文章编号:1000-5404(2011)04-0349-04

论著

抗原特异 TCR α 和 β 链基因克隆及分子空间结构预测

尹青松[1,2],谭 荻[3],陈少华[2],杨力建[2],李 蒨[2],叶静梅[3],李扬秋[2,4] (450008 郑州,河南省肿瘤医院[1];510632 广州,暨南大学医学院血液病研究所[2],再生医学教育部重点实验室[4];510260 广州,广州医学院第一附属医院肿瘤血液中心[3])

【摘要】 **目的** 扩增弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma,DLBCL)相关抗原特异 T 细胞克隆的全长 TCR α 和 β 链基因序列,并对其三维空间结构进行预测。**方法** 从已鉴定的 2 例伴有克隆性增殖 TCR Vα6 和 Vβ13 亚家族 T 细胞的 DLBCL 患者外周血中克隆全长 TCR α 和 β 基因序列,利用 Primer Premier 5.0 分析软件推算其相应的氨基酸序列,并通过自动化蛋白质模建服务器 SWISS-MODEL 进行三维空间结构预测。然后利用蛋白质三维图像分析软件 Rasmol 对所获得的 TCR 三维空间结构进行显示和分析。**结果** 获得 DLBCL 相关抗原特异 TCR α6 和 β13 全长基因序列及其氨基酸序列。2 例患者的 TCR Vα6 的空间结构与 PDB ID 3ffcD 模型相似,序列同源性分别为 92.16% 和 91.71%;而 2 个 TCR Vβ13 也均具有同一个空间结构模型 PDB ID 2ialD,序列同源性分别为 92.95% 和 92.18%。**结论** 来自不同 DLBCL 患者外周血中克隆性增殖的 TCR Vα6 或 Vβ13 亚家族 T 细胞的 TCR 具有高度同源性的空间结构,提示其可能识别相同的肿瘤抗原表位。

【关键词】 T 细胞受体;CDR3 区;同源建模;弥漫大 B 细胞淋巴瘤
【中图法分类号】 R394-33;R392.12;R394.3 **【文献标志码】** A

Cloning of antigen-specific TCR α and β genes and their 3-D structure prediction

Yin Qingsong[1,2], Tan Huo[3], Chen Shaohua[2], Yang Lijian[2], Li Bo[2], Ye Jingmei[3], Li Yangqiu[2,4] ([1]Henan Cancer Hospital, Zhengzhou, Henan Province, 450008; [2]Institute of Hematology, Medical College, [4]Key Laboratory for Regenerative Medicine of Ministry of Education, Jinan University, Guangzhou, Guangdong Province, 510632; [3]Centre of Oncology and Hematology, First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong Province, 510260, China)

【Abstract】 **Objective** To amplify the full-length sequences of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL)-associated antigen-specific TCR α and β genes and to predict three-dimensional (3-D) structure of the proteins. **Methods** The full-length TCR genes were amplified from the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) derived from 2 pathologically identified DLBCL patients for the TCR Vα6 and Vβ13 subfamily T-cell clones, and their amino acid sequences were deduced by primer premier 5.0 analytical software. 3-D spatial structures of the TCR α and β were modeled by SWISS-MODEL, then displayed and analyzed by the analytical software of Rasmol. **Results** The full-length TCR genes and their amino acid sequences were obtained successfully. the TCR Vα6 chains from the 2 cases of DLBCL patients were of high homology not only in sequence (92.16% and 91.71%, respectively), but also in the 3-D spatial structures, which displayed the same model (PDB ID 3ffcD) by the SWISS-MODEL homology-modeling server. While the TCR Vβ13 chains also used an identical model (PDB ID:3dx9D), and sequence homology was 92.95% and 92.18%, respectively. **Conclusion** The TCR of Vα6 or Vβ13 subfamily T cell clones have high homology in the 3-D spatial structures from the PBMCs of 2 cases of DLBCL patients, suggesting that they might recognize similar tumor associated antigen epitope.

【Key words】 T cell receptor; CDR3 region; homology-modeling; diffuse large B cell lymphoma

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2006AA02Z114) and the Key Program of Natural Science Foundation of Guangdong Province(05103293, 9251063201000001). Corresponding author: Li Yangqiu, Tel: 86-20-85226877, E-mail: jnyangqiuli@163.com

众多研究表明肿瘤患者体内存在能够杀伤肿瘤细胞的抗原特异细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL),然而,分离纯化及扩增特异性 CTL 非常困难从而限制其在临床过继性免疫治疗中的广泛应用。目前,抗原特异 TCR 基因修饰 T 细胞是近年来产生的一种新的用于过继性免疫治疗的效应细胞。动物模型或者临床试验均发现该治疗措施可行,但并没有获得

【基金项目】 国家高技术研究发展计划(863 Program,2006AA02Z114);广东自然科学基金重点项目(05103293,9251063201000001)
【通信作者】 李扬秋,电话:(020) 85226877, E-mail:jnyangqiuli@163.com

理想的治疗效果。有研究者采取一系列措施改善转基因TCR的表达和产生高亲和性的TCR[1-4]，但TCR基因修饰T细胞仍然表现出较低的反应效力，表明在改善转基因T细胞与靶细胞的亲和性方面还需要深入的研究。由于TCR是和抗原肽-MHC分子特异性识别结合的部位，尤其是TCR-CDR3区，因此，分析抗原特异性TCR的空间结构对于了解及进一步改善其与靶抗原的特异性结合至关重要。本课题组既往的研究[5-6]发现：DLBCL患者外周血中存在克隆性增殖的TCR Vα和Vβ亚家族T细胞。本研究在此基础上，进一步扩增并克隆呈明显单克隆增殖的亚家族T细胞TCR的全长基因序列，并对其空间结构进行预测，为深入提高抗原特异TCR转基因修饰T细胞的特异性杀伤活性提供研究资料。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集经病理活检确诊的2例弥漫大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma，DLBCL)患者(男性，56岁和51岁各1名)的外周血标本，淋巴细胞分离液(Ficoll，密度1.077)按常规方法分离外周血单个核细胞，血球计数板计数，根据细胞总数将其放入2 ml离心管中，提取RNA需细胞数为$(0.8\sim1)\times10^7$个细胞，加入0.8～1 ml Trizol试剂后冻存于－20 ℃备用。

1.2 RNA提取

按Trizol试剂盒说明进行操作，将已加入Trizol试剂的细胞依次加入氯仿、异丙醇抽提RNA，再用75%乙醇洗涤RNA沉淀1～2次，置于超净台上自然干燥，加入超纯水(20～50 μl)溶解RNA沉淀；用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性和质量。

1.3 cDNA合成

按SuperscriptⅡ反转录酶试剂盒说明进行cDNA第1链合成，1 μg RNA加入预先配制的混合液(含7 μl超纯水、2 μl 10×Buffer、2 μl 0.1 mmol/L DTT、5 μl 2.5 mmol/L dNTP和0.5 μl Rand. Hexmer)；73 ℃ 3 min后，置于冰中2～3 min；加入0.6 μl RNA酶抑制剂(33 U/μl)和0.5 μl Superscript Ⅱ(200 U/μl)；室温静置10 min后，依次经42 ℃ 70 min、83 ℃ 5 min后，－20 ℃保存备用。合成的cDNA样本经PCR检测β2M基因而确定其合成质量。

1.4 抗原特异TCR α6和TCR β13全长基因序列扩增

本课题组的前期研究工作[7-8]通过利用RT-PCR和基因扫描分析确定了DLBCL患者外周血中呈单/寡克隆性增殖的TCR Vα6和Vβ13亚家族T细胞，将其PCR产物进行序列分析，方法按照本课题组既往的研究方法进行。通过NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)的Blast，将所克隆性增殖的TCR Vα6和TCR Vβ13亚家族的基因序列与基因库中的基因序列比对，标出Vα6基因的V、J、C区和Vβ13基因的V、D、J、C区，显示出了其特异性TCR序列的高度可变区V-N-J区(Vα6)和V-NDN-J区(Vβ13)，即互补决定区3(CDR3)，与抗原特异性识别结合的部位。

根据前期的研究结果，在TCR Vα6和Vβ13基因起始密码子的上游各设一上游引物，在Cα区和Cβ2区终止密码子的下游各设一下游引物，PCR扩增出完整的V区、CDR3区、J区、C区，即TCR Vα6和TCR Vβ13亚家族T细胞的全长TCR基因序列。用于扩增TCRVα6亚家族基因全长的引物，上游：5′-GCCAGGTTCACCTCACAGTACAGAGTCC-3′，下游：5′-GCAGAGGAAGGAGCGAGGGAGCAC-3′。用于扩增TCR Vβ13亚家族基因全长的引物，上游：5′-GCACAGATACAGAAGACCCCTCCGTC-3′，下游：5′-GGGTGAGGATGAAGAATGACCTGGGATG-3′。PCR总反应体积为20 μl，包括0.1 mmol/L dNTP、0.5 μmol/L引物、1.5 U *Taq* DNA聚合酶(Promega公司)、10×PCR缓冲液、1.5 mmol/L $MgCl_2$和超纯水，以1 μl cDNA作为模板。反应在PCR扩增仪(BioMetra)中进行。PCR扩增反应条件：94 ℃ 3 min预变性后，40个循环(94 ℃ 1 min，60 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min)，72 ℃ 6 min，扩增产物保存于4 ℃中备用，用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.5 抗原特异TCR α6和TCR β13全长基因序列克隆

将PCR产物阳性的TCR Vα6和TCR Vβ13亚家族利用E.Z.N.A™ Kit(OMEGA公司)切胶纯化回收，与克隆载体pGEM-T Easy载体(Promega公司)连接。转化感受态大肠杆菌DH5α，氨苄青霉素抗性选择阳性菌落，经菌落PCR扩增初步鉴定和菌液经上海英骏生物技术有限公司测序鉴定。

1.6 TCR-CDR3区氨基酸残基的界定

TCR基因的命名根据Koop等提交的序列而定(基因登记号，α链是#AE000658～AE000662，β链是#U66059～U66061)。TCR-CDR3的序列分析显示基本上所有的转录本在V基因片段的末端都有Y-(L/F)-C-A的氨基酸序列，而在TCR Jα/Jβ片段的中间都有一个F-G-x-G-T的高度保守模序(x为任意氨基酸)。在保守的丙氨酸(A)后的氨基酸残基是多样的，然而大多数的TCR Vβ亚家族基因都有2个丝氨酸残基(S)相连，即Y-(L/F)-C-A-S-S。我们将CDR3区界定为V区末端的保守的A与J区中间的保守模序的第1个残基F之间的氨基酸残基序列(不包括两个氨基酸残基)，对于有2个丝氨酸残基相连的TCR Vβ片段，1个丝氨酸包括在CDR3区之内[9]。

1.7 抗原特异全长TCRα和β链的三维空间结构预测

通过瑞士日内瓦Glaxo Smith Kline中心提供的自动化蛋白质比较模建服务器SWISS-MODEL(http://swissmodel.expasy.org)进行三维空间结构推测。然后采用蛋白质三维图像分析软件Rasmol对所获得的三维空间结构进行显示和分析。

2 结果

2.1 DLBCL相关抗原特异TCR Vα6和Vβ13亚家族T细胞克隆的全长TCR基因序列

我们前期的研究工作对2例DLBCL患者外周血中的TCR Vα和Vβ亚家族T细胞进行克隆性分析。本研究进一步对呈单克隆增殖的Vα6和Vβ13亚家族T细胞扩增其全长TCR基因序列，包括：P1患者的TCR Vα6(958 bp)和TCR Vβ13(1 010 bp)、P2患者的TCR Vα6(961 bp)和TCR Vβ13(1 016 bp)。将其分别与T载体连接进行克隆性扩增及测序分析鉴定(略)。并在NCBI的GenBank中进行基因登记，基因登记的序列号分别为：

EU863816、EU368854、EU885175 和 EU885174。

2.2 TCR Vα6 和 Vβ13 亚家族 T 细胞克隆 TCR 的氨基酸序列推算

根据这 4 个 TCR 基因的全长核苷酸序列(略),应用 Premier Primer 5.0 分析软件推测其相应的氨基酸序列,具体氨基酸序列如下所示(划线部分为 TCR-CDR3 区,黑体部分为界定 TCR-CDR3 区氨基酸残基的两端的保守序列):

P1-TCR Vβ13s6A2T(新命名:TCR Vβ6S6)-ND_1N-J2.5-Cβ2 基因的氨基酸序列(310 aa.):

MSISLLCCAAFPLLWAGPVNAGVTQTPKFRILKIGQSMTLRCTQDMNHNY
MYWYRQDPGMGLKLIYYSVGAGITDKGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLEL
AAPSQTSV**YFCAS**SYDSPETQY**FGPGT**RLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE
AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP
ALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK
PVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAL
VLMAMVKRKDSRG

P1-TCR Vα6S1-hDV104S1(新命名:hADV14S1)-N-J8-Cα 基因的氨基酸序列(277 aa.):

MSLSSLLKVVTASLWLGPGIAQKITQTQPGMFVQEKEAVTLDCTYDTSDQS
YGLFWYKQPSSGEMIFLIYQGSYDEQNATEGRYSLNFQKARKSANLVISAS
QLGDSAM**YFCA**MSPMNTGFQKLV**FGTGT**RLLVSPNIQNPDPAVYQLRDS
KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAW
SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSV
IGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

P2-TCR Vβ13s6A2T(新命名:TCR Vβ6S6)-ND1N-J2.3-Cβ2 基因的氨基酸序列(312 aa.):

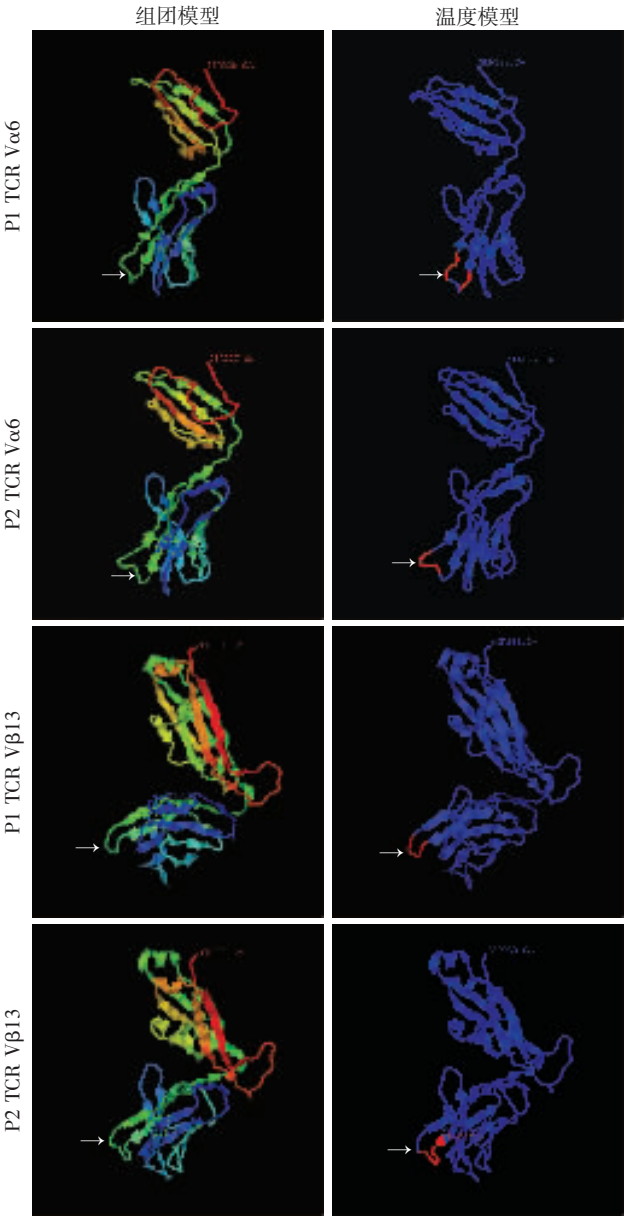
MSISLLCCAAFPLLWAGPVNAGVTQTPKFRILKIGQSMTLRCTQDMNHNY
MYWYRQDPGMGLKLIYYSVGAGITDKGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLELA
APSQTSV**YFCAS**SRGISSTDTQY**FGPGT**RLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE
AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPA
LNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV
TQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVL
MAMVKRKDSRG

P2-TCR Vα6S1-hDV104S1(新命名:hADV14S1)-N-J28-Cα 基因的氨基酸序列(278 aa.):

MSLSSLLKVVTASLWLGPGIAQKITQTQPGMFVQEKEAVTLDCTYDTSDQS
YGLFWYKQPSSGEMIFLIYQGSYDEQNATEGRYSLNFQKARKSANLVISAS
QLGDSAM**YFCA**MRDYSGAGSYQLT**FGKGT**KLSVIPNIQNPDPAVYQLRD
SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAW
SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVI
GFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

2.3 TCR Vα6 和 TCR Vβ13 亚家族 T 细胞 TCR 的同源模式

根据 4 个 TCR 基因的全长氨基酸序列,通过瑞士日内瓦 Glaxo Smith Kline 中心提供的自动化蛋白质比较模建服务器 SWISS-MODEL(http://swissmodel.expasy.org)进行三维空间结构推测。然后利用蛋白质三维图像分析软件 Rasmol 对所获得的 TCR 三维空间结构进行显示和分析。发现 2 例患者共有的 Vα6 亚家族的 TCR 均与 PDB ID:3ffcD(2.80 Å)[10] 的模型相似,序列同源性分别为 92.16% 和 91.71%;而 Vβ13 亚家族的 TCR 也具有同一个空间结构模型 PDB ID:2ialD(1.92 Å)[11],序列同源性分别为 92.95% 和 92.18%。根据氨基酸与核苷酸残基在分子链中的位置进行上色,每一条链从蓝色、绿色、黄色、橙色到红色。蛋白质的 N 端与核苷酸的 5'端为红色,蛋白质的 C 端与核苷酸的 3'端为蓝色,箭头所示部位为 CDR3 区(图 1)。另外,通过温度来表示不同原子在分子中的不同的温度值,主要用于衡量给定原子的可移动性。数值越高,越偏重于暖色(红);数值越低,越偏重于冷色(蓝),CDR3 区显示为红色(图 1 右图)。



↑:CDR3 区

图 1　TCRα 和 TCRβ 链的三维结构模式图

3　讨论

TCRα 和 β 链分别包含 3 个互补决定区,即 CDR1、CDR2 和 CDR3,每个决定区形成一个环分别与 MHC-抗原肽复合体识别结合,其中 TCR-CDR3 区则是和 MHC-抗原肽复合体的抗原肽特异性识别结合的部位,决定抗原识别的特异性。由于蛋白质的三级结构比一级结构更加保守,具有相似一级结构的 CDR3 序

列的三级结构也可能同源性并不强，并且TCR的空间结构与抗原识别的关系至关密切，因此，只有通过TCR的三维结构分析才能更好地判断是否具有同源性的CDR3，是否能够识别相似的抗原表位。为此，本研究对前期研究已鉴定的存在于DLBCL患者外周血中的克隆性增殖T细胞TCR的三维空间结构进行了初步的预测。

蛋白质空间结构的预测方法有多种，而基于同源蛋白质进行结构建模是当前应用最为广泛也是最为可靠的一种蛋白质结构预测方法[10]。本研究通过SWISS-MODEL蛋白质同源建模服务器对TCR的氨基酸序列进行三维空间结构预测。一般来说，同一家族蛋白质的氨基酸序列同源性大于30%时，具有同源模式的可靠性很高，否则，结构预测的结果不可靠。本研究发现2例患者的TCR Vα6的氨基酸序列与PDB ID：3ffcD模型的序列同源性分别为92.16%和91.71%；而TCR Vβ13的氨基酸序列与模型PDB ID：2ialD的序列同源性分别为92.95%和92.18%。这也表明本研究根据该方法所获得的TCR的三维空间结构是可靠的。通过利用Rasmol蛋白质三维图像分析软件对所获得的TCR三维空间结构进行显示和分析，发现两例患者同一亚家族T细胞克隆的TCR不仅具有高度同源的一级结构，其三维空间结构也具有明显的相似性，即两例的TCR vα6或TCR Vβ13的TCR均分别与同一个蛋白结构模型高度同源，蛋白质空间结构模型分别为PDB ID：3ffcD和PDB ID：2ialD[11-12]，因此，更加支持其可能识别相同或相似的抗原决定簇的推断。这也更进一步证实了我们前期的研究结果：DLBCL患者外周血中的这些T细胞克隆是由于同一个肿瘤相关抗原肽刺激而产生的克隆性扩增。

利用蛋白质三维图像分析软件，通过多种方式对TCR的三维空间结构进行显示，如温度图、分组图等，以便于分析TCR-CDR3的三维空间结构特点。其中温度图是根据不同原子在分子中呈现出不同的温度值对TCR的氨基酸序列进行分析，数值越高，越偏重于暖色，表明给定原子的可移动性越大。本研究对所获得的TCR采用温度图来显示其三维空间结构，发现TCR-CDR3区的颜色显示为红色，表明相应部位的原子温度较高，预示TCR-CDR3区原子的可移动性较大，这就使得其与MHC-抗原肽复合物识别和结合过程中有较强的可移动性和相当的适应能力[13-14]；结构分析也发现两例患者的TCR vα6或TCR Vβ13亚家族T细胞的TCR-CDR3区的空间结构也具有高度的相似性，推测可能具有相同或相似的抗原特异性。由于TCR-CDR3区是和MHC-抗原肽复合体的抗原肽特异性识别结合的部位，通过对TCR-CDR3区空间结构的预测和研究或许可以对TCR-MHC-抗原肽相互作用的活性位点进行预测，设计突变位点促进TCR与MHC-抗原肽复合体相互作用的活性，从而提高效/靶细胞结合的亲和性，或许可以提高抗原特异TCR过继性细胞免疫治疗的疗效。

总之，本研究对来自两例DLBCL患者外周血的TCR Vα6和Vβ13亚家族T细胞TCR的空间结构进行了初步预测，发现2例患者相同亚家族T细胞的TCR-CDR3区具有高度同源的空间结构，推测可能具有相同或相似的抗原特异性。至于如何设计促进其与MHC-抗原肽复合体的结合还需要进一步的研究。

参考文献：

[1] Sebestyen Z, Schooten E, Sals T, *et al*. Human TCR that incorporate CD3zeta induce highly preferred pairing between TCRalpha and beta chains following gene transfer[J]. J Immunol, 2008, 180(11): 7736-7746.

[2] Cohen C J, Li Y F, El-Gamil M, *et al*. Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond[J]. Cancer Res, 2007, 67(8): 3898-3903.

[3] Scholten K B, Kramer D, Kueter E W, *et al*. Codon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells[J]. Clin Immunol, 2006, 119(2): 135-145.

[4] Jorritsma A, Gomez-Eerland R, Dokter M, *et al*. Selecting highly affine and well-expressed TCRs for gene therapy of melanoma[J]. Blood, 2007, 110(10): 3564-3572.

[5] 叶静梅，谭荻，李扬秋，等. 弥漫大B型非霍奇金淋巴瘤患者外周血TCR Vβ亚家族T细胞分布和克隆性增生特点[J]. 临床血液学杂志，2009，22(11)：594-596.

[6] Yin Q, Tan H, Chen S, *et al*. Characterization of conserved CDR3 sequence of TCR alpha- and beta-chain genes in peripheral blood T-cells from patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. Hematology, 2010, 15(1): 48-57.

[7] 李扬秋. 血液肿瘤免疫治疗学：基础研究与临床应用[M]. 北京：人民卫生出版社，2005：361-371.

[8] Li Y, Chen S, Yang L, *et al*. TRAV and TRBV repertoire, clonality and the proliferative history of umbilical cord blood T-cells[J]. Transpl Immunol, 2007, 18(2): 151-158.

[9] Moss P A, Bell J I. Comparative sequence analysis of the human T cell receptor TCRA and TCRB CDR3 regions[J]. Hum Immunol, 1996, 48(1/2): 32-38.

[10] Peitsch M C, Schwede T, Guex N. Automated protein modelling--the proteome in 3D[J]. Pharmacogenomics, 2000, 1(3): 257-266.

[11] Gras S, Burrows S R, Kjer-Nielsen L, *et al*. The shaping of T cell receptor recognition by self-tolerance[J]. Immunity, 2009, 30(2): 193-203.

[12] Deng L, Langley R J, Brown P H, *et al*. Structural basis for the recognition of mutant self by a tumor-specific, MHC class II-restricted T cell receptor[J]. Nat Immunol, 2007, 8(4): 398-408.

[13] Al-Lazikani B, Hill E E, Morea V. Protein structure prediction[J]. Methods Mol Biol, 2008, 453: 33-85.

[14] Armstrong K M, Piepenbrink K H, Baker B M. Conformational changes and flexibility in T-cell receptor recognition of peptide-MHC complexes[J]. Biochem J, 2008, 415(2): 183-196.

（收稿：2010-09-09 修回：2010-12-06）

（编辑 邓强庭）