论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0872-04

SSX基因家族HLA-A2.1限制性CTL表位预测及其MHC-Ⅰ亲和力分析

何仰东[1],吴玉章[1],林治华[2],贾正才[1],姜 曼[1],黎万玲[1],付晓岚[1],邓一静[1],倪 兵[1] ([1]第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038;[2]重庆工学院生物工程学院,重庆 400050)

提 要:目的 通过对肿瘤基因SSX家族不同成员进行CTL表位预测,并对其与MHC-Ⅰ亲和力进行分析,为探索基于SSX肿瘤基因家族的免疫治疗奠定基础。**方法** 利用基于超基序结合量化基序方案开发的HLA-A2.1限制性CTL表位预测软件,对SSX基因家族不同成员进行CTL表位预测,然后合成SSX相关待测表位肽P1(AMTKLGFKA)、P4(AMTKLGFNV)、P5(AMTKLGFKV)和P6(VMTKLGFKV),再对这些合成肽与MHC-Ⅰ结合亲和力及其结合物稳定性进行实验分析。**结果** 与实验阳性肽(HBcAg,18~27)相比,除P1外,P4、P5、P6均显示较高的结合亲和力;而结合稳定性实验(DC_{50})结果显示,P1、P4与阳性对照肽(HBcAg,18~27)DC_{50}均大于8 h,而P5和P6的DC_{50}介于2~4 h之间。**结论** 计算机软件预测的CTL表位肽,经过体外亲和力与结合稳定性实验筛选到2条理想的表位肽,为该表位的下一步体内鉴定奠定基础。

关键词: SSX肿瘤基因;表位预测;HLA-A2.1限制性;结合亲和力

中图法分类号: R392-33; R392.3; R73-3 **文献标识码:** A

Prediction of HLA-A2.1 restricted CTL epitope of SSX gene family and affinity assay of these epitopes with MHC-Ⅰ molecule

HE Yang-dong[1], WU Yu-zhang[1], LIN Zhi-hua[2], JIA Zheng-cai[1], JIANG Man[1], LI Wan-ling[1], FU Xiao-lan[1], DENG Yi-jing[1], NI Bing[1] ([1]Department of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Bioengineering, Chongqing Institute of Technology, Chongqing 400050, China)

Abstract: Objective To explore the immunotherapeutic strategy based on SSX tumor gene family by the CTL epitope prediction of the members of SSX tumor gene family and affinity assay of the epitope combining with MHC-Ⅰ molecule. **Methods** The CTL epitope in the members of SSX gene family were predicted with the predictive software of HLA-A2.1 restricted CTL epitope. The 4 predicted epitope peptides were synthesized: P1 (AMTKLGFKA), P4 (AMTKLGFNV), P5 (AMTKLGFKV) and P6 (VMTKLGFKV). After the affinity between these peptides and MHC-Ⅰ molecule were examined respectively, the combining stability between these peptides and the MHC-Ⅰ molecule were investigated respectively. **Results** As compared with positive control peptide HBcAg18-27, all of the synthesized peptides except P1 showed high affinity with MHC-Ⅰ molecule. The combining stability assay indicated that dissociation complex 50 (DC_{50}) for P1, P4 and the positive control HBcAg 18-27 was all above 8.0 h, but DC_{50} for P5 and P6 was between 2 h and 4 h. **Conclusion** Two ideal peptides were screened out from the predicted CTL epitope peptides by *in vitro* MHC-Ⅰ combining affinity and stability assay, which provided the experimental data for the further identification of these epitope peptides *in vivo*.

Key words: SSX tumor gene; epitope prediction; HLA-A2.1 restriction; combining affinity

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2003CB514108);国家自然科学基金资助项目(30571835)

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2003CB514108) and the National Natural Science Foundation of China (30571835)

作者简介: 何仰东(1964-),男,江苏省淮安市人,硕士研究生,主管技师,主要从事分子免疫学方面的研究。电话:(023)68752236-617

通讯作者: 倪 兵,E-mail: nibingxi@yahoo.com

收稿日期: 2005-11-07;**修回日期:** 2006-01-04

SSX（synovial sarcoma X chromosome breakpoint，SSX）基因家族是肿瘤/睾丸抗原（cancer/testis antigen，CTA）之一，其由 9 个基因成员组成，即 SSX-1-9。它最初被作为两个染色体易位融合的伴侣基因之一被发现，即 SYT（synovial sarcoma translocation，SYT）和 SSX-1 易位融合以及 SYT 和 SSX-2 的易位融合，它们分别分别位于 18 号染色体（18q11）和 X 染色体（Xp11）[1]。除 SSX-8 以外，它们都由 188 个氨基酸残基组成。其核苷酸序列同源性为 87% ~96%，相应的蛋白质水平氨基酸同源序列为 73% ~92%[2]。结合以往的研究，我们认为 SSX 基因家族有望作为肿瘤特异性治疗的新靶点。由于 HLA-A2 阳性人群的比例最高，在我国 HLA-A2 阳性人群达到了 53%[3]，因而由 HLA-A2.1 分子呈递的肿瘤抗原细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）表位在肿瘤免疫治疗中具有应用价值。本研究拟应用超基序结合量化基序方案对 SSX 基因家族不同成分 HLA-A2.1 限制性 CTL 表位进行预测，在体外对预测得到的表位肽进行与 HLA-A2 分子结合亲和力及其稳定性实验，期望筛选出合适的 CTL 表位肽。

1　材料与方法

1.1　目的基因来源

SSX 基因家族不同成分的 DNA、蛋白质序列摘录自 GenBank。它们的登录号分别如下：NM 005653（SSX-1）、NM 003147（SSX-2）、NM 021014（SSX-3）、NM 175729（SSX-4）、NM 175723（SSX-5）、NM 173357（SSX-6）、NM 173358（SSX-7）、NM 174961（SSX-8）、NM 174962（SSX-9）。

1.2　CTL 表位的预测

SSX 基因家族不同成员 CTL 表位的预测，采用 Lin 等[4,5]基于超基序法和量化基序法联合开发的“CTL 限制性表位预测 2003 版 Build 3.14”软件。将 SSX 基因家族 9 个成员的氨基酸序列输入软件中，对软件生成的结合系数大于或等于 5 时暂时确定为 HLA-A2.1 限制性 CTL 表位（即待测表位肽）。

1.3　多肽的合成

多肽的合成在 ABI431A 型多肽合成仪（美国 PE 公司）上进行。采用标准 Fmoc 方案，精氨酸采用双偶合。多肽合成后，用 95% 的 TFA 裂解液将多肽从树脂上裂解下来，同时去除多种保护基团。多肽的纯化和纯度分析采用 RP-HPLC（美国 Weters 公司，Delta 600 型），用质谱（美国 PE 公司，API2000 型）测定其分子量并进行鉴定。用 DMSO 溶解多肽为 20 mmol/L 的溶液，-70℃保存。

1.4　细胞株及单克隆抗体

$BB7_{.}2$ 细胞株为小鼠 B 细胞杂交瘤细胞，购于美国 ATCC 公司，分泌抗人 HLA-A2.1 的单抗 IgG。当细胞生长状态良好，培养液变黄后收集上清，作为 HLA-A2.1 的单克隆抗体。T2 细胞，为小鼠 B 细胞杂交瘤细胞，其抗原呈递转运体（transporters associated with antigen processing，TAP）缺陷，购自军事医学科学院。BB7.2 细胞和 T2 细胞均用含有 10% 胎牛血清的 RPM1640 培养液体外常规培养。

1.5　预测抗原表位肽 HLA-A2.1 结合性能测定

待测表位肽只有在可以结合 HLA 分子，且结合稳定性良好的情况下，才可能被视为对免疫治疗有用的潜在抗原肽。为此，我们用两个独立的 HLA-A2 分子结合性能检测实验，来评估通过相关 CTL 表位预测软件预测的这些待测表位肽，即结合亲和力实验和结合稳定性实验。

1.5.1　结合亲和力测定　参照参考文献[6]进行，大致步骤为：将用不同浓度实验实验肽孵育的 2×10^5 T2 细胞，37 ℃/5% CO_2 的环境下培养 18 h。之后经过一抗和带有荧光标记的二抗孵育后，在流式细胞仪（美国 BD 公司）进行荧光强度检测。每个待测表位肽与 HLA-A2.1 分子的亲和力大小，用 HLA-A2.1 分子平均荧光强度百分数增加（percentage of mean fluorescence intensity increase，% MFI increase）表示。计算公式如下：

% MFI = [（实验肽 MFI-不加肽的 MFI）/（不加肽的 MFI）] ×100。

1.5.2　结合亲和力稳定性测定　结合亲和力稳定性实验（dissociation complex 50，DC_{50}）概括描述如下[7]：取 100 μmol/L 实验肽与 T2 细胞共孵育，以布雷菲德菌素 A（Brefeldin A）为蛋白转运抑制剂。收集阻断后 0、2、4、6、8 h 细胞，分别用一抗和二抗孵育。流式细胞仪上进行荧光强度测定。对于不同的时间点，实验肽诱导的 HLA-A2.1 的表达按如下公式计算：肽诱导的平均荧光强度 - 没有肽诱导的平均荧光强度。DC_{50} 表示每个肽在 $t=0$ 时间点的荧光强度减弱到 50% 时的时间长度。

2　结果

2.1　SSX 基因家族不同基因成员 HLA-A2.1 限制性 CTL 表位的预测结果

通过联合超基序和量化基序软件，对 SSX 基因家族不同基因成员 HLA-A2.1 限制性 CTL 表位的预测，其结果如表 1 所示。从表 1 可以看出，在联合超基序量化基序预测 CTL 表位的结果中，第 41 ~49 位氨基酸序列仅为 SSX-2 和 SSX-3 比较具有优势的表位，而第 57 ~65 位氨基酸序列和第 99 ~107 位氨基酸序列是不同 SSX 基因家族成员中共有的表位序列，且 SSX57 ~65 是除 SSX-9 以外与 CTL 结合指数最高的表位。

2.2　多肽的纯化、分析及鉴定

由于第 57 ~65 位氨基酸序列是不同 SSX 基因家族成分中共有的表位序列，且 SSX57 ~65 是除 SSX-9 以外与 CTL 结合指数最高的表位。同时因为 SSX-2、SSX-3、SSX-5、SSX-7、SSX-9 的 SSX57-65 氨基酸序列相同，SSX-6 和 SSX-8 的 SSX57 ~65 氨基酸序列相同，故本实验仅合成了 P1：AMTKLGFKA（57 ~65）（SSX-2、SSX-3、SSX-5、SSX-7、SSX-9）、P4：AMTKLGFNV（57 ~65）（SSX-6、SSX-8）、P5：AMTKLGFKV（57 ~65）（SSX-1）、P6：VMTKLGFKV（57 ~65）（SSX-4）等 4 条表位肽进行研究。我们同时还合成了 HLA-A2.1 限制性 CTL 表位 FLPSDFFPSV（HBcAg，18 ~27）作为阳性对照肽。所有待测表位肽经反相高压液相色谱仪（RP-HPLC）分析，其纯度均达到 95% 以上，用 API

2000 型质谱仪(美国 Waters 公司)测定纯化后相对分子质量,结果测定值与理论值相符。

表 1 超基序结合量化基序预测 SSX1 -9 CTL 表位结果

基因	预测序列	位置	分值	基因	预测序列	位置	分值
SSX-1	AMTKLGFKV	57 ~ 65	289.01	SSX-6	AMTKLGFNV	57 ~ 65	289.01
	MTFGRLHRI	99 ~ 107	5.58		SLFMRNKRA	68 ~ 76	104.87
	RLHRIIPKI	103 ~ 111	8.16		MTFGRLQRI	99 ~ 107	5.58
					RLQRIIPKI	103 ~ 111	
SSX-2	KASEKIFYV	41 ~ 49	9.81	SSX-7	AMTKLGFKA	57 ~ 65	59.17
	AMTKLGFKA	57 ~ 65	59.17		MTFCRLQRI	99 ~ 107	5.58
	MTFGRLQGI	99 ~ 107	5.58		RLQRIFPKI	103 ~ 111	35.65
	RLQGISPKI	103 ~ 111	8.16				
	SLSTSMGAV	185 ~ 193	7.84				
	NMPGPTDCV	210 ~ 218	53.86				
SSX-3	KVSEKIVYV	41 ~ 49	10.19	SSX-8	AMTKLGFNV	57 ~ 65	289.01
	AMTKLGFKA	57 ~ 65	59.17		MTFGRLQRI	99 ~ 107	5.58
	MTFGRLQGI	99 ~ 107	5.58		RLQRIIPKI	103 ~ 111	8.16
	RLQGIFPKI	103 ~ 111	35.65				
SSX-4	KIVYVYMKL	45 ~ 53	27.24	SSX-9	AMTKLGFKA	57 ~ 65	59.17
	VMTKLGFKV	57 ~ 65	289.01		MTFGRLQGI	99 ~ 107	5.58
	MTFGSLQRI	99 ~ 107	5.58		RLQGIFPKI	103 ~ 111	35.65
	NMPGPTDCV	116 ~ 124	53.86		IMPKKPAEV	111 ~ 119	389.14
SSX-5	KMQKAFDDI	20 ~ 28	20.40				
	AMTKLGFKA	57 ~ 65	59.17				
	MTFGRLQGI	99 ~ 107	5.58				
	RLQGIFPKI	103 ~ 111	35.65				

2.3 预测抗原肽 HLA-A2 结合性能测定

2.3.1 结合亲和力测定 在此实验中我们使用 T2 细胞株。该细胞不表达含有内源性抗原分子的 HLA-A2 分子,未结合表位肽 HLA-A2 分子非常不稳定,仅仅偶尔且短暂的出现在细胞表面;而当外源性表位肽与该细胞表面的 HLA-A2 分子,在有 β2m 存在下特异性结合时,HLA-A2 分子可以稳定在细胞表面,并可以用免疫荧光的方法进行检测。该实验的结果如图 1,可以看出 T2 细胞表面的 HLA-A2 分子,在用不同待测表位肽处理后,其% MFI 出现不同的变化结果。其中阳性对照肽(HBcAg,18 ~ 27)% MFI 从 6.29 增高到 169.27,P4 % MFI 从 4.72 增高到 193.15,P5% MFI 从 5.66 增高到 81.13,P6 % MFI 从 2.33 增高到 119.79,而 P1% MFI 从 8.0 降低到 1.5。说明 P4、P5、P6 均具有较好结合亲和力,而 P1 的结合亲和力较低。

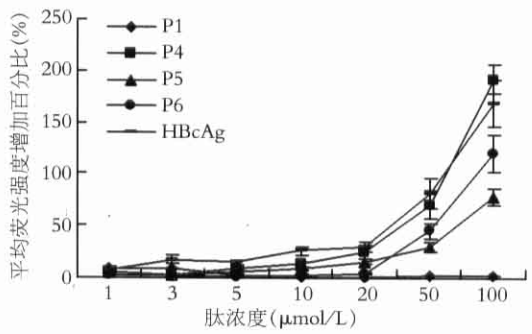


图 1 待测表位肽亲和力分析

2.3.2 结合稳定性测定结果 由于作为可以结合 MHC-Ⅰ的潜在抗原肽,还必须依赖其与 MHC-Ⅰ的结合稳定性,即只有结合稳定性良好的潜在抗原肽才能具有较好的免疫原性[8]。故我们进一步利用 TAP 缺陷的 T2 细胞进行这些待测表位肽的结合 MHC-Ⅰ稳定性实验。表 2 的实验结果表明,P1 和 P4 与阳性对照肽(HBcAg,18 ~ 27)DC_{50} 值高于 8 h;而 P5 和 P6 的 DC_{50} 值远低于 8 h,它们均介于 2 ~ 4 h 之间。

表 2 不同待测表位肽 DC_{50}

不同合成肽	时间点(h)					50% 0 h 平均荧光强度	DC_{50}(h)
	0	2	4	6	8		
P1	53.83	53.72	44.16	40.16	35.24	26.92	>8
P4	110.43	83.09	73.71	66.62	55.14	55.22	8
P5	35.19	32.17	16.79	21.50	15.32	18.60	2 ~ 4
P6	22.28	16.74	10.62	16.15	6.04	11.14	2 ~ 4
T	267.23	212.52	177.05	164.17	146.03	133.62	>8

3 讨论

随着肿瘤抗原特别是肿瘤特异性抗原的发现及诸多 CTL 表位的鉴定,肿瘤特异性多肽免疫治疗已经成为可能,并得以迅速发展,有一些多肽疫苗已进入临床Ⅱ期[9]。但仍不足为用,还需进一步鉴定更多的 CTL 表位,特别是能够被占人群比例较高的 HLA-A2 分子呈递的表位,为更多理想的多肽疫苗的设计、研究打下基础。目前已经产生了多种 HLA 限制性抗原表位预测方案,一种是简单基序法,这种方法主要依据与 HLA 分子结合的抗原表位主要锚定氨基酸位点上的氨基酸残基规律性进行预测,其后在此基础上又发展了超基序方案,使预测准确性大大提高。另一种是量化基序法方案,由 Parker 等[10]于 1994 年提出。以后的研究证实,量化基序方案预测表位具有高灵敏度及准确性,可作为基序法的补充。利用联合超基序量化基序法方案,寻找发现新的特异性抗原表位日渐受到关注[11]。

SSX 基因家族表达的抗原是一种核蛋白,它在肿瘤细胞中主要以两种机制出现:其一,出现在涉及 X 染色体的染色体易位中;其二,就是与其他 CT 抗原一样,可以一定比例在不同组织类型的肿瘤细胞中检测到此家族不同成分的异位表达。Türeci 等[12]在 325 份不同组织来源的肿瘤样品中分析 SSX-1、SSX-2、SSX-3、SSX-4、SSX-5 等基因 mRNA 的表达情况时发现,除 SSX-3 以外其余 4 种基因至少有一种基因,在 75% 头颈部肿瘤、50% 卵巢肿瘤、43% 恶性黑色素瘤、36% 淋巴瘤、27% 结肠肿瘤、23% 乳腺肿瘤中表达,其中 SSX-2 在 15% 的肿瘤中表达;Naka 等[13]在研究骨肉瘤

SSX 基因表达情况时发现，不仅 17 个患者标本中有 16 个不同患者的标本至少表达上述 5 种基因中的一种，而且发现有 4 个不同患者的标本表达 SSX-3；后来也发现在子宫平滑肌肉瘤中有 SSX-3 表达。总之，所有 SSX 基因家族中的 9 个成分都定位于 X 染色体上，到目前为止发现，除了上述描述的 SSX-1 ~ SSX-5 表达分布情况外，SSX-6 和 SSX-7 也在黑色素瘤细胞系中被检测到[2]。

2002 年美国学者利用从一个抗 SSX-2 抗体阳性黑色素瘤患者（LAU 50、HLA-A2$^+$）分离到的肿瘤浸润淋巴结 CTL（HLA-A2$^+$）细胞，结合表位预测数据库软件的分析，在体外用蛋白酶体消化包括 SSX-2 全长的不同交叉重叠的肽片段，首次确认 SSX-2$_{41-49}$（KASEKIFYV）是 HLA-A2 限制性 CD8$^+$ T 细胞反应特异的优势表位肽，并从肿瘤患者淋巴结中分离出 SSX-2$_{41-49}$特异的 CTL 细胞[14]。Ayyoub 等[15]用荧光 HLA-A2/SSX-2$_{41-49}$多聚复合物，不仅在表达 SSX-2 的不同肿瘤患者的 TILN（肿瘤浸润淋巴结）和 PBMC 中分离出特异性 CD8$^+$ T 细胞，而且从没有 SSX-2 基因表达的肿瘤患者和健康人中分离出少量的这种特异性 CD8$^+$ T 细胞，还用实验证实，从表达 SSX-2 基因的恶性黑色素瘤患者 TILN 和 PBMC 中分离的 HLA-A2/SSX-2$_{41-49}$特异 CD8$^+$T 细胞，具有高亲和力的外源性抗原识别和很强的抗肿瘤免疫效应。通过内源性抗原识别方式在脂肪肉瘤细胞系（HLA-A2$^+$、SSX-2$^+$）实验中也证实特异性 CD8$^+$ CTL 对该肿瘤细胞的有效裂解。针对 SSX-1、3 和 4 抗原的抗体也已经在包括黑色素瘤、结肠癌、乳腺癌的不同类型肿瘤患者的血清中检测到[6]。

由此可见，机体本身可以激发出针对 SSX 基因家族的免疫应答。不过，可能是机体中所激发的免疫应答强度不够，不能有效杀死肿瘤。而且可以推测，由于 SSX 家族基因在肿瘤组织中高表达频率，许多肿瘤组织虽然不一定表达某一种成分，但很可能表达 SSX 家族中的其它成分；由于 SSX 家族的高度同源性，可以推测应该存在该家族不同成员彼此之间的交叉免疫应答。因此，研究 SSX 基因家族不同成分的表位多态性和 HLA 限制性之间的关系，为基于 SSX 基因家族的肿瘤免疫治疗研究提供理论和实验基础具有重要意义。

根据我们对 SSX 基因家族不同成员 57 ~ 65 氨基酸序列的表位预测和亲和力分析结果，这些 SSX57 ~ 65 HLA-A2 限制性待测表位肽有待 CTL 反应或体内转基因小鼠证明。利用体外细胞毒分析对上述表位进一步鉴定工作目前仍在进行中。

参考文献：

[1] CLARK J, ROCQUES P J, CREW A J, *et al*. Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma[J]. Nat Genet, 1994, 7(4): 502 - 508.

[2] GURE A O, WEI I J, OLD L J, *et al*. The SSX gene family: characterization of 9 complete genes [J]. Int J Cancer, 2002, 101(5): 448 - 453.

[3] ROTZSCHKE O, Falk K, Stevanovic S, *et al*. Peptide motifs of closely related HLA class Ⅰ molecules encompass substantial differences [J]. Eur J Immunol, 1992, 22(9): 2453 - 2456.

[4] LIN Z H, WU Y Z, ZHU B, *et al*. Toward the quantitative prediction of T-cell epitopes: QSAR studies on peptides having affinity with the class Ⅰ MHC molecular HLA-A*0201[J]. J Comput Biol, 2004, 11(4): 683 - 694.

[5] LIN Z H, WU Y Z, QUAN X J, *et al*. Use of a novel electrotopological descriptor for the prediction of biological activity of peptide analogues [J]. Letter in Peptide Science, 2002, 9(6): 273 - 281.

[6] PASSONI L, SCARDINO A, BERTAZZOLI C, *et al*. ALK as a novel lymphoma-associated tumor antigen: identification of 2 HLA-A2.1-restricted CD8 + T-cell epitopes[J]. Blood, 2002, 99(6): 2100 - 2106.

[7] SCARDINO A, GROSS D A, ALVES P, *et al*. HER-2/neu and hTERT cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy[J]. J Immunol, 2002 , 168(11): 5900 - 5906.

[8] VAN-DER-BURG S H, VISSEREN M J, BRANDT R M, *et al*. Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability[J] . J Immunol, 1996, 156(9): 3308 - 3314.

[9] DAGHER R, LONG L M, READ E J, *et al*. Pilot trial of tumor-specific peptide vaccination and continuous infusion interleukin-2 in patients with recurrent Ewing sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma: an inter-institute NIH study [J]. Med Pediatr Oncol, 2002, 38(3): 158 - 164.

[10] PARKER K C, BEDNAREK M A, COLIGAN J E. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains[J]. J Immunol, 1994, 152(1): 163 - 175.

[11] ZHU B, CHEN Z, CHENG X, *et al*. Identification of HLA-A*0201-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from TRAG-3 antigen [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(5): 1850 - 1857.

[12] TÜRECI O, CHEN Y T, SAHIN U, *et al*. Expression of SSX genes in human tumors[J]. Int J Cancer, 1998, 77(1): 19 - 23.

[13] NAKA N, ARAKI N, NAKANISHI H, *et al*. Expression of SSX Genes in Human Osteosarcomas[J]. Int J Cancer, 2002, 98(4): 640 - 642.

[14] RUBIO-GODOY V, AYYOUB M, DUTOIT V, *et al*. Combinatorial peptide library-based identification of peptide ligands for tumor-reactive cytolytic T lymphocytes of unknown specificity[J]. Eur J Immunol, 2002, 32(8): 2292 - 2299.

[15] AYYOUB M, BREHM M, METTHEZ G, *et al*. SSX antigens as tumor vaccine targets in human sarcoma[J]. Cancer Immun, 2003, 3: 13.

（编辑　王　红）