DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.017

论著

文章编号:1000-5404(2002)10-1166-03

分子模拟在筛选 HLA-A2.1 高亲和性 MART-1 CTL 表位中的应用研究

王 莉,吴玉章,林治华,石统东 (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 探讨计算机分子模拟在CTL表位与HLA-A2.1亲和力特性研究中的应用价值。方法 应用Silicon Graphics图像工作站及Insight Ⅱ软件,分别建立MART-1 6个CTL预测表位与HLA-A2.1结合的三维结构,并进行分子动力学模拟,通过对各结合特征性参数的计算,对各表位肽与HLA-A2.1结合稳定性进行了比较。应用Merrifield固相多肽合成技术合成上述小肽,通过HLA-A2.1与各肽亲和力分析试验,证实分子模拟结果的可靠性。结果 通过分子模拟手段计算所得6个表位与HLA-A2.1结合特性结果,基本与通过实验手段所得结果相符。结论 计算机分子模拟在CTL表位与MHC-Ⅰ类分子的亲和力研究中,具有简单、直观、快速、准确等优点,该方法在筛选MHC-Ⅰ类分子高亲和性CTL表位的研究中具有诱人的应用前景。

关键词:MART-1;CTL表位;分子动力学模拟;结合亲和力分析
中图法分类号:R319;R392.2;R73-36 文献标识码:A

Molecular modeling in selection of MART-1 CTL epitopes stably binding to HLA-A2.1 molecule

WANG Li, WU Yu-zhang, LIN Zhi-hua, SHI Tong-dong (Institute of Immunology of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To verify the practicability of computed molecular modeling in the study of MART-1 CTL epitopes binding to the HLA-A2.1 molecule. Methods Silicon Graphics workstation and Insight Ⅱ software were used to build 6 CTL epitope candidates of MART-1 and the 3-dimensional structures of them binding to HLA-A2.1. Molecular dynamics simulation was carried out to select the best epitope by calculating the parameters related to binding affinity. MHC peptide binding assays was employed to test the binding of HLA-A2.1 with 6 nonamer peptides synthesized with Merrifield solid phase polypeptide synthesis according to computer prediction in order to verify the reliability of the results obtained from molecular modeling. Results The results obtained from molecular modeling were consistent with those from the MHC peptide binding affinity assays in substance. Conclusion This study demonstrates that molecular modeling can be used in the study on the affinities of CTL epitope candidates to MHC-Ⅰ molecules its convenience, speediness and veracity.

Key words: MART-1; CTL epitope; molecular dynamics simulation; binding affinity assays

随着肿瘤特异性抗原的不断发现和确定,肿瘤特异性免疫治疗已成为目前肿瘤综合治疗中不可缺少的手段。研究表明,机体对于肿瘤抗原的免疫应答中,细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)是主要的效应细胞。肿瘤抗原首先在抗原提呈细胞内被加工形成含8~10个氨基酸残基的肽段(CTL表位),后者在两种分子伴娘(TAP1, TAP2)的协助下,被转运至内质网中,并与其中组装成熟的MHC-Ⅰ类分子形成复合物,最终该复合物表达于细胞表面,供CTL识别。研究认为,抗原肽(CTL表位)与MHC-Ⅰ类分子形成复合物的稳固性是能否引起有效CTL应答的决定因素[1]。因此,寻找有效的优势CTL表位成为肿瘤特异性免疫治疗及治疗性多肽疫苗研究的重要前提。

以往对于一个已知序列的肿瘤抗原,筛选其优势CTL表位的技术路线通常是:先将抗原肽从APCs表面用弱酸洗脱下来,或逐一合成重叠肽,然后通过实验方法检测各候选多肽与MHC-Ⅰ类分子间的结合情况,并比较各肽诱导特异性CTL杀伤效应的能力。这一过程不仅难度高、花费大,而且效率低。随着多种MHC-Ⅰ类分子的晶体结构[2,3]和与MHC-Ⅰ类分子结合的大量内源性肽序列[4]得以阐明,多种CTL表位预测方法[5]不断推陈出新并日益完善。在此基础之上,计算机分子模拟技术平台的引入更是大大提高了筛选效率和准确性。

本研究在以往黑色素瘤分化抗原MART-1的CTL表位预测基础之上,应用计算机分子模拟手段,通过对各候选表位肽与HLA-A2.1分子结合特性参数的计算及分析,筛选出理论上可与HLA-A2.1稳定结合的表位。同时,应用Merrifield固相多肽合成技术合成了各表位肽,进一步用检测HLA-A2.1与各肽间结合情况的经典试验证实了以上结果的可靠性。

1 材料与方法

1.1 多肽序列

多肽序列选用以往预测的黑色素瘤分化抗原MART-1的6个CTL表位(九肽),分别为MART-1_{27-35}(AAGIGILTV),MART-1_{31-39}(GILTVILGV),MART-1_{32-40}(ILTVILGVL),MART-1_{34-42}

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800170)
作者简介:王 莉(1975-),女,四川省南充市人,博士研究生,助教,主要从事肿瘤免疫学及多肽疫苗分子设计方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752236
通信作者:吴玉章,电话:(023)68752680
收稿日期:2001-09-15;修回日期:2002-01-10

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

(TVILGVLLL), MART-1_{56-64} (ALMDKSLHV), MART-1_{61-69} (SLHVGTQCA)。HBV 核心抗原 18~27(FLPSDFFPSV)作为阳性参照肽。

1.2　分子动力学模拟

1.2.1　分子模型构建　　运用 Insight Ⅱ 软件包中的 Discover 3 模块(采用 CVFF 力场), 对来自 MART-1 的 6 个九肽与 HLA-A2.1 的复合物进行分子动力学模拟。HLA-A2.1 的初始坐标来自于蛋白质晶体结构数据库中 HLA-A0201 与流感病毒蛋白(AInfluenza A Matrix Protein) M1(58~66)的复合物(Protein Data Bank entry 1HHI), 各九肽分子是运用 Bioploymer 模块对 1HHI 中的表位肽进行氨基酸替换而得。模拟过程如下: 首先, 将 HLA 与β2 m 固定, 运用最陡下降法(Steepest descent method)对九肽进行 2 000 步优化计算, 然后用共轭梯度法(Conjugate gradients method)优化, 直到能量 RMS 小于 0.11.018 7 kJ·mol^{-1}·$Å^{-1}$; 第二步, 在复合物周围加一层 7.5Å 的水分子, 并固定 HLA 复合物对水分子进行 2 000 步能量优化, 以消除水分子之间以及水分子与蛋白质之间的不合理接触; 第三步, 对溶液状态下的复合物进行能量最小化计算, 非键相互作用采用 9.5Å 的截断值(cut off), 先后运用最陡下降法和共轭梯度法优化, 直到能量均方根误差(Root mean square, RMS)小于 1.018 7 kJ·mol^{-1}·$Å^{-1}$; 第四步, 在 298 K 的恒定温度下进行 20 皮秒的分子动力学计算; 最后, 对动力学优化得到的最后构象进行分子力学优化 5 000 步, 得到 HLA-A2.1 与九肽复合物的最终构象。

1.2.2　结合特征参数计算　　借助 Homology 模块, 计算 MART-1 的 6 个表位肽中各残基的溶剂可及表面积、锚点间距、非键作用能及氢键数等结合特征参数。溶剂可及面积(Solvent-Accessible Surface Areas, SAS)的计算采用 Lee 和 Richards[6] 定义的空间填充模型。

1.3　多肽合成、纯化、分析、鉴定

多肽合成在 ABI 431A 型多肽合成仪(PE)上进行。采用标准 Fmoc 方案, 略加修改。多肽合成后在 Delta600 型 HPLC(Waters)上进行纯化, 纯度达到 90%以上。纯化后多肽的分子量鉴定在 API 2000 型质谱仪(Waters)上进行。将多肽纯品溶于 DMSO 中, 终浓度为 20 mg/ml, 置于-20 ℃保存备用。

1.4　HLA-A2.1 和各肽亲和力分析

本实验使用 HLA-A2.1 表达阳性, 且内源性抗原加工处理能力缺失的 T2 细胞系(由军事医学科学院馈赠), 及可产生抗 HLA-A2.1 单克隆抗体的 BB7.2 杂交瘤细胞(购于 ATCC)。T2 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基体外培养。BB7.2 杂交瘤细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基体外培养。1×10^6 T2 细胞用 4 ℃PBS 悬浮, 600 r/min 离心 6 min, 洗涤 3 次后, 再与 25 μg/ml 待测肽、15 μg/ml 人β2 m(购于北京中山生物技术公司)于 37 ℃共育 3 h。然后用 4 ℃PBS 同前条件离心洗涤 1 次, 加入 100 μl BB7.2 杂交瘤细胞培养上清液, 冰浴 40 min。T2 细胞用 4 ℃PBS 洗涤 3 次后, 加入 100 μl 稀释度为 1∶100 的 FITC-羊抗鼠 IgG(购于北京中山生物技术有限公司)溶液, 冰浴 40 min, 离心洗涤后用流式细胞仪检测荧光强度, 波长 488 nm。荧光强度=(样品平均荧光-背景平均荧光)/背景平均荧光。

2　结果

2.1　HLA-A2.1 和各表位多肽的分子动力学模拟分析结果

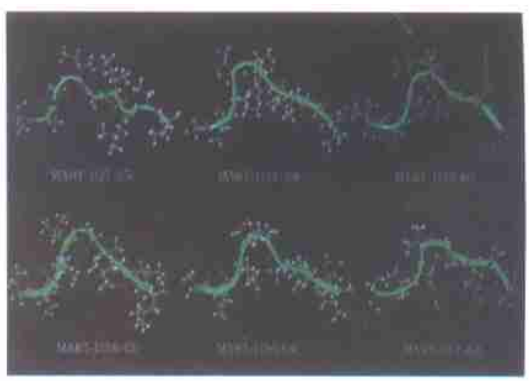
各抗原肽与 HLA-A2.1 结合的最终构型见图 1。从抗原肽与 HLA-A2.1 结合的总体结构上看各抗原肽前后 3 个氨基酸残基在空间构型上很相似, 氮末端深陷入 HLA-A2.1 结合槽中, 而 P3 至 P6 的各残基则呈不同构型凸出在结合槽之外, 形成复合物的抗原性表面, 供 TCR 识别, 显示出其与 TCR 结合的多样性; 在羧基末端附近缓慢下降至末端与 HLA-A2 结合槽紧密结合。各表位肽与 HLA-A2.1 的复合物模型见图 2。

表 1 显示: MART-1 各表位肽中以 MART-1(56—64)、MART-1(31—39) 与 HLA-A2.1 结合最强, 有较高的亲和力, 而以 MART-1(27—35)与 HLA-A2.1 结合较弱, 仅有低到中度的亲和力, 其它表位与 HLA-A2.1 的亲和力居中。

表 1　MART-1 各表位肽与 HLA-A2.1 结合的特征参数

Tab 1　Characteristic parameters of the antigenic peptides of MART-1 bound to HLA-A2.1

Peptide(origin)	Sequence	Distance/Å (P2—P9)	H-bond number	Nonbond	SAS of anchor residue(%)	
					P2	P9
MART-1(27—35)	AAGIGILTV	18.93	5	−17097.4	2.6(2.3)	3.8(2.4)
MART-1(31—39)	GILTVILGV	17.96	10	−18139.1	3.7(2.1)	0(0)
MART-1(32—40)	ILTVILGVL	17.55	6	−17206.6	0(0)	4.8(2.8)
MART-1(34—42)	TVILGVLLL	18.05	7	−17180.1	3.3(2.1)	1.6(0.9)
MART-1(56—64)	ALMDKSLHV	18.66	12	−19450.7	2.6(1.5)	0(0)
MART-1(61—69)	SLHVGTQCA	17.61	8	−17512.3	4.4(2.6)	1.0(0.9)



Green: Carbon atom; Red: Oxygen atom; Blue: Nitrogen atom; White: Hydrogen atom

图 1　源于 MART-抗原的 6 个 HLA-A2.1 限制性表位多肽的分子动力学模拟构象

Fig 1　Configuration of the 6 HLA-A2.1 restricted peptides in MART-1 antigen detemined by molecular dynamics simulation



MHC models were constructed by using crystallographic data of α1 and α2 heavy domains (Blue). Peptides are represented as a ramose structure (Red)

图 2　HLA-A2.1 和 MART-1 各表位多肽的复合物模型

Fig 2　Complex models of HLA-A2.1 binding to 6 CTL epitodes of MART-1 respectively

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

2.2 HLA-A2.1 和各表位肽亲和力分析结果

我们应用间接免疫荧光法检测各肽与 HLA-A2.1 分子的结合情况，结果显示，在 6 个表位中，MART-1_{31-39}（GILTVILGV）与 MART-1_{56-64}（AIMDKSLHV）与 HLA-A2.1 分子的结合最为稳定；MART-1_{27-35}（AAGIGILTV）显示出最弱的结合 HLA-A2.1 分子的能力；其余各肽与 HLA-A2.1 结合均表现出一定的稳定性，见图 3。HBV 核心抗原$_{18-27}$（FLPSDFFPSV）作为阳性参照表位。

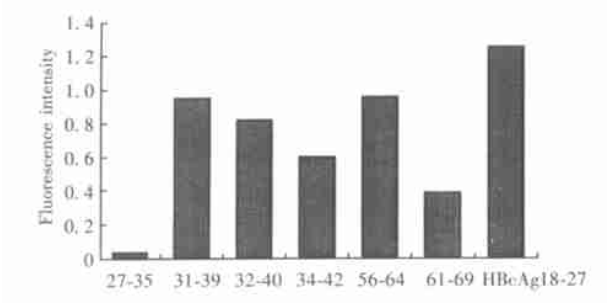


图 3 间接免疫荧光法检测 **HLA-A2.1** 和各肽的结合情况

Fig 3 HLA-A2.1 binding to MART-1— derived peptides with indirect immunofluorescent method

3 讨论

随着分子免疫学的发展，人们已将很多免疫学现象的本质归结为配体-受体间的相互作用，其实质是分子识别。MHC-Ⅰ类分子特异性识别合适的肽段（即 CTL 表位）并与之结合，形成了 CTL 免疫识别的靶分子。晶体结构学的发展使人们认识到 MHC 分子与抗原肽的相互作用好比“锁”和“钥匙”的关系，它们之间不仅有一级结构的识别，而且有更细微的空间构象上的识别。计算机分子图形模拟功能的日渐完备，加上量子力学与分子动力学等相关学科的发展，使基于 MHC-Ⅰ-抗原肽复合物三维结构的计算机辅助手段筛选优势 CTL 表位成为可能。

本研究利用来源于 X-射线晶体学数据库的 HLA-A2.1 计算机分子模型，对黑色素瘤分化抗原 MART-1 的 6 个 CTL 表位与 HLA-A2.1 的结合情况进行了分子动力学模拟，并精确计算出锚点残基间距及溶剂可及面积、非键作用能和氢键数等反映表位肽与 MHC-Ⅰ类分子结合特征的参数。

从分子动力学模拟过程中可观察到，各表位肽骨架不断调整其构型，以更好地同 HLA-A2.1 结合槽中各口袋匹配，各表位肽序列两锚定残基 P2 与 P9 之间的距离在 17～19 Å 范围内，满足大部分 HLA-A2 限制性 CTL 表位的锚定残基在 15～20 Å 之间的要求[7]。

在对各残基溶剂可及表面积的计算中，我们选择水分子作为探针分子，溶剂半径选为 0.14 nm。分子的溶剂可及表面积是指蛋白质分子暴露到溶剂中的面积，Lee 和 Richards 将其定义为溶剂球（又称探针分子）的中心在蛋白质分子表面滚过的面积。MHC-肽复合物模型中多肽各残基的溶剂可及表面积可直观反映肽与 MHC 分子的嵌合情况，各残基尤其是锚点的溶剂可及表面积越小，说明两者嵌合越紧密。

抗原肽与 MHC 分子之间主要通过疏水作用、氢键、盐键等弱相互作用进行分子间的识别。这些非键作用越强，结合则越紧密，相应分子间的非键作用能就越低。

本研究通过对各抗原肽与 HLA-A2.1 结合的非键能、溶剂可及表面积 SAS、氢键数等特征性参数的分析，筛选出理论上与 HLA-A2.1 分子结合最好的表位。

为进一步探讨分子动力学模拟的准确性，我们合成了上述 6 个九肽，用经典试验方法对 HLA-A2.1 与各肽的亲和力情况进行了检测。该方法基于：通常情况下 T2 细胞表面的 MHC-Ⅰ类分子仅有少量表达且极不稳定，当有外源性多肽与 MHC-Ⅰ类分子结合时，其表面 MHC-Ⅰ类分子的表达量和稳定性均有增加，两者结合越稳固，则可检测到的 MHC-Ⅰ类分子越多[8]。结果表明，分子模拟结果基本与通过实验所测到的实际结果相符。

综上所述，分子模拟在抗原肽与 MHC-Ⅰ类分子结合特性的研究中，具有简单、直观、快速、准确、经济等优点，该技术在筛选大量优势 CTL 表位中具有较大的应用价值。

参考文献：

[1] Franco A, Tilly DA, Gramaglia I, *et al*. Epitope affinity for MHC class I determines helper requirement for CTL priming[J]. Nat Immunol, 2000, 1(2): 145—150.

[2] Meng W S, von Grafenstein H, Haworth IS. A model of water structure inside the HLA-A2 peptide binding groove[J]. Int Immunol, 1997, 9(9): 1 339—1 346.

[3] Li H, Natarajan K, Margulies D H, *et al*. Three-dimensional structure of H-2Dd complexed with an immunodominant peptide from human immunodeficiency virus envelope glycoprotein 120[J]. J Mol Biol, 1998, 283(1): 179—191.

[4] Dzuris J L, Sidney J, Appella E, *et al*. Conserved MHC class I peptide binding motif between humans and rhesus macaques[J]. J Immunol, 2000, 164(1): 283—291.

[5] 赵建平，吴玉章. CTL 表位预测的方法学进展[J]. 第三军医大学学报，2000, 22(10): 988—992.

[6] Lee B, Bichards F M. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility[J]. J Mol Biol, 1971, 55(3): 379—400.

[7] Lim J S, Kim S, Lee H G, *et al*. Selection of peptides that bind to the HLA-A2.1 molecule by molecular modeling[J]. Mol Immunol, 1996, 33(2): 221—230.

[8] Nijman H W, Houbiers J G, Vierboom M P, *et al*. Identification of peptide sequences that potentially trigger HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes[J]. Eur J Immunol, 1993, 23(6): 1 215—1 219.

（编辑 薛国文）

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