

利用分子模拟技术筛选 HLA-A2 限制性 CTL 表位肽

耿森^① 吴玉章^{①*} 林治华^② 贾正才^① 周伟^① 邹丽云^①

(^①第三军医大学免疫学研究所, 重庆 400038, ^②重庆工学院生物工程学院, 重庆 400050. * 联系人, E-mail: wuyuzhang@yahoo.com)

摘要 以肿瘤抗原 MAGE-2 为例, 运用分子模拟方法对其 4 个优势候选 HLA-A2 限制性 CTL 表位进行初步鉴定, 再通过多肽结合实验对鉴定结果进行验证. 结果表明, 4 个候选肽中有 3 个与 HLA-A2 分子有较好的亲和力, 进一步进行体外诱导 CTL 效应实验显示, 3 个高亲和力的表位肽可在体外有效诱导特异性 CTL 效应. 利用计算机辅助鉴定 CTL 表位, 克服了以往筛选肽要将肽逐一洗脱下来的繁琐实验过程, 并且可直接观测到多肽复合物的结合模式, 该技术在筛选大量优势 CTL 表位中具有较大的应用价值.

关键词 CTL 表位 HLA-A2 分子 计算机辅助 分子模拟 鉴定

免疫是机体识别排除抗原性异物的一种保护性反应. 在抗原递呈免疫应答中, 主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)作为抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)表面的一种抗原分子, 在免疫应答抗原递呈过程中起中枢作用, 尤其以 MHC-I 类分子限制性抗原的递呈是激活细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的前奏, 而 CTL 在机体抗肿瘤和病毒免疫中起至关重要的作用. CTL 在识别过程中通常只能识别 APC 提交的由抗原肽和 MHC 分子组成的复合物, 因此 MHC 分子是否能与抗原肽形成稳定的复合物则成为 CTL 发挥作用的关键, 同时也是 CTL 表位肽鉴定的首要条件. 以往对 CTL 表位的鉴定多采用合成大量交叠肽或将全基因裂解为众多小片段, 通过多肽结合或 CTL 杀伤实验再进行筛选, 这一实验路线需要耗费大量的时间和经费. 近年来, 随着对抗原表位肽递呈机制认识的深化, 大量的人和鼠的 MHC-I 类分子的晶体结构的解析^[1~5], 计算机科学的进步, 以及量子力学与分子动力学等相关学科的发展^[6], 使基于 MHC-I-抗原肽复合物三维结构的计算机辅助筛选优势 CTL 表位的研究策略成为可能.

肿瘤抗原 MAGE-2 为特异性肿瘤抗原, 在黑色素瘤中有高达 70% 的表达^[7], 同时也在其他肿瘤中也有不同程度的表达(如: 肺部肿瘤、肝细胞癌等)^[8,9]. 新近报道其特异性高表达于头部肿瘤和横纹肌肉瘤^[10,11]. MAGE-2 作为肿瘤的诊断标志以及免疫治疗的靶抗原, 近年来备受关注. 因此对 MAGE-2 的 CTL 表位进行鉴定, 对开发其相应的多肽疫苗具有重要意义. Visseren 等人^[12]已鉴定了 HLA-A2 限制性

MAGE-2 表位九肽 112 ~ 120 aa KMVELVHFL, 十肽 157 ~ 166 aa YLQLVFGIEV, 在 HLA-A0201 转基因小鼠的体内进行实验, 发现这两个肽在体内引起免疫反应, 并在正常体温下能稳定存在, 但在人体是否能够诱发抗原效应尚没有直接的证据, 因而研究新的直接针对人体肿瘤细胞的 CTL 表位更具有现实的意义. 本研究根据以往研究中发现的 HLA-A2 分子结合肽的规律, 并结合分子模拟技术, 构建了利用计算机辅助筛选 HLA-A2 限制性 CTL 表位的新路线. 利用此路线对 4 个候选肿瘤抗原 MAGE-2 的 HLA-A2 限制性 CTL 表位进行了模拟和鉴定, 最终通过肽结合实验和体外诱导 CTL 杀伤实验进行验证.

1 材料与方法

(i) 多肽序列. 多肽序列选用超基序方案与量化基序结合预测出的 4 个优势表位^[13]: MAGE-2(112 ~ 120) KMEELVHFL, MAGE-2(171 ~ 179) PISHLYILV, MAGE-2 (220 ~ 228)KIWEELSML 和 MAGE-2(271 ~ 279) FLWGPRALI, 其中 MAGE-2(112 ~ 120)已证实为 HLA-A2 限制性 CTL 表位.

(ii) 多肽制备. 多肽合成在 ABI 431A 型多肽合成仪上进行. 采用标准 Fmoc 方案, 略加修改, 精氨酸采用 2 次偶联. 在 Explore100 型中压液相色谱仪上纯化, 反相高压液相色谱仪(RP-HPLC)鉴定纯度, 液相色谱/质谱联用(LC/MS)测定目标多肽的分子量.

(iii) HLA-A2.1 分子与预测表位多肽的分子模建. 运用 Insight II 软件包的 Discover 3 模块(采用 CVFF 力场), 对来自 MAGE-2 的 4 个九肽与 HLA-A0201 的复合物进行分子动力学模拟. HLA-A0201 的初始坐标来自于蛋白质晶体结构数据库, 九肽模型则是运

用 Biopolymer 模块对晶体结构数据库中的表位肽进行氨基酸替换而得. 整个模拟过程按如下步骤进行: 首先, 将 HLA 与 $\beta 2m$ 固定, 运用最陡下降法(steepest descent method)对九肽进行 2000 步优化计算, 然后用共轭梯度法(conjugate gradients method)优化直到能量 RMS 小于 $1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1}$; 第二, 在复合物周围加一层 0.75 nm 的水分子, 并固定 HLA 复合物对水分子进行 2000 步能量优化, 以消除水分子之间以及水分子与蛋白质之间的不合理的接触; 第三, 对溶液状态下的复合物在 298 K 的恒定温度下进行 20 PS 的分子动力学计算, 非键相互作用采用 0.95 nm 的截断值(cut off). 最终计算出各结合参数如锚点间距、非键作用能及氢键数等.

(iv) 肽结合实验. 采用经典的肽结合实验^[14], 首先将 1×10^6 个 T2 细胞(T2 细胞为 HLA-A2 阳性的 T, B 淋巴细胞杂交瘤细胞天然 TAP 缺陷, 内源抗原加工处理能力缺失, 可用于研究抗原递呈过程和 T 细胞与 MHC-I 分子的相互识别, 来自于军事医学科学院三所, 由本所管孝鞠博士后提供)用冰 PBS, $800 \times g$ 离心 6 min, 洗涤 3 次后, 再与 $10 \mu\text{g/mL}$ 待测肽 37°C 共孵育 4 h. 孵育好的细胞用冰 PBS, 同样离心条件洗涤 3 次, 加入 $100 \mu\text{L}$ BB7.2 杂交瘤细胞培养上清液, 冰浴 40 min. PBS 洗涤 3 次后, 加入 $100 \mu\text{L}$ 稀释度为 1:100 的 FITC-羊抗鼠 IgG(购于北京中山生物技术有限公司)溶液, 在冰上孵育 40 min, 洗涤后于流式细胞仪(FACS, 由本校中心仪器室提供)检测平均荧光强度, 波长 488 nm . 以单纯的 T2 细胞加二抗为阴性对照, T2 细胞加一、二抗为背景对照.

结果判定, 间接免疫荧光法检测各肽与 HLA-A2.1 分子的结合情况, 是基于外源性多肽与 T2 细胞表面 MHC-I 类分子的结合可使其表面 MHC-I 类分子的表达量增加, 两者结合越稳固, 则可检测到的 MHC-I 类分子越多. 结果以平均荧光强度为检测指标, 以荧光系数(FI)作为衡量指标, $\text{FI} > 120$ 判定为候选肽与 HLA-A2 分子形成稳定复合物, $\text{FI} < 120$ 判定多肽与 HLA-A2 分子不形成复合物^[15].

荧光系数(FI) =

$$\frac{\text{样品平均荧光强度} - \text{背景平均荧光强度}}{\text{T2细胞荧光强度} - \text{背景荧光强度}} \times 100.$$

(v) 细胞毒实验. 采用标准的 ^{51}Cr 释放实验^[16]. 首先分离外周血单个核细胞(PBMC)常规聚蔗糖-泛影葡氨分层液梯度离心法分离, 体外常规培养, 培养

基选用 1640 加 10% 胎牛血清. 靶细胞选用 LB373-MEL(人黑色素瘤细胞系, MAGE-2, HLA-A2 阳性. 由比利时 Ludwig 肿瘤研究所 Marchand 教授惠赠). 培养基选用 IMDM 加 10% 胎牛血清. 诱导 CTL, PBMC 于分离后的第 2 天分别用 4 个备选肽刺激($10 \mu\text{g/mL}$), 以后每隔 7 d 刺激 1 次, 共刺激 3 次, 刺激同时加 IL-2 50 U/mL . 靶细胞标记, 将靶细胞浓度调整到 1×10^6 个/mL 加入 $100 \text{ U CiNa}^{51}\text{CrO}_4$, 37°C , 5% CO_2 孵育 90 min 后, 将标记好的靶细胞以 1×10^4 个/ $100 \mu\text{L}$ 加入 96 孔板. 将效应细胞分别按照效靶比 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1 加入靶细胞中, 每孔 $100 \mu\text{L}$. 对照组选用无关肽 HBVc18-27FLPSDFFPSV 刺激效应细胞获得, 肿瘤细胞的最大杀伤采用 2 mol/L HCL , 自释放为靶细胞加培养基. 将 96 孔板 37°C , 5% CO_2 孵育 4 h, 离心后取上清液 $100 \mu\text{L}$, γ 计数器测定脉冲数(cpm).

^{51}Cr 特异释放率 =

$$\frac{\text{实验组cpm平均值} - \text{自释放cpm平均值}}{\text{最大释放cpm平均值} - \text{自释放cpm平均值}} \times 100\%.$$

2 结果

2.1 多肽制备

经反相高压液相色谱仪(RP-HPLC)测定各候选肽的纯度均在 90% 以上, 液质联用鉴定合成肽均为目标肽.

2.2 分子建模

图 1 为各表位肽的空间结构建模图, 图中显示了锚点残基 P2 与 P9 位均指向结合槽的 B, F 口袋, P1 氨基酸残基侧链 MAGE-2(112~120), MAGE-2(220~228)和 MAGE-2(271~279)三者相似均向上凸起指向溶液, 而 MAGE-2(171~179)并没有明显的上翘指向溶液. TCR 结合部位 P3~P6 均有不同形式的明显凸起于 HLA-A2 与多肽复合物的表面, 锚点残基 P2, P9 的 $\text{C}\alpha$ 之间的距离分别为 MAGE-2(112~120) 1.987 nm , MAGE-2(171~179) 1.784 nm , MAGE-2(220~228) 1.873 nm 和 MAGE-2(271~279) 1.792 nm . 图 2 为各表位肽与 HLA-A2 分子的结合图, 如图 2 所示, 各肽均深陷于 HLA-A2 分子的多肽结合槽中.

2.3 结合参数的计算

表 1 中显示了各肽与 HLA-A2 分子的结合参数.

2.4 候选肽与 HLA-A2 分子的亲和力

单纯的 T2 细胞表面 HLA-A2 分子表达不稳定,

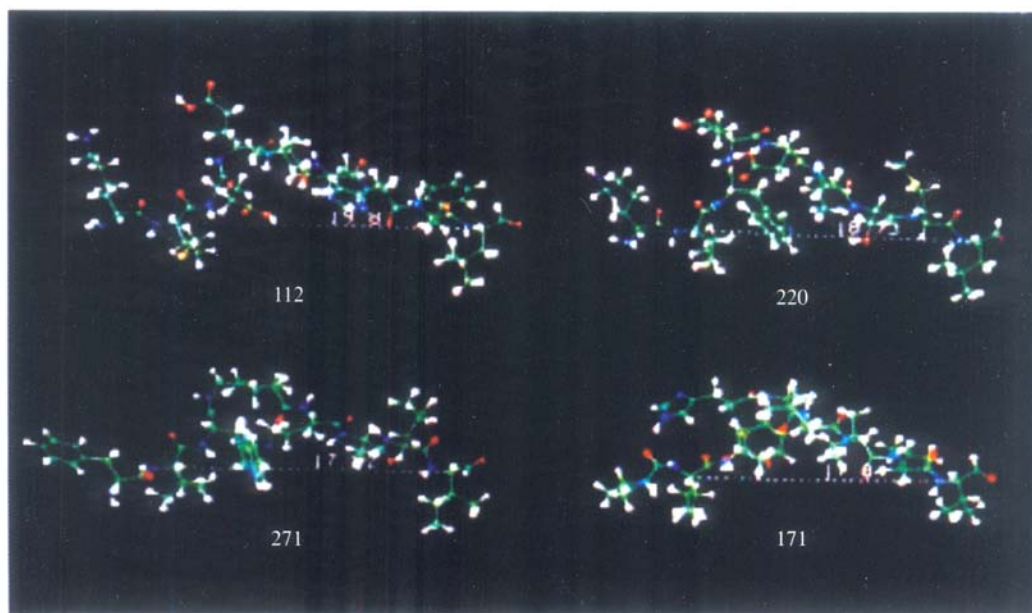


图 1 4 个多肽三维结构

绿色示碳原子, 红色示氧原子, 蓝色示氮原子, 白色示氢原子

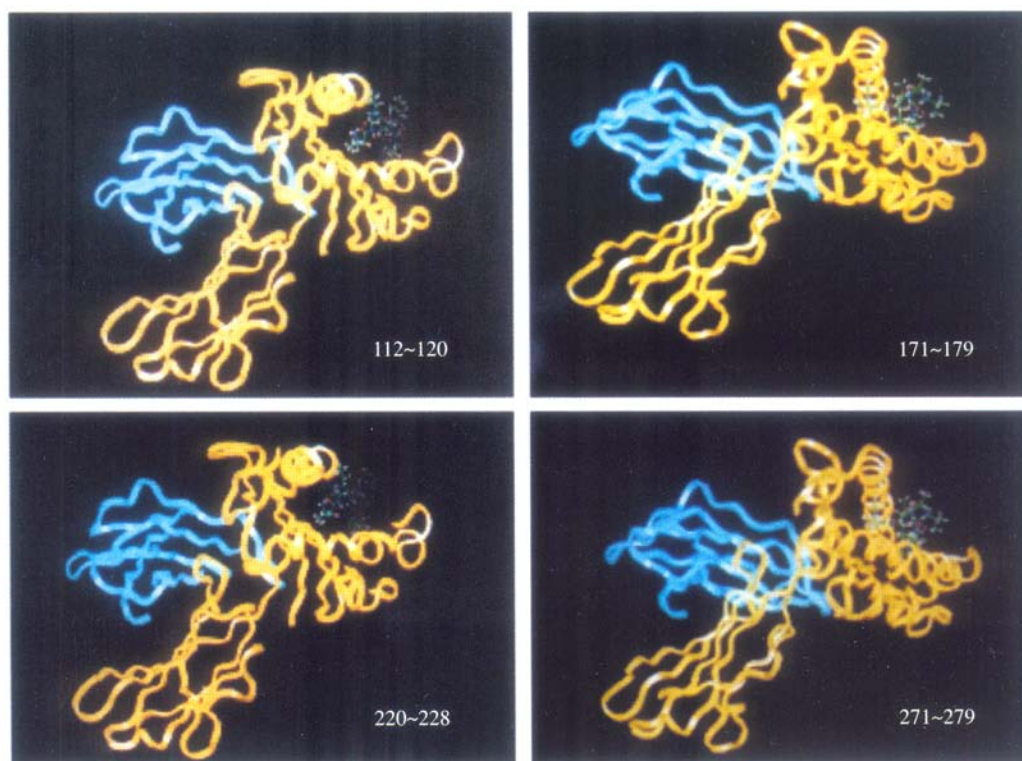


图 2 HLA-A2.1-MAGE-2 候选表位肽复合物模型

黄色条带示 HLA-A2.1 的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$, 蓝色示 $\beta 2$ 微球蛋白

表 1 MAGE-2 各表位肽与 HLA-A2.1 结合的特征参数

候选表位肽	序列	锚点间距(P2~P9)/nm	氢键数	Van der Waals 能 /kJ · mol ⁻¹ · nm ⁻¹	静电能 /kJ · mol ⁻¹ · nm ⁻¹	总能量 /kJ · mol ⁻¹ · nm ⁻¹
MAGE-2(112~120)	KMEELVHFL	1.987	7	-2256.20	-209089.70	-185132.00
MAGE-2(171~179)	PISHLYILV	1.784	5	-1876.50	-204096.30	-180821.00
MAGE-2(220~228)	KIWEELSML	1.873	7	-2179.00	-205903.20	-182932.00
MAGE-2(271~279)	FLWGPRLI	1.792	6	-2017.10	-204765.20	-181809.00

外源肽加入后增加了其 HLA-A2 分子稳定性, 其表达量也相对增加. 图 3 显示流式细胞仪检测平均荧光强度. 图 4 显示 4 个候选表位肽与 HLA-A2 分子的结合系数(FI), 其中 MAGE-2112, MAGE-2220 和 MAGE-2271 均能与 HLA-A2 分子有效结合, 具有高的 FI(FI > 120), 而 MAGE-2171 则不能与 HLA-A2 分子稳定结合, FI = 106.

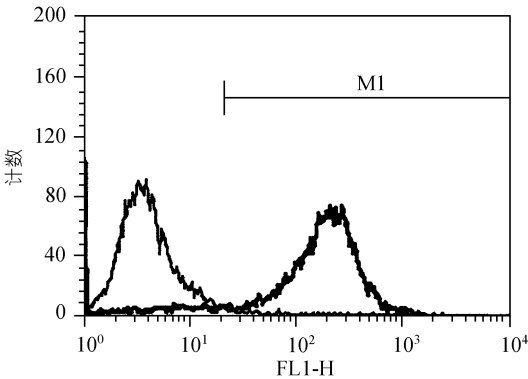


图 3 流式细胞仪检测平均荧光强度
M1 示相对阳性区域, FL1-H 示利用 FL1 通道检测 FITC 标记的
荧光强度

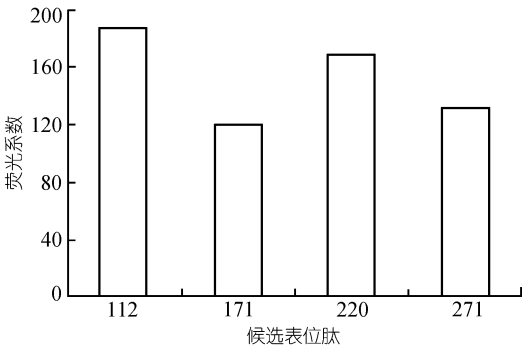


图 4 候选表位肽与 HLA-A2 分子的结合荧光系数

2.5 体外诱导 CTL 活性

候选表位肽体外 3 次刺激 HLA-A2⁺健康人的 PBMC, 诱导特异性 CTL 杀伤效应, 通过标准的 ⁵¹Cr

释放实验验证, 如图 5 所示, 3 个与 HLA-A2 有高亲和力的表位肽 MAGE-2(112 ~ 120), MAGE-2(220 ~ 228) 和 MAGE-2(271 ~ 279)均能诱导有效的 CTL 效应, 对靶细胞具有较高的溶破率, 在效靶比为 100 : 1 时, 靶细胞溶破率分别为 71.2%, 74.4% 和 68.2%, 而 MAGE-2 (171 ~ 179)则没有诱导出明显的 CTL 活性, 对靶细胞溶破率仅为 18.5%.

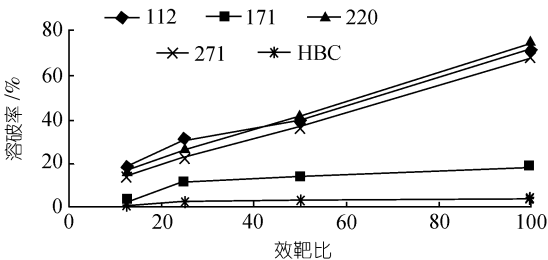


图 5 候选表位肽刺激 PBMC 后对靶细胞 LB373-MEL 的溶破率

3 讨论

表位多肽与 MHC-I 分子形成稳定的复合物是 CTL 细胞激活的关键. Lim 等人^[17]利用 HLA-A2 分子晶体结构, 以已知 HLA-A2 分子有较好亲和力的 CTL 表位九肽为基础, 利用分子模拟技术构建了 CTL 表位肽与 HLA-A2 分子的复合物的三维结构. 通过对其构象分析发现, HLA-A2 分子的重链肽结合区的 6 个口袋中, 其中起主要作用的是 B, F 口袋, 分别与锚点残基 P2, P9 结合, CTL 表位两个锚点残基的间距为 1.5 ~ 2.0 nm, 符合这些结构的多肽可以认为与 HLA-A2 分子有较好的亲和力. 随着分子动力学方法的进展^[18], 可在经典力场下搜索肽复合物的构象空间并得到能量最小的优势构象, 通过对 MHC-肽复合物优势空间构象分析, 表明抗原肽与 MHC 之间主要通过疏水作用、氢键和盐键等弱相互作用进行分子间的识别, 这些非键作用越强, 相应分子间的非键作用能就越低, 结合则越紧密.

本研究利用上述研究进展,对 MAGE-2 的 4 个候选肽进行了分子模拟. 首先空间构象显示, 4 个候选肽中除 MAGE-2171 的 P1 残基侧链未指向溶液外, 其余各肽结构均相似, 符合 HLA-A2 限制性表位肽的空间构象. 进一步肽结合实验表明, 除候选肽 MAGE-2 (171~179) 与 HLA-A2 分子未能较好地结合, 其余候选肽均与 HLA-A2 分子形成稳定的复合物. 这提示, 多肽与 MHC-I 类分子结合时除了锚点残基侧链 P2, P9 外, 残基侧链 P1 也起关键作用, 当 P1 侧链上翘指向溶液时可能多肽与 HLA-A2 的亲和力更好. 经分子动力学计算, 结合表 1 和图 4 不难发现候选肽复合物氢键数的减少、多肽与 HLA-A2 分子之间的静电作用的减弱、Van der Waals 能的下降和结合总能量的升高均导致复合物稳定性的显著下降. 相对于其他候选肽 MAGE-2171 具有最少的氢键数, 其静电作用也最弱, 提示多肽与 HLA-A2 分子的相互作用中, 氢键起着关键作用. 进一步的体外诱导 CTL 效应实验, 显示与 HLA-A2 分子有高亲和力的 3 个肽均能诱导 CTL 效应, 有效杀伤靶细胞, 而 MAGE-2(171~179) 则未能诱导出 CTL 效应, 此结果进一步验证了 MHC-I 分子与抗原肽形成稳定的复合物, 是诱发 CTL 效应的关键.

本研究运用分子模拟与多肽结合实验最终鉴定出 MAGE-2 的两个新的 HLA-A2 限制的 CTL 表位, 并能在体外有效诱导 CTL 效应. 构建了运用分子模拟与分子动力学筛选 CTL 表位肽的技术路线, 此路线可用于已知晶体结构的各类 MHC-I 分子表位肽的筛选, 也可用于提高复合物稳定性的结构优化.

致谢 本工作作为国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号: 2001CB510001)和国家自然科学基金资助项目(批准号: 30100167).

参 考 文 献

- van Elsas A, van der Burg S H, van der Minne C E, et al. Peptide-pulsed dendritic cells induce tumoricidal cytotoxic T lymphocytes from healthy donors against stably HLA-A*0201-binding peptides from the Melan-A/MART-1 self antigen. *Eur J Immunol*, 1996, 26(8): 1683~1689
- Bristol J A, Schlom J, Abrams S I. Development of a murine mutant Ras CD8+ CTL peptide epitope variant that possesses enhanced MHC class I binding and immunogenic properties. *J Immunol*, 1998, 160(5): 2433~2441
- Manici S, Sturniolo T, Imro M A, et al. Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11. *J Exp Med*, 1999, 189(5): 871~876
- Falk K, Rotzschke O, Stefanivic S, et al. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 1991, 351: 290~296
- Adams H P, Koziol J A. Prediction of binding to MHC class I molecules. *J Immunol Methods*, 1995, 185(2): 181~190
- 孙命, 车晔, 缪方明, 等. 具有抗艾滋病病毒活性的多肽 T22 ($(I T_{yr}^{5,12}, L_{ys}^7)$ -Polyphemusin II) 骨架构象模拟. *科学通报*, 2001, 46(12): 999~1002
- De Backer O, Verheyden A M, Boon T. Structure, chromosomal location, and expression pattern of three mouse genes homologous to the human MAGE genes. *Genomics*, 1995, 28(1): 74~83
- Weynants P, Lethe B, Brasseur F, et al. Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas. *Int J Cancer*, 1994, 56(6): 826~829
- Tahara K, Mori M, Sadanaga N, et al. Expression of the MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 1999, 85(6): 1234~1240
- Scarcella D L, Chow C W, Gonzales M F, et al. Expression of MAGE and GAGE in high-grade brain tumors: a potential target for specific immunotherapy and diagnostic markers. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(2): 335~339
- Dalerba P, Frascella E, Macino B T I, et al. MAGE, BAGE and GAGE gene expression in human rhabdomyosarcomas. *Int J Cancer*, 2001, 93(1): 85~90
- Visseren M J, van der Burg S H, van der Voort E I, et al. Identification of HLA-A*0201-restricted CTL epitopes encoded by the tumor-specific MAGE-2 gene product. *Int J Cancer*, 1997, 73(1): 125~130
- 耿森, 贾正才, 万瑛, 等. 肿瘤抗原 MAGE-2HLA-A2 限制性 CTL 表位的预测. *第三军医大学学报*, 2000, 22(10): 934~937
- Nijman H W, Houbiers J G, Vierboom M P, et al. Identification of peptide sequences that potentially trigger HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol*, 1993, 23(6): 1215~1219
- Yoon H, Chung M K, Min S S, et al. Synthetic peptides of human papillomavirus type 18 E6 harboring HLA-A2 motif can induce peptide-specific cytotoxic T-cell from peripheral blood mononuclear cell. *Virus Research*, 1998, 54: 23~29
- Matsumura M, Fremont D H, Peterson P A, et al. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science*, 1992, 257(5072): 927~935
- Lim J S, Kim S, Lee H G, et al. Selection of peptides that bind to the HLA-A2 molecule by molecular modeling. *Molecular Immunology*, 1996, 33(2): 221~230
- McCammon J A, Harvey S C. Dynamics of protein and nucleic acid. London: Cambridge University Press, 1987. 150~270

(2003-03-24 收稿, 2003-06-16 收修改稿)