DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.10.006
第22卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 10
2000年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2000

文章编号:1000-5404(2000)10-0931-03

论著

MART-1 HLA-A2限制性CTL表位的预测

王 莉,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 预测黑色素瘤分化抗原MART-1的HLA-A2限制性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)表位。方法 采用超基序与量化基序多项式方案相结合的办法,对目的抗原MART-1的HLA-A2限制性CTL表位进行预测。结果 预测出了6个九肽表位。结论 两种方法预测结果的一致性较好,所预测出的6个MART-1的HLA-A2限制性CTL表位经后续实验筛选、鉴定后,可望用于新型MART-1肿瘤治疗性多肽疫苗的设计研究,为临床特异性治疗恶性黑色素瘤奠定基础。

关键词:MART-1;HLA-A2;CTL表位;超基序;多项式方案
中图法分类号:R392.11;R394.2 文献标识码:A

Prediction of HLA-A2-restricted CTL epitope derived from human melanoma antigen MART-1

WANG Li, WU Yu-zhang (Institute of Immunology PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To predict the HLA-A2-restricted CTL epitopes of human melanoma antigen MART-1. Methods The CTL epitopes of MART-1 were predicted by HLA-A2-binding peptide supermotif prediction method combined with the polynomial method. Results Six CTL epitope candidates (nonamers) derived from the antigen MART-1 were selected and binding well to HLA-A2 molecules. Conclusion These nonamers having high affinity with HLA-A2 molecules. It may be useful in the design of therapeutic peptide vaccine for tumor and as immunotherapeutic strategies against melanoma.

Key words: MART-1; HLA-A2; CTL epitope; supermotif; the polynomial method

现代保护性免疫理论认为:细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)在抗肿瘤免疫应答中起关键作用。在抗原加工与递呈、分子晶体结构力学及免疫识别等知识基础之上,设计新型的基于CTL表位(Epitope)的肿瘤治疗性多肽疫苗已成为极具挑战性的研究领域。

MART-1为人类黑色素瘤分化抗原,表达于几乎所有的黑色素瘤细胞和正常黑色素细胞,而其它正常组织不表达[1]。实验证实:用MART-1抗原体外刺激健康人或肿瘤病人的外周血单个核细胞(PBMC)可诱导产生特异的具杀瘤效应的CTL[2];用转染了MART-1基因的树突状细胞(DC)可诱导产生MART-1特异性$CD8^+$和$CD4^+$T细胞[3]。目前所发现的能呈递MART-1的抗原肽的HLA-Ⅰ类分子有HLA-A2和HLA-B45.1,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%[4],因而由HLA-A2分子呈递的MART-1抗原的CTL表位在肿瘤疫苗设计中最有价值。大部分能与MHC Ⅰ类分子结合的多肽都有严格的长度,一般而言由9±1个氨基酸残基组成,本研究将超基序预测方案与量化基序多项式方案相结合,拟预测由9个氨基酸残基组成的HLA-A2限制性CTL表位。

1 材料和方法

1.1 目的抗原

肿瘤抗原选用黑色素瘤分化抗原MART-1,由118个氨基酸残基组成,分子量约为18.5×10^3。其氨基酸序列如下:

MPRED AHFIY GYPKK GHGHS YTTAE EAAGI GILTV ILGVL LLIGC WYCRR RNGYR ALMDK SLHVG TQCAL TRRCP QEGFD HRDSK VSLQE KNCEP VVPNA PPAYE KLSAE QSPPP YSP

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,硕士研究生,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。电话:(023)68752236
收稿日期:2000-08-04;修回日期:2000-09-20

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

1.2 CTL 表位预测的超基序方案

对于某一HLA 分子，其结合抗原肽的锚定氨基酸残基性质不同，这种特征结构称为 HLA 分子的等位基因特异性抗原肽一致性基序（Allele-specific consensus motif），但不少属于同一 HLA 家族，甚至不同家族的 HLA 同种异型分子所接纳的抗原肽可有相同或相似的锚着氨基酸残基，这种特征称为结合抗原肽的超基序（Supermotif）。现已根据 HLA-Ⅰ类分子接纳抗原肽的肽基序，将 HLA-Ⅰ类分子归纳为 4 个超基序家族，即 A2、A3、B7 和 B44[5]。HLA—A2 超型所接纳的抗原肽具有相同或相似的锚定氨基酸残基，P2 与羧基末端的氨基酸残基（P9）应是丙氨酸（A）、异亮氨酸（I）、亮氨酸（L）、蛋氨酸（M）、缬氨酸（V）或苏氨酸（T）。

1.3 多项式方案

当某残基 R 出现在某肽的第 i 位时，在不考虑其它肽序列的情况下，该残基对于整个肽与 MHC Ⅰ类分子的结合自由能提供了一常量 Ri，用在第 i 位为残基 R 的大量多肽的 IC_{50}的负 log10 值的平均值来估计此常量。IC_{50}被定义为待测肽将对照肽-MHC 复合物中 50% 的对照肽置换下来的浓度。20 种氨基酸残基分别在九肽 1～9 位的 Ri 值列于表 1[6]。

表 1 多项式系数

Tab 1 Coefficients of the polynomial method

Res	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	−2.38	−3.22	−2.8	−2.66	−2.89	−2.7	−2.35	−3.07	−2.47
C	−2.94	−15.0	−2.58	−1.96	−3.29	−2.22	−2.97	−2.37	−15.0
D	−3.69	−15.0	−3.46	−2.71	−2.26	−2.63	−3.61	−3.03	−15.0
E	−3.64	−15.0	−3.51	−2.65	−3.39	−3.41	−3.21	−2.63	−15.0
F	−1.89	−15.0	−2.35	−2.5	−1.34	−2.43	−2.18	−1.71	−15.0
G	−2.32	−15.0	−3.04	−2.63	−2.56	−2.3	−3.13	−2.96	−15.0
H	−2.67	−15.0	−2.58	−2.58	−2.05	−3.32	−3.13	−2.16	−15.0
I	−1.65	−2.55	−2.8	−3.44	−2.74	−2.79	−2.2	−2.69	−2.1
K	−2.51	−15.0	−3.65	−2.93	−3.34	−3.77	−2.97	−3.27	−15.0
L	−2.32	−1.7	−2.09	−2.49	−2.71	−2.63	−2.62	−2.01	−2.74
M	−0.39	−1.39	−1.79	−3.01	−3.43	−1.38	−1.33	−0.97	−2.96
N	−3.12	−15.0	−3.31	−2.22	−2.36	−2.3	−3.14	−3.31	−15.0
P	−3.61	−15.0	−2.97	−2.64	−2.42	−2.31	−1.83	−2.42	−15.0
Q	−2.76	−15.0	−2.81	−2.63	−3.06	−2.84	−2.12	−3.05	−15.0
R	−1.92	−15.0	−3.41	−2.61	−3.05	−3.76	−3.43	−3.02	−15.0
S	−2.39	−15.0	−2.04	−2.12	−2.83	−3.04	−2.73	−2.02	−15.0
T	−2.89	−3.58	−2.6	−2.48	−2.17	−2.58	−2.67	−3.14	−3.7
V	−2.44	−2.64	−2.68	−3.29	−2.49	−2.25	−2.68	−2.8	−1.7
W	−0.14	−15.0	−1.01	−2.94	−1.77	−2.77	−2.85	−2.13	−15.0
Y	−1.46	−15.0	−1.67	−2.7	−1.92	−2.39	−1.35	−3.37	−15.0

For each of the 20 amino acid residues, the amount they contribute to the polynomial score is shown (for all nine positions in which they may occur)

给定某肽，将其所有氨基酸残基对应的 Ri 值相加，如果所得总和大于选定的阈值，可推测该肽与 MHC 分子有较好的亲和力。本研究所选择的阈值为－24。

2 结果

2.1 超基序方案预测

根据超基序方案，扫描 MART-1 抗原的氨基酸序列，预测出 12 个候选表位九肽，分别是：EAAGIGILT（26～34）、AAGIGILTV（27～35）、GILTVLGV（31～39）、ILTVILGVL（32～40）、LTVILGVLL（33～41）、TVILGVLLL（34～42）、ALMDKSLHV（54～64）、SLHVGTQCA（61～69）、HVGTQCALT（63～71）、PVVPNAPPA（95～103）和 NAPPAYEKL（99～107）。

2.2 计算候选肽多项式系数

计算以上 12 个候选肽的 Sisum 结果分别是：Sisum（26～34）＝－25.24，Sisum（27～35）＝－24.89，Sisum（29～37）＝－24.75，Sisum（31～39）＝－22，Sisum（32～40）＝－23.28，Sisum（33～41）＝－24.46，Sisum（43～42）＝－23，Sisum（56～64）＝－21.44，Sisum（61～69）＝－22.03，Sisum（63～71）＝－24.17，Sisum（95～103）＝－23.37，Sisum（99～107）＝－24.06。

而扫描其它重叠九肽，Sisum 值均在－30 以下。根据所选阈值，筛选出 6 个与 MHC 分子有较高亲和力的九肽，分别是：MART-1（31～39）、MART-1（32～40）、MART-1（34～42）、MART-1（56～64）、MART-1（61～69）、MART-1（95～103）。这些九肽很有可能经 HLA-A2 呈递后，被特异性 CTL 识别。

3 讨论

CTL 在机体抗细胞内感染和抗肿瘤免疫中发挥着极为重要的作用。靶抗原需先经抗原提呈途径以“抗原肽-MHC Ⅰ类分子”的复合物形式呈现于 APC 或靶细胞表面方能被表达有特异性 TCR 的 CTL 所识别，相应的与 MHC Ⅰ类分子结合的抗原肽即为 CTL 表位。相关晶体结构学的进展加深了我们对 MHC Ⅰ类分子与抗原肽相互作用规律的认识。MHC Ⅰ类分子由一条重链和 β_2 微球蛋白组成，重链 α_1 和 α_2 结构域中的两个 α 螺旋和一个 8 片层的 β 折叠共同构成了一个两端封闭的肽结合槽（Groove），其内顺次分布着由氨基酸侧链形成的 6 个口袋（Pocket）A-F，其中在与抗原肽结合中起主要作用的是 B 和 F 两个口袋[7]。对于某型 MHC Ⅰ类分子，它所结合的抗原肽在特定位点上常出现某几个特定氨基酸残基，它们在结合中起着锚点作用。以往鉴定 CTL 表位的技术路线为：用酸洗脱法，将肿瘤细胞上与 MHC Ⅰ类分子结合的抗原肽洗脱下来，进一步观察这些抗原肽在体外是否能诱导 CTL 反应。甚至有人通过逐一合成重叠肽分别诱导 CTL 的办法来筛选 CTL 表位。这些方法显得繁琐、费时、

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

耗资大。近年来随着对 MHC Ⅰ类分子与抗原肽结合规律及结合基序认识的深入, 基于结合基序(Binding motif)预测 CTL 表位的新方法已逐步被采用及推广。现在已产生了多种基序预测方案: (1)简单基序法。1991 年 Falk 等[8] 采用肽池测序法, 发现大部分与 HLA-A2 分子有较高亲和力的九肽, 其第二位氨基酸残基为 L 或 M, 第九位为 V、I 或 L, 基于此建立的表位预测法其准确率为 30%左右, 但漏检率及假阳性率均较高; (2)延展基序法。Ruppert 等[9] 通过对大量与 HLA-A2 分子结合的多肽中的氨基酸残基出现频率的统计分析, 证明多肽与 HLA-A2 分子的有效结合不仅与简单基序有关, 还与二级锚点的存在和一些不利于结合的氨基酸残基缺失有关。基于此建立的延展基序法准确率达到了 70%。(3)超基序法。Rammensee[10] 综合了一些常见的 MHC 分子所结合的肽, 确定了大量肽基序。经深入比较研究后, 发现不少属于同一 HLA 家族, 甚至不同家族的 HLA 同种异型分子所结合的抗原肽具有相同或相似的锚着基序, 即超基序。该方法的建立大大降低了漏检率。(4)量化基序多项式法。1994 年 Parker 等[11] 提出假设: 在一个抗原肽中, 每个氨基酸相互独立地以一定结合能影响着该肽与 MHC 分子的亲和力。他们用多肽结合实验分析了 154 个九肽与 HLA-A2 分子的亲和力, 并得出一个包含 180 个系数的距阵, 其中每个系数反映了相应氨基酸在该位置时与 HLA-A2 分子的结合能。1997 年, Gulukota 等[6] 认为简单基序和延展基序对于某肽与 MHC 分子的结合并不是充分和必要的, 他们通过分析 463 个九肽与 HLA-A2 的结合能力, 进一步证明了"系数距阵"的合理性, 并提出以该方法预测表位具高灵敏度及可很好排除假阴性的特点, 故优于基序法, 可作为基序法的补充。

本研究采用超基序与多项式方案结合的方法, 预测出了 6 个理论上与 HLA-A2 分子有较高亲和力的九肽表位。在基于超基序法预测的 12 个表位中, 已有实验证实, AAGIGILTV(27～35)虽与 HLA-A2 分子仅有中到低度的亲和力, 但能诱生特异性 CTL 抗瘤效应; 而 GILTVILGV(31～39)与 ALMDKSLHV(56～64)虽与 HLA-A2 分子有较高亲和力, 却不易引发 CTL 反应, 但用预先经它们刺激过的 DC 却能诱导 CTL 反应[12]。提示: 能与 MHC Ⅰ类分子高度亲和的肽段并不一定能被 APC 中 TAP 的选择性结合, 从而不能进入经典的 MHC Ⅰ类途径, 或并不存在理想的结构与 TCR 作用, 故并不一定是真正的 CTL 表位。这些侯选表位有待进一步的体外实验筛选与鉴定。

参考文献:

[1] Kawakami Y, Battles J K, Kobayashi T, *et al*. Production of recombinant MART-1 proteins and specific anti-MART-1 polyclonal and monoclonal antibodies: Use in the characterization of the human melanoma antigen MART-1[J]. J Immunol Methods, 1997, 202(1): 13—25.

[2] Coulie P G, Brichard V, Van Pel A, *et al*. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanoma[J]. J Exp Med, 1994, 180(1): 35—42.

[3] Pérez-Díez A, Butterfield L H, Li L, *et al*. Generation of $CD8^+$ and $CD4^+$ T-cell response to dendritic cells genetically engineered to express the MART-1/Melan-A gene[J]. Cancer Res, 1998, 58(1): 5 305—5 309.

[4] Roetzschke O, Falk K, Stevanovic S, *et al*. Peptides motif of closely related HLA class I molecules encompass substantial differences[J]. Eur J Immunol, 1992, 22(9): 2 453—2 456.

[5] Sidney J, Grey H M, Kubo R T, *et al*. Practical, biochemical and evolutionary implications of HLA class I supermotifs[J]. Immunol Today, 1996, 17(6): 261—266.

[6] Gulukota K, Sidney J, Sette A, *et al*. Two complementary methods for predicting peptides binding major histocompatibility complex molecules[J]. J Mol Biol, 1997, 267(5): 1 258—1 267.

[7] Latron F, Pazmany L, Morrison J, *et al*. A critical role for conserved residues in the cleft of HLA-A2 in the presentation of a nonapeptide to T cell[J]. Science, 1992, 257(5 072): 964—967.

[8] Falk K, Rotzschke O, Stefanivic S, *et al*. Allete-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules[J]. Nature, 1991, 351(6 324): 290—296.

[9] Ruppert J, Sidney J, Celis E, *et al*. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules[J]. Cell, 1993, 74(5): 929—937.

[10] Rammensee H G, Friede T, Stevanoviic S, *et al*. MHC ligands and peptide motifs: First listing[J]. Immunogenetics, 1995, 41(4): 178—228.

[11] Parker K C, Bednarek M A, Coligen J E, *et al*. 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.

[12] Van-Elsas A, Van-der-Burg S H, Van-der-Minne C E, *et al*. Peptide-pulsed dendritic cells induce tumoricidal cytotoxic T lymphocytes from healthy donors against stably HLA-A*0201-binding peptides from the Melan-A/MART-1 self antigen[J]. Eur J Immunol, 1996, 26(8): 1 683—1 689.

(编辑　汪勤俭)

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