

[文章编号] 1003-4684(2023)05-0082-06

HLA-E 与 oHSV2 VP5 蛋白相互作用研究

姚若一, 范嘉琦, 肖 雄, 周 芹, 汪 洋, 胡 翰, 刘滨磊

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068)

[摘 要] 溶瘤病毒代表了一类新的免疫治疗药物。它通过选择性杀伤肿瘤细胞和诱导全身性抗肿瘤免疫的双重作用机制, 促进抗肿瘤反应。溶瘤Ⅱ型单纯疱疹病毒 oHSV2 是由单纯疱疹病毒Ⅱ型(HSV-2)基因改造而来的新型溶瘤病毒。人类白细胞抗原 E(HLA-E)是一种 HLA I b 类分子, 是 CD94/NKG2A 的强效抑制配体, 它们的结合会抑制 CTL 细胞和 NK 细胞功能。多项研究已证实 HLA-E 会在人肿瘤细胞表面过表达, 研究团队前期研究也表明 oHSV2 会在体外上调部分肿瘤细胞系表面 HLA-E 的表达。应用 GST pull-down 和质谱技术确定 oHSV2 的 VP5 蛋白(由 UL19 基因编码)为 HLA-E 的相互作用蛋白, 并通过激光共聚焦实验进行了初步验证。它们相互作用的确定, 为探究 oHSV2 是否干扰 HLA-E 和 CD94/NKG2A 的结合奠定研究基础。

[关键词] 人类白细胞抗原 E; 溶瘤Ⅱ型单纯疱疹病毒; 蛋白互作

[中图分类号] Q51 **[文献标识码]** A

溶瘤病毒(oncolytic virus, OV)s)疗法是一种癌症免疫治疗方式。溶瘤病毒可以直接原位感染和裂解肿瘤细胞, 诱导肿瘤内的急性炎症, 并提供病原体相关分子模式(PAMPs)和危险相关分子模式(DAMPs), 其感染的肿瘤细胞的死亡会在这种免疫刺激环境中释放肿瘤相关抗原(TAAs), 从而促进免疫细胞流入、抗肿瘤免疫反应和肿瘤免疫环境的重构^[1]。目前, 已有多种病毒被用作溶瘤病毒载体, 单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)由于其具有多种优势而被广泛应用、研究^[2]。

oHSV2 是在单纯疱疹病毒Ⅱ型(HSV-2)标准毒株 HG52 的基础上, 敲除了 ICP34.5 和 ICP47, 插入编码人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(human granulocyte macrophage colony stimulating factor, hGM-CSF)的表达序列的新型溶瘤病毒。ICP34.5 是一种神经毒性因子, 可以抑制 I 型干扰素(IFN)反应, 拮抗非分裂细胞内的 PKR 信号通路。ICP34.5 的敲除提高了肿瘤细胞的选择性, 防止神经元的感染。ICP47 可以阻断 TAP(与抗原加工相关的转运体)的功能, 从而阻止了受感染细胞向 CD8⁺ T 细胞呈递抗原。ICP47 的敲除诱导了 US11 启动子的早期激活, 增加溶瘤病毒治疗活性, 还使健康细胞和肿瘤细胞都呈递病毒抗原, 抑制健康组织的感染, 免疫介导破坏肿瘤细胞, 选择性繁殖溶瘤病毒。hGM-

CSF 可以促进树突状细胞的积累和成熟, 改善肿瘤抗原呈递并刺激强大的 T 细胞反应^[3]。目前, 其产品 OH2 注射液作为多适应症单药(NCT03866525)和联合用药 HX008(NCT04616443)均正在进行临床试验。

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)是基因组中多态性最强的区域, 并且富含编码具有免疫学意义的分子的基因^[4]。人的 MHC 被称为人类白细胞抗原(human leucocyte antigens, HLA)基因复合体, 可分为 HLA I、HLA II、HLA III^[5]。HLA I 类基因通常分为两类: 经典类(I a 类), 包括 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C, 具有明显的多态性; 非经典类(I b 类), 包括 HLA-E、HLA-F、HLA-G 等, 不显示或仅显示有限的多态性^[6]。HLA I a 分子可被杀伤细胞免疫球蛋白样受体(killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR)识别, 而 HLA I b 分子主要通过同源二聚体 NKG2D 和异二聚体 CD94-NKG2 受体介导识别^[7]。

在肿瘤细胞表面, HLA I a 类分子的表达通常下调甚至丢失, 从而逃避细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)对其的识别和特异性杀伤。理论上, 自然杀伤(NK)细胞可以杀伤缺乏 HLA I 分子的肿瘤细胞。但实际上, 它们之所以能逃避 NK 细胞的攻击,

[收稿日期] 2022-02-23

[第一作者] 姚若一(1997-), 女, 湖北襄阳人, 湖北工业大学硕士研究生, 研究方向为生物工程。

[通信作者] 刘滨磊(1962-), 男, 湖北武汉人, 湖北工业大学教授, 研究方向为生物制药。

此现象可能与 HLA I b 分子在肿瘤细胞表面的表达有关^[8]。

人类白细胞抗原 E(HLA-E)是功能和作用途径较为明确的 HLA I b 类分子,具有组织分布狭窄但细胞表面表达较低的特征,几乎在所有成人细胞表面低水平表达。不过,已有多项研究证实了 HLA-E 在许多类型的人类肿瘤细胞的表面过表达。HLA-E 是 CD94/NKG2A 的主要配体,该受体在来自外周血的超过 50%的 CD56^{bright}或 CD56^{dim} NK 细胞及 CD8⁺T 细胞的一些亚群上表达^[9],是一种抑制性受体。HLA-E 与 CD94/NKG2A 结合后, SHP-1 磷酸酶被招募到 NKG2A 的酪氨酸磷酸化的免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM),然后将抑制信号传递给免疫效应细胞,最终产生抑制作用^[10]。因此,HLA-E 在肿瘤细胞上的上调表达,对 NK 细胞和 CD8⁺T 细胞发挥抗肿瘤功能是不利的。

前期研究发现, UV-oHSV2 的处理可以使 BGC823、LoVo 和 U87MG 细胞上的 HLA-E 上调表达。在体外实验中,经过 HLA-E 抗体预处理的 BGC823 细胞被杀伤效果更明显。在皮下荷瘤裸鼠瘤内给药模型,和腹腔荷瘤裸鼠腹腔给药模型中,药物中添加 HLA-E 抗体均可以减小小鼠肿瘤体积,并延长小鼠的生存期。基于此,本文进行 oHSV2 与 HLA-E 的相互作用研究,并运用激光共聚焦实验进行初步验证。

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

溶瘤病毒 oHSV2 由本实验团队基因改造,并进行生产、纯化。293T 细胞,BGC823 细胞由本实验团队保存。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,BL21 (DE3)感受态细胞由本实验团队制备。质粒载体 pGEX-6p-1、EGFP-C1 由本实验团队保存,pCMV-N-DsRed 购于碧云天生物。

总 RNA 提取、通用型 DNA 纯化回收、无内毒素质粒小提中量试剂盒均于 TIANGEN 购买。限制性内切酶于 NEB 购买。非连接酶依赖型单片段快速克隆试剂盒、2 \times Phanta[®] Max Master Mix (Dye Plus)于 Vazyme 购买。GST 标签蛋白纯化试剂盒于碧云天生物购买。HLA-E 抗体、HRP 标记的山羊抗兔二抗于 proteintech 购买。DAPI、4%多聚甲醛于 biosharp 购买。

1.2 细胞培养、总 RNA 提取

细胞均用 DMEM/F12(添加 10%FBS)培养基,在 5% CO₂,37℃的细胞培养箱中培养。总 RNA 提取步骤依据试剂盒说明书。

1.3 质粒构建

目的基因 PCR 体系配制及反应程序依据说明书。所用到的引物见表 1。

表 1 引物信息

名称	引物序列(5'→3')
HLA-E(GST)	F:cccctgggattccccggaattcATGGTAGATGGAACCCTCCTTTT
	R:tcagttagtcacgatgcggccgcTCACAGCGTCTCCTTCCCCTTCT
HLA-E(EGFP)	F:tcaagtccggactcagatctATGGTAGATGGAACCCTCCTTT
	R:gtaccgtcgactgcagaattcCAGCGTCTCCTTCCCCTTCT
HLA-E(DsRed)	F:tccaagcttctgcaggaattcATGGTAGATGGAACCCTCCTTTT
	R:cccactagtcttagactcgagCAGCGTCTCCTTCCCCTTCT
UL19(EGFP)	F:aattctgcagtcgacggtaccATGGCCGCTCCTGCCCGC
	R:ttatctagatccggtggatccTCACGGCCACGTCGTCCAG
UL19(DsRed)	F:tccaagcttctgcaggaattcATGGCCGCTCCTGCCCGC
	R:cccactagtcttagactcgagTCACGGCCACGTCGTCCAG

质粒载体双酶切,反应体系:质粒 2000 ng,内切酶各 4 μ L,cutsmart buffer 20 μ L,补加 DEPC 水至 200 μ L。反应条件:37℃,2 h。

以上体系用试剂盒回收后进行同源臂连接。连接反应产物转化 DH5 α 感受态细胞,涂板。第二天挑取单菌落,进行菌落 PCR 鉴定。

1.4 GST-HLA-E 融合蛋白的表达与纯化

将 pGEX-6p-1-HLA-E 质粒转化 DE3 感受态,以 1 : 100 接种于 LB 液体培养基(含 100 mg/L Amp),37℃摇菌;然后加入 IPTG,20℃低温诱导表

达过夜。接下来 4℃离心收集菌体,超声破碎 15 min;再次 4℃离心后的上清使用 GST 标签蛋白纯化试剂盒进行纯化。

1.5 质粒提取、转染及总蛋白提取

质粒提取步骤依据试剂盒说明书。
293T 细胞在六孔板中培养。当细胞密度达到 70%左右时,更换细胞培养液,均匀加入转染体系(质粒 2.5 μ g,lipo8000 转染试剂 4 μ L,MEM α 培养基补至 125 μ L),培养 24 h。弃培养基,用 RIPA (强)裂解液冰上裂解细胞 20 min,转至 1.5 mL EP

管,13000 r/min,4℃离心 15 min 收集上清,加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液煮沸变性。

1.6 western blot

蛋白样品经电泳分离后,使用半干法转膜(电压 15 V),将蛋白转到 NC 膜上。然后膜用 5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗(1 : 1000)4℃孵育过夜,二抗(1 : 10000)室温孵育 1 h。最后在膜上滴加 ECL 显色液进行显影。

1.7 激光共聚焦实验

293T 细胞在玻底培养皿中培养,pCMV-N-DsRed-HLA-E 质粒和 EGFP-C1-UL19 质粒、pC-MV-N-DsRed-UL19 质粒和 EGFP-C1-HLA-E 质粒分别 1 : 1 共转染。转染 24 h 后,用 4%多聚甲醛室温固定细胞 15 min,再用 DAPI(1 μg/mL)室温避光染核 10 min。最后加入抗荧光淬灭剂,在激光共聚焦显微镜下观察 VP5 与 HLA-E 的共定位情况。

2 结果

2.1 原核表达载体的构建

提取 BGC823 细胞总 RNA,反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板扩增 HLA-E 基因(1~600 bp),琼脂糖凝胶电泳显示扩增出的条带在约 600 bp 处,与目的基因大小相符(图 1)。然后将回收的 DNA 与原核表达载体 pGEX-6p-1 连接,连接反应产物转化 DH5α 感受态细胞,挑取 11 个 Amp 抗性菌落为模板进行菌落 PCR 鉴定,均扩增成功,条带位置与目的基因相符(图 2)。再从中挑取 3 个送公司测序,测序得到的基因序列同 GenBank 中发布的标准序列一致。提取质粒后进行双酶切鉴定(图 3),证明 pGEX-6p-1-HLA-E 质粒构建成功。

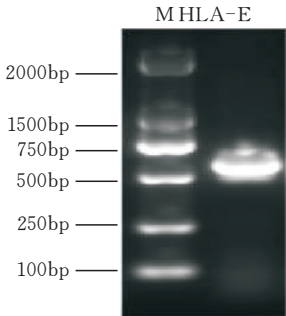


图 1 PCR 扩增 HLA-E 基因

2.2 GST-HLA-E 融合蛋白的纯化

破碎后的上清与 GSH-琼脂糖珠孵育,收集孵育后的上清和洗脱(共 4 次)下来的蛋白样品,加入蛋白上样缓冲液煮沸变性,然后通过 SDS-PAGE 分离。考马斯亮蓝染液染色(图 4)和 western blot(图 5)显示的结果一致,GST-HLA-E 蛋白在 45 kDa

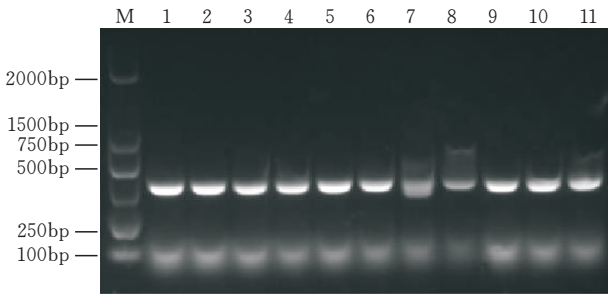


图 2 菌落 PCR 筛选 pGEX-6p-1-HLA-E 重组子

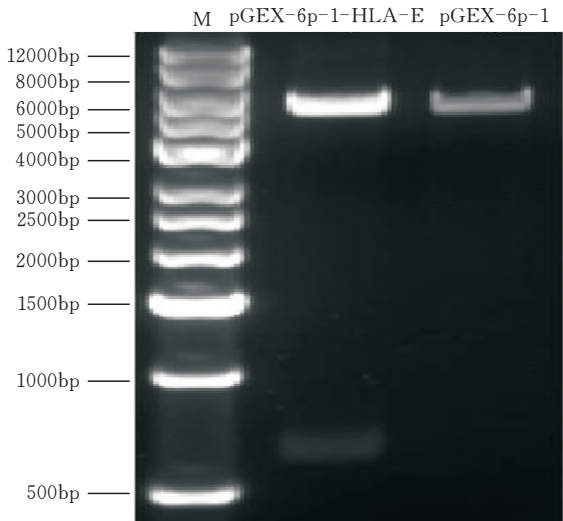


图 3 pGEX-6p-1-HLA-E(EcoR I、Not I)双酶切上方。

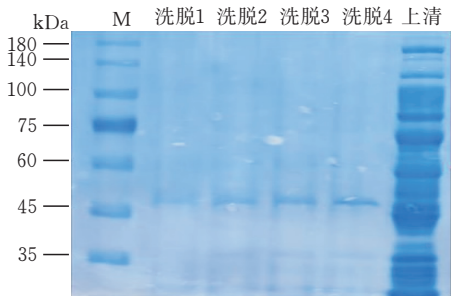


图 4 考马斯亮蓝染色

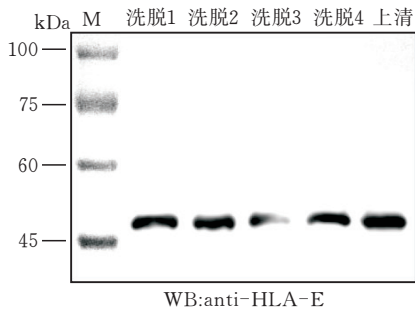


图 5 western blot 验证纯化蛋白 HLA-E 的表达

2.3 GST pull-down 及质谱鉴定

先使纯化后的 GST-HLA-E 蛋白结合在 GSH-琼脂糖珠上,然后与 oHSV2(RIPA 强裂解液裂解)蛋白孵育,洗掉其中不与 HLA-E 结合的杂蛋白,保留剩余的样品。质谱分析结果为 oHSV2 的主要衣

壳蛋白 VP5 与 HLA-E 相互作用(图 6)。

Sample	N	Unused	Accession	Gene	Mw(kD)	Equivalents	Peptides (95%)	Spectra
A1	2	45.82	P06491	MCP	149.084	« »	25	34
	6	22.37	P13747	HLA-E	40.058	« »	13	20
	7	18.39	P35579	MYH9	226.532	« »	9	9

图 6 质谱分析结果

2.4 HLA-E 荧光质粒构建

PCR 扩增见 2.1。回收的 DNA 产物与载体 EGFP-C1、pCMV-N-DsRed 连接,连接反应产物转化 DH5α 感受态细胞。挑取 10 个 Kana 抗性菌落为模板进行菌落 PCR 鉴定,均扩增成功(图 7)。各挑取 3 个重组子送公司测序,测序得到的基因序列同 GenBank 中发布的标准序列一致。提取质粒后,将质粒转染 293T 细胞,然后在体视荧光显微镜下观察,均发荧光(图 8),同时将细胞裂解取上清进行 western blot 分析,可以检测到 HLA-E(图 9),证明 EGFP-C1-HLA-E、pCMV-N-DsRed-HLA-E 质粒构建成功。

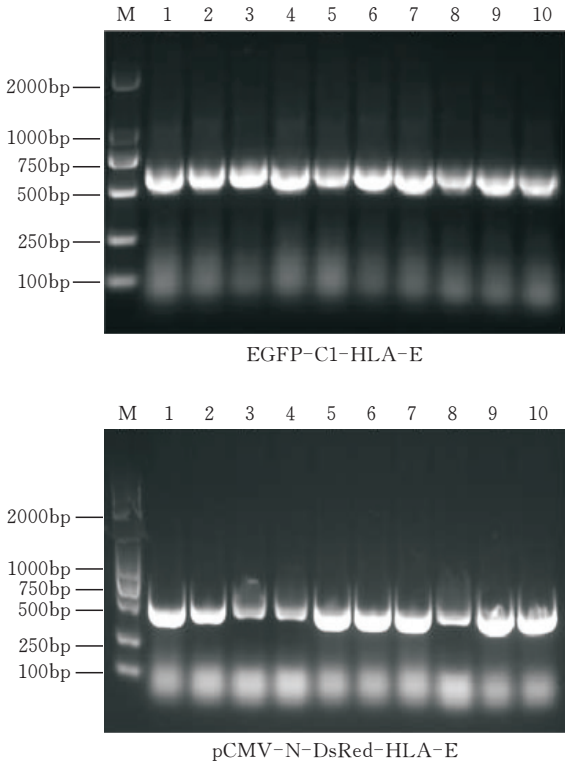


图 7 菌落 PCR 筛选 EGFP-C1-HLA-E、pCMV-N-DsRed-HLA-E 重组子

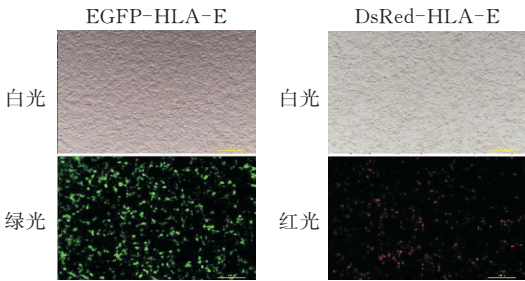


图 8 体视荧光显微镜下转染 HLA-E 荧光质粒的细胞

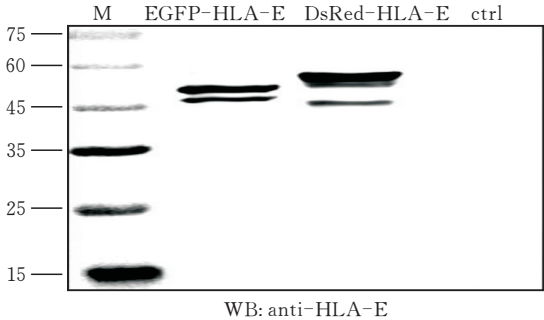


图 9 western blot 验证荧光质粒 HLA-E 的表达

2.5 UL19 荧光质粒构建

提取 oHSV2 病毒 DNA,以其为模板 PCR 扩增 UL19 基因(1~1002 bp),琼脂糖凝胶电泳结果如图 10 所示。

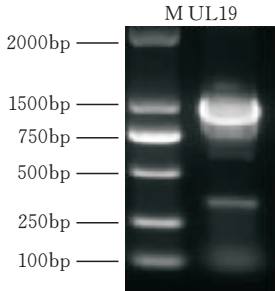


图 10 PCR 扩增 UL19 基因

将回收产物与载体 EGFP-C1、pCMV-N-DsRed 连接,连接反应产物转化 DH5α 感受态细胞。各挑取 10 个 Kana 抗性菌落为模板进行菌落 PCR 鉴定,均扩增成功(图 11)。

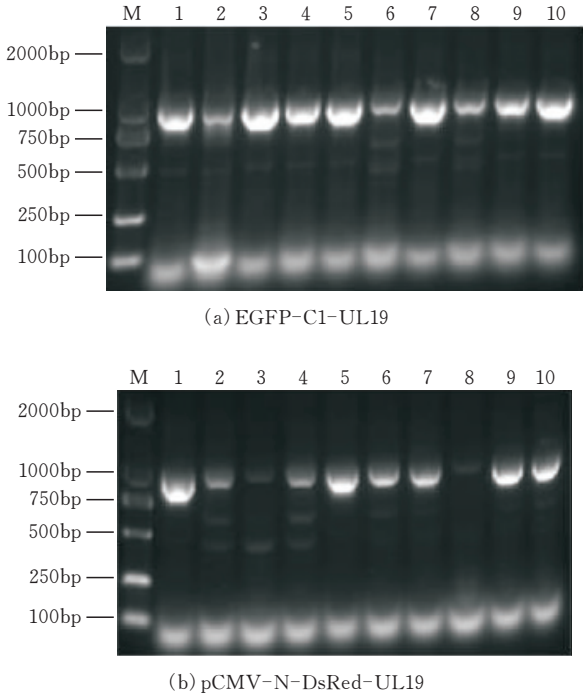


图 11 菌落 PCR 筛选 EGFP-C1-UL19、pCMV-N-DsRed-UL19 重组子

各挑取 3 个重组子送公司测序,测序得到的基

因序列同 GenBank 中发布的标准序列一致。提取质粒后进行双酶切鉴定(图 12)。同时质粒转染 293T 细胞,在体视荧光显微镜下看到均发荧光(图 13)。证明 EGFP-C1-UL19、pCMV-N-DsRed-UL19 质粒构建成功。

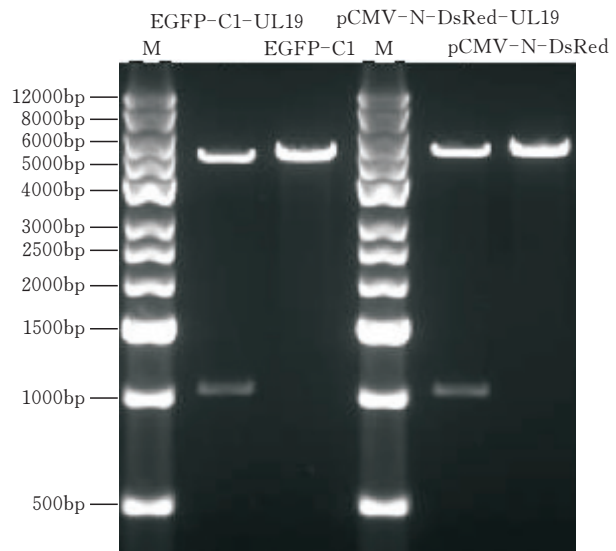


图 12 EGFP-C1-UL19(Kpn I、BamH I); pCMV-N-DsRed-UL19(EcoR I、Xho I)双酶切

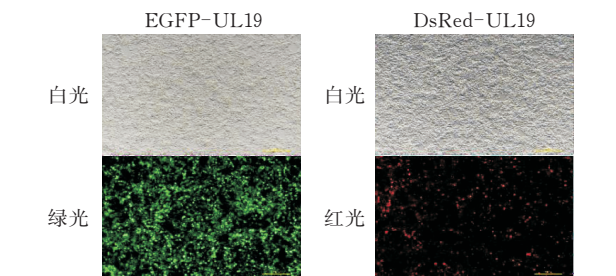


图 13 体视荧光显微镜下转染 UL19 荧光质粒的细胞

2.6 激光共聚焦实验验证 HLA-E 与 VP5 蛋白相互作用

HLA-E 和 UL19 荧光质粒 1 : 1 共转染 293T 细胞,细胞经过固定、染核处理后,在激光共聚焦显微镜下观察。结果显示,无论质粒带何种荧光标签,荧光均在细胞质中分布,在荧光叠加后,可以观察到 HLA-E 和 VP5 蛋白在细胞质中的共定位(图 14)。

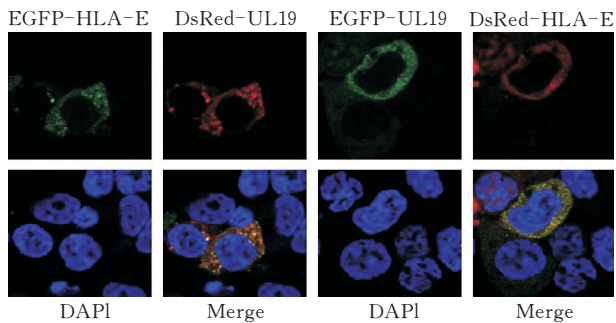


图 14 激光共聚焦实验验证 HLA-E 与 VP5 蛋白相互作用

3 结论

已有研究报道 HCMV(人巨细胞病毒)、HCV(丙型肝炎病毒)也存在病毒感染引起 HLA-E 表达上调的现象。HCMV 感染细胞后,通过其糖蛋白 UL40 产生的多肽与 HLA-E 结合,上调 HLA-E 在细胞表面的表达,然后通过 CD94/NKG2A 受体,从而逃脱 NK 细胞的裂解^[11]。Nattermann 等在 HCV 中也发现了类似的机制,HCV 导致 HLA-E 上调,通过其与 CD94/NKG2A 的相互作用,从而抑制 NK 细胞的裂解功能^[12]。但 EBV(Epstein-Barr 病毒)能够产生一种多肽绑定 HLA-E 分子,破坏 NKG2A 的识别,导致 NK 细胞的激活^[13]。我们前期也发现 oHSV2 在体外上调部分肿瘤细胞系表面 HLA-E 的表达水平。为了研究 oHSV2 是否也能与 HLA-E 结合,从而通过 CD94/NKG2A 调控 NK 细胞激活或抑制,本文应用 GST pull-down 和质谱技术筛选出了 oHSV2 的 VP5 蛋白(由 UL19 基因编码)为 HLA-E 的相互作用蛋白,并进行了初步验证。

HSV-1/HSV-2 UL19 基因编码的 VP5 蛋白是病毒的主要衣壳蛋白,是一种晚期(leaky-late)表达蛋白,在感染复制周期中晚期最高表达^[14]。冷冻电子显微镜下观察到 HSV-2(MS 株)衣壳结构由大约 3000 个蛋白质组成,分为 3 种类型:六邻体(hexons)、五邻体(pentons)和三联体(triplexes)。六邻体和五邻体都包含 VP5(六邻体还包含 VP26);三联体包括 VP23 和 VP19C。VP5 蛋白形成了广泛的分子间网络,包括多个二硫键(总共约 1500 个)和非共价相互作用,与 VP26 蛋白和三联体支撑衣壳稳定和装配^[15]。

我们截取 UL19 基因前 1002 bp 构建了红/绿荧光质粒,与 HLA-E 的荧光质粒共转染 293T 细胞,通过激光共聚焦显微镜的观察,发现它们在细胞质中共定位。但这只是初步的验证,后期将进行免疫共沉淀(co-IP)和双分子荧光互补(BiFC)实验作进一步验证。

[参 考 文 献]

[1] VEINALDER, PIDELASERRA-MARTÍG, MOULIN C, et al. Oncolytic measles vaccines encoding PD-1 and PD-L1 checkpoint blocking antibodies to increase tumor-specific T cell memory [J]. Mol Ther Oncolytics, 2022, 24: 43-58.

[2] ZHANG W, ZENG B, HU X, et al. Oncolytic herpes simplex virus type 2 can effectively inhibit colorectal

cancer liver metastasis by modulating the immune status in the tumor microenvironment and inducing specific antitumor immunity [J]. Hum Gene Ther, 2021, 32(3-4): 815-822.

[3] KAUFMAN H L, KOHLHAPP F J, ZLOZA A. Oncolytic viruses; a new class of immunotherapy drugs [J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14(09): 642-662.

[4] OCALLAGHAN C A. Structure of Nonclassical MHC I (HLA-E, HLA-F, HLA-G, and Orthologs) [M]// RATCLIFFE M J H. Encyclopedia of Immunobiology. Oxford; Academic Press, 2016: 178-189.

[5] WU Z, LIANG J, WANG Z, et al. HLA-E expression in diffuse glioma: relationship with clinicopathological features and patient survival [J]. BMC Neurol, 2020, 20(01): 59.

[6] PALMISANO G L, CONTARDI E, MORABITO A, et al. HLA-E surface expression is independent of the availability of HLA class I signal sequence-derived peptides in human tumor cell lines [J]. Hum Immunol, 2005, 66(01): 1-12.

[7] PETRIE E J, CLEMENTS C S, LIN J, et al. CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence [J]. J Exp Med, 2008, 205(03): 725-735.

[8] ZHEN Z J, LING J Y, CAI Y, et al. Impact of HLA-E gene polymorphism on HLA-E expression in tumor cells and prognosis in patients with stage III colorectal cancer [J]. Med Oncol, 2013, 30(01): 482.

[9] VAN HALL T, ANDRÉP, HOROWITZ A, et al. Monalizumab: inhibiting the novel immune checkpoint NKG2A[J].J Immunother Cancer,2019,7 (01): 263.

[10] ANDRÉP, DENIS C, SOULAS C, et al. Anti-NKG2A mAb Is a checkpoint inhibitor that promotes anti-tumor immunity by unleashing Both T and NK cells [J]. Cell, 2018, 175(07): 1731-1743.

[11] ULBRECHT M, MARTINOZZI S, GRZESCHIK M, et al. Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis [J]. J Immunol, 2000, 164 (10): 5019-5022.

[12] NATTERMANN J, NISCHALKE H D, HOFMEISTER V, et al. The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytotoxicity mediated by natural killer cells [J]. Am J Pathol, 2005, 166(02): 443-453.

[13] MBIRIBINDI B, PENA J K, ARVEDSON M P, et al. Epstein-Barr virus peptides derived from latent cycle proteins alter NKG2A+NK cell effector function [J]. Sci Rep, 2020, 10(01): 19973.

[14] TRAN R K, LIEU P T, AGUILAR S, et al. Altering the expression kinetics of VP5 results in altered virulence and pathogenesis of herpes simplex virus type 1 in mice [J]. J Virol, 2002, 76(05): 2199-2205.

[15] YUAN S, WANG J L, ZHU D J, et al. Cryo-EM structure of a herpesvirus capsid at 3.1 Å [J]. Science, 2018, 360(6384):1-11.

Study on the Interaction Between HLA-E and oHSV2 VP5 Protein

YAO Ruoyi, FAN Jiaqi, XIAO Xiong, ZHOU Qin, WANG Yang, HU Han, LIU Binlei
(College of Food and Biological Engin., Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068, China)

Abstract: Oncolytic viruses represent a new class of immunotherapy therapeutic agents that promote anti-tumor responses through a dual mechanism of action that is dependent on selective tumor cell killing and the induction of systemic anti-tumor immunity. oHSV2 is a new type of oncolytic virus genetically modified from herpes simplex virus type II (HSV-2). Human leukocyte antigen E (HLA-E), an HLA I b molecule, is a potent inhibitory ligand for CD94/NKG2A. Binding of CD94/NKG2A and HLA-E inhibit CTL and NK cell functions. A number of studies have confirmed that HLA-E is over-expressed on the surface of human tumor cells. Our group's previous studies also showed that oHSV2 can upregulate the expression of HLA-E on the surface of some tumor cell lines in vitro. In this study, GST pull-down and mass spectrometry techniques were used to confirm that the VP5 protein (encoded by the UL19 gene) of oHSV2 interacts with HLA-E, and the preliminary verification was carried out by laser confocal experiments. The determination of their interaction lays a research foundation for exploring whether oHSV2 interferes with the binding of HLA-E and CD94/NKG2A, and further provides a theoretical basis for revealing the mechanism of oHSV2 anti-tumor effect exertion.

Keywords: HLA-E; oncolytic herpes simplex virus type II ; proteininteraction

[责任编辑: 张 众]