文章编号:1000-5404(2006)06-0499-04

论著

轮状病毒结构蛋白 VP6 HLA-A*0201 限制性 CTL 表位的初步鉴定

魏 静,李晋涛,支 轶,唐 艳,张小萍,王靖雪,吴玉章 (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 预测并初步鉴定轮状病毒 Wa 株结构蛋白 VP6 HLA-A*0201 限制性 CTL 表位,为轮状病毒免疫保护机制研究及疫苗的研制奠定基础。**方法** 应用表位亲和力预测软件 SYFPEITHI 及蛋白酶切位点预测软件 PAProc 和 Fragpredict 相结合预测 VP6 HLA-A*0201 限制性 CTL 表位;用分子模拟对候选肽作进一步筛选;标准 Fmoc 方案合成候选肽,RP-HPLC 纯化、分析,质谱进行鉴定;最后用 T2 细胞株测定候选肽与 HLA-A*0201 分子的亲和力及稳定性。**结果** 结合 SYFPEITHI、蛋白酶切位点预测结果及分子模建结果,选择分值最高同时在 C-末端含有蛋白酶切位点的 4 条肽作为候选表位肽;标准 Fmoc 方案合成的各肽纯度均大于 95%,质谱检测结果表明,各肽的相对分子质量与理论值基本一致;在候选的 4 条表位肽中,TLLANVTAV(340-348)和 VLADANETL(333-341)与 HLA-A*0201 呈高亲和力结合,荧光系数(flurorescene index, FI)分别为 2.66 和 2.64,同时肽-HLA-A*0201 复合物半数解离时间(dissociation complex$_{50}$, DC$_{50}$)均大于 8 h。**结论** TLLANVTAV(340-348)和 VLADANETL(333-341)为潜在的 HLA-A*0201 限制性 CTL 表位。

关键词: 轮状病毒; VP6; HLA-A*0201; CTL; 表位

中图法分类号: R341;R373.2;R394.2 **文献标识码:** A

Primary identification of HLA-A*0201-restricted CTL epitopes from rotavirus protein VP6

WEI Jing, LI Jin-tao, ZHI Yi, TANG Yan, ZHANG Xiao-ping, WANG Jing-xue, WU Yu-zhang (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To develop new reagents for future studies on the role of CTLs in protection against rotavirus infection and vaccine design/evaluation in humans, HLA-A*0201 restricted CTL epitopes from protein VP6 of rotavirus Wa strain were predicted and identified. **Methods** A computer-based program, which is accessed through SYFPEITHI combined with PAProc/Fragpredict proteasomal cleavage site prediction algorithm and molecular modeling was utilized to predict HLA-A*0201 restricted CTL epitopes within rotavirus protein VP6. Candidate peptides were synthesized and purified by reverse phase HPLC, and analysed by mass spectrometry. T2 cells were used to determine the peptide binding affinity and HLA-A*0201-peptide complex stability. **Results** Six peptides with the highest score predicted by SYFPEITHI and proteasomal cleavage site at the C-terminal were chosen and then two of them were eliminated through molecular modeling. Finally, four candidate peptides were synthesized and purified to over 95% by reverse phase HPLC and confirmed by mass spectrometry. Among the four predicted peptides, TLLANVTAV(340-348) and VLADANETL(333-341) could bind to HLA-A*0201 with high affinity, the value of flurorescene index (FI) was 2.66 and 2.64 respectively, and the dissociation time of 50% HLA-A*0201-peptide complex was over to 8 h. **Conclusion** Our results suggest that TLLANVTAV(340-348) and VLADANETL(333-341) might be HLA-A*0201 restricted CTL epitopes.

Key words: rotavirus; VP6; HLA-A*0201; CTL; epitopes

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30400402, 30490240, 30325020)和国家重点基础研究发展规划资助项目"973项目"(2001CB510001)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400402, 30490240 and 30325020) and the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2001CB510001)

作者简介: 魏 静(1972-),女,四川省营山县人,博士研究生,讲师,主要从事病毒免疫及疫苗方面的研究。电话:(023)68752236-816,E-mail: weijing06@yahoo.com.cn
通讯作者: 吴玉章,E-mail: wuyuzhang@yahoo.com

收稿日期: 2005-03-07;**修回日期:** 2006-01-12

A 组轮状病毒(rotavirus, RV)是引起全世界婴幼儿病毒性重症腹泻的最主要病原[1]。实验动物模型中的实验数据表明,$CD8^+$ T 细胞在轮状病毒原发感染和再次感染的免疫保护中扮演了重要角色[2-4]。但在人体内, $CD8^+$ T 细胞在轮状病毒感染中的免疫地位和作用尚不明确。

细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxicity T lyphocytes, CTL)表位的鉴定可为轮状病毒感染的免疫保护机制研究及基于表位的疫苗设计、研制及评估提供强有力的工具。轮状病毒结构蛋白 VP6 是轮状病毒含量最高的结构蛋白,约占轮状病毒结构蛋白总量的 80%,并且 A 组轮状病毒结构蛋白 VP6 高度保守(87% ~ 99%)[5];另一方面,HLA-A2 是亚洲人(特别是中国人)最普遍的 HLA 表型,其比例高达 50%[6]。因此对 A 组轮状病毒(人轮状病毒 Wa 株)结构蛋白 VP6 HLA-A * 0201 限制性 CTL 表位进行鉴定具有较重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 VP6 多肽序列

人轮状病毒 Wa 株 VP6 的氨基酸序列从 SwissProt 获得(Accession number:P03530),共 397 个氨基酸。

1.2 CTL 表位的预测

应用表位亲和力预测软件 SYFPEITHI 对轮状病毒 Wa 株 VP6 结构蛋白 HLA-A * 0201 限制性 CTL 表位进行预测,得到多条可能结合之 9 肽表位。根据预测分值进行排序,取分值最高的 6 条肽作为候选表位肽;同时用蛋白酶切位点预测软件 PAProc 和 Fragpredict 对 VP6 的蛋白酶切位点进行预测(阈值为 0.5),以对侯选的 6 条表位肽进一步筛选,选择 C-末端含有酶切位点的肽(PAProc 和 Fragpredict 任何 1 个)作为候选表位肽;最后将候选表位肽与已报道的表位肽进行比对筛选。

1.3 初始模型构建

所有工作均采用 Insight II(Accelrys Inc.)分子模拟软件包,在 SGI-Fuel 工作站上完成。肽-MHC 复合物晶体结构取自 PDB 数据库(PDB 编号 1DUZ)。9 肽经残基替换后,构建目标多肽序列,对氨基酸侧链进行适当优化修饰,以减少不合理几何碰撞。采用 cff91 力场,最陡下降法和共轭梯度法分别对 9 肽进行 2 000 步能量优化,收敛条件为能量梯度小于 0.001 kcal · mol^{-1} · $Å^{-1}$(1 kcal = 4.186 8 kj, 1Å = 10^{-10} m)。

1.4 分子力学优化与动力学模拟

在复合物体系外加两层水分子,内层水 5 Å,外层水 3 Å,以保证复合物体系的构象变化空间。固定复合物骨架原子,对内层水分子进行能量优化,然后约束外层水分子,固定 MHC 分子重链 α_3结构域和 β_2微球蛋白,对整个体系进行 3 000 步能量优化直至收敛。对上述力学优化的构象进行 500 ps 分子动力学模拟,范德华相互作用的截断值设为 10 Å。NVT 统计系统,温度 26.85 ℃,积分步长为 1 fs,记录能量文件和轨迹文件。最后再次对上述分子动力学模拟所得结构进行能量优化,收敛条件为体系能量的 RMSD 值小于 0.001 kcal · mol^{-1} · $Å^{-1}$,并以此结构作为判断多肽与 MHC 分子间相互作用的分析构象。计算候选肽与 HLA-A * 0201 分子间的静电相互作用能和范德华相互作用能、氢键数目以及溶剂可及性表面积(solvent accessible surface, SAS)等值,以判断候选肽与 HLA-A * 0201 分子的亲和力大小。

1.5 多肽的制备

1.5.1 多肽的合成 采用标准的 Fmoc 方案在 431A 型多肽合成仪(ABI 公司)上进行合成。

1.5.2 多肽的纯化与分析 各肽的纯化选用 Vydac218TP101510 制备柱,各肽的纯度分析选用 Vydac218TP152022 分析柱。流动相选用 0.1% TFA 的乙氰溶液,用 UV Detector K-2001 进行检测。

1.5.3 质谱鉴定 用 Mariner ESI-TOF 型质谱仪测定各合成肽的相对分子质量。

1.5.4 多肽产品的收集 纯化收集液在真空冷冻干燥器蒸发至完全干燥, -20 ℃保存、备用。

1.6 候选肽与 HLA- A * 0201 的亲和力分析

1.6.1 细胞株及单克隆抗体 人 T2 细胞和 BB7.2 杂交瘤细胞株购于美国 ATCC(American Type Culture Collection)。T2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中;BB7.2 杂交瘤细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,收集 BB7.2 杂交瘤细胞培养上清作为鼠抗人 HLA-A * 0201 的单克隆抗体。

1.6.2 T2 细胞与待测肽的孵育 Hanks 液洗涤 T2 细胞 3 次,800 r/min 离心 6 min,然后与含 20 μmol/L 待测肽及 3 μmol/L 的人 β_2-微球蛋白(购于 Serotec 公司)的 RPMI1640 培养液于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下共孵育 18 h。用 HLA-A * 0201 阳性表位肽 HBcAg18-27 作阳性对照,HLA-A * 0201 阴性表位肽 HbcAg131-140 为阴性对照,T2 细胞只加与样品中同等量的 DMSO 及乙醇作为背景对照。

1.6.3 流式细胞仪检测 T2 细胞表面 HLA-A * 0201 分子的表达 孵育好的 T2 细胞 800 r/min 离心 6 min 后,细胞沉淀用冰浴的 FACS 洗液(含 0.5% BSA, 0.01% Na_3N 的 PBS)洗涤 3 次,同样条件离心后,在细胞沉淀中加入 100 μl BB7.2 来源的鼠抗人 HLA-A * 0201 单抗,冰浴 30 min;同样方法洗涤 3 次后,加入 100 μl 稀释度为 1∶50 的 FITC-羊抗鼠 IgG(购于北京中山生物技术公司),冰浴 30 min 后洗涤 3 次,用 0.5 ml 冰 FACS 稀释后,在流式细胞仪 Calibur(美国 BD 公司)检测,检测波长 488 nm。

1.6.4 结果判定 结果以 FI 作为衡量指标,计算公式如下: FI = (样本平均荧光强度 - 背景平均荧光强度)/背景平均荧光强度。

1.7 候选肽与 HLA-A2 结合稳定性分析

同 1.6.2 处理 T2 细胞,洗涤 4 次,以去除游离肽,然后加入 10 μg/ml 的 HLA-A * 0201 合成阻断剂 Brefeldin A(购于 Sigma 公司)孵育 1 h,洗涤,37 ℃ 孵育 0、2、4、6、8 h,同 1.6.3 用流式细胞仪分别检测每个时间点的平均荧光强度,计算 FI 值及 50% 的 HLA-A * 0201-待测肽复合物解离所需的时间,即 DC_{50}(Dissociation $complex_{50}$, DC_{50})。

2　结果

2.1　VP6 HLA-A＊0201 限制性 CTL 表位的预测结果

SYFPEITHI 软件对轮状病毒 Wa 株 VP6 结构蛋白 HLA-A＊0201 限制性 CTL 表位进行预测，得到 293 条可能结合之 9 肽表位，取分值最高的 6 条肽作为候选表位肽（占总预测表位的 2%），即 ILRPNNVEV（252-260）、LLGTTLLNL（64-72）、TLLANVTAV（340-348）、VLADANETL（333-341）、TLYSNVSDL（21-30）和 ALTTATITL（216-224），具体见表 1；用蛋白酶切位点预测软件 PAProc 和 Fragpredict 对 VP6 酶切位点进行预测，上述 6 条肽 C-末端均含有蛋白酶切位点；最后将其与 CTL 表位库中已鉴定的 CTL 表位进行比对筛查，显示均未经鉴定，故用于下一步研究。

表 1　VP6 HLA-A＊0201 限制性候选表位及其与 HLA-A＊0201 分子结合的亲和力

编号	起始位点	序列	SYFPEITHI 预测分值	PAProc	Fragpredict	FI	DC_{50}（h）
1	252	ILRPNNVEV	28	—	1.000 0	1.48	<2
2	64	LLGTTLLNL	27	0.779 3	1.000 0	0.95	<2
3	340	TLLANVTAV	27	0.806 6	—	2.66	>8
4	333	VLADANETL	26	—	1.000	2.64	>8
5	21	ALTTATITL	25	—	1.000 0	—	—
6	216	TLYSNVSDL	25	—	0.698 0	—	—

FI 及 DC_{50} 表示 3 次实验的平均值

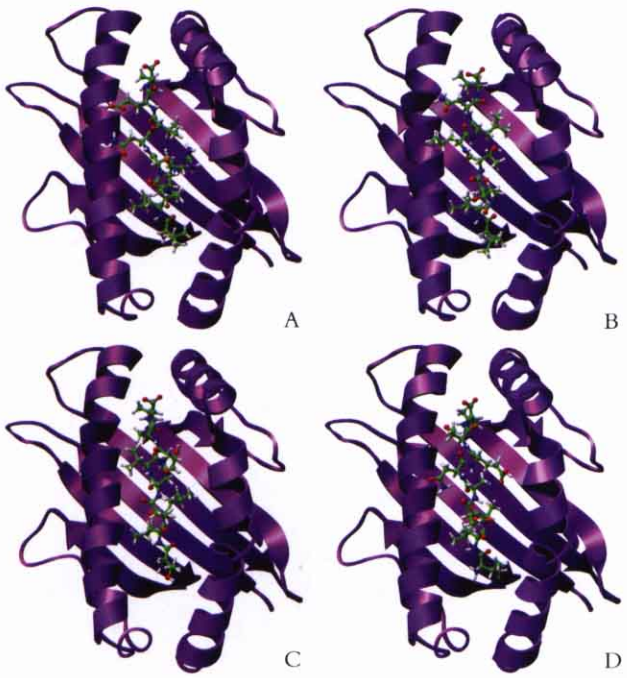
2.2　分子动力学模拟

分析 6 条候选肽与 HLA-A＊0201 分子的最终复合物构象，分别计算体系总能量（E_{Total}）、分子间静电相互作用能（E_{Elect}）和范德华相互作用能（E_{VdW}），以及受体与配体间的氢键数目和锚固性残基的溶剂可及性表面积，结果见表 2。从表中数据可见，TLYSNVSDL（21-30）和 ALTTATITL（216-224）与 HLA-A＊0201 分子的复合物结构体系能量较高，同时多肽与组成 MHC 肽结合槽的残基间不能形成稳定的氢键作用网络，分子间的静电相互作用能和范德华相互作用能也较其他 4 条候选肽为高，说明上述两条多肽与 HLA-A＊0201 分子之间的结合不如其他多肽稳固。另外，对各候选肽锚固性残基溶剂可及性表面积进行计算，发现 TLYSNVSDL（21-30）和 ALTTATITL（216-224）的 P2 与 P9 残基 SAS 值较高，也表明多肽分子与肽结合槽的嵌合不够紧密。因此，我们淘汰了上述 2 条多肽，仅选择 ILRPNNVEV（252-260）、LLGTTLLNL（64-72）、TLLANVTAV（340-348）和 VLADANETL（333-341）4 条候选多肽进行合成，用于进一步的研究，这 4 条多肽的分子模拟最终构象见图 1。

表 2　6 条候选表位肽的分子模拟计算结果

序列	E_{Total} ·kcal^{-1}·mol^{-1}	E_{Elect} ·kcal^{-1}·mol^{-1}	E_{VdW} ·kcal^{-1}·mol^{-1}	SAS of P2/ Å^2	SAS of P9/ Å^2	氢键数目
TLYSNVSDL(21-30)	−14 276.5	−142.5	−58.4	3.21	2.12	5
ALTTATITL(216-224)	−14 569.7	−152.3	−55.8	2.87	1.99	6
ILRPNNVEV(252-260)	−16 315.0	−198.3	−72.5	0.00	0.54	9
LLGTTLLNL(64-72)	−15 478.4	−182.5	−77.0	0.12	0.05	10
TLLANVTAV(340-348)	−17 526.7	−188.1	−80.0	0.09	0.11	12
VLADANETL(333-341)	−16 279.2	−179.2	−77.3	0.02	0.00	11

1 kcal = 4.186 9 kJ，1 Å = 10^{-10} m



飘带表示 HLA-A＊0201 肽结合槽；球棍模型表示结合肽；A：ILRPNNVEV（252-260）；B：LLGTTLLNL（64-72）；C：TLLANVTAV（340-348）；D：VLADANETL（333-341）

图 1　4 条候选表位肽与 MHC-I 类分子肽结合槽结合的结构示意图

2.3　多肽的 RP-HPLC 分析及质谱鉴定结果

反相高压液相色谱仪（RP-HPLC）测定合成的 4 条多肽的纯度均在 95% 以上，质谱分析结果显示，各肽的相对分子质量测定值与理论值基本相符，可用于后继试验研究。

2.4　多肽结合亲和力及结合稳定性

间接免疫荧光法检测各肽与 HLA-A＊0201 分子的结合情况，结果显示：在候选的 4 条表位肽中，TLLANVTAV（340-348）、VLADANETL（333-341）与 HLA-A＊0201 呈高亲和力结合，FI 值分别为 2.66 和 2.64，同时其 DC_{50} 均大于 8 h（表 1）。

3　讨论

随着对抗原呈递机制认识的加深，MHC-Ⅰ类分子晶体结构的解析，计算生物学家以试验数据为基础，生物信息学方法为技术平台，使 CTL 表位预测的方法得到了极大的发展与完善。

基于抗原肽与 MHC-Ⅰ类分子结合特性是目前发展相对成熟的 CTL 表位预测策略。针对这一策略又建立了几类算法，主要包括结合基序法、矩阵法、人工神经网络和基于三维结构的表位预测算法[7]。本研究首先采用 Rammensee 等[8] 开发的 SYFPEITHI 程序对 VP6 的 HLA-A＊0201 限制性候选表位进行预测。该程序是通过肽池测序等方法分析大量与 MHC-Ⅰ类分子结合的天然表位多肽而建立的，通过打分函数，对蛋白抗原的众多交叠肽进行评估，按得分由高到低列

出所有可能的表位。现 SYFPEITHI 程序可以对来自不同种属的200种以上不同型别 MHC-Ⅰ类分子 CTL 表位进行预测，已被成功的广泛应用于 MHC-Ⅰ类分子 CTL 表位预测。在本研究预测分值最高的4条表位肽中，有两条肽 TLLANVTAV(340-348)和 VLADANETL(333-341)与 HLA-A＊0201 呈高亲和力结合。一方面，表明该程序有较高的预测准确率；另一方面，预测分值高的两条肽 ILRPNNVEV(252-260)和 LLGTTLLNL(64-72)与 MHC 结合的亲和力不如预测分值低的两条肽，提示基于矩阵法的 SYFPEITHI 程序也存在一些缺陷，其评估分值与其和 MHC 结合的亲和力并非总是线性相关。

Margalit 等[9]开发的基于表位多肽的空间构型为基础的 CTL 表位预测方法，充分考虑肽-MHC 复合物的三维构象。从理论上讲，蛋白质的空间结构比序列更加保守，可以避免仅以蛋白质一级序列信息为基础的算法的片面性。尽管目前该方案尚有许多方面有待完善，预测精度有待进一步提高，但该方案与前面基于矩阵法的 SYFPEITHI 程序相结合，可从不同侧面反应候选表位与 MHC-Ⅰ类分子的结合特性，进一步提高候选肽的预测准确率。本研究利用分子模拟对候选的6条表位肽进行了分子模建，淘汰了预测分值较低的两条肽 TLYSNVSDL(21-30)和 ALTTATITL(216-224)，同时其他4条肽的分子模建计算结果与试验结果具有很好的相关性，进一步证明分子模拟作为 SYFPEITHI 程序预测 CTL 表位辅助手段的合理性。

有效 CTL 表位的产生除了能与 MHC Ⅰ类分子有效结合，还涉及以下几个环节：细胞质中蛋白酶体对抗原的选择性裂解，裂解产生的多肽片断被 TAP 的选择性转运以及 TCR 对抗原肽-MHC-Ⅰ类分子复合物的识别。近年来，针对抗原加工处理过程的表位预测受到了广泛关注和深入研究，现已开发出了针对蛋白酶体裂解基序的 CTL 表位预测方案。蛋白酶体是存在于细胞质或细胞核中由多个亚单位组成的复合物，与 MHC-Ⅰ类分子配体的产生直接相关。蛋白酶体酶活性中心复合物 20S 有3种催化活性位点，表现出不同的底物特异性，分别为糜蛋白酶样(大的疏水性氨基酸氨基后)、胰蛋白酶样(碱性氨基酸残基后)及肽-谷氨酰胺-肽(酸性氨基酸残基后)水解活性。在体外用人或酵母 20S 蛋白酶体裂解抗原，从中获得有关的特征性数据，据此开发出蛋白酶体裂解基序的 CTL 表位预测工具。在人体内，蛋白酶体存在不同的类型，同时还受 ATP-依赖的 19S 冒复合物或 11S 的调节亚基 PA28 等多种因素的调控，从而增加了蛋白酶体裂解基序预测的复杂性和难度[10,11]。到目前为止，蛋白酶体裂解基序预测方案尚处于起步阶段。有关研究提示，蛋白酶体的裂解对产生抗原肽 C-端很重要，其 N-端可能由细胞质或内质网中的其他酶进行剪辑[12]。故本研究用 Nussbaum 等[10]开发的 PAProC 及 Holzhutter 等[11]开发的 Fragpredict 预测候选表位肽 C-末端是否存在酶切位点、或能否产生某特定片断(候选肽)，结果表明，候选的6条肽 C-末端均存在酶切位点。

总之，本研究通过几种表位预测方案相结合，预测了轮状病毒 Wa 株结构蛋白 VP6 HLA-A＊0201 限制性 CTL 表位，同时通过试验验证了候选肽与 HLA-A＊0201 分子结合的亲和力及结合稳定性。本研究结果强烈提示，TLLANVTAV(340-348)和 VLADANETL(333-341)为潜在的 HLA-A＊0201 限制性 CTL 表位。进一步的体外、体内功能实验目前正在进行中。

参考文献：

[1] PARASHAR U D, HUMMELMAN E G, BRESEE J S, *et al*. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children[J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(5): 565－572.

[2] WARD R L. Possible mechanisms of protection elicited by candidate rotavirus vaccines as determined with the adult mouse model[J]. Viral Immunol, 2003, 16(1): 17－24.

[3] FRANCO M A, TIN C, GREENBERG H B. $CD8^+$ T cells can mediate almost complete short-term and partial long-term immunity to rotavirus in mice[J]. J Virol, 1997, 71(5): 4165－4170.

[4] HEATH R R, STAGG S, XU F, *et al*. Mapping of the target antigens of the rotavirus-specific cytotoxic T cell response[J]. J Gen Virol, 1997, 78(Pt 5): 1065－1075.

[5] RAMIG R F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection[J]. J Virol, 2004, 78(19): 10213－10220.

[6] SHIEH D C, LIN D T, YANG B S, *et al*. High frequency of HLA-A＊0207 subtype in Chinese population[J]. Transfusion, 1996, 36(9): 818－821.

[7] 支 轶，吴玉章，万 瑛. 生物信息学方法在 CTL 表位预测中的应用[J]. 免疫学杂志，2005，21(2)：155－159.

[8] RAMMENSEE H, BACHMANN J, EMMERICH N P, *et al*. SYFPEITHI; database for MHC ligands and peptide motifs[J]. Immunogenetics, 1999, 50(3-4): 213－219.

[9] MARGALIT H, ALTUVIA Y. Insights from MHC-bound peptides[J]. Novartis Found Symp, 2003, 254: 77－90.

[10] NUSSBAUM A K, KUTTLER C, HADELER K P, *et al*. PAProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW[J]. Immunogenetics, 2001, 53(2): 87－94.

[11] HOLZHUTTER H G, FROMMEL C, KLOETZEL P M. A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20 S proteasome[J]. J Mol Biol, 1999, 286(4): 1251-1265.

[12] CASCIO P, HILTON C, KISSELEV A F, *et al*. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide[J]. EMBO J, 2001, 20(10): 2357－2366.

（编辑 栾 嘉）