 CD3 ϵ 胞内区从膜上解离^[29]; 于是, 暴露于胞质的游离 CD3 ϵ ITAM 进一步被下游的蛋白质酪氨酸激酶磷酸化, 进而发生一系列磷酸化级联反应, 从而放大 TCR 活化信号。另外, 还有学者指出 pMHC 与 TCR 的结合会暴露 CD3 ϵ 的 PRS 区域, 这一暴露的 PRS 区域可以为含有 SH3 结构域的非催化域酪氨酸激酶 (non-catalytic region of tyrosine kinase, Nck) 提供结合位点并进一步放大 TCR 信号^[30-31]。但不管是 BRS 还是 PRS, 都暗示 TCR 信号转导不是简单的磷酸化级联反应, 其中必定存在尚不清楚的复杂结构变化, 因此, 对 pMHC 与 TCR 结合后, 导致 TCR 复合物磷酸化及其结构变化的理解仍然是一个非常大的挑战。近期以机械力为参数的研究另辟蹊径, 利用 TCR 与激动型 pMHC 配体的结合具有机械力依赖性的特点, 通过观测 TCR 与 pMHC 配体结合时形成“捕获键 (catch bond)”还是“滑移键 (slip bond)”, 研究人员能够推测下游信号激活的差异^[32]。

受体聚集也是导致构象形变的机制之一。配体结合会导致膜蛋白的聚集或构象改变。Janeway 于 1995 年首次提出 TCR 的活化伴随 TCR 的聚集和构象改变。由于常规 T 细胞的激活并不需要 pMHC 多聚体^[33], 因此受体聚集可能并不是 TCR 激活的主要机制。而 CAR 启动信号传递必须依赖 CAR 蛋白分子聚集^[34-35], 因此这种机制可能在 CAR 中发挥更为关键的作用。

4 T 细胞受体和嵌合抗原受体免疫突触的形成

上文提到, TCR 和 CAR 信号转导的起始伴随受体聚集。对于天然 TCR 而言, 当 TCR 与 pMHC 结合后, T 细胞和 APC 之间会形成复杂

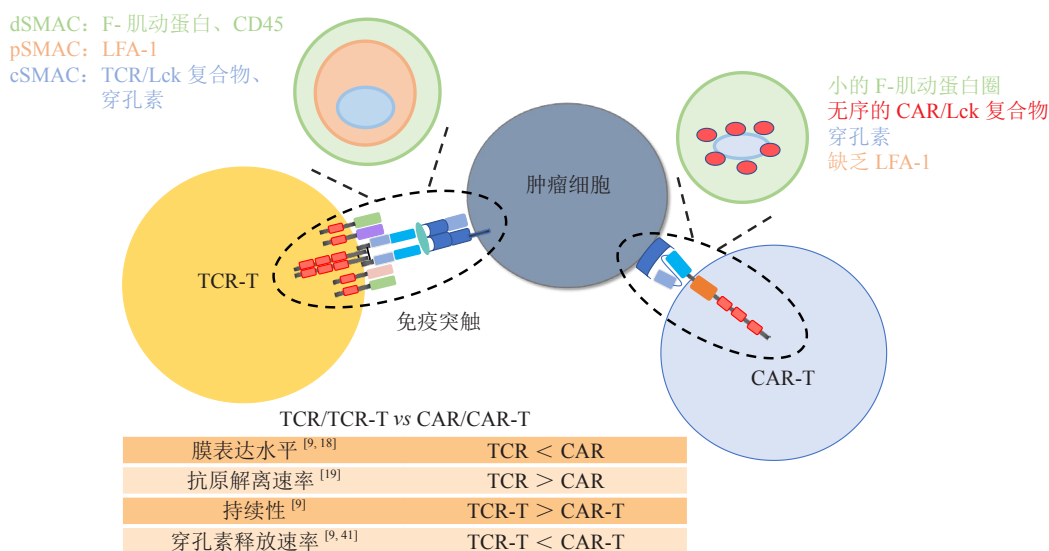
而有序的超分子结构, 称为超分子激活聚集体 (supramolecular activation cluster, SMAC), 即免疫突触。这种细胞与细胞之间的接触包括“immunological kinapse” (IK) 和“immunological synapse” (IS)。其中 kinapse 是 TCR 在受体迁移寻找相应配体 pMHC 的过程中形成的一种瞬时且不稳定的结构, synapse 则是 TCR 与 pMHC 识别后形成的稳定长时接触面^[36]。TCR 刺激和共刺激信号水平、T 细胞的分化状态以及靶细胞的表型共同决定了细胞是否形成对称、稳定的 IS 或瞬时的 IK, 或在 2 种模式之间过渡^[37]。IS 由 3 种不同类型的受体组成, 包括 TCR、黏附受体和共刺激或共抑制受体, 以及它们相关的信号转导分子。在 TCR 与 pMHC 识别过程中, T 细胞和 APC 之间会形成约为 15 nm 的间隙, 这为受体和配体形成 IS 提供了空间^[38]。黏附分子通过将细胞膜紧密连接在一起来支持 IS 的结构, 这对于持续的抗原识别必不可少。另外, IS 招募的共刺激受体或共抑制受体可以显著调节 T 细胞的激活。T 细胞与 B 细胞或平面抗原呈递底物相互作用的免疫荧光成像显示, SMAC 由 3 个同心圆环组成, 类似于“牛眼 (bull's eye)”^[39] (见图 2)。中央 SMAC (cSMAC) 形成中心环, 外围 SMAC (pSMAC) 和远端 SMAC (dSMAC) 在其外围环绕。每个环都有自己特殊的组成和功能。cSMAC 包含一定浓度的 TCR 和共刺激分子 CD28, 负责伴随突触形成的关键 T 细胞活化信号事件; pSMAC 包含一系列黏附分子, 如淋巴细胞功能相关抗原-1 (lymphocyte function-associated antigen-1, LFA-1), 负责稳定细胞间的相互作用; dSMAC 由丝状肌动蛋白组成, 有助于对突触施加机械力, 另外, dSMAC 还聚集许多酪氨酸磷酸酶, 最典型的即为 CD45^[40]。

CAR-T 突触并不像 SMAC 那样具有高度组织性。相反, 它们是杂乱无章的、零散的信号簇, 缺乏明确的结构。除了不形成较小且不典型的 F-肌动蛋白环之外, CAR 形成的免疫突触缺乏黏附环并且 Lck 激酶簇呈散乱分布^[9, 41] (见图 2)。因此, CAR-T 与其靶细胞形成的免疫突触在结构上不同于经典免疫突触^[9, 21]。这也可能是两者具有杀伤能力

差异的重要原因之一。

CAR-T 突触和经典 pMHC/TCR 突触之间的这些结构差异会导致功能差异。对突触形成后 TCR-T 介导的杀伤与 CAR-T 介导的杀伤的时程比较显示, CAR-T 的信号强度比 TCR-T 信号更强且上升更快, 穿孔素 (perforin) 和颗粒酶 B (granzyme B) 的释放更快, 脱落也明显更快。因此, 与细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 相比, CAR-T 杀死靶细胞的速度更快^[9, 41]。而无序的 CAR-T 突触可能就是其快速杀伤活性的结构基础^[42]。需要指出的是, 这里 CAR-T 的快速杀伤活性建立在高抗原密度的基础上。在低抗原密度下, CAR-T 近端信号弱且常受限于其活化阈值而不能对靶细胞进行有效杀伤^[7]。这种对靶抗原的低敏感性正好能够解释在 CAR-T 免疫治疗中由于肿瘤抗原低表达或无法检测而导致癌症复发的现象^[43]。

了解突触的形成机制并鉴定其质量非常有必要。基于玻璃制成的平面脂质双层系统的成像系统已被用于预测 IS 的质量, 并证明 IS 的质量与 CAR-T 功能相关联^[44]。更有数据表明, 在病理条件下, 高 IK 频率表明 T 细胞无能化, 进入免疫耐受状态而阻止肿瘤免疫^[45]。由此可见, 合适的 IS 形成是 T 细胞抗肿瘤功能发挥的必要条件。然而, 目前 IS 在 T 细胞中的形成机制仍未完全了解, 还有许多关键问题有待回答。例如 CAR-T 这种无序 IS 结构产生的机制尚不清楚。有研究人员将具有高亲和力识别结构的 CAR 与天然的 TCR 融合或连接后发现, 改造后的 T 细胞能够与相应的靶细胞形成典型的稳定的 IS 结构^[46-47]。因此, 这种 IS 结构的混乱也许并不是由于 CAR 对抗原的高亲和力及它的非 MHC 限制性性质所导致。鉴于 IS 结构的重要性, 仍需进一步了解其在抗肿瘤作用中的地位。



SMAC: supramolecular activation cluster (超分子激活聚集); Lck: lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶); CD45: cluster of differentiation 45 (分化簇 45); LFA-1: lymphocyte function-associated antigen-1 (淋巴细胞功能相关抗原-1); TCR-T: T cell receptor-engineered T cell (T 细胞受体工程化 T 细胞); CAR-T: chimeric antigen receptor-T cell (嵌合抗原受体 T 细胞); TCR: T cell receptor (T 细胞受体); CAR: chimeric antigen receptor (嵌合抗原受体)

图 2 T 细胞受体和嵌合抗原受体免疫突触的比较

Figure 2 Comparison of immune synapses between T cell receptor and chimeric antigen receptor

5 T 细胞受体的近端信号转导

TCR 通过其配体识别亚基与 APC 上特异性表达的 pMHC 复合物结合, 激活 TCR 信号通路。SRC 家族蛋白酪氨酸激酶 Lck 是 TCR 信号起始的关键因子, 它能够与 CD4 和 CD8 共受体的胞质结

构域结合, 并分别通过 CD8 或 CD4 与 MHC I 类或 MHC II 类复合物的共结合募集至 TCR。处于活化构象的 Lck 可以磷酸化 ITAM, 每个 ITAM 具有 2 个可被磷酸化的关键酪氨酸残基, 被双磷酸化的 ITAM 可以招募相对分子质量为 70 000 的 ζ 链相关

蛋白激酶 (zeta-chain-associated protein kinase-70, ZAP-70), 使蛋白酪氨酸激酶 ZAP-70 结合到 CD3 链中^[48]。这里需要说明的是, Lck 激酶包括游离状态和与共受体偶联的 2 类群体, 它们均能在 TCR 活化后磷酸化 CD3, 但游离状态的激活态 Lck 会被更早地招募至 TCR 起始信号传递^[49]。换言之, 由 Lck 介导的 TCR 活化可以分为 2 个阶段: 首先, 游离态 Lck 激酶最先被招募到 TCR 并磷酸化 CD3 ITAM; 接着, 与共受体偶联的 Lck 被招募, 一方面能够促进 TCR 与 pMHC 的结合, 另一方面起到放大信号的作用^[49-51]。随后, 与 ITAM 结合的 ZAP-70 被磷酸化并招募更多的 ZAP-70 分子且进一步传递信号。由此可见, Lck 和 ZAP-70 之间存在着非常严格的层级关系, Lck 位于 ZAP-70 的上游^[24]。

Lck 在 TCR 的信号转导起始中发挥非常重要的功能, 它将细胞外 TCR 与 pMHC 的结合事件与细胞内生物化学事件联系在一起。研究发现, Lck 的定位和构象变化是 TCR 信号转导的重要决定因素^[52-53]。Lck 由 1 个 UD 结构域 (unique domain)、2 个调节结构域 (SH3 和 SH2) 和 1 个激酶结构域 (kinase domain) 组成, 它包含若干个磷酸化位点, 其激酶活性受 2 个关键调节性酪氨酸位点 Y394 和 Y505 的磷酸化和去磷酸化控制。Y394 位于 Lck 激酶环中, 其自磷酸化可以稳定催化结构域的活性构象。而 C 末端 Src 激酶 (C-terminal Src kinase, Csk) 能够对 Lck 的活性负向调控, 它通过对 Lck 羧基末端 Y505 残基的磷酸化, 促进 Y505 与 Lck SH2 结构域分子相互作用, 从而稳定了使催化结构域失活的折叠构象。CD3 ϵ ITAM 存在部分单磷酸化现象, 这种单磷酸化的 CD3 ϵ 能够招募抑制性激酶 Csk, 发挥抑制性作用^[54]。另外, 跨膜酪氨酸磷酸酶 CD45 可使 Lck 磷酸化的 Y505 和 Y394 去磷酸化, 因此, CD45 可以直接调节控制 Lck 活性。上文中已经提到, 在 T 细胞活化早期, 游离的活化型 Lck 最先被招募至 TCR 附近磷酸化 CD3 链以及一些关键的激酶来起始 T 细胞活化, 这可能是由于游离的 Lck 比与共受体结合的 Lck 具有更高的流动性、更多的 Y394 磷酸化以及更强的激酶活性^[55], 因而游离的 Lck 对于 TCR 的早期活化非常重要; 但当共受体结合的

Lck 不能被招募到 TCR 周围时, T 细胞同样不能被有效地活化^[56]。另外, 作为早期活化重要成分, ITAM 和 ZAP-70 的磷酸化都需要具有活性的 Lck 的存在, 因此活化型的 Lck 必须位于 TCR:pMHC 附近足够长的时间, 以确保这些事件的发生。综上, Lck 的定位和构象变化都将影响免疫突触的形成和稳定性。

关于 CAR, 与 TCR 共享相同的 CD3 ζ 胞内区的同时, 它还包含 CD28 和肿瘤坏死因子超家族成员 4-1BB 等共刺激结构域。因此 CAR 与 TCR 之间, 以及包含不同共刺激结构域的 CAR 之间的近端信号传导不尽相同。例如, 在包含 CD28 或 4-1BB 的 2 种二代 CAR 中, 配体结合后, CD3 ζ ITAM 的磷酸化虽然位置相同, 但强度不同, 包含 CD28 的 CAR 在早期时间点检测到更强的磷酸化信号。这可能是因为 CD28 含有 1 个可以结合 Lck 的脯氨酸富含区, 使其能够像共受体一样招募 Lck^[57]。有关 CAR 的近端信号传导仍属于活跃的研究领域。

6 T 细胞受体的下游信号转导

在上述提及的一系列酪氨酸激酶初始激活后, T 细胞活化衔接因子 (the linker of active T cells, LAT) 和含 SH2 结构域相对分子质量为 76 000 的白细胞磷酸化蛋白 (SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 000, SLP-76) 被磷酸化, 活化 T 细胞, 募集多个衔接因子和效应分子, 形成 LAT 信号转导体来调节下游信号^[58]。LAT 的磷酸化由 ZAP-70 介导, 而两者的连接通过 Lck 激酶的 SH2 作为桥梁所介导^[59]。随后, 磷酸化的 LAT 招募磷脂酶 C- γ (phospholipase C- γ , PLC- γ)、生长因子受体结合蛋白 2 (growth factor receptor-bound protein 2, GRB 2) 和 Shc 下游 GRB 相关接头蛋白 (GRB-related adaptor downstream of Shc, Gads)。LAT 相关效应分子的活化导致信号通过 3 种主要信号通路进行转导: 钙调蛋白、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和核因子 κ -B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路。钙调蛋白信号转导会导致活化 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFAT) 发生核转移。MAPK 信号

转导致肌动蛋白聚合以及转录因子 FOS, JUN 和激活蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) 的激活; NF- κ B 信号转导使 REL 和 NF- κ B 转录因子核移位; 这些转录因子协同作用引起 T 细胞增殖和迁移、细胞因子分泌、免疫突触的形成以及相关效应功能。由此可见, LAT 是 T 细胞信号转导的必需支架蛋白。

由于 CAR 是利用 CD3 ζ 作为信号基序去激活 T 细胞的效应功能, 因此普遍认为 CAR 存在与 TCR 相同的信号转导机制。许多着眼于 CAR 下游的磷酸化事件的研究结果显示 CAR-T 和 TCR-T 的磷酸化事件虽然在量级和动力学上存在差异, 但 CAR-T 中并未出现新的通路^[57, 60-61]。CAR 利用相同的分子机制去转导信号, 包括 PLC- γ , ZAP-70, LAT 和 Src 家族蛋白激酶等。但也有研究表明, CAR 和 TCR 拥有不同的信号通路, 即 CAR 的信号转导可以绕过 LAT^[10]。此外, CAR-T 对抗原刺激之后的表现仍有无法解释的方面。例如, 与 TCR 相比, CAR 触发下游信号分子的酪氨酸磷酸化更快, 细胞毒性颗粒释放更快^[62]。通过直接将 TCR 和 CAR 表达在同一细胞中进而比较它们的信号过程, 发现尽管 TCR 信号与 CAR 信号相比更缓慢和更微弱, 但 TCR 信号更为持久^[9]。另外, 两者对抗原的敏感性不同。已有许多研究指出, TCR 的信号转导具有高度的敏感性, 在只有单个抗原 pMHC 存在的情况下, 就足以激活 T 细胞反应^[8, 63]。然而, CAR 的激活需要更多的抗原分子刺激^[62]。有学者解释这种低敏感性是由于 CAR 活化时近端信号明显减弱导致, 尽管 CAR 在免疫突触内的抗原结合亲和力方面表现优于 TCR, 但其胞内区 CD3 ζ 链的酪氨酸蛋白激酶 ZAP-70 的招募效率很低^[7]。CAR 的这种信号转导缺陷, 一方面限制了 CAR-T 疗法治疗表面抗原密度低的肿瘤的疗效; 另一方面, 这也许解释了 CAR-T 临床治疗中患者由于肿瘤的抗原表达水平低或无法检测到而出现癌症复发的现象。

CAR 和 TCR 在激活后具有许多相似的下流信号事件, 如它们都分泌穿孔素和颗粒酶 B 去诱导靶细胞的凋亡, 并表达细胞因子和趋化因子来增强免疫功能或调控炎症反应, 然而, 临床报告却显示出不同的结果。细胞因子释放综合征 (cytokine release

syndrome, CRS) 表现为 CAR-T 疗法中最常见的毒性, 其确切的机制尚不完全清楚; 其潜在的原因可能是 CAR 异常或过度活化的信号。在静息态 T 细胞中, CD3 ζ 肽链对借助于其 C 末端的正电与质膜上带负电的酸性磷脂相互作用, 从而达到屏蔽信号的作用^[29]。而当抗原不存在时, CAR-T 仍存在很强的基底信号^[64]。因此, 高强度的基底信号也许放大了信号而促进细胞因子的产生, 进而进一步导致细胞因子风暴的产生而影响 CAR-T 疗法的疗效。此外, 在天然的 TCR 复合物中, CD3 ϵ ITAM 可被单磷酸化, 从而招募 Csk 磷酸酶, 发挥负调控功能^[54]。提示除了过强的活化信号, 有关负调控信号在 CAR 中的缺失也可能是导致 CRS 的重要原因。总之, 天然 TCR 复合物结构远比想象的更复杂, 故应当意识到其在指导过继性免疫疗法中 T 细胞设计改造方面的重要性。

7 结语

TCR-T 和 CAR-T 疗法均为过继性免疫疗法治疗癌症的前沿技术, 且基本思路均为将 T 细胞在体外进行修饰、扩增后再植入患者体内, 2 种改造过的受体都能够介导 T 细胞发挥肿瘤杀伤作用。但两者显然存在许多不同: 包括结构、抗原识别机制和识别类型、对抗原响应的敏感度等。CAR-T 疗法已在难治性白血病和淋巴瘤患者中诱导了显著的反应, 并获得了美国 FDA 的批准, 因此其对血液瘤及淋巴瘤的疗效毋庸置疑。但目前许多临床数据均显示 TCR-T 疗法在治疗实体瘤的能力方面比 CAR-T 疗法略胜一筹。总的来说, 从 2 种细胞本身特点出发: 首先, CAR-T 靶向肿瘤抗原, 而 TCR-T 除了识别表面抗原之外, 还能够通过白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 提呈进而靶向细胞内蛋白质组, 这意味着 TCR-T 可以识别广泛的肿瘤抗原, 不限于膜表达抗原, 还包括一些由体细胞突变产生的新抗原 (neo-antigen)。此外, 从患者体内取出的 T 细胞所制备的 TCR-T 与患者 HLA 等位基因匹配, 避免了移植后的免疫排斥反应。最后, TCR-T 有更好的肿瘤浸润和分布, 而 CAR-T 由于识别表面抗原倾向于分布在肿瘤周围, 使得 TCR-T 在治疗实体瘤时更有效^[11]。尽管如此, 目前对于特异性肿

瘤抗原靶点的发现还甚少, 并且从病人体内取出的 T 细胞无法在体外有效地大量扩增, 体外的制备工序费时费力。另外, 科学家们现在还无法很好地解决 T 细胞疗法治疗后的大量不良反应。综上所述, 过继性免疫细胞疗法治愈癌症任重而道远。不论是

CAR-T 疗法, 还是 TCR-T 疗法都仍存在一系列问题, 因此很有必要清楚理解基本的 TCR 信号转导机制, 并为设计更好的 T 细胞产品提出新的策略, 以求其在实体瘤临床治疗中得到进一步应用。

【参考文献】

- [1] Nel A E. T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 109(5): 758-770.
- [2] Dong D, Zheng L, Lin J, et al. Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex[J]. *Nature*, 2019, 573(7775): 546-552.
- [3] Guy C S, Vignali K M, Temirov J, et al. Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(3): 262-270.
- [4] Mayya V, Dustin M L. What scales the T cell response?[J]. *Trends Immunol*, 2016, 37(8): 513-522.
- [5] Smith E L, Staehr M, Masakayan R, et al. Development and evaluation of an optimal human single-chain variable fragment-derived BCMA-targeted CAR T cell vector[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(6): 1447-1456.
- [6] D'Ippolito E, Schober K, Nauwerth M, et al. T cell engineering for adoptive T cell therapy: safety and receptor avidity[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(10): 1701-1712.
- [7] Gudipati V, Rydzek J, Doel-Perez I, et al. Inefficient CAR-proximal signaling blunts antigen sensitivity[J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(8): 848-856.
- [8] Huang J, Brameshuber M, Zeng X, et al. A single peptide-major histocompatibility complex ligand triggers digital cytokine secretion in CD4⁺ T cells[J]. *Immunity*, 2013, 39(5): 846-857.
- [9] Davenport A J, Cross R S, Watson K A, et al. Chimeric antigen receptor T cells form nonclassical and potent immune synapses driving rapid cytotoxicity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(9): E2068-E2076.
- [10] Dong R, Libby K A, Blaeschke F, et al. Rewired signaling network in T cells expressing the chimeric antigen receptor (CAR)[J/OL]. *EMBO J*, 2020, 39(16): e104730[2021-08-02]. <https://www.embojournal.org/doi/full/10.15252/emj.2020104730>.
- [11] Garber K. Driving T-cell immunotherapy to solid tumors[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(3): 215-219.
- [12] Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom B M, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome[J/OL]. *Science*, 2015, 347(6220): 1260419[2021-08-02]. <https://www.science.org/lookup/doi/10.1126/science.1260419>.
- [13] Fagerberg L, Jonasson K, von Heijne G, et al. Prediction of the human membrane proteome[J]. *Proteomics*, 2010, 10(6): 1141-1149.
- [14] Cole D K, Pumphrey N J, Boulter J M, et al. Human TCR-binding affinity is governed by MHC class restriction[J]. *J Immunol*, 2007, 178(9): 5727-5734.
- [15] Ghorashian S, Kramer A M, Onuoha S, et al. Enhanced CAR T cell expansion and prolonged persistence in pediatric patients with ALL treated with a low-affinity CD19 CAR[J]. *Nat Med*, 2019, 25(9): 1408-1414.
- [16] Park S, Shevlin E, Vedvyas Y, et al. Micromolar affinity CAR T cells to ICAM-1 achieves rapid tumor elimination while avoiding systemic toxicity[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14366[2021-08-02]. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-14749-3>. DOI: 10.1038/s41598-017-14749-3.
- [17] Sykulev Y, Joo M, Vturina I, et al. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response[J]. *Immunity*, 1996, 4(6): 565-571.
- [18] Harris D T, Hager M V, Smith S N, et al. Comparison of T cell activities mediated by human TCRs and CARs that use the same recognition domains[J]. *J Immunol*, 2018, 200(3): 1088-1100.
- [19] Valitutti S, Muller S, Cella M, et al. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes[J]. *Nature*, 1995, 375(6527): 148-151.
- [20] Davis S J, van der Merwe P A. The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond[J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(8): 803-809.
- [21] James J R, Vale R D. Biophysical mechanism of T-cell receptor

- triggering in a reconstituted system[J]. *Nature*, 2012, 487(7405): 64–69.
- [22] Tischer D K, Weiner O D. Light-based tuning of ligand half-life supports kinetic proofreading model of T cell signaling[J/OL]. *Elife*, 2019, 8: e42498[2021-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30947808>. DOI: 10.7554/eLife.42498.
- [23] Courtney A H, Lo W L, Weiss A. TCR signaling: mechanisms of initiation and propagation[J]. *Trends Biochem Sci*, 2018, 43(2): 108–123.
- [24] Chakraborty A K, Weiss A. Insights into the initiation of TCR signaling[J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(9): 798–807.
- [25] Feng Y, Reinherz E, Lang M. $\alpha\beta$ T cell receptor mechanosensing forces out serial engagement[J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(8): 596–609.
- [26] Liu Y, Galior K, Ma V P, *et al.* Molecular tension probes for imaging forces at the cell surface[J]. *Acc Chem Res*, 2017, 50(12): 2915–2924.
- [27] Balint S, Muller S, Fischer R, *et al.* Supramolecular attack particles are autonomous killing entities released from cytotoxic T cells[J]. *Science*, 2020, 368(6493): 897–901.
- [28] Xu C, Gagnon E, Call M E, *et al.* Regulation of T cell receptor activation by dynamic membrane binding of the CD3 ϵ cytoplasmic tyrosine-based motif[J]. *Cell*, 2008, 135(4): 702–713.
- [29] Shi X, Bi Y, Yang W, *et al.* Ca²⁺ regulates T-cell receptor activation by modulating the charge property of lipids[J]. *Nature*, 2013, 493(7430): 111–115.
- [30] Gil D, Schamel W W A, Montoya M, *et al.* Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation[J]. *Cell*, 2002, 109(7): 901–912.
- [31] Mingueneau M, Sansoni A, Grégoire C, *et al.* The proline-rich sequence of CD3 controls T cell antigen receptor expression on and signaling potency in preselection CD4⁺CD8⁺ thymocytes[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(5): 522–532.
- [32] Wu P, Zhang T, Liu B, *et al.* Mechano-regulation of peptide-MHC class I conformations determines TCR antigen recognition[J/OL]. *Mol Cell*, 2019, 73(5): 1015–1027. e7[2021-08-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30711376>. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.12.018.
- [33] Brameshuber M, Kellner F, Rossboth B K, *et al.* Monomeric TCRs drive T cell antigen recognition[J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(5): 487–496.
- [34] Chang Z L, Lorenzini M H, Chen X, *et al.* Rewiring T-cell responses to soluble factors with chimeric antigen receptors[J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(3): 317–324.
- [35] Ma X, Shou P, Smith C, *et al.* Interleukin-23 engineering improves CAR T cell function in solid tumors[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(4): 448–459.
- [36] Fooksman D R, Vardhana S, Vasiliver-Shamis G, *et al.* Functional anatomy of T cell activation and synapse formation[J/OL]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 28: 79–105[2021-08-02]. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101308>.
- [37] Thauland T J, Parker D C. Diversity in immunological synapse structure[J]. *Immunology*, 2010, 131(4): 466–472.
- [38] Dustin M L. The immunological synapse[J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2(11): 1023–1033.
- [39] Monks C R, Freiberg B A, Kupfer H, *et al.* Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells[J]. *Nature*, 1998, 395(6697): 82–86.
- [40] Freiberg B A, Kupfer H, Maslanik W, *et al.* Staging and resetting T cell activation in smacs[J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(10): 911–917.
- [41] Davenport A J, Jenkins M R, Cross R S, *et al.* CAR-T cells inflict sequential killing of multiple tumor target cells[J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(5): 483–494.
- [42] Davenport A J, Jenkins M R. Programming a serial killer: CAR T cells form non-classical immune synapses[J]. *Oncoscience*, 2018, 5(3/4): 69–70.
- [43] Turtle C J, Hanafi L A, Berger C, *et al.* CD19 CAR-T cells of defined CD4⁺: CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(6): 2123–2138.
- [44] Xiong W, Chen Y, Kang X, *et al.* Immunological synapse predicts effectiveness of chimeric antigen receptor cells[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(3): 1349–1351.
- [45] Díaz L R, Saavedra-López E, Romarate L, *et al.* Imbalance of immunological synapse-kinapse states reflects tumor escape to immunity in glioblastoma[J/OL]. *JCI Insight*, 2018, 3(18): e120757[2021-08-02]. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.120757>.
- [46] Baeuerle P A, Ding J, Patel E, *et al.* Synthetic TRuC receptors engaging the complete T cell receptor for potent anti-tumor response[J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2087[2021-08-02]. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10097-0>.

- [47] Helsen C W, Hammill J A, Lau V W C, *et al.* The chimeric TAC receptor co-opts the T cell receptor yielding robust anti-tumor activity without toxicity[J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3049[2021-08-02]. <https://www.nature.com/articles/s41467-018-05395-y>. Doi:10.1038/s41467-018-05395-y.
- [48] Palacios E H, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation[J]. *Oncogene*, 2004, 23(48): 7990–8000.
- [49] Casas J, Brzostek J, Zarnitsyna V I, *et al.* Ligand-engaged TCR is triggered by Lck not associated with CD8 coreceptor[J/OL]. *Nat Commun*, 2014, 5(1): 5624[2021-08-02]. <https://doi.org/10.1038/ncomms6624>.
- [50] Gascoigne NR, Casas J, Brzostek J, *et al.* Initiation of TCR phosphorylation and signal transduction[J/OL]. *Front Immunol*, 2011, 2: 72[2021-08-02]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00072>.
- [51] Jiang N, Huang J, Edwards L J, *et al.* Two-stage cooperative T cell receptor-peptide major histocompatibility complex-CD8 trimolecular interactions amplify antigen discrimination[J]. *Immunity*, 2011, 34(1): 13–23.
- [52] Philipsen L, Reddycherla A V, Hartig R, *et al.* De novo phosphorylation and conformational opening of the tyrosine kinase Lck act in concert to initiate T cell receptor signaling[J/OL]. *Sci Signal*, 2017, 10(462) [2021-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28096507>. DOI: 10.1126/scisignal.aaf4736.
- [53] Stirnweiss A, Hartig R, Gieseler S, *et al.* T cell activation results in conformational changes in the Src family kinase Lck to induce its activation[J]. *Sci Signal*, 2013, 6(263): ra13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23423439>. Doi: 10.1126/scisignal.2003607.
- [54] Wu W, Zhou Q, Masubuchi T, *et al.* Multiple signaling roles of CD3epsilon and its application in CAR-T cell therapy[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 855–871.
- [55] Wei Q, Brzostek J, Sankaran S, *et al.* Lck bound to coreceptor is less active than free Lck[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(27): 15809–15817.
- [56] Zareie P, Szeto C, Farenc C, *et al.* Canonical T cell receptor docking on peptide-MHC is essential for T cell signaling[J/OL]. *Science*, 2021, 372(6546): eabe9124[2021-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34083463>. DOI: 10.1126/science.abe9124.
- [57] Salter A I, Ivey R G, Kennedy J J, *et al.* Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function[J/OL]. *Sci Signal*, 2018, 11(544): eaat6753[2021-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30131370>. DOI: 10.1126/scisignal.aat6753.
- [58] Weiss A, Littman D R. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors[J]. *Cell*, 1994, 76(2): 263–274.
- [59] Lo W L, Shah N H, Ahsan N, *et al.* Lck promotes ZAP70-dependent Lat phosphorylation by bridging ZAP70 to Lat[J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(7): 733–741.
- [60] Karlsson H, Svensson E, Gigg C, *et al.* Evaluation of intracellular signaling downstream chimeric antigen receptors[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144787[2021-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26700307>. DOI: 10.1371/journal.pone.0144787.
- [61] Ramello M C, Benzaid I, Kuenzi B M, *et al.* An immunoproteomic approach to characterize the CAR interactome and signalosome[J/OL]. *Sci Signal*, 2019, 12(568): eaap9777[2021-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30755478>. DOI: 10.1126/scisignal.aap9777.
- [62] Watanabe K, Kuramitsu S, Posey A, *et al.* Expanding the therapeutic window for CAR T cell therapy in solid tumors: The knowns and unknowns of CAR T cell biology[J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2486[2021-08-02]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02486>.
- [63] Irvine D J, Purbhoo M A, Krogsgaard M, *et al.* Direct observation of ligand recognition by T cells[J]. *Nature*, 2002, 419(6909): 845–849.
- [64] Ajina A, Maher J. Strategies to address chimeric antigen receptor tonic signaling[J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(9): 1795–1815.



【专家介绍】李华: 理学博士, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(生物化学与细胞生物学研究所)副研究员。1990年毕业于吉林大学化学系, 获学士学位。1999年毕业于日本神户大学, 获博士学位, 从事蛋白质高压核磁共振(NMR)研究。1999—2001年作为日本学术振兴会外国人特别研究员在日本神户大学继续从事蛋白质高压NMR研究。2001—2012年在日本理化学研究所(RIKEN)先后任助理研究员、研究员, 从事蛋白质结构与功能的NMR研究。2012年回国任现职, 从事关键免疫受体分子活化机制的结构生物学研究, 研究成果发表在 *Nature Structural & Molecular Biology*, *Cell Research* 等国际学术期刊。现任中国生物物理学会生物磁共振分会理事。