论著

文章编号:1000-5404(2005)11-1106-03

肿瘤血管内皮抗原TEM8的HLA-2.1限制性低亲和性CTL表位预测及改造分析

阮志华,吴玉章,支 轶,王惠明,唐 艳,林治华,吕燕波 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 初步筛选肿瘤血管内皮标志物8(tumor endothelial marker 8, TEM 8) HLA-A2.1限制性低亲和性CTL表位,并预测修饰后的表位与HLA-A2.1之间亲和性的变化。**方法** 采用超基序、3D-QSAR、蛋白酶解预测等相结合的办法筛选HLA-A2.1限制性低亲和性CTL表位,并通过氨基酸置换适当修饰,最后对部分候选的多肽进行分子动力学模拟。**结果** 筛选出8个低亲和性CTL候选表位,经修饰后的表位与HLA-A2.1之间的亲和性均有不同程度的提高。**结论** 初步预测和修饰的表位系列可为下一步实验提供了依据。

关键词:肿瘤血管内皮标志物;CTL;表位;分子动力学模拟
中图法分类号:R392-33; R392.13; R73-354 **文献标识码**:A

Prediction and modification analysis of low-affinity HLA-2.1 restricted CTL epitopes derived from tumor endothelial marker 8

RUAN Zhi-hua, WU Yu-zhang, ZHI Yi, WANG Hui-ming, TANG Yan, LIN Zhi-hua, LU Yan-bo (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To screen the possible HLA-A2.1 restricted low-affinity CTL epitopes derived from TEM8 and to predict the possible change of the affinity between epitope and the HLA-A2.1 molecule when the epitope is modified. **Methods** HLA-A2.1 restricted low-affinity CTL epitopes were predicted by CTL epitope-prediction-software based on supermotif, 3D-QSAR and proteasome cleavage probability. The candidates were modified by amino acid substitution and analyzed by computer. Six peptides were modeled by molecular dynamic simulation program. **Results** Eight low-affinity CTL candidate epitopes were selected out, and the affinity of the modified epitopes with HLA-A2.1 improved. **Conclusion** These data are very valuable for further experiments.

Key words: TEM8; CTL; epitope; molecular dynamic simulation

在机体针对肿瘤的免疫应答过程中,细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)是主要的效应细胞,而CTL在识别抗原时是以表位为基础的。抗原提呈细胞(antigen processing cell, APC)摄取肿瘤抗原后,将其加工成含8~10个氨基酸的段肽,提呈给$CD8^+$ T细胞。研究者基于上述原理设计了多肽疫苗,并在动物实验和临床试验中均证实了多肽疫苗的有效性[1]。肿瘤内皮标志物8(tumor endothelial marker 8, TEM 8)是最近发现的肿瘤相关抗原,是一个很有吸引力的新的抗肿瘤治疗靶点[2]。由于鉴定和筛选HLA限制性CTL表位是设计多肽疫苗的前提条件,所以,在下一步工作之前,我们需要明确TEM8所包含的表位数据。目前,计算机分子模拟预测表位的技术可以有效简化鉴定表位的常规程序[3],本研究运用计算机模拟技术,对肿瘤血管内皮标志物8的HLA-A2限制性低亲和性CTL表位进行了初步筛选和改造模拟。

1 材料与方法

1.1 蛋白质的多肽系列

检索人类肿瘤内皮标志物8剪接变异体Ⅰ的多肽序列(http://www.ncbi.nlm.nih.Gov ; accession number NP-115584)。

1.2 HLA-2.1限制CTL表位预测及改造

1.2.1 亲和性预测 以HLA限制性CTL表位预测软件(林治华等[3]编写)作为工具,采用超基序和3D-QSAR相结合的方法得到TEM8所包含的候选表位肽数据,评价标准如下,低亲和性:$pIC_{50} < 6.301$ ($IC_{50} > 500$ nmol/L);中亲和性:$6.301 < pIC_{50} < 7.301$ (50 nmol/L $< IC_{50} <$ 500 nmol/L);高亲合性:$pIC_{50} > 7.301$

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471579)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471579)
作者简介:阮志华(1971-),男,湖北省枝江县人,博士,主治医生,讲师,主要从事肿瘤免疫治疗方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752236
通讯作者:吴玉章,电话:(023)68752236
收稿日期:2004-10-21;修回日期:2005-03-07

(IC_{50} < 50 nmol/L);选择 pIC_{50} < 7.0 的肽进入下一步筛选过程。

1.2.2　酶切预测　　对 TEM8 分子进行蛋白酶切预测(http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP)[4]。

选择在 1.2.1 和 1.2.2 两种预测结果中均出现的肽为最终候选肽。

1.2.3　表位修饰　　对候选肽进行修饰,修饰肽按下面的原则进行:①将第 1 位氨基酸改为 Y。② 将第 9 位氨基酸改为 A(P9 是 V 时除外)。改造后的多肽序列按第 1 步的程序预测亲和性(pIC_{50})。

1.2.4　亲和性评分　　对所有的肽的亲和性评分(http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/hla-bind)[4]。

1.3　分子动力学模拟

模拟工作采用 Insight Ⅱ(Accelrys Inc.)分子模拟软件包,在 SGI-Fuel 工作站上完成。选取 HLA-A*0201 与人类 T 细胞嗜淋巴病毒Ⅰ(Htlv-1)Tax 蛋白来源的九肽复合物晶体结构作为起始坐标(PDB 编号 1DUZ)。多肽分子经残基替换后构建突变体,对氨基酸侧链进行优化修饰。采用 cvff91 力场,最陡下降法和共轭梯度法分别对九肽进行 2 000 步能量优化,收敛条件为能量梯度小于 0.001 $kCal \cdot mol^{-1} \cdot Å^{-1}$。在复合物外加两层水分子,固定复合物骨架原子,对内层水分子进行优化,收敛条件为能量的 RMSD 值小于 0.01 $kCal \cdot mol^{-1} \cdot Å^{-1}$。再约束外层水分子,保持 MHC 分子重链 α3 结构域和 β 微球蛋白氨基酸残基的刚性,对整个体系进行3 000步能量优化至收敛。对上述力学优化的构象进行 300 ps 分子动力学模拟,范德华相互作用的截断值设为 12 Å。采用 NVT 系综,温度恒定在 300 K,原子初始速度用 Maxwell-Boltzmann 分布产生。积分步长设为 1 fs,记录能量文件和轨迹文件,每隔 100 步抽出一个结构,共得到 3 000 个构型用于分析。根据轨迹文件,取体系达到平衡后的平均构象。再次对上述构象进行优化,收敛条件为体系能量的 RMSD 小于 0.001 $kCal \cdot mol^{-1} \cdot Å^{-1}$,并以此得到的最终构象作为判断多肽与 MHC 分子间亲和力的分析构象。

1.4　构象分析

九肽与 MHC 分子间的能量(InterE)利用 Docking 模块完成。结合自由能采用自由能的经验打分函数 SCORE 计算[5]。溶剂可及性表面积(Solvent accessible surface,SAS)根据 Shrake 和 Rupley 对分子表面的定义,以水分子为探针,半径 1.4 Å。

2　结果

2.1　HLA-2.1 限制 CTL 表位预测结果

以超基序方案预测的候选 9 肽有 61 条,其中 pIC_{50} < 7.0 的肽有 38 条,在这 38 条肽中符合酶切预测结果的仅有 8 条肽(表 1)。在表 1 中 p460-468 的 pIC_{50} 值最高,而且仅有这一条肽达到了量化基序预测方案所提供的阈值。P369-377 则在 BIMAS 网站有较高的评分。

2.2　HLA-2.1 限制 CTL 候选肽改造及评分结果

表 1 中的候选肽经过改造后再次评分,发现所有肽的亲和性均有不同程度的提高,大多数肽的亲和性提高了 10 倍以上,p369-377Y1A9 的变化最显著,得到了量化基序预测方案和 BIMAS 网站的较高评分(表 2)。

表 1　不同方法得到的候选肽的亲和力指数预测值

Tab 1　The affinity index of each peptide predicted by diverse predictive methods

No.	Peptide	Sequence	pIC_{50}	Score[a]	Score[b]	Score[c]
1	p10-18	GIGFQWLSL	6.5899	n	-23.62	4.993
2	p82-90	FIVFSTRGT	5.7588	n	n	<2
3	p172-180	GAIVYCVGV	6.1425	n	-23.11	<2
4	p248-256	HARNVDRVL	4.8190	n	n	<2
5	p314-322	TTHCSDGSI	6.1921	n	-23.72	<2
6	p324-332	AIALLILFL	6.2231	n	-22.79	37.157
7	p369-377	GLPKKKWPT	6.2325	n	n	55.89
8	p460-468	LLRKGYDRV	6.6696	6.87	-23.64	6.605

Score[a] is the results of quantitative-motif scheme; Score[b] is the results of polynomial methods; Score[c] is the results obtained from the website http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/hla-bind; n: the numerical value less than the threshold provided by the predictive method; All peptides have been validated by proteasome cleavage prediction from the website http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP

表 2　不同方法得到的改造后的候选肽亲和力指数预测值

Tab 2　The affinity index of each modified peptide predicted by diverse predictive methods

No.	Peptide	Sequence	pIC_{50}	Score[a]	Score[b]	Score[c]
1	p10-18Y1A9	YIGFQWLSA	7.9137		-22.49	5.32
2	p82-90Y1A9	YIVFSTRGA	6.6393		-23.46	< 2
3	p172-180Y1	YAIVYCVGV	6.7098	12.22	-22.25	4.44
4	p248-256Y1A9	YARNVDRVA	5.7434		n	< 2
5	p314-322L2A9	TLHCSDGSA	7.8349		-22.21	< 2
6	p324-332Y1A9	YIALLILFA	7.4463		-21.60	39.75
7	p369-377Y1A9	YLPKKKWPA	7.5107	57.13	-23.91	171.396
8	p460-468Y1	YLRKGYDRV	6.9289	6.87	-22.78	17.82

Score[a] is the results of quantitative-motif scheme; Score[b] is the results of polynomial methods; Score[c] is the results obtained from the website http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/hla-bind; n indicates the numerical value less than the threshold provided by the predictive method

2.3　分子动力学模拟结果

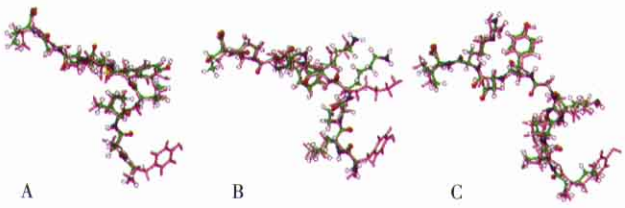
我们选择了 p172-180、p369-377、p460-468 及其改造后的肽 p172-180Y1、p369-377Y1A9、P468Y1 经行分子动力学模拟。由表 3 可见,各候选表位的 P2 - P9 锚基间距在 16 ~ 20 Å 范围内,满足大部分 HLA-2.1 限制 CTL 表位的锚定残基间距在 15 ~ 20 Å 的要求。表位肽 P1 位点经酪氨酸替换后,其 N 末端与肽结合槽残基间形成多个稳定氢键,使得多肽与结合槽嵌合更加紧密,P2 位点残基暴露于溶剂环境中的表面积(SAS)减小。能量项计算显示氨基酸替换修饰后体系总能量、分子间能量较改造前降低,结合自由能(以 pKscore 值反映)有一定的提高,说明改造后的多肽与 MHC 的亲和性更高。其中 p369-377Y1A9 由于同时对 P1 与 P9 锚基替换修饰,故变化较为显著(表 3、图 1)。

表 3　肽-MHC 复合物构象分析

Tab 3　Analysis of the interaction factors between peptides and MHC molecules

Peptide	H-bond	Distance of P2-P9/Å	TotalE/ $kCal \cdot mol^{-1}$	InterE/ $kCal \cdot mol^{-1}$	pKscore	SAS of P2/$Å^2$	SAS of P9/$Å^2$
p172	9	17.42	-12 815.6	-267.79	7.79	2.95	7.83
p172Y1	11	16.57	-13 692.4	-274.06	7.81	2.12	5.82
p369	11	18.43	-14 798.9	-271.75	6.26	3.97	1.35
p369Y1A9	17	18.06	-15 750.9	-275.51	6.43	0.23	3.16
p460	11	16.23	-14 878.6	-256.92	6.51	1.17	0.00
p460Y1	19	19.21	-15 006.6	-288.24	6.63	1.40	0.00

SAS: Solvent accessible surface; TotalE: Total energy; InterE: Intermolecular energy



A: p172-180; B: p369-377; C: p460-468. Ball-stick conformation present original nonapeptide. Stick conformation present modified nonapeptide

图1 改造前后九肽构象叠加图

Fig 1 Overlapped figures of the original peptides and their modified homologous peptides

3 讨论

在T细胞的发育过程中,多数自身反应性T细胞被克隆清除,未被清除的T细胞在多种免疫调节机制的调控下,处于外周耐受状态。大多数肿瘤相关抗原(TAA)是没有变异的自身抗原,免疫系统对这些抗原通常是处于耐受状态。研究表明,T细胞的自身耐受主要针对T细胞优势表位,而针对隐性表位的免疫耐受却很少发生。所以,通过适当的途径可以募集高活性的针对隐性表位的CTL并达到抑制肿瘤生长的目的。

一般情况下,隐性表位一般是低亲和性表位。天然的低亲和力表位肽很难激发相应的T细胞应答,而对表位进行修饰,在不改变表位肽和TCR结合的特异性的同时,增加"肽-MHCⅠ"的亲和性却可以激发针对天然低亲和性表位的免疫应答,并产生高活性的CTL。因此,选择低亲和力或者隐性表位,经过适当改造后再进行免疫治疗,可能为抗肿瘤免疫治疗的有效途径[6,7]。

修饰表位肽的办法有3种:①修改MHCⅠ主要锚着位点氨基酸,即在P2或者P8/9位以高亲和性的氨基酸替换低亲和性氨基酸[8]。②修饰表位肽的TCR结合特性或者修改TCR结合区氨基酸,在1、3、5、7等奇数位替换1个或者2个氨基酸,通常可以改变表位肽的与TCR结合的亲和性和特异性,替换这位点的氨基酸有可能激活更多的CTL。但是,替换3、5、7位氨基酸在更多的情况下改变了抗原特异性,使修饰后的肽所募集的CTL不能识别原始表位,故在修改TCR结合区氨基酸的时候应该慎重[9]。③修改次级锚着位氨基酸,实验表明,以酪氨酸(Y)替换第一位氨基酸却可以明显提高表位肽与HLA-2.1的亲和力和免疫原性,并且不改变表位的抗原特异性[6,9]。

2000年Croix等[10]发现了9条在结肠癌血管内皮中特异性高表达的基因,命名为肿瘤内皮标志物(tumor endothelial markers, TEMs)。研究表明,大多数TEM的mRNA在部分正常组织中也丰富表达,但TEM8却是例外。在人体内,TEM8的mRNA和TEM8蛋白几乎在所有的结肠癌、食管癌、膀胱癌、肺癌病例中高表达,而在同一病例的癌旁组织和正常组织没有检测出TEM8蛋白分子[11]。这些研究结果提示TEM8是理想的免疫治疗候选靶点之一。

我们以TEM8的一级结构为基础,预测了TEM8所包含的HLA-2.1限制性低亲和性CTL表位,并以氨基酸替换的方法对候选表位进行了适当的修饰。以酪氨酸(Y)替换九肽的第一位氨基酸后,软件分析提示修饰后的肽与MHCⅠ之间的亲和性有不同程度的提高,以丙氨酸(A)替换九位氨基酸后亲和性也有一定的增强,这个结果和其他文献所提供的实验数据是一致的[5]。这些预测结果缩小了选择范围,为下一步试验提供了依据。

参考文献:

[1] Rosenberg S A, Yang J C, Schwartzentruber D J, *et al*. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma[J]. Nat Med, 1998, 4(3): 321-327.

[2] Nanda A, St Croix B. Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy[J]. Curr Opin Oncol, 2004, 16(1): 44-49.

[3] Lin Z H, Wu Y Z, Wei Y L, *et al*. A Rapid Method for Quantitative Prediction of High Affinity CTL Epitopes: QSAR Studies on Peptides Having Affinity with The Class I MHC Molecular HLA-A*0201[J]. Letters in Peptide Sci, 2003, 10(1): 15-23.

[4] Nussbaum A K, Kuttler C, Tenzer S, *et al*. Using the World Wide Web for predicting CTL epitopes[J]. Curr Opin Immunol, 2003, 15(1): 69-74.

[5] Wang R X, Liu L, Lai L H, *et al*. SCORE: A new empirical method for estimating the binding affinity of a protein-ligand complex[J]. J Mol Model, 1998, 4(12): 379-394.

[6] Tourdot S, Scardino A, Saloustrou E, *et al*. A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes[J]. Eur J Immunol, 2000, 30(12): 3411-3421.

[7] Gross D A, Graff Dubois S, Opolon P, *et al*. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy[J]. J Clin Invest, 2004, 113(3): 425-433.

[8] Valmori D, Fonteneau J F, Lizana C M, *et al*. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL *in vitro* by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues[J]. J Immunol, 1998, 160(4): 1750-1758.

[9] Huarte E, Sarobe P, Lu J, *et al*. Enhancing immunogenicity of a CTL epitope from carcinoembryonic antigen by selective amino acid replacements[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(7): 2336-2344.

[10] Croix B S, Rago C, Velculescu V, *et al*. Genes expressed in human tumor endothelium[J]. Science, 2000, 289(5482): 1197-1202.

[11] Nanda A, Carson-Walter E B, Seaman D S, *et al*. TEM8 interacts with the cleaved C5 domain of collagen α3(VI)[J]. Cancer Res, 2004, 64(3): 817-820.

(编辑 栾 嘉)