

T 细胞功能学与结构免疫学结合方法 鉴定 HLA-A2 限制性的细胞毒性 T 淋巴细胞表位富集区

刘 军¹, 齐建勋¹, 高 峰², 严景华¹, 高 福¹

1. 中国科学院微生物研究所病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101
2. 中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101

摘要 T 细胞表位在抗病毒的 T 细胞免疫中发挥核心作用, 目前已在多种病原微生物的蛋白序列上发现存在 T 细胞表位的聚集现象。本文建立了一套功能学与结构学结合的策略鉴定病原体上细胞毒性 T 细胞 (Cytotoxic T Lymphocyte, CTL) 表位富集区的方法, 并以严重急性呼吸道综合征 (SARS) 相关冠状病毒 (SARS-CoV) 的 M 蛋白为例, 成功地鉴定了一个 HLA-A2 限制性的表位富集区。首先通过生物信息学的方法预测并合成 M 蛋白跨膜区的 HLA-A2 潜在结合多肽, 通过体外复性实验和 T2 细胞结合实验验证多肽与 HLA-A2 的结合力; 然后在 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠中检测这些多肽的免疫原性; 最后通过 X 射线衍射技术, 成功解析了其中一条多肽与 HLA-A*0201 的复合物结构, 其结构显示该多肽具有典型的 HLA-A*0201 表位的结构特点, 但却呈现出与以往鉴定多肽不同的构象和锚定残基。本文对于理解机体对 SARS-CoV 等病原体产生的 T 细胞免疫反应, 以及为更广泛的人群设计 T 细胞疫苗具有重要意义。

关键词 细胞免疫; 表位富集区; 主要组织相容性复合物; HLA-A2; 晶体结构

中图分类号 Q939.91

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.27.001

Functional and Structural Definition of a Clustering Region of HLA-A2-restricted Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes

LIU Jun¹, QI Jianxun¹, GAO Feng², YAN Jinghua¹, GAO George Fu¹

1. CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China
2. National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract T cell epitopes play an important role in the anti-virus specific T cell immunity. Currently, the phenomenon of T cell epitope clustering is reported among different pathogenic microbes. Here, a strategy is established to identify Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) epitope clusters region with the combined functional and structural methods. And by using this strategy, a HLA-A2-restricted epitope cluster in SARS-CoV M protein is successfully defined. Firstly, the computer-assisted algorithm was utilized to predict a series of potential HLA-A2 binding peptides around the sequences of two previous identified HLA-A2 epitopes Mn2 and Md3 in the transmembrane domain of SARS-CoV M protein. The HLA-A2 binding affinities of these peptides were accessed through *in vitro* refolding assay and T2 cell binding assay. Consequently, antigenicity of the peptides was confirmed by ELISPOT by using transgenic mice immunized with peptide Mn2 or DNA vaccine of M protein. Furthermore, the crystal structure of HLA-A*0201 complexed with peptide Md3-C9 was determined. And the structure shows that the peptide is presented in a traditional conformation of HLA-A2 restricted peptides, however is different from the previously-determined structure of Md3. The result is a great help to understand anti-

收稿日期: 2011-08-23; 修回日期: 2011-09-04

基金项目: 国家自然科学基金创新研究群体项目 (81021003); 《科技导报》博士生创新研究计划项目 (kjdb20090102-4)

作者简介: 刘军, 博士研究生, 研究方向为预防医学和 T 细胞免疫学, 电子信箱: liuj333@gmail.com; 高福 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: M200269402S), 研究员, 研究方向为病原微生物和结构免疫学, 电子信箱: gaof@im.ac.cn



virus T cell responses and might pave a new way for the T cell-related vaccines for a broader population.

Keywords cell immunity; epitope clustering region; MHC; HLA-A2; crystal structure

0 引言

近年来,病毒性传染病在世界范围内不断暴发和流行,引起这些疾病的病原体有变异或重组的病毒,如A型流感病毒H5N1、H1N1等^[1-4],也可能是新发的病毒,如SARS相关冠状病毒(SARS-CoV)^[5],这些疾病的流行严重危害人类健康,给人类社会带来巨大的损失。

在抵抗病毒的过程中,人体的T细胞免疫发挥着举足轻重的作用^[6]。失去T细胞免疫力的保护,机体将丧失对多种病原体的抵抗能力^[7]。T细胞通过识别由抗原呈递细胞(APC)加工呈递到组织相容性复合物(MHC)分子上的表位多肽,活化增殖,发挥其免疫功能,杀伤被病毒感染的细胞,最终达到清除病毒的目的。T细胞表位抗原多位于蛋白的内核或跨膜蛋白的跨膜区,这些位置的氨基酸不容易发生突变^[8]。近期,以激发T细胞免疫反应为主的疫苗在流感病毒的防控方面取得重要进展^[9],人们因而开始重新审视T细胞免疫在病毒免疫中的重要作用,T细胞表位的鉴定及相关疫苗的研发方兴未艾^[6,10]。

近年来,在多种病原微生物的蛋白序列上发现T细胞表位的聚集现象^[11-13],这种表位的聚集不仅表现为某一个体的抗原呈递细胞可以加工呈递某一区域的多个T细胞表位,而且表现为具有不同的人类白细胞抗原(Human Leukocyte

Antigen,HLA)型别的个体都利用同一区域的重叠多肽或邻近的多肽进行T细胞应答。这一发现为T细胞表位疫苗的研究和开发提供了新的思路。

在先前的研究中曾在SARS-CoV的M蛋白上鉴定了2条HLA-A2限制性表位Mn2和Md3^[14],这两个表位相互靠近,都位于M蛋白的跨膜区。通过进一步分析,发现这一区域多数多肽仍然具有典型的HLA-A*0201限制性的锚定残基,故有必要进一步研究这些多肽是否具有免疫原性。本文以SARS-CoV的M蛋白的跨膜区为例,对HLA-A2限制性的细胞毒性T细胞(CTL)表位富集区进行了相应的功能学与结构学研究。

1 材料与方法

1.1 多肽预测与合成

以SARS-CoV的M蛋白(SARS-CoV Strain TJF,GenBank:AY654624)为例,对其跨膜区的HLA-A2潜在表位进行预测,表位多肽的预测使用BIMAS的网站进行(http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/index.html),对其中分值相对较高的多肽进行化学合成(表1),纯度达90%。合成的多肽经HPLC纯化并用质谱检测,冻干的多肽存放于-80℃。

表1 SARS M蛋白跨膜区HLA-A*0201限制性多肽

Table 1 Mn2 and Md3 derived peptides and their binding affinity to HLA-A*0201

多肽名称	位置	氨基酸序列	分值 ^a	复性结果	FI ^c
Mn2	M88-96	GLMWLSYFV	1415.383	+	ND
Mn2-C8	M89-96	LMWLSYFV	^b	+	3.57
Mn2-C9	M89-97	LMWLSYFVA	180.585	+	2.92
Mn2-N10	M87-96	VGLMWLSYFV	15.707	ND	3.53
Mn2-C10	M88-97	GLMWLSYFVA	65.567	ND	1.11
Md3	M60-69	TLACFVLA AV	159.970	+	2.19 ^d
Md3-N9	M60-68	TLACFVLAA	43.420	+	2.43
Md3-C9	M61-69	LACFVLA AV	3.777	+	0.88

注:a,在http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/index.html上对多肽与HLA-A*0201的结合半衰期进行预测得出的分值。b,八肽与HLA-A*0201结合常数的预测不可用。c,荧光指数FI=(给定多肽相应的平均荧光强度-无多肽的平均荧光强度)/无多肽的平均荧光强度,FI≥1表示高亲和力,FI<1表示低亲和力。d,多肽Md3在这里用作T2细胞结合实验的阳性对照,列出的结果是3次独立实验的代表。

Notes: a, The estimated half-time of dissociation (T1/2) of HLA-A*0201 peptide complexes is calculated by using the website: http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/index.html. b, The score prediction of peptides with 8 amino acid residues is not available on the website. c, FI=(Mean FITC fluorescence with the given peptide-mean FITC fluorescence without peptide)/(mean FITC fluorescence without peptide). FI≥1 represents high-affinity peptide; FI<1 represents low-affinity peptides. d, Md3 is used as a positive control in this assay. The results are the representatives of 3 independent experiments.

1.2 多肽与MHC分子的复性

将HLA-A*0201及人β₂-微球蛋白(β₂-microglobulin, β_{2m})表达质粒分别转化到BL21(DE3)型大肠杆菌中进行诱

导表达。提取包涵体,将HLA-A*0201及人β_{2m}的包涵体加入含有多肽的复性液(100mmol/L Tris pH 8.0,400mmol/L L-Arg HCl,2mmol/L EDTA,5mmol/L GSH,0.5mmol/L GSSG)中,使之

进行重新折叠复性^[15-16],用 Superdex 20010/300 GL(GE Healthcare)凝胶层析柱进行 HLA-A*0201 蛋白质复性效果分析。

1.3 T2 细胞结合实验

T2 细胞表面表达 HLA-A*0201 分子,但属于低水平表达。而当具有 HLA-A*0201 亲和力的外源性抗原肽与 T2 细胞表面的 HLA-A*0201 分子结合时,T2 细胞表面 HLA-A*0201 的表达强度将大大提高。取对数生长期的 T2 细胞,用无血清的 RPMI-1640 培养基洗 2 次后,将细胞调至 $2 \times 10^5/\text{mL}$,接种于 24 孔板中,加入 $50 \mu\text{mol/L}$ 待测的多肽。在 37°C 和 $5\%\text{CO}_2$ 的条件下培养 18h 后,收获细胞,用 PBS 洗 2 次,加入 FITC 标记的 anti-HLA-A2 单克隆抗体 BB7.2(Serotech),在冰上孵育 20min 后,用流式细胞仪测定样品的荧光强度。

1.4 DNA 疫苗免疫 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠

HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠细胞表面 HLA-A*0201 表达通过 FITC 标记的单抗 BB7.2 染色,再经流式细胞仪检测。将 SARS 的 M 蛋白相应基因连接到 pDNA3.0 载体中构建成 DNA 疫苗(pD3-M),然后将该质粒转染 293T 细胞,用 Western Blot 可以检测到该细胞中表达大量的 M 蛋白。取雌性 6 至 8 周龄的 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠,用 pD3-M 质粒 DNA(溶于 $200 \mu\text{L}$ 的 PBS 中)对小鼠进行免疫。免疫的途径为肌肉注射,免疫的剂量为每次 $100 \mu\text{g}$ 。免疫分 3 次进行,两次免疫的时间间隔为 3 周。在最后一次免疫后的第 10 天,分离小鼠脾细胞,用酶联免疫斑点实验(ELISPOT)检测多肽特异性的 CD8⁺T 细胞。

1.5 多肽免疫 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠

选择 6—8 周的雌性小鼠,每只小鼠用 $50 \mu\text{g}$ 的多肽,加上 $50 \mu\text{g}$ 的鼠 Gp96 的 N 端片断 N333(23-355aa)和 $100 \mu\text{L}$ 的弗氏佐剂(Sigma)免疫(第一次免疫用完全佐剂,以后用不完全佐剂)^[17]。总体积为 $200 \mu\text{L}$,采用背部皮下多点注射。免疫分 3 次进行,两次免疫的时间间隔为 2 周。在最后一次免疫后的第 10 天,杀鼠取脾细胞进行酶联免疫斑点实验检测。

1.6 酶联免疫斑点实验

将用 PBS 稀释好的包被抗体 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$ 加入底部为 PVDF 膜的 96 孔板, 4°C 包被过夜。次日倾倒包被液,用无菌 PBS 洗涤 3 次后加入 $200 \mu\text{L}/\text{孔}$ 稀释好的封闭液, 37°C 封闭 2h。倾倒封闭液,加入 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的多肽,然后以 $2.5 \times 10^5/\text{孔}$ 的密度加入分离好的小鼠脾脏细胞,在 37°C 和 $5\%\text{CO}_2$ 的条件下培养 18h。倾倒孔内的细胞及培养基,清洗后每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 稀释好的生物素标记检测抗体, 37°C 孵育 1h。倾倒孔中的抗体,清洗后每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 稀释好的酶标亲和素, 37°C 孵育 1h。再次清洗,晾干。每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 的显色液,室温静置 15—45min,避光。待斑点生长到肉眼可见的大小之后,以去离子水洗涤 2 次以终止显色过程。晾干后,计数形成斑点的可分泌 IFN- γ 的细胞。每一个带有模糊边界的点代表一个斑点形成细胞(Spot Forming Cell,SFC),将 ELISPOT 板置于自动读板仪(Cellular Technology Limited)内,调节好合适的参数,计数斑点。

1.7 HLA-A*0201 蛋白的晶体制备与 X 射线衍射

HLA-A*0201 复性后,先用 Superdex20010/300GL 凝胶层

析柱进行纯化,然后将对应 MHC 复合物蛋白峰位置的样品收集,再用离子交换层析柱 Resource Q 进行进一步纯化,收集到的蛋白浓缩后用 25mmol/L ,pH 为 6.5 的 MES 和 0.1%叠氮钠以 1:1000 稀释。将 MHC-多肽复合物(pMHC)的浓度调节为 5,10,20mg/mL,用悬滴法在 4°C 的条件下对晶体生长条件进行筛选,晶体生长约为 7d。生长条件为 IndexTM (HR2-144 Reagent Formulation,Hampton research)65[#] 条件,进一步进行晶体优化,最终晶体生长条件确定为 0.1mol/L Ammonium acetate, 0.1mol/L BIS-Tris,pH 为 6.5 和 17% polyethylene glycol 10000,蛋白浓度为 20mg/mL,使用 30%甘油进行防冻处理,数据收集是在 Rigaku MicroMax007 rotating-anode X 射线衍射仪上进行,使用的电压为 40kV,电流 20mA,其 λ 值为 $1.5418 \text{ \AA}$,用 R-Axis VII++收集器检测衍射图像。

1.8 晶体结构解析与优化

将收集到的数据使用 Denzo 和 HKL2000 软件包进行处理,晶体结构的解析是用 MOLREP 软件进行分子置换,所用 HLA-A*0201 结构模型的蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB)编号 (PDB ID)为 3I6K^[14],交替用 COOT 和 REFMAC5 软件对建立的结构模型进行优化;并用 PHENIX 优化软件包进行进一步结构精修;对最终结构用 Procheck 进行了评价。结果作图用 PyMOL(www.pymol.org)进行。

HLA-A*0201 与多肽 Md3-C9 形成复合物的晶体结构在 PDB 中的编号是 3TO2。

2 结果

2.1 HLA-A2 限制性表位富集区的预测

通过网站预测与人工选择,合成了 SARS-CoV 的 M 蛋白跨膜区的共 6 条具有 HLA-A*0201 潜在结合力的多肽(表 1),同时合成了该区域已经确定的 2 条 HLA-A*0201 限制性 CTL 表位 Mn2 和 Md3^[14]。6 条新预测合成的多肽在其 N 端第 2 位(P2)及 C 端(Pc)至少具有一个 HLA-A*0201 的典型锚定残基 (Met,Leu 或 Val),多肽 Mn2-C8,Mn2-C9,Mn2-N10 和 Mn2-C10 的氨基酸序列与 Mn2 具有重叠,而 Md3-N9 和 Md3-C9 则与多肽 Md3 具有重叠序列。

2.2 多肽与 HLA-A*0201 的结合力

MHC 分子与其相应限制性的表位多肽结合后,能与 $\beta_2\text{m}$ 结合,形成稳定的多肽-MHC- $\beta_2\text{m}$ 三元复合物。在多肽存在下,用稀释法对 HLA-A*0201 和 $\beta_2\text{m}$ 的包涵体进行复性,如果多肽与 HLA-A*0201 分子能结合,则在分子筛层析时出现多肽-MHC- $\beta_2\text{m}$ 复合物吸收峰^[18]。在本文研究的多肽中,多肽 Mn2-C9,Md3-N9 和 Md3-C9 与 HLA-A*0201 分子结合较强,共复性后能够产生大量的 HLA-A*0201 复合物的单体,而 Mn2-C8 与 HLA-A*0201 形成复合物的单体峰值较低,表明 Mn2-C8 与 HLA-A*0201 的亲合力相对较弱(280nm 吸收)(图 1)。

具有 HLA-A*0201 亲和力的外源性抗原肽与 T2 细胞表面的 HLA-A*0201 分子结合,T2 细胞表面 HLA-A*0201 的表

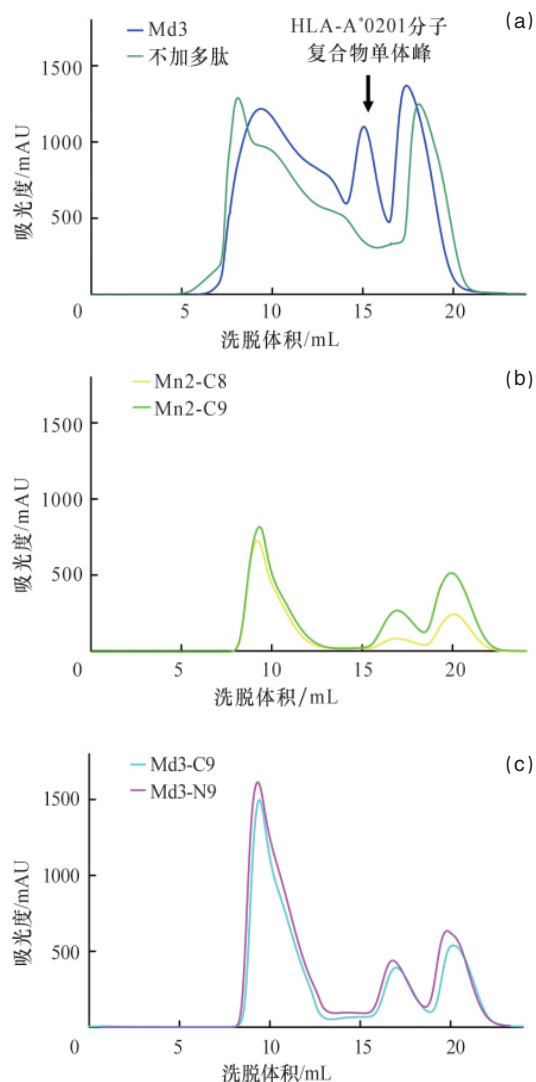


图1 体外复性的方法检测表位多肽与 HLA-A*0201 分子的亲和力

Fig. 1 Binding ability of peptides to HLA-A*0201 revealed by *in vitro* refolding

注: a, 阳性对照多肽 Md3 能够使 MHC 分子在 15—16mL 处产生复合物蛋白峰, 而不加多肽时该位置不产生相应吸收峰; b, 多肽 Mn2-C8 和 Mn2-C9 帮助 HLA-A*0201 重折叠; c, 多肽 Md3-N9 和 Md3-C9 帮助 HLA-A*0201 重折叠。

Notes: a, Peptide Md3 acts as a positive control, and the monomer of the HLA-A*0201/Md3 complex is eluted between 15—16mL, while no peak will be observed if no peptide is added into the refolding system; b, Mn2-C8 and Mn2-C9 bind to HLA-A*0201; c, Md3-N9 and Md3-C9 bind to HLA-A*0201.

达强度将大大提高。用 T2 细胞结合实验对 6 条多肽的 HLA-A*0201 结合力进行验证, 结果显示其中 5 条多肽 Mn2-C8, Mn2-C9, Mn2-N10, Mn2-C10 和 Md3-N9 能使 T2 细胞表面的 HLA-A*0201 分子表达水平提高 ($FI>1.0$), 证实了它们可以与 HLA-A*0201 分子结合 (表 1)。T2 细胞结合实验与复性实验结果不完全一致, 显示实际研究中需要将这两种验证多肽

HLA-A*0201 结合力的方法进行综合评价。预测的所有多肽在至少一种结合力检测实验中能够与 HLA-A*0201 结合, 可定为潜在的 HLA-A*0201 限制性表位。

2.3 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠中评价多肽的免疫原性

用表达 SARS-CoV 的 M 蛋白的 DNA 疫苗 pD3-M 免疫 HLA-A2.1/K^b 转基因鼠。三次肌肉注射免疫后, 合成的多肽作为刺激物, 通过 ELISPOT 检测特异 CTL 的 IFN- γ 分泌水平, 这 6 条多肽均能诱导特异性 T 细胞释放 IFN- γ (图 2), 表明小鼠体内在免疫后产生了多肽特异的 CTL。在利用未插入 SARS-CoV 的 M 蛋白基因的 DNA 载体免疫的小鼠中, 却没有检测到多肽特异的 CTL。这些结果表明这 6 条多肽均具有 CD8⁺T 细胞免疫原性, 而且在体内能够自然加工产生。

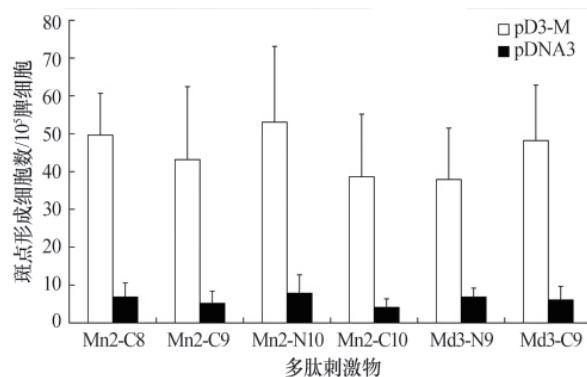


图2 T 细胞表位富集区内相关多肽的免疫原性检测
Fig. 2 Evaluation of the immunogenicity of the peptide within the potential T cell epitope cluster region

注: 白色表示 pD3-M DNA 疫苗免疫后的小鼠脾细胞, 而黑色表示用 pDNA3 空载体免疫后的小鼠脾细胞作为对照。

Notes: The results of the pD3-M DNA immunized mice are represented with white bars. The results shown with black bars indicate the mice inoculated with empty pDNA3 vectors as a negative control.

为验证这几条多肽与先前鉴定的多肽 Mn2 和 Md3 是否具有交叉免疫反应, 用多肽 Mn2 免疫小鼠后, 在与 Mn2 相重叠的多肽 Mn2-C8, Mn2-N10 和 Mn2-C10 的刺激下, 小鼠脾细胞特异的 CD8⁺T 细胞释放大量 IFN- γ 。表明 Mn2 免疫小鼠后产生的特异性 T 细胞对 Mn2 周围的 3 条多肽都具有交叉免疫反应 (图 3), 而 Mn2-C9 不能激起 Mn2 特异的 T 细胞反应 ($P>0.05$), 表明 Mn2-C9 是免疫原性独立于 Mn2 的多肽。

2.4 HLA-A*0201 呈递 Md3-C9 的结构

为进一步验证这些新鉴定的多肽是否具有典型的 HLA-A2 限制性表位的结构特征, 制备了多肽 Md3-C9 与 HLA-A*0201 形成的复合物蛋白的单晶 (图 4), 并成功解析了晶体结构。HLA-A*0201/Md3-C9 复合物的晶体结构含有 HLA-A*0201 重链的 275 个氨基酸、人 β_2m 的 99 个氨基酸, 以及与重链结合的 Md3-C9 (表 2)。整体结构与以往报道的 HLA-

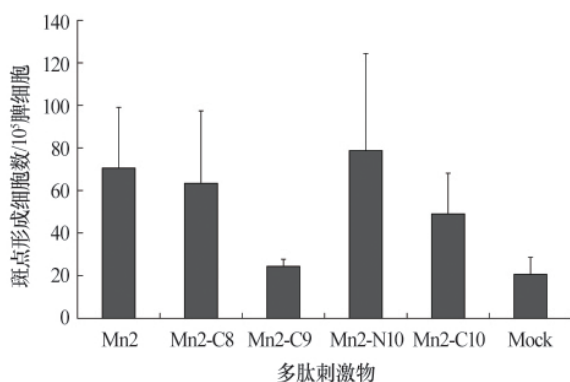


图3 Mn2 特异性 CD8⁺T 细胞对 Mn2 周围相关多肽具有交叉免疫反应

Fig. 3 Cross-recognition of Mn2-overlapping peptides by Mn2-specific CD8⁺T cells

注:用多肽 Mn2 及鼠 Gp96 和弗氏佐剂共同免疫 HLA-A2.1/K^b 转基因小鼠后,用 ELISPOT 实验检测 Mn2 特异性 CD8⁺T 细胞对多肽的交叉免疫反应,Mock 表示无多肽刺激。

Notes: The HLA-A2.1/K^b transgenic mice were immunized by peptide Mn2 together with the N-terminal fragment N333 (23-355 aa) of murine Gp96 emulsified in complete Freund's adjuvant. Cross-responses of Mn2-specific CD8⁺T cells were analyzed by ELISPOT assays. Mock indicated the cells which were not stimulated with any peptide.

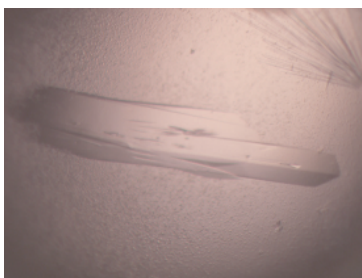


图4 HLA-A*0201/ Md3-C9 复合物晶体生长状况

Fig. 4 Growth condition of HLA-A*0201/ Md3-C9 crystals

注:用悬滴法筛选 HLA-A*0201/ Md3-C9 复合物晶体生长条件,在经过优化的条件中,发现生长良好的晶体,取晶体右侧部分进行 X 射线衍射。

Notes: The crystal growing conditions of HLA-A*0201/ Md3-C9 were screened by using hanging drop method. The ideal crystal was observed after a series of optimization of the growing conditions. The right part of the crystal shown here was cut for the X-ray diffraction.

A*0201 分子的三维结构类似^[9]。将 HLA-A*0201/Md3-C9 与 PDB 中 HLA-A*0201/Md3 复合物的整体结构重合比对,主链 Cα 的 r.m.s.d(root-mean-squared-deviation)值小于 1.6Å(图 5)。

2.5 Md3-C9 作为独立最短表位的结构基础

多肽 Md3-C9 在 HLA-A*0201 的多肽结合槽中呈现出典型的 HLA-A*0201 限制性多肽的构象特征,多肽的 N 端第 2 位(P2)Ala 及 C 端(Pc)残基 Val 插入到多肽结合槽的口袋中稳定多肽形成主要锚定残基,多肽的 N 端第 3 位(P3)Cys 深

表 2 HLA-A*0201/Md3-C9 的 X 射线衍射及结构精化数据^a

Table 2 X-ray diffraction and structure refinement data^a

统计项	数据
空间群	P6 ₃
晶胞参数	
晶胞边长/Å (<i>a, b, c</i>)	147.5, 147.5, 49.9
晶面夹角/(°) (<i>α, β, γ</i>)	90.0, 90.0, 120.0
分辨率/Å	50.0—2.6 (2.69—2.60)
总衍射点数	194239
独立衍射点数	1942
完整性/%	100.0 (100.0)
信噪比 <i>I</i> /σ	32.5 (5.2)
<i>R</i> _{merge} /% ^b	7.6 (46.0)
精化数据统计结果	
分辨率/Å	2.6
<i>R</i> _{work} /% ^c	19.3
<i>R</i> _{free} /% ^c	23.0
均方偏差	
键长/Å	0.005
键角/(°)	0.856

注: a, 括号中的数值为最外鞘层的数据; b, $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i - \langle I \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i$, *I_i* 为观察到的强度, *⟨I⟩* 为对称相关衍射点的平均强度; c, $R = \sum_{hkl} \|F_{\text{obs}} - |F_{\text{cal}}| \| / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$, *R_{free}* 是由任意 5% 衍射点计算所得, *R_{work}* 是由用于结构精化的其余 95% 衍射点计算所得。

Notes: a, Values in parentheses are given for the highest resolution shell. b, $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i - \langle I \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i$, where *I_i* is the observed intensity and *⟨I⟩* is the average intensity of multiple observations of symmetry related reflections. c, $R = \sum_{hkl} \|F_{\text{obs}} - |F_{\text{cal}}| \| / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$, where *R_{free}* is calculated for a randomly chosen 5% of reflections, *R_{work}* is calculated for the remaining 95% of reflections used for structure refinement.

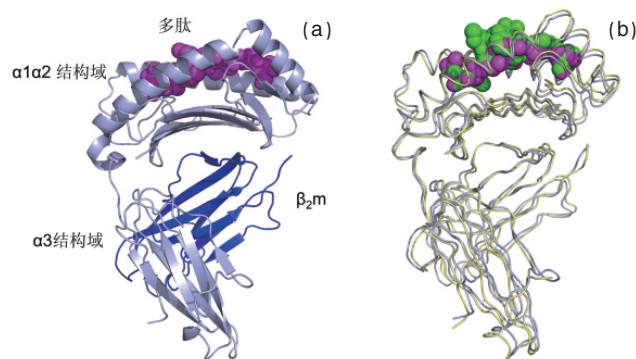


图5 HLA-A*0201/ Md3-C9 复合物的结构

Fig. 5 Overall structure of HLA-A*0201/ Md3-C9

注: (a) HLA-A*0201/ Md3-C9 分子的整体结构。多肽 Md3-C9 (紫色圆球) 位于 HLA-A*0201 分子 α1α2 结构域形成的多肽结合槽中; (b) HLA-A*0201/Md3-C9 (青色) 与 HLA-A*0201/Md3 (黄色) 的整体结构比对。

Notes: (a) The integral of the structure of HLA-A*0201/ Md3-C9. Peptide Md3-C9 (purple spheres) is loaded in the peptide binding groove formed by the α1α2 domains of HLA-A*0201. (b) The comparison of the integral structures between HLA-A*0201/Md3-C9 (cyan) and HLA-A*0201/Md3 (yellow).

入到 D 口袋中形成次级锚定残基,其余氨基酸的侧链暴露或部分暴露于多肽结合槽的外部,可能参与 T 细胞识别。

将 HLA-A*0201/Md3-C9 与 HLA-A*0201/Md3 复合物结构中的多肽进行比对(图 6),显示九肽 Md3-C9 与十肽 Md3 的构象完全不同,前者具有典型的九肽呈递特征^[20],重要的是虽然 Md3-C9 的 C 端锚定残基与 Md3 相同即都是 Val,但其 N 端第 2 位锚定残基由 Md3 的 Leu 变为了 Md3-C9 的 Ala,也就是说在 N 端第一位氨基酸缺失的情况下,Md3-C9 的第 3 位 Ala 向 N 端延伸充当了锚定残基,从而使其中部的氨基酸构象发生显著变化(图 6)。结构特征显示 Md3-C9 可能作为全新的 HLA-A*0201 限制性表位发挥其免疫原性,其激发的 T 细胞库可能与 Md3 完全不同。

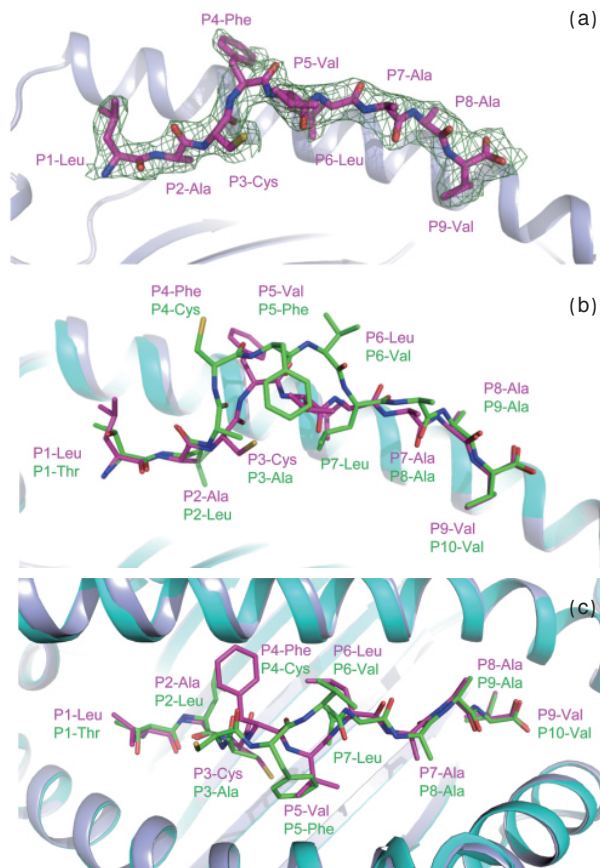


图6 Md3 的 C 端九肽 Md3-C9 多肽构象

Fig. 6 Conformation of peptide Md3-C9

注:(a) Md3-C9 的电子密度图。(b)和(c) Md3-C9(紫色)与 Md3(绿色)的构象对比。Md3-C9 的 C 端锚定残基与 Md3 相同,都是 Val,但其 N 端第 2 位锚定残基是 Md3 的第 3 位氨基酸 Ala,2 条多肽的构象具有明显差异。

Notes: (a), The electron density and conformation of peptide Md3-C9 complexed to HLA-A*0201. The picture shown here is a final 2Fo-Fc-stimulated annealing omission map contoured at 1.0 σ . (b) and (c), The conformation comparison between Md3-C9 (purple) and Md3 (green). The C-terminal anchors of Md3-C9 and Md3 are the same as Val, however the P2 anchor of N terminus of Md3-C9 are Ala which is the P3 anchor in peptide Md3. The conformations of these two peptides are obviously different.

2.6 表位富集区上潜在的其他 MHC 限制性表位分析

除 HLA-A2 限制性 CD8⁺T 细胞表位外,对 SARS-CoV 的 M 蛋白的跨膜区一级序列上的潜在的其他 MHC 限制性的表位进行了预测,结果表明,在这一区域存在多种相互重叠的不同 MHC 等位基因的结合基序,例如 HLA-A24, A33, B7, B27 和 Cw*04 等。此外还有小鼠的 H2-K^d, H2-K^d 限制性多肽和恒河猴的 Mamu-A*02 限制的多肽(图 7)。因此,这个区域与 T 细胞免疫学中的表位“热点”概念相符合,在这里称之为 T 细胞表位富集区。

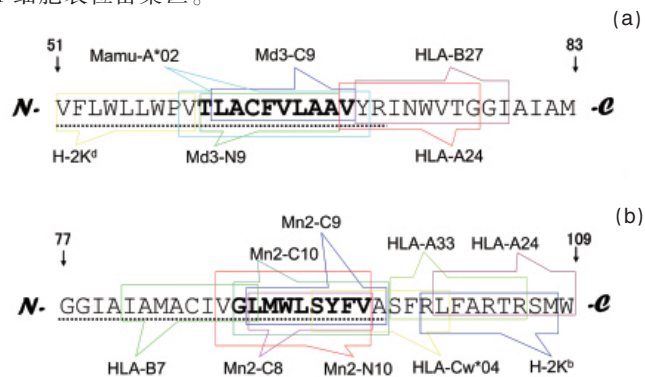


图7 SARS-CoV 的 M 蛋白上 T 细胞表位富集区的其他 MHC I 类潜在表位分析

Fig. 7 Analysis on the potential epitopes with other MHC I restriction within the T cell epitope cluster region SARS-CoV M protein

注:图中显示 SARS-CoV 的 M 蛋白第 2(a)和第 3 跨膜区(b)序列上 MHC I 类表位预测,早期鉴定的 SARS-CoV 的 M 蛋白上两条 CD8⁺ T 细胞表位用加粗的字体表示,SARS-CoV 的 M 蛋白的膜内氨基酸用虚线标出。

Notes: The potential MHC I restricted peptides within the second (a) and third (b) transmembrane domain of SARS-CoV M protein are represented with different colours. The previously defined two CD8⁺ T cell epitopes derived from SARS-CoV M protein are denoted with bold letters. The amino acids within the transmembrane regions of SARS-CoV M protein are underlined.

3 讨论

由于 T 细胞免疫的重要意义,T 细胞表位的鉴定已经成为 T 细胞免疫学研究及其病原微生物临床研究中不可或缺的部分。近年来,针对不同种类的病原体甚至自身抗原,人们筛选和鉴定了大量的 T 细胞表位。但是,鲜见有针对病原体某一特定区域进行 T 细胞表位富集区的筛选和鉴定的研究,相应方法也没有建立。本文通过 T 细胞功能学与结构免疫学相结合的方法,成功鉴定了一个 HLA-A2 限制性的 CTL 表位富集区。

鉴定的 6 条 CD8⁺T 细胞表位的免疫原性不尽相同。对于与多肽 Mn2 相重叠的几条多肽,Mn2 特异性的 T 细胞能够对 Mn2-C8, Mn2-N10 和 Mn2-C10 产生交叉反应,表明这几条多肽的免疫原性可能部分依赖于 Mn2,它们对应的 T 细胞库可

能部分重叠。而多肽 Mn2-C9 并不能激发 Mn2 特异性的 T 细胞释放 IFN- γ ,而在 DNA 疫苗免疫后的小鼠体内却能够检测到多肽 Mn2-C9 特异性的 T 细胞,表明多肽 Mn2-C9 可能具有完全独立于 Mn2 的表位,它们的 T 细胞库没有交叉重叠。而对于氨基酸序列与 Md3 具有重叠的 Md3-N9 和 Md3-C9 两条多肽,DNA 疫苗免疫小鼠的实验中都证实它们都具有较强的 T 细胞免疫原性。但是在结构学研究表明,Md3-C9 具有典型 HLA-A*0201 呈递的九肽的结构特征,与 Md3 的十肽呈递构象完全不同。研究表明,T 细胞表位的呈递特征对于其免疫原性具有重要影响^[21],Md3-C9 与 Md3 构象不同,预示着二者对应的 T 细胞库可能不同,Md3-C9 是独立于 Md3 的 T 细胞表位。这些多肽对应的 T 细胞库的 TCR usage 还有待于进一步研究。

针对 SARS-CoV 全蛋白质组的免疫功能研究表明,SARS 病人的 T 细胞免疫主要针对结构蛋白,而非结构蛋白激起的免疫反应相对较弱^[22]。SARS-CoV 主要含有 Spike(S),Nucleocapsid(N),Membrane(M)和 Envelope(E)等 4 个结构蛋白,冠状病毒的 M 蛋白是病毒体中丰度最高的结构蛋白^[23],它对于病毒颗粒的形成起到非常关键的作用。M 蛋白具有 3 个主要结构域,一个很短的 N 端结构域裸露于病毒包膜外、一个 3 次跨膜结构域以及位于病毒包膜内的很长的 C 端结构域^[24]。病毒或者表达 M 蛋白的重组病毒载体疫苗均可以激起针对 M 蛋白的抗体反应。研究表明,在 M 蛋白的 N 端膜外区(1-15 残基)以及 C 端膜内区(132-161 残基)分别含有 2 个抗体表位,这在人体、小鼠以及兔中已得到证明。且用人工合成的这两个部位的多肽免疫兔,可以激起很高滴度的抗体^[24-25]。本文发现 M 蛋白的 3 次跨膜区是一个含有大量 T 细胞表位的细胞免疫原性区域,从而进一步证明 M 蛋白作为能够激起体液及细胞免疫反应的重要抗原,这在病毒的诊断以及疫苗开发中具有很重要的应用前景。

本文利用以 SARS 冠状病毒相关的细胞毒性 T 细胞免疫学方法,不仅成功鉴定了一个重要的 T 细胞表位富集区,而且建立了一套有效的细胞毒性 T 细胞免疫学研究策略,以对病原体表位富集区进行鉴定和研究。这一策略包含了先期生物信息学预测、体外 MHC/多肽复性,中期的小鼠或人体内特异性 T 细胞检测,后期结构免疫学的研究方法。

4 结论

通过 T 细胞功能学与蛋白质结构学相结合的方法,本文以 SARS-CoV 的 M 蛋白为例,鉴定了一个 HLA-A*0201 限制性表位的 T 细胞表位富集区,并对该 T 细胞免疫原性区内一系列多肽的表位特性和结构特征进行了研究。本文证明了“所谓”病毒蛋白序列上的 HOTSPOT 内各表位多肽之间的免疫原性关系:首先重叠多肽可以各自独立激发机体免疫反应,如 Md3 及其 C 端九肽 Md3-C9 从功能到结构都表明它们是各自独立的表位。其次重叠多肽激发机体免疫反应可以发生交叉,如 Mn2 特异的 T 细胞可以对与 Mn2 重叠的多条表

位多肽发生交叉反应。T 细胞表位富集区的鉴定,对于理解病毒特异性细胞免疫具有重要意义,同时对利用病毒的某一特定区域进行相应亚单位疫苗设计具有指导意义。

致谢 感谢中国科学院微生物研究所的张建华博士在本文修改过程中提供的帮助。

参考文献 (References)

- [1] Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus[J]. *Nature*, 2009, 459: 931-939.
- [2] Garten R J, Davis C T, Russell C A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans[J]. *Science*, 2009, 325(5937): 197-201.
- [3] 宋晓晖, 胡旭东, 马素芳, 等. 动物源性流感病毒与人流感流行 [J]. 科技导报, 2009, 27(9): 19-24.
Song Xiaohui, Hu Xudong, Ma Sufang, et al. *Science and Technology Review*, 2009, 27(9): 19-24.
- [4] Gao G F, Sun Y P. It is not just AIV: From avian to swine-origin influenza virus[J]. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(1): 151-153.
- [5] Rota P A, Oberste M S, Monroe S S, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. *Science*, 2003, 300(5624): 1394-1399.
- [6] Liu J, Zhang S, Tan S, et al. Revival of the identification of cytotoxic T-lymphocyte epitopes for immunological diagnosis, therapy and vaccine development[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2011, 236(3): 253-267.
- [7] Jin X, Bauer D E, Tuttleton S E, et al. Dramatic rise in plasma viremia after CD8⁺ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1999, 189(6): 991-998.
- [8] Sun Y, Liu J, Yang M, et al. Identification and structural definition of H5-specific CTL epitopes restricted by HLA-A*0201 derived from the H5N1 subtype of influenza A viruses[J]. *Journal of General Virology*, 2010, 91(4): 919-930.
- [9] Berthoud T K, Hamill M, Lillie P J, et al. Potent CD8⁺ T-cell immunogenicity in humans of a novel heterosubtypic influenza A vaccine, MVA-NP+M1[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2011, 52(1): 1-7.
- [10] Purcell A W, McCluskey J, Rossjohn J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007, 6: 404-414.
- [11] Oleksiewicz M B, Bøtner A, Toft P, et al. Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: The nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes[J]. *The Journal of Virology*, 2001, 75(7): 3277-3290.
- [12] Liu J, Li C, Ke S, et al. Structure-based rational design of β -hairpin peptides from discontinuous epitopes of cluster of differentiation 2(CD2) protein to modulate cell adhesion interaction [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, 50(17): 4038-4047.
- [13] Gupta V, Tabiin T M, Sun K, et al. SARS coronavirus nucleocapsid immunodominant T-cell epitope cluster is common to both exogenous recombinant and endogenous DNA-encoded immunogens [J]. *Virology*, 2006, 347(1): 127-139.
- [14] Liu J, Sun Y, Qi J, et al. The membrane protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus acts as a dominant immunogen revealed by a clustering region of novel functionally and structurally defined cytotoxic T-lymphocyte epitopes[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2010, 202

- (8): 1171-1180.
- [15] 张建华, 高峰, 彭浩, 等. 鸡 β_2 -微球蛋白及其硒代衍生物的制备和晶体学研究[J]. 科技导报, 2009, 27(1): 38-41.
Zhang Jianhua, Gao Feng, Peng Hao, *et al.* *Science and Technology Review*, 2009, 27(1): 38-41.
- [16] Liu J, Dai L, Qi J, *et al.* Diverse peptide presentation of rhesus macaque major histocompatibility complex class I mamu-A*02 revealed by two peptide complex structures and insights into immune escape of simian immunodeficiency virus [J]. *The Journal of Virology*, 2011, 85 (14): 7372-7383.
- [17] Li H, Zhou M, Han J, *et al.* Generation of murine CTL by a hepatitis B virus-specific peptide and evaluation of the adjuvant effect of heat shock protein glycoprotein 96 and its terminal fragments[J]. *The Journal of Immunology*, 2005, 174(1): 195-204.
- [18] Li X, Liu J, Qi J, *et al.* Two distinct conformations of a rinderpest virus epitope presented by bovine major histocompatibility complex class I N*01801: A host strategy to present featured peptides[J]. *The Journal of Virology*, 2011, 85(12): 6038-6048.
- [19] Bjorkman, P J, Saper M A, Samraoui B, *et al.* Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2[J]. *Nature*, 1987, 329: 506-512.
- [20] Liu J, Gao G F. Major histocompatibility complex: Interaction with

- peptides[M]. *The Encyclopedia of Life Sciences*, Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, August 2011. doi: 101002/9780470015902a0000922pub2.
- [21] Liu J, Wu P, Gao F, *et al.* Novel immunodominant peptide presentation strategy: A featured HLA-A*2402-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope stabilized by intrachain hydrogen bonds from severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein[J]. *The Journal of Virology*, 2010, 84(22): 11849-11857.
- [22] Li C K, Wu H, Yan H, *et al.* T cell responses to whole SARS coronavirus in humans [J]. *The Journal of Immunology*, 2008, 181(8): 5490-5500.
- [23] Armstrong J, Niemann H, Smeekens S, *et al.* Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus[J]. *Nature*, 1984, 308: 751-752.
- [24] Pang H, Liu Y, Han X, *et al.* Protective humoral responses to severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus: Implications for the design of an effective protein-based vaccine [J]. *Journal of General Virology*, 2004, 85(10): 3109-3113.
- [25] He Y X, Zhou Y S, Siddiqui P, *et al.* Identification of immunodominant epitopes on the membrane protein of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(8): 3718-3726.

(责任编辑 马骁骁)

·学术动态·



“第四届国际寄生虫学研讨会”征文

中国动物学会寄生虫学专业委员会定于2011年11月5—9日在广西省南宁市召开“第七届全国会员代表大会暨第十三次全国学术会议和第四次国际寄生虫学学术研讨会”。会议旨在为来自全国乃至世界的寄生虫学家提供一个高科技论坛,就寄生虫学及相关学科的最新研究成果展开交流和讨论。

本次会议将围绕转化寄生虫学这个寄生虫研究领域的新兴研究方向,主题内容包括寄生虫与寄生虫病、寄生虫细胞与分子生物学、寄生虫组学及其最新进展、寄生虫免疫学等。

全文截止日期:2011年10月15日。

联系电话:010-62734325。

电子信箱:suoxun@cau.edu.cn。

大会网站:<http://4thparasitology.dconference.cn/dct/page/1>。



《科技导报》征集“封面文章”

为快速反映我国最新科技研究成果,《科技导报》拟利用刊物最显著位置——封面将最新科研成果第一时间予以突出报道。来稿要求:研究成果具创新性或新颖性;反映该领域我国乃至世界前沿研究水平;可以图片形式予以反映,图片美观、清晰、分辨率超过300dpi;文章篇幅不限,要说明研究的背景、方法、取得的结果,以及结论。在线投稿:www.kjdb.org。