DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.10.016
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)10-0961-04

论著

O-糖基化 HBV Pre-$S_{(2)}$ CTL 表位分子模建及免疫学活性研究

周吉军,吴玉章,王祥智,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 研究O-糖基化(Glycosylation)修饰对HBV Pre-$S_{(2)}$上CTL表位结构及其免疫学活性的影响。方法 选择HBV Pre-$S_{(2)}$上公认的HLA-A2限制性CTL表位44~53(SILSKTGDPV),以Ser44为糖基化位点,进行计算机分子模建,并利用糖肽合成技术,固相合成α-GalNAc糖基化CTL表位,免疫BALB/c(H-2D^b)小鼠,观察其诱导CTL活性。结果 α-GalNAc-糖基化可改变表位形态使之更适宜与HLA-A2类分子结合,糖基部分基团可从HLA-A2结合沟中向外伸出。与对照组比Ser44α-D-GalNAc O-糖基化44~53肽,诱导出较强的针对经抗原预刺激P_{815}细胞的CTL应答,特别是50 μg和500 μg组,而且有明显的剂量-效应关系。结论 Ser44α-D-GalNAc-糖基化修饰能改变Pre-$S_{(2)}$上CTL表位44~53的结构,并促进特异性CTL应答,表明表位糖基化修饰可以调节CTL应答。

关键词:糖基化;HBV;CTL表位;糖肽合成;分子模建
中图法分类号:R373.21;R392.2 文献标识码:A

Molecular modelling and immunological activity of glycosylated CTL epitope of HBV Pre-$S_{(2)}$

ZHOU Ji-jun, WU Yu-zhang, WANG Xiang-zhi, SHI Tong-dong (Institute of Immunology PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of modifying O-glycosylation on the construction and immunological activity of cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope of HBV Pre-$S_{(2)}$. Methods Based on HBV Pre-$S_{(2)}$ (44~53, SILSKTGDPV, HLA-A2 restricted) α-GalNAc-glycosylated viral CTL epitope peptide sequence was built with computer; This glycosylated decapeptide were synthesized and then used to investigate their immunological activity by Balb/c(H-2D^b) mice immunization. Results By the model building of HLA-A2 and the glycosylated or unglycosylated decamer peptide complex, it was found that monosaccharide glycosylation could change the conformation of decapeptide. Ser44α-GalNAc glycosylation, increase the binding affinity and stability by hydrogen bonds and the saccharide could stretch to the outside of the HLA-A2 binding groove and might interact to TCR. After mice immunization, the results demonstrated that glycosylated decapeptide could prime stronger specific cytolysis in a dosage-dependent manner. Conclusion Ser44α-GalNAc glycosylation modification could change the construction of CTL epitope peptide sequence based on HBV Pre-$S_{(2)}$ (44~53, SILSKTGDPV, HLA-A2 restricted), and facilitate the specific cytolysis. It is demonstrated that glycosylation could regulate the CTL response.

Key words: glycosylation; HBV; CTL epitope; molecular modeling

全世界目前有3亿以上人口受乙型肝炎病毒(HBV)慢性感染。各型急慢性肝炎都与肝细胞免疫病理损伤直接相关,感染慢性化又表明机体免疫系统不能对其有效识别,产生特异性T细胞免疫。成功清除HBV感染者均表现出对HBV抗原健全的、MHC-I类限制性CTL应答。传统概念中,天然CTL表位由氨基酸侧链未修饰的短肽构成。然而有证据表明,翻译后修饰能在表位MHC结合和TCR识别水平调节CTL应答,引起不同应答后果,糖基化可干涉表位肽与限制性MHC分子结合,这种干涉包括既能完全阻断肽结合,废止肽的免疫原性,也能大大增强肽结合性而增强肽免疫原性[1,2]。这受糖基大小、种类、数量及连接在表位

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39789010)
作者简介:周吉军(1967—),男,重庆市人,博士,讲师,主要从事表位糖基化与HBV特异性CTV应答方面的研究,发表论文6篇,现在附属西南医院全军感染病研究所工作。电话:(023)68754479
收稿日期:2000-08-04;修回日期:2000-09-29

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

位置不同影响，与该位点在MHC-I类分子肽结合槽的位置有关。而T细胞的TCR具有仅通过糖基辨别糖肽的能力，糖基化也可阻碍糖肽与TCR结合[2]。认识表位糖基化对HBV特异性CTL应答影响，对研究HBV感染后所表现出免疫病理损伤和免疫逃避机制，有重要意义。本研究通过计算机分子模建和观察α-GalNAc糖基化CTL表位的免疫学活性，探索O-糖基化对表位特异性CTL应答影响。

1 研究方法

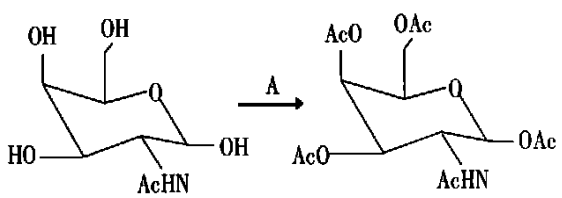
1.1 α-GalNAc糖基化CTL表位分子模建研究

表位肽诱导CTL能力与其MHC-I类分子结合亲和力呈正相关。为研究糖基化对CTL表位肽与MHC-I类分子结合影响，利用计算机软件，运用分子图形学和计算化学技术分析糖基化表位与HLA-A2分子结合特性。

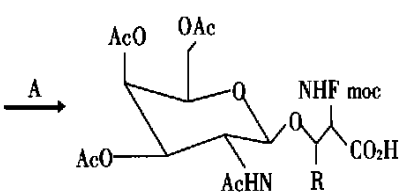
分子模建使用Silicon Graphics工作站以及Insight Ⅱ(version 2.2.0., Biosym technologies, San Diego, U.S.A)软件。选择已知HBV的HLA-A2限制CTL表位Pre-$S_{(2)}$ 44～53(SIISKTGDPV)[3]，Ser44为O-糖基化位点，选取已发现Pre-$S_{(2)}$存在的α-乙酰氨基半乳糖(α-GalNAc)[4]为目标糖。所用HLA-A2分子来自Brookhaven蛋白数据库(Protein data bank, PDB)。在已有结合数据基础上，创建三维分子模型，利用软件进行能量最小化等一系列分子力学计算。

1.2 O-糖基化CTL表位固相合成

1.2.1 糖肽合成构建单位(Building blocks)合成过程示意图为：



乙酰氨基半乳糖(Gal NAc)　　过乙酰化乙酰氨基半乳糖



过乙酰化乙酰半乳糖基化 N-Fmoc 保护氨基酸
(R = H 为 Ser; R = CH3 为 Thr)

1.2.2 O-糖基化CTL表位固相合成　过乙酰化乙酰氨基半乳糖与N-α-Fmoc保护丝氨酸，通过反相制备HPLC纯化后，作为O-连接糖肽合成的构建单位，作为在固相多肽合成仪上合成所需糖肽原料。同样选择Pre-$S_{(2)}$上CTL表位44～53，以Ser44为糖基化位点，用多肽合成仪合成α-GalNAc糖基化CTL表位肽。固相合成产物经RP-HPLC鉴定及纯化制备，并经氨基酸组分分析鉴定。

1.3 α-GalNAc糖基化Pre-$S_{(2)}$ CTL表位肽免疫学活性研究

1.3.1 免疫动物　由于该肽氨基酸结构有可能满足H-$2D^b$分子的结合基序，故选择同样表达H-$2D^b$的BALB/c小鼠和P_{815}细胞分别作为免疫对象及靶细胞。纯系雄性BALB/c(H-$2D^b$)小鼠(6周龄)分6组：3种不同剂量糖基化肽及3种剂量非糖基化肽(均分别为5、50和500 μg)，使用不完全福氏佐剂，双侧后足掌免疫。

1.3.2 淋巴细胞培养及^{51}Cr释放实验　按期分批处死小鼠，取双侧腹股沟淋巴结，分离淋巴细胞，体外培养，作为效应细胞。靶细胞选体外培养的小鼠肥大细胞瘤细胞P_{815}，实验前进行靶细胞抗原预刺激。效应细胞/靶细胞(E/T)分别为12∶1、25∶1、50∶1，γ-计数仪测cpm。计算细胞溶破率(^{51}Cr特异释放百分数)，进行统计学分析(采用析因分析)。

2 结果

分子模建的部分结果，见图1、2。α-GalNAc糖基化Pre-$S_{(2)}$ CTL表位肽免疫学活性研究部分结果，见图3、4。

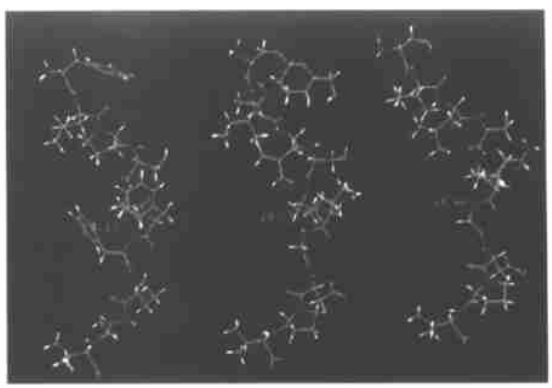


图1 3种CTL表位HLA-A2结合形态比较

Fig 1 The comparison of HLA-A2 binding configuration among three HLA-A2 binding peptides

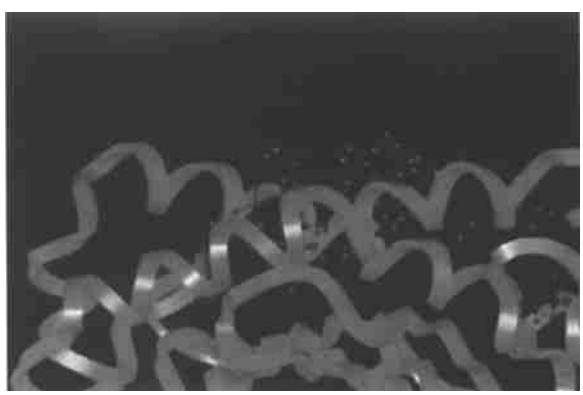


图2 显示从HLA-A2结合沟中伸出的糖肽侧链残基，可见部分糖基从结合沟中伸出

Fig 2 The configuration of the flanking residues on glycopeptide in HLA-A2 binding groove

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

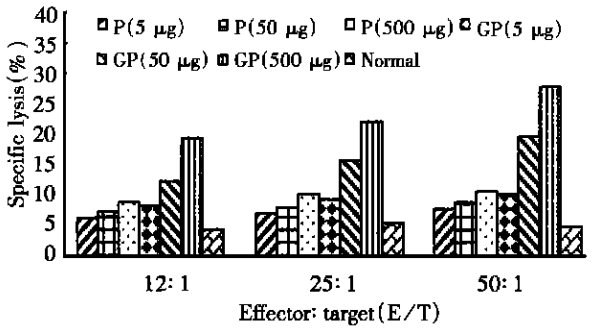


图3　免疫后第 14 天, 不同剂量 α-D-GalNAc O-糖基化 Pre-S(2) 44～53 肽和非糖基化 44～53 肽诱导特异性胞溶结果

Fig 3　The specific lysis(%) of CTL response in day 14 primed by defferent dose of peptide and glycopeptide

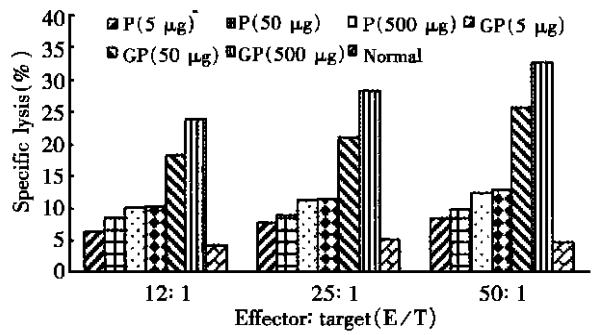


图4　免疫后第 28 天, 不同剂量 α-D-GalNAc O-糖基化 Pre-S(2) 44～53 肽和非糖基化 44～53 肽诱导特异性胞溶结果

Fig 4　The specific lysis(%) of CTL response in day 28 primed by defferent dose of peptide and glycopeptide

3　讨论

蛋白的翻译后修饰(Posttranslational modification)状态反映了其表达细胞的胞内环境, 如病毒感染、细胞恶性化或其它环境因素(包括年龄、应激、激素)均可影响胞内代谢, 导致翻译后修饰改变。糖基化是最普遍、最重要的翻译后修饰, 它不仅增强抗原肽耐受蛋白酶水解能力, 增加稳定性, 还可在不改变基因水平情况下, 导致抗原表位结构改变, 引起抗原变异或生成新表位(Neo-epitope)。α-GalNAc O-糖基化的 Ser 或 Thr(Tn 抗原)广泛存在于多种病毒和肿瘤蛋白的翻译后修饰结构中, 并能进入 MHC-I 类途径。病毒(如 HBV)和恶性化细胞有可能通过获得或丧失某些特定糖结构逃避 CTL 的选择压力, 而不依赖基因水平的突变, 因此认识糖肽在抗病毒感染和抗肿瘤免疫中的地位具有重要意义。

近年来研究表明, 糖基化结构在改变蛋白或肽的三维结构同时[5], 还可通过改变短肽表位与 MHC-I 类分子的结合及与 TCR 的交互作用影响细胞免疫。糖基化可生成新的 CTL 表位, 或相反, 废除识别[1]; 糖基化可阻断肽与 MHC-Ⅰ类分子结合, 也可通过糖基直接与 MHC 分子交互作用, 恢复结合[1]; 有的糖基可帮助 Th 细胞对抗原肽识别的精确化学定位[7]。而一些寡糖结构本身就是半抗原(Hapten), 与适当载体肽结合后, 可诱导糖或糖肽特异性 CTL[7], 甚至还可作为自身免疫原, 引起免疫性损害。如在细胞内环境压力因素作用下, 糖基化修饰发生改变, 可诱发针对自身的体液免疫或细胞免疫, 引起自身免疫疾病。如Ⅱ型胶原(Type Ⅱ collagen, CⅡ)诱导性关节炎(Collagen induced arthritis, CIA)。此外, 还发现象甘露聚糖(Mannan)融合蛋白, 可影响 Th1/Th2 平衡, 决定免疫应答主要为细胞免疫还是体液免疫。

本研究分子模建结果显示, 同肽 N-末端氨基相比, C-末端 Val 的羰基通过疏水交互作用与 HLA-A2 结合沟疏水侧链结合较紧, N 端糖基化对其影响较小。Pre-S(2) 44～53 肽与 HLA-A2 分子的结合基序是 Ile 45 和 C-末端 Val 53 二疏水氨基酸, 即 Ile 45 和 Val 53 是该 CTL 表位与 HLA-A2 分子的结合的锚残基, 其分子间距离为 19.46Å。Ser44 α-GalNAc 糖基化对 44～53 肽形态影响不大, 对 Ile 45 和 Val 53 间距影响较小, 为 20.17Å, 符合与 HLA-A2 分子的结合所需距离要求(>14Å)。因此从理论上说, Ser44 α-GalNAc 糖基化不影响锚残基与 HLA-A2 分子结合, 而且糖基还可作为氢键的供体和受体直接与 HLA-A2 分子交互作用, 这种氢键结合比疏水氨基酸与 HLA-A2 结合沟疏水侧链通过范德华力疏水交互作用结合更稳定。能量最小化计算显示, 未糖基化 Pre-S(2) 44～53 肽与 HLA-A2 分子的结合的能量, 高于 Ser44 α-GalNAc 糖基化 Pre-S(2) 44～53 肽与 HLA-A2 分子的结合的能量, 表明 α-GalNAc 糖基化 P44～53 肽与 HLA-A2 分子的结合稳定性高于未糖基化肽, 糖基提供的氢键增强了 CTL 表位肽与 MHC 结合沟结合的亲和力及稳定性。由于抗原特异性 CTL 应答存在等级性, 不同表位诱导特异性 CTL 应答能力差异主要与 APC 表面对应的 MHC-I 类分子/肽复合物表达水平有关[8], 糖基化改变 CTL 表位肽与 MHC 结合沟结合的亲和力及稳定性, 可改变 MHC-I 类分子/肽复合物表达水平, 就有可能改变原有等级性, 并产生新的等级性。另外, 糖基部分基团可从 MHC 结合沟中向外伸出, 可为与 TCR 交互作用提供了新的侧链基团, 反过来, 也不难理解如果糖基过大或过长, 则不能被

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

MHC 结合沟容纳，或形成空间障碍，阻止该肽-MHC 复合物被TCR 识别。

本研究利用糖肽合成构建单位，以固相肽合成技术合成糖肽，为获得精确糖基化结构的糖肽提供了可能，特别是为糖基化短肽的免疫学活性研究提供了简便、快捷的手段。从 RP-HPLC 色谱图看，固相合成糖肽技术，精确性好，纯度高。

实验结果看出，免疫小鼠 14、28 d 后，与对照组比 Ser44α-D-GalNAc O-糖基化 44～53 肽，诱导出较强的特异性胞溶作用，特别是 50 μg 和 500 μg 组，而且有明显的剂量－效应关系，表明 Ser44α-D-GalNAc O-糖基化 44～53 肽能与小鼠 APC 上跨膜“空”H-2D^b 分子结合，并有可能经内生小泡方式内在化和再循环而呈递。H-2D^b 限制肽与小鼠 H-2D^b 分子结合，主要利用 C-末端的疏水氨基酸残基（如 Leu、Val）和中部的具氢键供体和受体功能的亲水残基（如 Asn）作为锚残基，分别主要以范德化（Van der Waals）力和氢键与 D^b 分子结合沟 α1 螺旋上特定氨基酸残基侧链交互作用，其中对氢键数量有一定要求，如发现用 Ser 作锚残基，其侧链一个羟基形成的氢键，不能满足肽与 D^b 分子稳定结合所需数量，而用 GlcNAc 连接到该 Ser 的羟基上后，增加的氢键使糖肽能与 D^b 分子稳定结合[1]。本研究所用 44～53 肽，C-末端疏水 Val 10 可作为锚残基，而中部的 Ser4，Lys5，Thr6 3 个亲水氨基酸残基，可形成氢键或盐键，故该肽有可能与 D^b 分子。而 Ser44α-D-GalNAc O-糖基化 44～53 肽，因其糖基所新生成氢键，更有可能与 D^b 分子稳定结合。Ser44α-D-GalNAc O-糖基化 44～53 肽免疫小鼠，表现出较强胞溶活性，再加上交叉反应较弱，提示至少生成二型 T 细胞克隆，一类是糖肽的肽部分特异性，虽然肽序列未改变，但形态结构受糖基化影响而改变，所以这种肽特异性也可能是糖基化依赖的。另一类是糖肽的 α-D-GalNAc O-糖基化部分特异性。已有研究表明，一些糖肽上的糖基同样具有与肽一样同 TCR 结合位点连接的能力[9]。有关糖肽的晶体结构研究已发现，像 O-GlcNAc 这样的单糖基能够被标准 TCR-MHC 几何结构所容纳，在溶液状态下，其亲水性使其部分基团从胞膜 MHC-I 类分子结合沟中向外暴露，供TCR 直接识别。

在 HBV 感染，其 3 种表面蛋白，小蛋白 S，中蛋白 M 和大蛋白 L，均为被糖基化修饰的糖蛋白，它们是在人肝细胞的粗面内质网和 Golgi 器中被翻译后修饰而糖基化，因此和肝细胞自身合成蛋白的糖基化修饰相似，这些糖结构不仅不能被机体免疫系统识别，而且还能阻碍对肝细胞膜上病毒蛋白抗原肽表位（特别是 CTL 表位）识别，使诱导特异性 CTL 应答失败或无效 CTL 应答，导致免疫逃避或耐受，使 HBV 感染慢性化。另一方面，肝细胞感染 HBV 后，在病毒感染及其它环境压力因素综合作用下，影响胞内代谢，糖基化修饰发生改变，产生可被免疫识别的糖或糖肽结构，活化糖或糖肽特异性 CTL，该类 CTL 通过直接胞溶作用及通过细胞因子激活一系列免疫反应，引起免疫性肝损害，不同反应强度有可能导致了各型肝炎的发生。该假说需进一步研究来验证，本研究结果显示单糖糖基化对 CTL 表位免疫原性有重要影响，表明进一步探索糖基化对 HBV 特异性 CTL 应答的影响具有重要意义。

参考文献：

[1] Haurum J S, Tan L, Arsequell G, *et al*. Peptide anchor residue glycosylation: effect on class I major histocompatibility complex binding and cytotoxic T lymphocyte recognition[J]. Eur J Immunol, 1995, 25(12): 3 270－3 276.

[2] Jensen T, Galli Stampino L, Mouritsen S, *et al*. T cell recognition of Tn-glycosylated peptide antigens[J]. Eur J Immunol, 1996, 26(6): 1 342－1 349.

[3] Chisari F V, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis [J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13: 29－60.

[4] Schmitt S, Glebd D, Alving K, *et al*. Analysis of the Pre-S$_{(2)}$ N- and O-linked Glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus[J]. J Biol Chem, 1999, 274(17): 11 945－11 957.

[5] Huang X, Smith M C, Berzofsky J A, *et al*. Structural comparison of a 15 residue peptide from the V3 loop of HIV-1 IIIb and an O-glycosylated analogue[J]. FEBS Lett, 1996, 16, 393(2－3): 280－286.

[6] Bay S, Lo Man R, Osinaga E, *et al*. Preparation of a multiple antigen glycopeptide (MAG) carrying the Tn antigen. A possible approach to a synthetic carbohydrate vaccine[J]. J Pept Res, 1997, 49(6): 620－625.

[7] Abdel Motal U M, Berg L, Rosen A, *et al*. Immunization with glycosylated Kb-binding peptides generates carbohydrate-specific, unrestricted cytotoxic T cells[J]. Eur J Immunol, 1996, 26(3): 544－551.

[8] Allimore A, Hengartner H, Zinkernagel R. Hierarchies of antigen-specific cytotoxic T-cell responses[J]. Immunol Rev, 1998, 164(1): 29－36.

[9] Carbone F R, Gleeson P A. Carbohydrates and antigen recognition by T cells[J]. Glycobiology, 1997, 7(6): 725－730.

（编辑 汪勤俭）

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