DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.10.007
第22卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 10
934 2000年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)10-0934-03

肿瘤抗原MAGE-2 HLA-A2限制性CTL表位的预测

耿 淼,贾正才,万 瑛,赵建平,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 预测黑色素瘤抗原MAGE-2的HLA-A2限制性CTL表位。方法 采用超基序法与量化基序法的联合应用。结果 发现8个HLA-A2限制性CTL表位。结论 超基序法与量化基序法联合应用可以提高预测效率。

关键词:肿瘤抗原;MAGE-2;表位;预测;超基序;量化基序
中图法分类号:R392.11;R394.2 文献标识码:A

Prediction of HLA-A2 restricted CTL epitopes of tumor antigen MAGE-2

GENG Miao, JIA Zheng-cai, WAN Ying, ZHAO Jian-ping, WU Yu-zhang (Insititute of Immunology PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To predict the HLA-A2-restricted CTL epitopes derived from melanoma antigen MAGE-2. Methods HLA-A2-restricted CTL epitope of MAGE-2 was predicted by peptide supermotif prediction combined with quantitative motif. Results Eight HLA-A2 restricted CTL epitopes of melanoma antigen MAGE-2 were found. Conclusion The combination of supermotif with quantitative motif can improve the prediction efficiency.

Key words: tumor-antigen; MAGE-2; epitope; prediction; supermotif; quantitative-motif

在过去几十年里肿瘤治疗已取得了明显的进步,有些肿瘤治疗基本取得成功。但在肿瘤治疗中仍然存在特异性杀伤率很低的难题,治疗肿瘤时往往在杀伤肿瘤细胞的同时对正常细胞也有很大的损伤。因此,近年来肿瘤特异性免疫治疗的研究迅速发展。其基本原理是根据细胞毒性T淋巴细胞(CTL)可以特异的识别存在于肿瘤细胞表面的抗原多肽(这种识别受MHC Ⅰ类发子限制),当肿瘤抗原多肽在抗原提呈细胞(APC)的作用下以MHC-肽分子复合物的形式被呈递于APC表面时被CTL所识别,同时CTL也被激活增生分化为具有杀瘤活性的CTL,从而特异杀伤肿瘤细胞。基于这一理论基础,肿瘤抗原的发现以及CTL表位的鉴定成为特异性免疫治疗及肽疫苗研制的重要前提。由Boon分离出的黑色素瘤抗原MAGE-2为肿瘤特异性抗原,不仅在黑色素瘤中有高表达(70%),在其他肿瘤中也有不同程度的表达(如:咽部肿瘤、肺部肿瘤等)。因此对MAGE-2的CTL表位进行预测并制备其相应的多肽疫苗是十分有意义的。同时由于MAGE-2 CTL表位可以被HLA-A2、HLA-A3分子递呈[1,2],而我国HLA-A2阳性人群高达到50%[3],故预测MAGE-2 HLA-A2限制性表位就更具有现实意义。本研究采用超基序法与量化基序法对MAGE-2HLA-A2限制性CTL表位进行预测,为临床肽疫苗的研制提供理论基础。

1 材料方法

1.1 肿瘤抗原

肿瘤特异性抗原MAGE-2,位于X染色体q28区,含4个外显子。抗原被第4个外显子编码,编码蛋白为一分子量为48×10^3的胞浆蛋白,由314个氨基酸残基组成。

1.2 MAGE-2编码蛋白氨基酸序列(由GENBANK获得)

MPLEQRSQHC KPEEGLEARG EALGLVGAQA PATEEQQTAS SSSTLVEVTL GEVPAADSPS PPHSPQGASS FSTTINYTLW RQSDEGSSNQ EEEGPRMFPD LESEFQAAIS RKMVELVHFL LLKYRAREPV TKAEMLESVL RNCQDFFPVI FSKASEYLQL

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800170)

作者简介:耿 淼(1973-),女,山东省滨洲市人,硕士研究生,主要从事肿瘤疫苗方面的研究。电话:(023)68752236

收稿日期:2000-08-04;修回日期:2000-09-27

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

VFGIEVVEVV　PISHLYILVT　CLGLSYDGLL　GDNQVMPKTG
LLIIVLAIIA　IEGDCAPEEK　IWEELSMLEV　FEGREDSVFA
HPRKLLMQDL　VQENYLEYRQ　VPGSDPACYE　FLWGPRALIE
TSYVKVIHHT　LKIGGEPHIS　YPPLHERALR　EGEE

1.3　CTL 表位预测的超基序方案

超基序是指在同一 HLA 家族, 甚至不同家族的 HLA 同种异性分子接纳的抗原肽具有相同或相似的锚着残基构成的肽基序[4,5], 超基序主要作用的锚点残基是位于肽链 2 位(P2)氨基酸残基及羧基末端 9 位(P9)氨基酸残基。当 P2、P9 的残基为 V、I、L、M、T 时, 与 HLA-A2 分子有高的亲和力。

1.4　量化基序法

量化基序法基于的原理是在抗原肽与 HLA-A2 分子的结合中, 抗原肽的侧链效应(锚定, 抑制或中性), 主要依赖与相应的氨基酸残基在肽中所处的位置, 而受相邻的氨基酸残基影响较小。这在一定的范围内可以假设在一个多肽序列中, 每个氨基酸残基相互独立且影响整个肽与 MHC1 类分子的结合, 而该抗原肽的结合能就是每个位置氨基酸残基结合能的综合。基于这种假设, 1993 年 Parker 等[6]用肽结合实验分析 154 个九肽与 HLA-A2 分子的亲和力, 并得到一个包含 180 个系数的结合矩阵, 见表 1, 其中每一个系数反应了相应氨基酸残基在该位置时的相应结合能。对于某测定多肽各位置相应氨基酸残基结合系数相乘再乘标准系数 0.151, 即为该肽与 HLA-A2 的结合力, 当结合系数大于或等于 5 可以确定为与 HLA-A2 分子结合稳定, 反之认定为结合不稳定。本研究采用 HLA-A2 分子的结合矩阵, 对超基序法预测出的 CTL 表位进一步采用量化基序进行进一步的验证, 以寻求结合最好的表位。

表 1　**HLA-A2** 分子限制九肽结合系数

Tab 1　Nonapeptides binding coefficients restricted by HLA-A2 molecule

Amino acid	Residue position within the peptide								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
B	0.597	0.500	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.010
D	0.041	0.500	0.726	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.010
E	0.578	2.840	0.054	1.000	0.756	3.246	0.820	1.000	0.015
F	1.000	0.500	11.383	0.027	6.004	4.369	6.383	1.000	0.009
G	0.044	0.500	0.088	1.000	0.804	1.060	0.105	1.000	0.009
H	1.000	0.500	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.010
I	3.465	10.151	1.849	0.078	1.000	1.000	1.000	1.000	0.534
K	1.000	20.524	0.024	1.000	2.085	0.239	0.603	1.000	0.015
L	1.000	103.183	3.685	0.646	1.000	1.000	1.000	1.000	2.357
M	1.000	57.920	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.501
N	1.000	0.542	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.009
P	1.000	0.500	1.261	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.010
Q	1.000	10.006	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.010
R	1.000	0.500	0.033	1.000	1.000	1.000	0.277	1.000	0.010
S	1.000	0.500	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.009
T	1.000	6.080	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.009
V	1.000	5.919	2.173	1.000	1.000	2.588	1.120	0.293	4.884
W	1.000	0.500	12.978	1.000	2.680	0.251	5.951	1.000	0.010
Y	1.000	0.500	7.613	1.000	8.002	3.470	1.000	1.000	0.009

2　结果

2.1　超基序法预测结果

预选出 35 个符合 P2(V、I、M、L、T)、P9(I、L、V、M、T)的 MAGE-2 HLA-A2 限制型 CTL 表位, 分别为:

(1)GLEARGEAL(15—23)　(2)KMVELVHFL(112—120)
(3)QLVFGIEVV(159—167)　(4)HLYILVTCL(174—182)
(5)CLGLSYDGL(181—189)　(6)VMPKTGLLI(195—203)
(7)GLLIIVLAI(200—208)　(8)LLIIVLAII(201—209)
(9)FLWGPRALI(271—279)　(10)PATEEQQTA(31—39)

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

(11)TASSSSTLV(38－46) (12)GASSFSTTI(67－75)
(13)RAREPVTKA(125－133) (14)KAEMLESVL(132－140)
(15)KASEYLQLV(153－161) (16)RALIETSYV(276－284)
(17)AISRKMVEL(108－116) (18)PISHLYILV(171－179)
(19)YILVTCLGL(176－184) (20)LIIVLAIIA(202－210)
(21)IIVLAIIAI(203－211) (22)IIAIEGDCA(208－216)
(23)KIWEELSML(220－228) (24)LIETSYVKV(278－286)
(25)LVGAQAPAT(25－33) (26)LVEVTLGEV(45－53)
(27)EVTLGEVPA(47－55) (28)MVELVHFLL(113－121)
(29)VVPISHLYI(169－177) (30)QVMPKTGLL(194－202)
(31)SVFAHPRKL(237－245) (32)YVKVIHHTL(283－291)
(33)QTASSSSTL(37－45) (34)VTLGEVPAA(48－56)
(35)KTGLLIIVL(198－206)

随后对预选出的35个HLA-A2限制的表位进行量化处理,寻找最好的结合。

2.2 量化基序法结果

利用九肽矩阵对每一个多肽结合系数运算。根据多肽的结合系数,我们发现9个HLA-A2限制型的CTL表位,其中KMVELVHFL(112－120)(401.66)为结合最好表位,此表位已被鉴定[1]。其他8个新表位分别是:
KIWEELSML(220－228)(122.82);FLWGPRALI(271－279)(108.05);
PISHLYILV(171－179)(25.99);KASEYLQLV(153－161)(20.45);
YILVTCLGL(176－184)(13.31);AISRKMVEL(108－116)(8.44);
SVFAHPRKL(237－245)(6.64);VTLGEVPAA(48－56)(6.62)。

3 讨论

近几年来对肿瘤多肽疫苗的研究已具有了巨大的进展,有一些多肽疫苗已进入临床Ⅱ期,并取得了良好的疗效。因此预测更多的CTL表位,已变得十分迫切。而我国属HLA-A2高阳性区,HLA-A2限制的CTL表位的预测与鉴定更具有现实意义。从1991年Falk[7]总结发现了大部分与HLA-A2有较高亲和力的九肽的第二位残基与第九位残基的特点建立了基序方案,到近期建立的人工神经网络预测法,越来越多的CTL表位预测方法已相继建立,本实验采用超基序法与量化基序法就是其中的两种基本方法。

超基序法是根据Rammensee等于1995年首次公布了一些常见HLA分子的配体及相应的肽基序(Peptide motif),进而研究发现,不少属于同一HLA家族,甚至不同家族的HLA同种异型分子(Allomorpgh)所接纳的抗原肽可有相同或相似的锚点氨基酸残基,具有这种残基的肽基序,称为结合抗原肽的超基序(Supermotif),因此建立了超基序法[8]。1993年Parker根据多肽中每个位置的氨基酸残基的相对独立结合效应将影响整个多肽的结合效应这一假设建立了九肽HLA-A2分子限制的结合矩阵,从而对CTL表位预测进行量化描述。超基序预测CTL表位虽然克服了以往采用简单基序法易产生的假阴性结果,但由于此预测法与基序法具有相同的弱点,即在预测中仅仅考虑了二、九位残基的影响而忽略了其它位点的残基结合情况,易出现假阳性。因此本实验采用超基序法与量化法基序法联合应用,对黑色素肿瘤MAGE-2的HLA-A2型分子限制CTL表位的进行预测,利用量化基序法对每一个位点氨基酸残基的结合力进行量化,分析这一优点,大大提高了预测效率。首先采用超基序法对所有可能成为MAGE-2抗原的HLA-A2型CTL表位进行初步筛选,发现符合的CTL表位有35个。然后再采用量化基序法,应用HLA-A2分子限制型九肽结合矩阵对9个表位进行定量计算且排序,发现结合最好的九肽表位为KMVELVHFL(112－120),此表位已经证实为MAGE-2抗原的HLA-A2型分子限制表位。对其它8个结合较好的新表位,拟进一步进行分子模拟与细胞杀伤实验验证,为多肽疫苗的研制提供更可靠的依据。

参考文献:

[1] Visseren M J, van der Burg S H, van der Voort E I, *et al*. Identification of HLA-A0201-restriction CTL epitopes encoded by the tumor-specific MAGE-2 gene product[J]. Int J Cancer, 1997, 73(1):125－130.

[2] Meintyre C A, Ress R C, Platts K E, *et al*. Identification of peptide epitopes of MAGE-1,-2,-3 that demonstrate HLA-A3-spetific binding[J]. Cancer Immunol Immunother, 1996, 42(4):246－250.

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

[4] 周光炎, 范丽安. HLA:新的进展和新的起点——记第九届国际组织相容性会议[J]. 上海免疫学杂志, 1996, 16(6):321－324.

[5] Sideny J, Grey H N, Kub R T, *et al*. Practical biochemical and evolutionary implications of discovery of HLA class Ⅰ supermotifs[J]. Immunol Today, 1996, 17(6):261－266.

[6] Parker K C, Bednarek M A, Coligan J E. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides base on independent binding of individual pepide side-chains[J]. J Immunol, 1994, 152(1):163－175.

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

[8] 汪泽厚, 朱锡华. HLA分子的超型、结合的超基序及其意义[J]. 免疫学杂志, 1999, 15(20):131－136.

(编辑 汪勤俭)

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