DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.05.008

人 Fas抗原死亡表位分析*

宋建勋** 朱锡华 陈克敏*** (第三军医大学基础医学部免疫学教研室、全军免疫学研究所) 重庆,400038

提 要 目的: 分析确定人 Fas(H-Fas)抗原具有死亡效应的表位区域。方法: 采用可及性方案、可塑性方案,结合抗原性方案、二级结构方案预测 H-Fas抗原 B细胞表位。Fmoc固相合成法合成部分预测表位肽段并鉴定后,经固相 ELISA确定是否与具有诱导细胞凋亡(PCD)的抗人 Fas mAb 2A1、DX2、CH-11反应。结果: H-Fas抗原胞外区的 B细胞表位可能位于 N-末端氨基酸(AA)残基 51~78,102~110,145~157等区域内或它们附近。用 Fmoc固相合成法合成 N-末端 AA残基 2~15,50~83肽段,毛细管电泳鉴定合成效率,AA序列分析仪检测合成序列组成正确后,经固相 ELISA法检测,抗人 Fas mAb 2A1、DX2、CH-11均不识别 N-末端 100个 AA内肽段。结论: H-Fas抗原死亡表位可能界定在 100~157区域。

关键词 Fas抗原表位;细胞凋亡;死亡信号
中图法分类号 R392.11

Fas抗原是现今已知的细胞膜表面具有诱导细胞凋亡能力最重要的分子之一,又称"死亡分子",与"存活分子" Bcl-2相互拮抗,成为近年细胞凋亡领域研究的一对热点[1]。抗 Fas单克隆抗体(mAb)或 Fas配体(FasL)与 Fas抗原结合可以诱导 Fas^+ 敏感细胞的凋亡。Fas抗原与抗 Fas mAb或 FasL结合后引起 Fas抗原胞内区死亡域交联,启动死亡信号的传导,其传导可能与蛋白激酶、蛋白酶、神经酰胺、Ca^{2+} 等有关[2]。传导途径与肿瘤坏死因子受体(TNFR)不同,受到多方面调控,包括:① 蛋白激酶及蛋白磷酸酶的磷酸化、去磷酸化调节;② Fas抗原死亡信号中的蛋白酶调控,又包括转录水平调节、翻译后修饰及其它调变剂的相互作用;③ Bcl-2、Bcl-X_L 等的拮抗凋亡作用等[3]。Fas抗原表位与信号传导关系密切,不同的表位启动的信号传导效果有差异,其中有的表位是启动死亡信号传导所必需[4]。抗人 Fas mAb 2A1、DX2、CH-11能诱导 Fas^+ 敏感细胞凋亡,那么,其所识别的 H-Fas抗原胞外区表位与死亡信号传导必定相关。明确能诱导 Fas^+ 敏感细胞凋亡的 Fas抗原表位对于 Fas抗原信号传导机制的研究,尤其是死亡信号传导的早期事件具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 多肽合成用试剂 Fmoc氨基酸、HMP树脂、哌啶等均为 PE公司产品。

1.1.2 抗体 鼠抗人 Fas mAb 2A1(自制,IgG_1),鼠抗人 Fas mAb CH-11(Kamiya,IgM,我室访美学者郑力新赠送),鼠抗人 Fas mAb DX2(PharMingen,IgG_1),HRP-羊抗鼠 IgG(华美),小鼠 IgG、IgM对照(华美)。

1.1.3 抗原 可溶性重组人 Fas标准蛋白(SrFas,PharMingen)。

1.1.4 主要仪器 多肽合成仪: ABI 431A(Applied Biosystems);毛细管电泳仪: CE300(Bio-Rad);氨基酸序列分析仪: 121MB型(Beckman);酶联检测仪: Model 3550(Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 H-Fas抗原胞外区 AA序列 根据 Itoh等[5](1991)及 Oehm等[6](1992)克隆的人细胞表面 Fas抗原 cDNA基因序列推导得知。

***** Sequence: H-FAS(extracellular domain) *****

Sequence length 157 Residues

10	20	30	40	50	60	70	80	90
RLSSKSVNAQ	VTDINSKGLE	LRKTVTTVET	QNLEGLHHDG	QFCHKPCPPG	ERKARDCTVN	GDEPDCVPCQ	EGKEYTDKAH	FSSKCRRCRL
100	110	120	130	140	150	160	170	180
CDEGHGLEVE	INCTRTQNTK	CRCKPNFFCN	STVCEHCDPC	TKCEHGIIKE	CTLTSNTKCK	EEGSRSN		

图 1 H-Fas抗原胞外区 AA序列

Fig 1 AA sequence of human Fas extracellular domain

* 全军"九五"重点项目,No. 96Z038
** 宋建勋,男,32岁,讲师,博士
*** 美国哥伦比亚大学

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

1.2.2 可及性方案和可塑性方案的预测方法 采用 Gold-key软件(北京军事医学科学院吴加金等编制),把 H-Fas抗原胞外区 AA序列输入第一工作区,用 7个 AA这一组的分析参数。两种方案的各残基指数参照文献全部在计算机上进行,高于阈值的峰为预测出的位点。

1.2.3 H-Fas多肽的顺序选择及化学合成 根据对 H-Fas抗原 B细胞表位的预测结果,选择 H-Fas抗原 N末端 AA残基 2~15, 50~83作为合成肽序列,并命名为 P14, P34,序列如下:

P14: NH_2-LSSKSVNAQVTDIN-COOH

P34: NH_2-GERKARDCTVNGDEPDCVPCQEGKEYTD KAHFSS-COOH

P14主要是作为 P34合成的对照。用 Fmoc固相合成法在 Applied Biosystems 431A多肽合成仪上进行。成肽反应用 DCC/HOBt法,肽链从 C端向 N端延伸。经保护肽树脂合成,切割与脱保护,分离与纯化获得 P14, P34合成产物。

1.2.4 H-Fas多肽合成产物鉴定 取少量多肽样品行毛细管区带电泳(CZE),电泳条件为:电泳缓冲液为 0.1 mol/L磷酸钠缓冲液,pH4.5,毛细管规格为 48 cm×50 μm,真空进样 1.0 s(20 Psi),电压 10 kV,电流 10μA,整合波长 200 nm,电泳方向从正极到负极。另取少量多肽样品经 6 mol/L HCl酸解后,用 Beckman 121MB型 AA序列分析仪进行 AA组成分析。

1.2.5 酶联免疫吸附测定(ELISA) 按常规固相 ELISA方法。简言之,用包被缓冲液(0.85 mol/L, pH7.6碳酸钠缓冲液)将合成肽 P14 P34稀释至 40μg/ml,包被 96孔酶联检测板(Corning),100μl/孔,37℃,水浴 1 h 弃去孔内液体,用洗涤缓冲液(pH7.4 PBS)洗涤,拍干。等量 SrFas包被酶联板作为对照。分别加入鼠抗人 Fas mAb 2A1 DX2 CH-11及正常小鼠 Ig对照 100μl/孔(1∶40稀释),37℃,水浴 1 h,同上洗涤,拍干。加 HRP酶标第二抗体 100μl/孔(1∶50稀释),置 37℃,水浴 1 h,同上洗涤,拍干。加新鲜配制的 O-邻苯二胺(OPD)-H_2O_2底物液,显示。于酶联检测仪上测定各孔 490 nm处的 D_A值。

2 结果

2.1 可及性方案和可塑性方案的预测结果

N末端 AA残基第 4~38, 45~55, 58~62, 68~81, 93~94, 102~108, 142~154为可及性区域,以 50 75 105 155残基附近可及性程度为高,可能位于 H-Fas抗原表面,见图 2 N-末端 AA残基 4~5, 14~18, 22~34, 47~54, 60~63, 69~74, 81~82, 102~110, 142~154为可塑性区域,以 50 105 155残基附近可塑性程度为高,可能具有一定柔韧性,见图 3

2.2 H-Fas B细胞表位预测结果

综合上述 2个方案的预测结果,结合抗原性预测、二级结构预测及表位预测方法结果,得出 H-Fas抗原的 B细胞表位可能位于 N末端 AA残基 51~78, 102~110, 145~157区域或它们附近(未考虑糖链的影响)。

2.3 P14 P34多肽合成

两种多肽合成产物经 AA序列分析仪测定后,其序列组成与选择顺序相同。毛细管电泳后经微积分显示其合成效率 P14为 30.13%, P34为 83.26%,见图 4

2.4 固相 ELISA鉴定

虽然抗人 Fas mAb 2A1 DX2 CH-11均识别 SrFas蛋白,但它们均不与合成肽 P14 P34反应,IgG IgM对照均为阴性结果,见图 5 说明抗人 Fas mAb 2A1 DX2 CH-11所识别的 Fas表位均不在 P34肽段内。

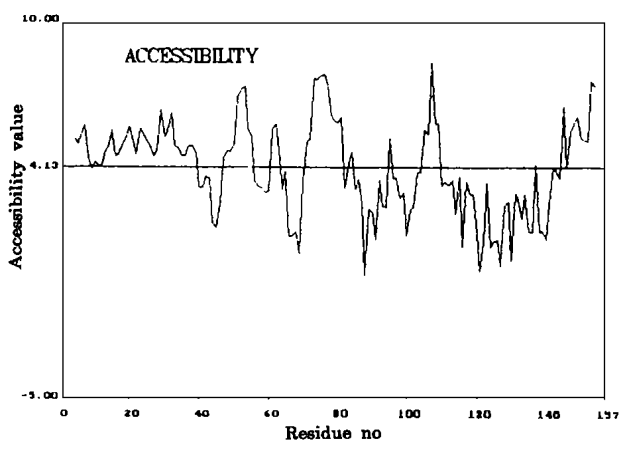


图 2 人 Fas抗原可及性预测

Fig 2 Accessibility prediction of H-Fas

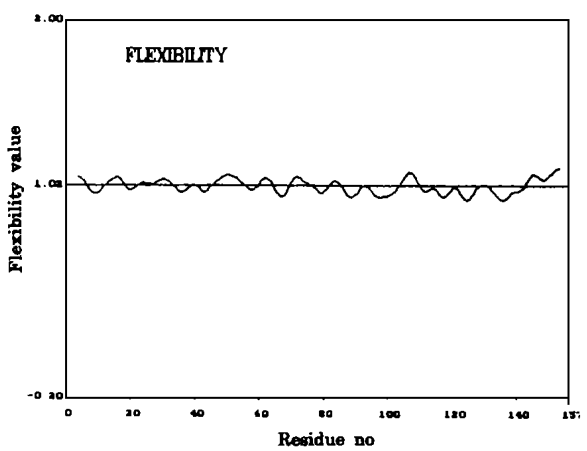


图 3 人 Fas抗原可塑性预测

Fig 3 Flexibility prediction of H-Fas

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

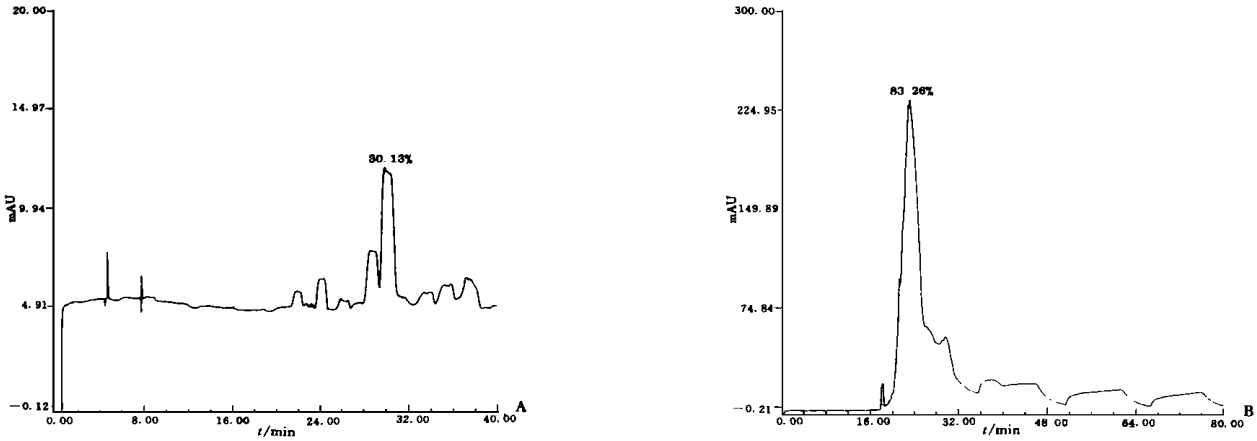


图 4　合成肽毛细管区带电泳分析结果　　A. P14　　B. P34

Fig 4　Analysis of synthetic peptides by capillary zone electrophoresis　　A. P14　　B. P34

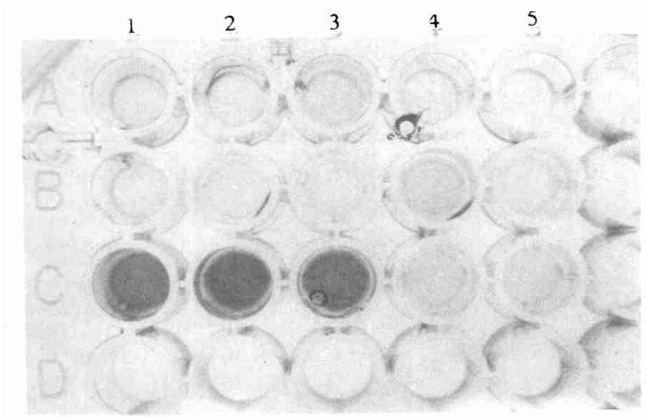


图 5　P14 P34的 ELISA分析结果

Fig 5　Analysis of P14, P34 by Elisa

A. P14　B. P34　C. SrFas

1. CH-11　2. DX2　3. 2A1　4. IgG control　5. IgM control

3　讨论

B细胞识别蛋白抗原时,是以其表面的 B细胞抗原受体(BCR)与蛋白抗原表位(抗原决定簇)结合,此过程与抗原抗体的结合相同。B细胞蛋白抗原表位的预测自从 80年代 Hopp& Woods提出亲水性参数对抗原表位预测的方法以来,已有许多参数、算法发表,对 B细胞蛋白抗原表位研究起到巨大的推动作用。现今已被大众认可并具有较好预测效果的方法,主要有 6种:① 亲水性方案(Hydrophilicity),尤以 Hopp & Woods方案最为有名。认为蛋白抗原各 AA残基可分为亲水残基和疏水残基两类。在机体内,疏水性残基一般埋在蛋白内部,而亲水性残基位于表面,因此蛋白的亲水部位与蛋白的抗原位点有密切的联系。Hopp& Woods方案是以残基由有机相环境转移到水相环境的自由能为依据计算各个 AA的亲水性。现已明确,亲水性部位与表位并无很好的一致性,即高亲水部位不一定是表位,表位也不一定是亲水性部位[7]。② 可及性方案(Accessibility),指蛋白抗原中 AA残基被溶剂分子接触的可能性,它反映了蛋白抗原内、外各层各残基的分布组成。③ 抗原性方案(Antigenicity)。认为除亲水性 AA残基外,疏水性 AA残基也经常出现在表位中,各残基在蛋白抗原位点中的相对出现率对抗原表位的定位预测有一定意义。许多蛋白抗原表位研究已证实,疏水性 AA残基对表位形成亦有贡献。④ 可塑性方案(Flexibility)。指蛋白抗原构象不是刚性不变的,其多肽骨架有一定程度的活动性。⑤ 电荷分布方案(Charge distribution)。认为对碱性抗原特异的抗体多趋于酸性,对酸性抗原特异的抗体多趋于碱性。但现在理解电荷作用引起的只是非特异性结合。⑥ 二级结构预测(Secondary structure)。认为β转角结构为凸出结构,多出现在蛋白抗原表面,利于与抗体嵌合,较可能成为抗原表位。α螺旋、β片层结构规则,不易变形,较难嵌合抗体,一般不作为抗原位点[8,9]。预测 B细胞蛋白抗原表位一般以上述多种方案综合考虑,尤以可及性方案、可塑性方案、抗原性方案及二级结构预测为重要。概括而言,作为 B细胞蛋白抗原的表位首先应易于位于或移动于蛋白抗原表面,有利于与 B细胞抗原受体或抗体结合,另外,要有一定柔韧性,因为抗原与抗原受体或抗体结合有一个嵌合的过程。

Fas抗原能引起免疫应答的表位(功能性表位)位于其胞外区,其跨膜区和胞内区因存在空间位阻,不能成为其功能性表位。H-Fas抗原胞外区 157个 AA,分子量为(17.573± 8)× 10^3u(8× 10^3u为存在的潜在的糖链分子量),理论上应存在 4~ 6个功能性表位,即能被 B细胞识别,或与抗体结合。经过可及性方案、可塑性方案以及抗原性方案、二级结构预测、表位分析预测等综合考虑可能位于 N-末端 AA残基 51~ 78, 102~ 110, 145~ 157等区域内或它们附近。这是一个比较粗的预测结果,只是排除了一些不易成为 H-Fas抗原表位的肽段。至于其精细表位(4~ 9个 AA残基)的确定

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

可以在明确表位所在区域后,进一步采用交叠肽合成方法分析,并随分析的进行,合成的交叠肽逐渐缩短,以至最后确定 H-Fas抗原的精细表位[10]。

从实验结果看,抗人 Fas mAb均不识别 P14和 P34合成肽段,说明具有诱导 PCD的抗人 Fas mAb所作用的 H-Fas抗原表位不在靠近 N末端的 100个 AA内。已有实验证实,H-Fas抗原 N-末端 49个 AA与 Fas抗原三聚化(Trimerization)有关,是特异性 FasL与 Fas抗原结合并诱导 PCD的部位[11]。即能起生物学功能作用的抗人 Fas mAb识别的 H-Fas抗原表位在靠近胞膜区的 50个 AA左右的区域内。这 50个 AA左右区域内的某些表位是具有诱导 PCD的抗人 Fas mAb作用域,根据其 MW估计,可能有 1~ 3个功能性表位。精确分析、明确这 1~ 3个表位,对 H-Fas抗原死亡信号传导具有重要意义。

H-Fas抗原靠近胞膜区的 50个 AA左右的区域根据上述预测方案分析,可能有 2个表位形成区,即 N-末端 AA残基 102~ 110, 145~ 157,但由于这一区域有 2个潜在的 N-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr, 102位和 120位),对表位形成有一定影响,可能会改变或形成新的表位。因此,具有诱导 PCD的抗人 Fas mAb所作用的 H-Fas抗原表位在 N-末端 AA残基 100~ 157区域内。这与已证实抗人 Fas mAb CH-11所作用的表位在 N-末端 AA残基 126~ 135部位相一致[12]。能够诱导细胞凋亡的抗人 Fas mAb所作用的 H-Fas抗原表位可以界定在 N-末端 AA残基 100~ 157区域内,至于其作用的精细表位还待进一步研究。

参考文献

1 Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. Science, 1995, 267(5023): 1449

2 Ju S T, Panka D J, Cui H, *et al*. Fas (CD95) /FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. Nature, 1995, 373(6513): 444

3 朱锡华. Fas系统研究进展. 中华微生物学与免疫学杂志, 1996, 16(2): 77

4 宋建勋,朱锡华. Fas抗原表位与死亡信号传导的关系. 免疫学杂志, 1997, 13(3): 206

5 Itoh N, Yonehara S, Ishil A, *et al*. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell, 1991, 66(4): 233

6 Oehm A, Behrmann I, Falk W, *et al*. Purification and molecular cloning of the Apo-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. J Biol Chem, 1992, 267(15): 10709

7 吴玉章,朱锡华. 蛋白质抗原表位的研究. 科学, 1994, 185(1): 93

8 Shih D T, Boettiger D, Buck C A. Epitopes of adhesion-perturbing monoclonal antibodies map within a predicted alpha-helical domain of the integrin beta 1 subunit. J Cell Sci, 1997, 110(20): 2619

9 Barlow D J, Edwards M S, Thornton J M, *et al*. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. Nature, 1986, 322(6081): 747

10 Gershoni J M, Stem B, Venisova G. Combinatorial libraries, epitope structure and the prediction of protein conformations. Immunol Today, 1997, 18(3): 108

11 Papoff G, Cascino I, Eramo A, *et al*. An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death *in vitro*. J Immunol, 1996, 156(3): 4623

12 Fadeel B, Thorpe C J, Chrodi F, *et al*. Mapping of the linear site on the Fas/Apo-1 molecule targeted by the prototype anti-Fas mAb. Int Immunol, 1995, 7(10): 1967

(收稿: 1998-06-27;修回: 1990-01-11)

(编辑 冷怀明)

Analysis of the death epitope in human Fas antigen*

Song Jianxun, Zhu Xihua, Chen Kemin (Institute of Immunology PLA, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To study the death epitope of human Fas (H-Fas) antigen extracellular domain. Methods: B cell epitopes of H-Fas antigen were predicted with accessibility and flexibility schemes associated with antigenicity, secondary structures and epitope analysis scheme. H-Fas antigen N-terminal residues 2~ 15 and 50~ 83, designated B14 and P34 peptides, were synthesized with peptide synthesizer and observed whether they could be recognized by anti-H-Fas mAb 2A1, DX2 and CH-11 which could induce apoptosis of Fas-sensitive cells. Results: B cell epitopes were likely at or adjacent to H-Fas antigen N-terminal residues 51~ 78, 102~ 110 and 145~ 157. H-Fas antigen N-terminal residues 1~ 100 could not be bound to anti-H-Fas mAb 2A1, DX2 and CH-11. Conclusion: The death epitope of H-Fas antigen is probably localized in the Fas N-terminal residues 100~ 157.

Key words Fas antigen; epitope; apoptosis/PCD; analysis

* This project was supported by the "Ninth five" obligatory budget of PLA, No. 96Z038

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net