DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.014
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2196 2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)24-2196-03

超抗原SED空间结构的同源建模及其免疫识别位点的预测

李亚斐[1],朱锡华[2],黄云辉[2],杨 劲[2] (第三军医大学:[1]军事预防医学院流行病学教研室;[2]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 对金黄色葡萄球菌肠毒素D(SED)的空间结构和免疫识别位点进行预测。方法 运用同源建模的方法构建了SED的三维空间结构模型,比较SED与其它金黄色葡萄球菌肠毒素超抗原的氨基酸序列、二级结构和空间结构的差异,对可能的活性位点进行预测。结果 SED的空间结构与其它肠毒素超抗原相似,具有两个结构域:氨基末端结构域和羧基末端结构域。α-螺旋和β-折叠可能与维持SED超抗原的空间结构以及与MHC的结合有关,而环状区域更多的参与SED与TCR的相互作用。结论 结合已有的研究结果,最终确定SED的N23、F45、L59、N61、I92和F203位氨基酸为可能的免疫识别位点。

关键词:超抗原;金黄色葡萄球菌肠毒素D;同源建模;免疫识别
中图法分类号:R392.11;R392.13 文献标识码:A

Homologous modeling of three-dimensional structure and prediction of active sites of immune recognition of superantigen SED

LI Ya-fei, ZHU Xi-hua, HUANG Yun-hui, YANG Jin (Department of Epidemiology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To predict the three-dimensional structure and active sites of immune recognition of SED. Methods The three-dimensional structure of SED was constructed by homology modeling method. The amino acid sequences, secondary structure and three-dimensional structure of SED were compared with those of other enterotoxin superantigens. On the basis of the results of the comparison, the active sites were predicted. Results The three-dimensional structure of SED, similar to that of other enterotoxin superantigens, was composed of two domains: amino-terminal domain and carboxyl-terminal domain. α-helix and β-sheet might probably be involved in the maintenance of the structure of SED and binding of SED to MHC. The loop domain of SED probably interacted with TCR. Conclusion According to our analysis and the previous studies, we predict that N23, F45, L59, N61, I92 and F203 on SED may be the active sites of immune recognition.

Key words: superantigen; staphylococcal enterotoxin D; homology modeling; immune recognition

超抗原是一类新型蛋白质抗原分子。业已证明,超抗原参与多种疾病的发病过程[1]。对超抗原免疫识别机制的深入研究,可望进一步为相关疾病的防治提供新的方法。金黄色葡萄球菌肠毒素超抗原家族由于涉及的疾病谱非常广泛,一直是比较活跃的研究领域。对金黄色葡萄球菌超抗原免疫识别机制研究较多的是金黄色葡萄球菌肠毒素A、B、C(Staphcoccal erterotocin A, B, C; SEA, SEB, SEC)[2~4]。已取得的研究进展提示,超抗原尽管具有相似的生物学活性,但它们的免疫识别机制存在明显的不同。金黄色葡萄球菌肠毒素D(Staphcoccal erterotocin D, SED)是一种常见的毒性作用较强的肠毒素,但对其免疫识别的研究相对较少。

迄今发现的金黄色葡萄球菌肠毒素超抗原多达10余种,其中部分超抗原的空间结构和免疫识别位点已基本明晰[5]。因此将SED与其它金黄色葡萄球菌肠毒素超抗原的氨基酸序列及空间结构进行比较分析,寻找保守及非保守氨基酸序列的特点,结合已知的功能位点,可为预测超抗原的免疫识别位点提供有用的线索。由于SED的晶体结构尚未被解析,因此我们利用同源建模构建其三维结构,进而对活性位点进行预测,为进一步运用定点突变技术研究SED的免疫识别提供依据。

作者简介:李亚斐(1972-),女,河南省汝州市人,博士,讲师,主要从事分子免疫和分子流行病学方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752286, E-mail: lyafei@hotmial.com

收稿日期:2003-04-28;修回日期:2003-07-17

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　蛋白质序列

检索自瑞士生物信息研究所(Swiss Institute of Bioinformatics)提供的 Swiss-Prot 蛋白质数据库(http://expasy.hcuge.ch/sprot/index.htm)。

1.2　多重序列比较和系统进化分析

用 Vector NTI Version6.0 软件的 AlignX 进行多重序列比较。

1.3　SED 三维空间结构建模

在瑞士日内瓦 Glaxo Smith Kline 中心提供的自动蛋白质分子模建服务器(Automated Protein Modelling Server) SWISS-MODEL (http://www.expasy.ch/swissmod/ SWISS-MODEL)上进行。

1.4　分子模型的显示、计算和结构对比

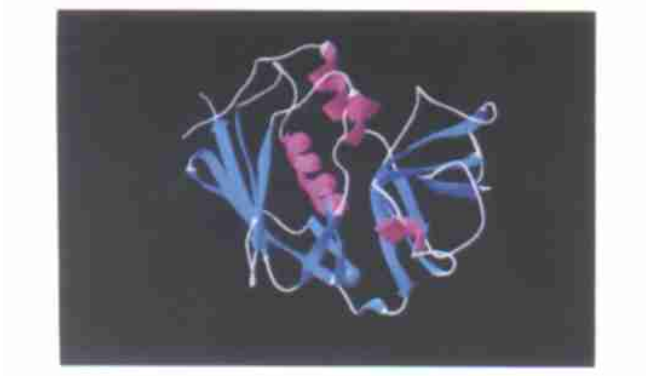
采用蛋白质三维图像软件 Swiss-Pdb Viewer3.7b2。结构对比根据距离平方和最小的叠合方法(Least-squares superposition),将两个蛋白质分子的结构进行叠合[6]。两个结构间的差异用 Cα 原子间的均方根值(Root-mean-square, RMS)表示。

2　结果

2.1　SED 三维空间结构建模

输入 SED 蛋白质序列, 在美国 Brookhaven PDB(Protein Data Bank)数据库中进行同源检索, 确定 SEA、SEB、SEE、SEC2、SEC3 (PDB 序列号分别为: 1SXT、1SBB、1SEE、1SE2、1JCK)为建模模板, 与 SED 的同源性分别为 53%、37%、54%、33%、33%。

结果显示 SED 的空间结构与其它肠毒素超抗原相似, 具有两个结构域: 氨基末端结构域和羧基末端结构域。分子的中心由一长的亲水性α-螺旋构成。氨基末端结构域由 1 个凹陷的 β-barrel 构成, 其末端有 1 个α-螺旋; 羧基末端结构域包含 4 个 β-片层和中心部位的α-螺旋。此外, 氨基末端的前 20 个氨基酸与羧基末端相邻, 可被看作羧基末端结构域的一部分, 见图 1。



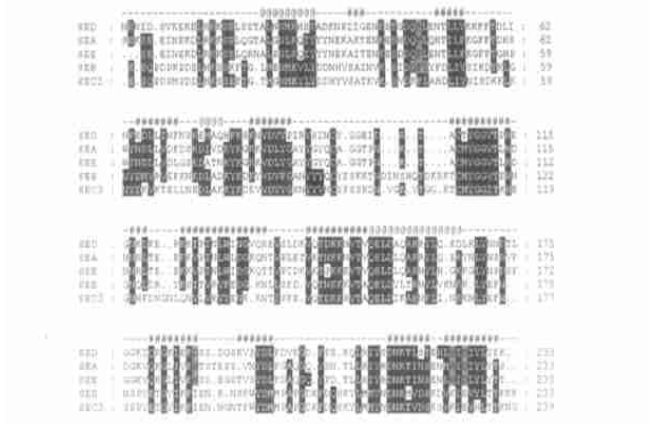
Red: α-helix; Bluee: β-sheet; White: Loop regions

图 1　SED 的主链结构

Fig 1　Structure of backbone of SED (showing the secondary structure)

2.2　SED 与 SEA、SEB 的氨基酸序列和二级结构比较

由于对 SEA、SEB、SEE、SEC3 的 T 细胞识别(T cell reactivity, TCR)和 MHC 结合位已基本清楚, 因此我们将 SED 与这几种超抗原的氨基酸序列和二级结构进行比较, 并标出已发现的 SEA、SEB、SEE、SEC 的 TCR 和 MHC 结合位点, 见图 2。可见这些超抗原的 TCR 和 MHC 结合位相对分离, 某些功能位点高度保守。位于 SED 的α-螺旋和β-折叠区域的氨基酸序列高度保守, 高变区多为环状结构。已发现与 TCR 结合有关的活性位点除了 23、26 位氨基酸外均处于环状区, MHC 结合位除了 44、45、47 位氨基酸外均处于β-折叠区内。



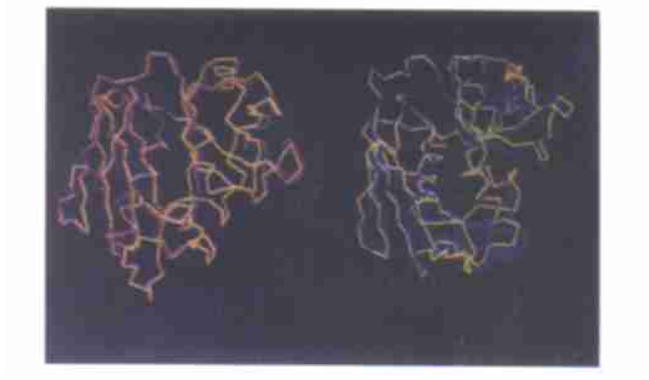
Dark gray residues: conservative amino acids; Black residues: binding sites of TCR; Light gray: binding sites of MHC; @: α-heix regions; #: β-sheet regions; —: Loop regions

图 2　SED、SEA、SEB、SEE 和 SEC3 蛋白质序列的对比分析

Fig 2　Comparison of sequences of SED, SEA, SEB, SEE and SEC3

2.3　SED 与 SEA、SEB 的空间结构比较

由图 3 空间结构比较结果也发现超抗原的α-螺旋和β-折叠比较保守, 而不规则环状(Loop)结构变异较大, 表明β-折叠除了维持 SEs 超抗原的空间结构外, 还可能参与超抗原与 MHC 结合, 而环状区域更多的参与超抗原与 TCR 相互作用, 这提示 SED 的 TCR 结合位很可能位于环状结构区域内。



Yellow: SED; Blue: SEB; Red: SEA

图 3　SED 与 SEA、SEB 结构比较

Fig 3　Comparison of structure of SED, SEA and SEB

2.4　免疫识别位点的预测

对 SEC3/SEB-TCRVβ(小鼠 Vβ8.2-Jβ2.1-Cβ1)晶体结构的研

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

究证明[7]，SEC3和SEB的TCR结合位位于SEC3和SEB两个结构域之间的沟槽内，突变位于SEC3和SEB两个结构域之间沟槽内的23、26、60、90和210位氨基酸影响二者对T细胞的激活，但并不影响与MHCⅡ的结合。金黄色葡萄球菌肠毒素超抗原家族的空间结构高度相似，因此可推测SED的TCR Vβ结合位同样位于两个结构域之间沟槽内的相应位点。

鉴于以上分析和现有研究结果提供的线索，我们将对以下可能的活性位点进行深入研究：N23、F45、L59、N61、I92和F203。其中N23位氨基酸在所有肠毒素超抗原中均保守；SED L59、N61和F203位氨基酸是SED与SEB、SEC的保守性氨基酸，另外，我们还选择了SED的变异位点I92。有研究提示F45位氨基酸可能参与SED与MHCⅡ的结合，在此我们希望能进一步证实此位点与MHC的结合有关，我们更感兴趣的是这一位点的突变是否影响SED的TCRVβ特异性[8]。这些位点均位于两个结构域之间的沟槽内，并且是蛋白质表面的可及性氨基酸，除了23位氨基酸外均位于环状区结构内。

3 讨论

蛋白质空间结构预测的方法有多种，基于同源蛋白质进行结构建模是当前最为可靠的一种蛋白质结构预测方法[9]。这一方法的基本思想是：蛋白质的三维结构比蛋白质的一级结构更加保守，氨基酸残基的替换通常发生在蛋白质表面的回折区域。而蛋白质的主链结构，特别是疏水核心的结构，受序列变异的影响很小，因此用类似物来预测蛋白质结构是比较可靠的。随着结构数据的积累，所谓无规结构也呈现出多种高频出现的构象，可以利用这些高频构象预测回折片段的构象，理论计算也可以用来预测不保守片段的构象[10]。根据经验，同一家族蛋白质的氨基酸序列同源性大于30%时，同源建模的可靠性很高，否则，结构预测的结果不可靠[11]。SEs超抗原家族中已有多种超抗原的空间结构已被解析，SED与建模模板的同源性为33%～54%，因此利用同源蛋白质进行SED的结构建模结果是可靠的。

氨基酸序列的对比分析可见，SEs家族的氨基酸序列具有较高的同源性，同一组的氨基酸序列同源性更高，结合结构对比和已经发现的活性位点，我们发现了以下线索：①SED的α-螺旋和β-折叠均处于氨基酸序列高度保守的区域，而且空间结构也高度保守，高变区多为环状结构；②已发现的TCR结合位点绝大部分均处于环状区，而且在同一组超抗原之间高度保守；③位于α-螺旋区域内的N23位氨基酸在所有SEs中均一致，而且证实是其它SEs超抗原的TCR结合位点，提示N23位氨基酸可能也是SED重要的活性位点；④MHC结合位除了44、45和47位氨基酸外均处于保守的β-折叠区内。上述结果提示α-螺旋和β-折叠可能与维持SEs超抗原的空间结构以及与MHC的结合有关，而环状区域更多的参与超抗原与TCR的相互作用。研究已证实[7] SEC3和SEB的TCR结合位位于SEC3和SEB两个结构域之间的沟槽内，突变位于SEC3和SEB两个结构域之间沟槽内的23、26、60、90和210位氨基酸影响二者对T细胞的激活，但并不影响与MHCⅡ的结合。金黄色葡萄球菌肠毒素超抗原家族的空间结构高度相似，因此可推测SED的TCR Vβ结合位同样位于两个结构域之间沟槽内的相应位点。鉴于以上分析和已有研究结果提供的线索，我们预测N23、F45、L59、N61、I92和F203为可能的免疫识别位点，为构建SED突变体以进一步研究其免疫识别机制提供了理论依据。

参考文献：

[1] Kotzin B L, Leung D Y, Kappler J, *et al*. Superantigens and their potential role in human disease[J]. Adv Immunol, 1993, 54: 99－166.

[2] Abrahmsen L, Dohlsten M, Segren S, *et al*. Characterization of two distinct MHC class II binding sites in the superantigen staphylococcal enterotoxin A[J]. EMBO J, 1995, 14(13): 2978－2986.

[3] Malchiodi E L, Eisenstein E, Fields B A, *et al*. Molecular characterization of the putative T-cell receptor cavity of the superantigen staphylococcal enterotoxin B[J]. Immunology, 1998, 94(2): 160－166.

[4] Papageorgiou A C, Acharya K R, Shapiro R, *et al*. Crystal structure of the superantigen enterotoxin C2 from *Staphylococcus* aureus reveals a zinc-binding site[J]. Structure, 1995, 3(8): 769－779.

[5] 李亚斐. 细菌性超抗原的结构及其免疫识别[J]. 国外医学免疫学分册, 2002, 25(5): 256－258.

[6] Schneider T R. Objective comparison of protein structures: error-scaled difference distance matrices[J]. Acta Crystallogr D, 2000, 56 (Pt6): 714－721.

[7] Fields B A, Malchiodi E L, Li H, *et al*. Crystal structure of a T-cell receptor beta-chain complexed with a superantigen[J]. Nature, 1996, 384 (6605): 188－192.

[8] Svensson L A, Schad E M, Sundstrom M, *et al*. Staphylococcal enterotoxins A, D, and E. Structure and function, including mechanism of T-cell superantigenicity[J]. Prep Biochem Biotechnol, 1997, 27(2－3): 111－141.

[9] Eisenhaber F, Persson B, Argos P. Protein structure prediction: recognition of primary, secondary, and tertiary structural features from amino acid sequence[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1995, 30(1): 1－94.

[10] Vasquez M. Modeling side-chain conformation[J]. Curr Opin Struct Biol, 1996, 6(2): 217－221.

[11] Al Lazikani B, Jung J, Xiang Z, *et al*. Protein structure prediction. Curr Opin Chem Biol, 2001, 5(1): 51－56.

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net