

ПРОГРАММА НИР

1. Фамилия, Имя, Отчество: Мамедов Азад Энверович.

2. Направление модернизации: Медицинские технологии, прежде всего диагностическое оборудование, а также лекарственные средства

3. Тема научного исследования: Исследование механизмов презентации аутоантигенов при рассеянном склерозе на главном комплексе гистосовместимости HLA-DR.

4. Характер научного исследования: Фундаментальный

5. Ключевые слова и словосочетания, характеризующие тематику научного исследования: рассеянный склероз, главный комплекс гистосовместимости второго класса, основной белок миелина

6. Коды ГРНТИ, охватываемые научным исследованием:

34.43.27 - Иммунология. Антигены

34.43.35 - Иммунология. Регуляция иммунного ответа

34.43.55 - Иммунология. Аутоиммунные состояния

7. Сроки реализации проекта: январь 2018 г. - декабрь 2019 г.

8. Формулировка решаемой проблемы: Проблема лечения рассеянного склероза (РС) остается на сегодняшний день неразрешенной в связи с отсутствием лекарственных препаратов, способных значительно замедлить течение РС. Для разработки лекарств направленного действия необходимо глубокое понимание механизма внутриклеточных процессов при иммунном ответе на собственные антигены. В качестве объекта исследования нами был выбран главный комплекс гистосовместимости II класса, презентующий фрагменты основного белка миелина, вызывающий иммунный ответ при протекании рассеянного склероза. Фундаментальная научная проблема, на решение которой направлен проект, - это изучение роли главного комплекса гистосовместимости II класса в этиологии и патогенезе рассеянного склероза. Понимание механизма данных процессов поможет в создании новых подходов к терапии рассеянного склероза, например, в использовании протективных аллелей HLA-DR в генной терапии.

9. Цели научного исследования: На сегодняшний день наиболее изученная аллель HLA-DR2b (HLA-DRA, HLA-DRB1 1501) является одной из основных молекул, ассоциированной с развитием РС. HLA-DR2b презентует на поверхности антиген-презентирующих клеток иммунодоминантный аутоантигенный пептид основного белка миелина (MBP), одного из антигенов при РС - MBP85-99. Группой Фаворовой О.О. был проведен генетический анализ российских пациентов, здоровых и больных рассеянным склерозом, с генотипированием по группам аллелей HLA-DR1. Из данного анализа мы выявили две группы аллелей, ассоциированные с заболеванием, HLA-DRB1 15 и HLA-DRB1 03, а также две потенциальные протективные группы аллелей HLA-DRB1 01 и HLA-DRB1 11. На данный момент уже имеются предварительные данные о возможном связывании С-концевого фрагмента MBP с протективной аллелью HLA-DR1 (HLA-DRA, HLA-DRB1 0101). Поэтому целью данного научного исследования является изучение механизма протективности аллелей HLA-DR при РС при возможном связывании аутоантигенов.

- 10. Задачи научного исследования:**
1. Получение рекомбинантных препаратов аллелей HLA-DRB1 0101, HLA-DRB1 0301, HLA-DRB1 1101 и HLA-DRB1 1501.
 2. Определение иммунодоминантных фрагментов МВР для других аллелей HLA-DRB1 0301 (ассоциированная с РС) и HLA-DRB1 1101 (протективная).
 3. Анализ кинетической составляющей загрузки пептидов МВР на всех четырех аллелях HLA-DR, катализируемой HLA-DM.
 4. Рентген-структурный анализ комплексов HLA-DR и пептидов МВР.
 5. Изучение процессов презентации HLA-DR фрагментов МВР *in vivo* с использованием модельной системы клеток HEK293.
 6. Общий анализ возможного механизма протективности.

11. Методы решения задач научного исследования: - Создание генетических конструкций, кодирующих патогенные HLA-DR, будет осуществляться стандартными методами генной инженерии.

- Экспрессия белковых молекул HLA-DR будет проводиться в эукариотической системе клеток насекомых, а пептидов МВР, слитных с тиоредоксином, в клетках *E. coli*.
- Определение иммунодоминантных фрагментов МВР будет осуществляться с использованием эпитопной библиотеки МВР методом ИФА.
- Анализ кинетических механизмов загрузки пептидов МВР на HLA-DR с участием HLA-DM будет проводиться методом ИФА, а также на приборе с эффектом поверхностного плазмонного резонанса Т-200.
- Химический синтез пептидов МВР с биотиновой меткой.
- Рентген структурный анализ.
- *In vivo* эксперименты будут проводиться на клетках HEK293 методом трансдукции лентивирусов.
- Дополнительные методики: высокоэффективная жидкостная хроматография и хроматография среднего давления, в особенности аффинная хроматография, разделение белков в полиакриламидных гелях, блоттинг по Вестерну.

12. Основное содержание научного исследования: Главный комплекс гистосовместимости II класса (МНС II) представляет собой гетеродимерный трансмембранный гликопротеин молекулярной массой 50 кДа. МНС II играет одну из важнейших функций не только в адаптивном иммунном ответе на чужеродные патогены, но и в развитии аутоиммунных заболеваний. В основном он экспрессируется «профессиональными» антиген-презентирующими клетками (АПК), такими как дендритные клетки, макрофаги и В-клетки. После загрузки комплекс МНС-пептид направляется к поверхности клетки, где он взаимодействует с Т-клеточными рецепторами, которые в свою очередь располагаются на поверхности CD4+ Т-клеток. Новосинтезированные алфа- и бета-субъединицы МНС II транслоцируются в эндоплазматический ретикулум, где связываются с тримерным шаперонным белком, известным как ассоциированная с МНС II инвариантная цепь. В отсутствие пептида МНС II агрегирует, поэтому инвариантная цепь первоначально защищает гидрофобную пептид-связывающую борозду. Далее образованный комплекс попадает в эндосомальный компартмент. Кроме участков, участвующих в формировании тримера и ассоциации МНС II, инвариантная цепь не структурирована и очень чувствительна к протеолизу, и быстро подвергается деградации эндосомальными протеазами, такими как катепсины. Большая часть инвариантной цепи за исключением короткого пептида, называемого CLIP, удаляется. Этот пептид остается в связанном состоянии в пептид-связывающей борозде МНС II.

Пептиды, предназначенные для загрузки на МНС II, образуются из собственных или чужеродных белков, попадающих в эндосому за счет пиноцитоза, рецептор- опосредованного

эндоцитоза или аутофагии. Вне зависимости от происхождения целевого пептида, перед его загрузкой пептид CLIP должен быть удален из МНС II. Данный процесс обеспечивается неклассическим МНС II – HLA-DM (DM). Понятие «неклассический» означает отсутствие полиморфности и неспособность связывать пептид по сравнению с классическими человеческими МНС II: HLA-DR, -DP и -DQ. DM проявляет каталитическую функцию, способствующую как связыванию, так и высвобождению пептида, поэтому DM можно рассматривать и в качестве фермента. После загрузки комплекс МНС-пептид направляется к поверхности клетки, где он взаимодействует с Т-клеточными рецепторами (TCR), которые в свою очередь располагаются на поверхности CD4+ Т-клеток. В результате узнавания запускается каскад иммунного ответа.

Необходимо отметить, что несмотря на значительное количество работ, как механизм действия DM до сих пор остается до конца неразрешенным, так и конформационные состояния, через которые МНС II проходит во время обмена CLIP на антигенный пептид даже без участия DM, до конца не разрешены. Помимо общих механизмов загрузки антигенных пептидов на МНС II основной интерес составляют роль HLA-DR при развитии аутоиммунных заболеваний и механизмы загрузки аутоантигенных пептидов при патологиях. Одним из таких заболеваний является хроническое нейродегенеративное аутоиммунное заболевание – рассеянный склероз (РС). Анализ иммунного ответа на антигены миелина человека первоначально был направлен на человеческий основной белок миелина. Различные работы продемонстрировали, что DR2 гаплотип присутствует с повышенной частотой у пациентов с РС, в особенности у пациентов Северной Европы с наивысшим риском. Этот гаплотип включает в себя DRB1 1501, DRB5 0101, DQA1 0102 и DQB1 0602 аллели, которые входят в состав следующих МНС II: HLA-DR2b (DRA, DRB1 1501), HLA-DR2a (DRA, DRB5 0101) и HLA-DQ6 (DQA1 0102, DQB1 0602). Пептид центральной части последовательности человеческого MBP84-102 является наиболее иммунодоминантным для MBP-специфичных Т-клеток человека, в особенности у пациентов с DR2 гаплотипом. В работе группы K. Wucherpfennig был точнее определен иммунодоминантный пептид MBP85-99 (ENPVVHFFKNIVTPR), презентируемый HLA-DR2b MBP-специфичным Т-клеточным клоном пациентов с DR2 гаплотипом. Этой же группой исследователей был проведен первый рентген-структурный анализ комплекса МНС II-пептид MBP (HLA-DR2b-MBP85-99).

Данное научное исследование даст возможность понять возможный механизм протективности как для рассеянного склероза, так и, возможно, для аутоиммунных заболеваний в целом. Кроме того данный проект поможет открыть новые аспекты в общих механизмах загрузки пептидов на HLA-DR и в роли HLA-DM в данном процессе.

13. Критические технологии Российской Федерации, в которых возможно использование результатов научного исследования: Геномные, протеомные и постгеномные технологии

14. Приоритет научно-технологического развития Российской Федерации, которому соответствует предлагаемое научное исследование: Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов

15. Планируемые показатели:

№ п/п	Планируемые результаты работы	Год	
		2018	2019
1	Количество научных публикаций (монографии, учебники, учебные пособия, статьи, тезисы докладов, другие публикации)	1	2
	Из них:		

	количество публикаций, индексируемых в международной информационно - аналитической системе научного цитирования Web of Science	1	1
	количество публикаций, индексируемых в международной информационно - аналитической системе научного цитирования Scopus	1	1
	количество публикаций в российских отраслевых научных изданиях, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий РИНЦ	0	0
2	Участие в конференциях, в том числе международных	0	1
3	Количество результатов интеллектуальной деятельности	0	0
	Из них:		
	имеющих правовую охрану и планируемых к использованию в Российской Федерации и за ее пределами	0	0
	имеющих правовую охрану и планируемых к использованию в Российской Федерации	0	0
	имеющих правовую охрану за пределами Российской Федерации	0	0
	имеющих правовую охрану в Российской Федерации	0	0

Руководитель организации _____ / **Иванов В. Т.** /
 директор, д.х.н., акад.РАН (подпись)
 М.П.

Соискатель Стипендии Президента РФ _____ / **Мамедов А. Э.** /
 (подпись)