

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Белогуров Алексей Анатольевич

**БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ АУТОИММУННОЙ
НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ**

Специальность 02.00.10 – Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	7
1. АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ	9
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
2.1 Патогенез рассеянного склероза	12
2.2 Характеристика компонентов иммунной системы при аутоиммунной нейродегенерации	18
Т-лимфоциты	18
В-лимфоциты	20
Цитокиновые сети	23
2.3 Проблематика процессинга и презентации аутоантигенов	25
Презентация антигенов на молекулах главного комплекса гистосовместимости	25
Мультикаталитический протеиназный комплекс (протеасома)	30
Ингибиторы протеасомы	39
2.4 Животные модели рассеянного склероза	42
2.5 Современные подходы к терапии рассеянного склероза	43
Сополимеры (антагонисты HLA)	46
Пептиды – структурные элементы рецепторов Т-клеток (ТКР) и костимулирующих молекул	47
Структурные фрагменты белков миелиновой оболочки	48
Kv1.3 каналo-блокирующие иммуномодулирующие пептиды	49
Терапия, направленная на В-клетки	50
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	53
3.1 Методики работы с клетками бактерий	53
Получение электрокомпетентных клеток бактерий	53
Трансформация клеток <i>E.coli</i> методом электропорации	53
Проведение ПЦР для клональной селекции	54
Ночная культура	54
Приготовление музейного штамма	54
Получение химически компетентных клеток бактерий	54
Трансформация клеток <i>E. coli</i> методом теплового шока	55
3.2 Методики работы с культурами клеток млекопитающих	55
Поддержание в культуре эукариотических клеток линии НЕК и HeLa.	55
Получение культуры зрелых олигодендроцитов	55
Получение активированных CD8+ Т-клеток	56
Получение первичной культуры астроцитов	56
Приготовление музея клеток млекопитающих	57
Выведение линии эукариотических клеток из заморозки	57
Трансфицирование эукариотических клеток методом липофекции	57
Определение цитотоксической активности CD8+ Т-клеток	58
Изучение эффективности интернализации липосомированных пептидов дендритными клетками	58
Оценка цитотоксического действия иммунотоксинов на модельные линии клеток	59
МТТ тест	59

Оценка цитотоксического действия иммунотоксинов на культуру спленоцитов, содержащую популяцию с-тус специфичных В-клеток	59
Проточная цитофлуориметрия	60
3.3 Методики работы с экспериментальными животными	60
Иммунизация мышей линии BALB/c конъюгатом KLH-с-тус	60
Индукция и терапия ЕАЕ в крысах линии DA	60
Терапия ЕАЕ в мышах линии SJL с применением иммунотоксинов	61
Индукция ЕАЕ в мышах линии C57BL/6	61
Терапия ЕАЕ в мышах линии SJL с применением ингибиторов протеасомы	61
Оценка тяжести протекания ЕАЕ	62
3.4 Секвенирование ДНК и транскриптомный анализ	62
Широкомасштабное секвенирование генов переменных участков V_H/V_L из фаг-дисплейных библиотек	62
Параметры фильтров для анализа встречаемости гиперпеременных участков	62
Транскриптомный анализ с помощью микрочиповой системы Affymetrix	63
3.5 Методы масс-спектрометрического анализа	63
Тандемный хромато-масс-спектрометрический анализ	63
Масс-спектрометрический анализ полноразмерного МВР (Top-down)	64
Масс-спектрометрия с мониторингом множественных реакций	65
3.6 Методики работы с бактериофагами	66
Аmplификация фаг-дисплейной библиотеки	66
Процедура обогащения фаг-дисплейной библиотеки	66
3.7 Приготовление липосомальных композиций	67
3.8 Методики работы с нуклеиновыми кислотами	67
Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции	67
Лигирование фрагментов ДНК	68
Выделение плазмидной ДНК	68
Электрофорез ДНК в агарозном геле	69
Электрофорез ДНК в полиакриламидном геле	69
Электроэлюция фрагментов ДНК из геля	69
Создание генетических конструкций, кодирующих МВР и его варианты	70
Создание генетических конструкций для экспрессии рекомбинантных одноцепочечных антител	70
Создание генетических конструкций для экспрессии рекомбинантных полноразмерных антител	70
3.9 Хроматографическое разделение белков и их комплексов	71
Выделение протеасомы из клеток млекопитающих	71
Получение и очистка МВР и его производных	72
Выделение и очистка полноразмерных антител	73
Очистка рекомбинантных одноцепочечных антител (scFv)	73
Выделение и очистка рекомбинантных белков, слитных с тиоредоксином	74
Выделение белков, содержащих Fc домен антитела человека класса G	75
Выделение и очистка рекомбинантных иммунотоксинов, слитных с с-тус пептидом	75
Обращенно-фазовая хроматография	76
3.10 Метод поверхностного плазмонного резонанса	76
3.11 Методики изучения убиквитин-протеасомной системы	77
Получение очищенного препарата протеасомы	77

Фракционирование протеасомы ультрацентрифугированием	77
Убиквитинилирование белков <i>in vitro</i>	77
Протеолиз белков протеасомой <i>in vitro</i>	78
Анализ активности протеасомы.....	78
Определение кинетических параметров ингибирования протеасомы.....	78
3.12 Иммунофемонтный анализ	79
Иммунопреципитация антителами к FLAG эпитопу.....	80
Иммунопреципитация протеасомы.....	80
Иммуноблоттинг.....	80
3.13 Иммуногистохимия	81
Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга мышей линии SJL.....	81
Гистологический и анализ и иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга крыс линии DA.....	82
Иммуноцитохимическое окрашивание первичных культур олигодендроцитов.....	82
3.14 Методики электрофоретического разделения	82
Денатурирующий электрофорез полипептидов в полиакриламидном геле.....	82
Окрашивание ПААГ Кумасси синим R-250 с усилением контраста солью меди	83
Электрофорез протеасомальных комплексов в неденатурирующих условиях.....	83
3.15 Анализ кроссреактивности антител с использованием технологии Luminex	83
3.16 Модификация и функциональный анализ рекомбинантных белков.....	84
Тест РНКазной активности рекомбинантных белков барназа и барназа-с-мус.....	84
Связывание C1q компонента системы комплемента рекомбинантными белками Fc-linker и Fc-linker-с-мус	84
Получение конъюгата БСА-ФИТЦ-с-мус	84
Получение конъюгата KLH-с-мус	85
Выделение, ацетилирование и деиминирование MBP	85
<i>In vitro</i> транскрипция-трансляция	85
Получение и фракционирование лизата ретикулоцитов.....	86
Убиквитинилирование MBP <i>in vitro</i>	86
Изучение подавления <i>in vitro</i> трансляции под влиянием иммунотоксинов.....	86
3.17 Пациенты с рассеянным склерозом.....	86
3.18 Химические реактивы, буферные растворы и сопутствующие материалы. ...	87
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	92
4.1 ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ АУТОИММУННОЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ	92
4.1.1 Структурно-функциональный анализ репертуара аутореактивных иммуноглобулинов к нейральным антигенам.....	92
Выявление эпитопов MBP, характерных для поликлональных аутоантител из сыворотки крови пациентов с РС и модельных животных с ЕАЕ.....	92
Получение фаговой библиотеки варьируемых фрагментов антител пациентов с рассеянным склерозом	95
Селекция MBP-связывающих одноцепочечных антител.....	95
Анализ эпитопной специфичности отобранных антител в виде растворимых scFv	97
Поиск известных гомологов анти-MBP антител	98
Экспериментальное подтверждение существования моноклональных миелин-реактивных аутоантител, способных связывать вирусный антиген.....	100

Изучение факторов, обеспечивающих стабильность аффинности моноклональных аутоантител к МВР.....	102
Анализ кросс-реактивности моноклональных аутоантител к МВР	104
Широкомасштабный анализ репертуаров иммуноглобулинов, предобогаченных на вирусные и миелиновые антигены.	105
Оценка состоятельности гипотезы вирусной этиологии рассеянного склероза	107

4.1.2 Изучение молекулярного механизма убиквитин-независимой внутриклеточной деградации основного белка миелина.....	110
Анализ необходимости в модификации убиквитином для протеасомной деградации МВР в клетках млекопитающих	110
Исследование протеасомной деградации МВР в клетках млекопитающих в присутствии UbK0 и подавления экспрессии E1 (UBA1)	112
Определение концентрационного диапазона, в котором возможен Ub-независимый протеолиз МВР протеасомой	115
Изучение эффекта химической и ферментативной модификации МВР на его гидролиз протеасомой.....	118
Поиск структурных детерминант в составе МВР, опосредующих его захват протеасомой.	119
Конструирование искусственных миелин-подобных дегронов.	121
Определение типа регуляторной субчастицы и субъединицы протеасомы, осуществляющей первичное связывание МВР.....	123
Исследование химической модификации основными производными в качестве способа создания Ub-независимых субстратов	129
Связь Ub-независимой деградации МВР протеасомой с его физиологической функцией.	131
4.1.3 Изучение патофизиологической значимости расщепления миелина различными типами протеасом	136
Ускорение внутриклеточного протеолиза основного белка миелина иммунопротеасомой.. ..	136
Определение субъединичного состава церебральных протеасом в норме и при протекании аутоиммунной нейродегенерации	137
Изучение особенностей фрагментации МВР различными типами протеасом.....	140
Иммунопротеасомы с высоким содержанием субъединицы $\beta 1$ маркируют олигодендроциты цитотоксическим клеткам для атаки	145
Значение убиквитин-независимого протеолиза МВР иммунопротеасомой в развитии аутоиммунной нейродегенерации	148
4.2 НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА	152
4.2.1 Создание модульных бифункциональных иммунотоксинов, способных к узконаправленной элиминации заранее предопределенных популяций патологических лимфоцитов.....	152
Наработка и структурно-функциональный анализ рекомбинантных иммунотоксинов ...	152
Исследование цитотоксических свойств иммунотоксинов <i>ex vivo</i>	156
Селективная элиминация В-клеток в культуре спленоцитов иммунотоксинами на основе барназы и константного домена иммуноглобулина	158
Элиминация иммунотоксинами миелин-реактивных В-клеток <i>in vivo</i>	160
Перспектива использования иммунотоксинов для селективной элиминации аутореактивных В-клеток	163
4.2.2 Разработка подходов к индукции иммунотолерантности при рассеянном склерозе инкапсулированными фрагментами аутоантигенов.	165

Введение иммунодоминантных пептидов MBP, инкапсулированных в маннозилированные липосомы, значительно снижает тяжесть протекания EAE у крыс линии DA	165
Инкапсулированные иммунодоминантные пептиды MBP подавляют развитие EAE путем подавления Th1-цитокинов и продукции BDNF в ЦНС	168
Липосомированные пептиды MBP (Хемус) в качестве универсального способа индукции иммунотолерантности при аутоиммунной нейродегенерации	170
Оценка экспрессии маркеров поверхностной активации РВМС, обработанных пептидами MBP, входящих в состав Хемус	171
Анализ выброса цитокинов мононуклеарными клетками человека, обработанных пептидами – компонентами Хемус	172
Анализ экспрессии маркеров поверхностной активации и выделения цитокинов рDCs, подверженных воздействию Хемус-содержащих пептидов MBP	174
Предполагаемый клеточный механизм индукции иммунотолерантности инкапсулированными миелиновыми антигенами	176
4.2.3 Клинические испытания препарата нового поколения Хемус	177
Проведение испытательной фазы IIa клинических исследований в режиме нарастающей дозировки	177
Анализ уровня цитокинов у больных РС в ответ на введение Хемус	183
Перспектива использования липосомальных композиций в терапии РС	187
4.2.4 Изучение низкомолекулярных ингибиторов иммунопротеасомы в качестве средства для терапии аутоиммунной нейродегенерации	188
Изучение кинетических параметров ингибирования иммунопротеасомы ингибиторами различных классов	188
Терапия экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита β 1i-специфическим пептидилэпоксикетоном	191
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	193
6. ВЫВОДЫ	199
7. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	200

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ат – антитело

АТФ - аденозинтрифосфат

АПК – антигенпредставляющая клетка

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГКГС (МНС) – главный комплекс гистосовместимости

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДМСО – диметилсульфоксид

ДСН – додецилсульфат натрия

ИП – иммунопреципитация

ИТ – иммунотоксин

ИФА – иммунно-ферментный анализ

кДа – килодальтон

НАФ – неполный адъювант Фрейнда

ПААГ – полиакриламидный гель

ПАФ – полный адъювант Фрейнда

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РИБ – рибосом-инактивирующие белки

РС – рассеянный склероз

ФИТЦ – флуоресцеин-5-изотиоцианат

ЦНС – центральная нервная система

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

BSA – бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin)

CaM – кальмодулин

CDR – участок, определяющий комплементарность (complementarity determining region)

CHX – циклогексимид (cycloheximide)

DHFR - дигидрофолатредуктаза (dihydrofolate reductase)

EAE – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (experimental autoimmune encephalomyelitis)

EBNA-1 – Epstein Barr nuclear antigen 1

ETA – псевдомонадный токсин

FACS - флуоресцентно-активированная сортировка клеток (fluorescence-activated cell sorting)

GA – глатирамера ацетат (glatiramer acetate)

HLA – лейкоцитарный антиген человека (Human Leucocyte Antigen)

IFN – интерферон

IgG – иммуноглобулины класса G

IL – интерлейкин

IPTG - изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

IRES – сайт внутренней посадки рибосомы (internal ribosome entry site)

LMP1- latent membrane protein 1

MBP – основной белок миелина (myelin basic protein)

MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)

MOG – миелин-олигодендроцитарный гликопротеин (myelin oligodendrocyte glycoprotein)

MRM – мониторинг множественных реакций (multiple reaction monitoring)

ODC – орнитиндекарбоксилаза (ornithine decarboxylase)

PBS – фосфатно-солевой буфер (phosphate buffered saline)

PLP – протеолипидный белок (proteolipid protein)

scFv – одноцепочечное антитело (single chain fragment variable)

SDS – додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate)

SPR – поверхностный плазмонный резонанс (surface plasmon resonance)

siRNA – малая интерферирующая РНК (small interfering RNA)

SUV – однослойные липосомы

TBS – солевой буфер на основе трис(гидроксиметил)аминометана (tris-buffered saline)

Th – Т-хелперы

Tr, Treg – Т-регуляторные клетки

WB – вестерн-блоттинг (western blotting)

ZsGreen – зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein)

1. АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

На сегодняшний день известно о почти 100 заболеваниях человека, имеющих аутоиммунную этиологию, и ожидается, что в ближайшие десятилетия этот список станет еще более представительным [1]. Аутоиммунные нарушения являются одной из самых страшных глобальных угроз для здоровья человечества в XXI веке, и в скором времени по значимости могут обойти проблему злокачественной трансформации. Одним из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний нейродегенеративной природы является рассеянный склероз (РС или MS¹). По приблизительным оценкам от 2 до 2.5 миллионов человек во всем мире (с частотой в среднем 30 больных на 100 000 человек населения) страдают этим недугом [2]. Средний возраст проявления первых клинических признаков РС колеблется от 20 до 40 лет, что придает этому заболеванию чрезвычайно острое социально-экономическое значение, так как по прошествии 10-15 лет инвалидизации подвергаются лица на пике физического и творческого развития.

Терапия аутоиммунных заболеваний, в частности РС, несмотря на успехи, достигнутые в последние годы с помощью рекомбинантных антител и других полипептидных и малых молекул, специфически действующих на компоненты иммунной системы, не позволяет добиться полного выздоровления пациента. Уровни инвалидизации не дают основания для позитивного прогноза в плане социальной реабилитации. Имеющиеся подходы крайне затратны для бюджетов развитых стран и с учетом длительности лечения ставят под угрозу всю систему реабилитации этих пациентов. Пациентов с рассеянным склерозом в нашей стране насчитывается более 200 000 человек. Существующие на сегодняшний момент методики лечения РС включают в себя в основном иммуносупрессирующие препараты ненаправленного действия, приводящие в большом количестве случаев к системным осложнениям. К сожалению, все лекарственные средства, применяемые в России для лечения РС, производятся за рубежом. Особое звучание эта проблема приобретает в свете сложившейся геополитической ситуации, включая санкционное давление и взятие изоляционного курса, осуществляемое рядом стран в отношении Российской Федерации. В связи с этим очевидно, что отечественная медицина крайне заинтересована, первое – в усилении существующих подходов или замене их на более совершенные, второе – в реализации этих проектов непосредственно на территории Российской Федерации. Резюмируя, можно с уверенностью сказать, что успешное осуществление двух этих задач приобретает приоритет национального значения.

Для разработки лекарств направленного действия необходимо глубокое понимание молекулярно-биологических и биохимических основ процессов, лежащих в основе иммунного

¹ от англ. Multiple Sclerosis

ответа на собственные антигены. Патогенез РС заключается в нарушении целостности миелиновой оболочки нервных волокон, формируемой специализированными клетками – олигодендроцитами. Первопричиной этого является активация миелин-реактивных лимфоцитов, проникающих за гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), что приводит на начальном этапе к демиелинизации, далее к аксональному/нейрональному повреждению и в конечном итоге – гибели олигодендроцитов, клинически проявляющемся в постепенном снижении способности аксонов проводить нервный импульс. В качестве факторов, повышающих риск возникновения РС, можно упомянуть наследственную генетическую предрасположенность, гормональный статус организма, климатические условия местности, в первую очередь связанные с интенсивностью солнечного излучения, а также целый ряд бактериальных и вирусных инфекций. К сожалению, на настоящий момент существующая картина патологических изменений при протекании аутоиммунной нейродегенерации, происходящих на молекулярном уровне, является в значительной степени мозаичной, несмотря на обилие накопленных экспериментальных и клинических данных.

Исторически основную роль в развитии РС отводили Т-лимфоцитам, в то время как исследования последних двух десятилетий выявили особую значимость аутореактивных В-клеток в патогенезе данного заболевания. Однако, последовательности соответствующих им В-клеточных рецепторов (БКР или BCR²) изучены явно в недостаточной степени, при этом для подавляющего большинства из них не установлена даже антигенная специфичность. В связи с вышеизложенным выявление и анализ последовательности таких БКР может прояснить этиологию РС, в то время как взаимно-однозначное соответствие «структура-функция» может способствовать появлению улучшенных методов диагностики и направленной терапии РС. Чрезвычайно актуальной задачей видится детализация вирусных антигенов, способных индуцировать образование В-клеток, реактивных к компонентам миелиновой оболочки. Наконец, в последнее время становится все более очевидным, что направленная элиминация подобных аутореактивных клеток может быть предпринята только после детального выяснения уникальных поверхностных детерминант, которые им присущи. Не менее важным вопросом является презентация миелиновых антигенов в процессе возникновения адаптивного аутоиммунитета. Для реализации своего цитотоксического потенциала Т-клетки должны опознать фрагменты миелина на поверхности олигодендроцитов. В деградации внутриклеточных белков для их последующей презентации особое значение имеет многосубъединичный мультикаталитический белковый комплекс, называемый протеасомой. На сегодняшний день

² от англ. B cell receptor

явным образом выявлена связь молекулярных механизмов деградации с последующей презентацией миелиновых аутоантигенов и развитием РС.

Представленная работа приносит существенное продвижение в ряде важных направлений на пути решения описанных выше проблем, в частности: (i) определение репертуара аутореактивных В-лимфоцитов на уровне отдельных клеток; (ii) экспериментальное подтверждение гипотезы молекулярной мимикрии как одного из вариантов развития РС; (iii) установление связи убиквитин-независимой внутриклеточной деградации физиологически значимого аутоантигена протеасомой с развитием аутоиммунной нейродегенерации; (iv) создание модульных бифункциональных иммунотоксинов, позволяющих проводить узконаправленную элиминацию заранее предопределенных популяций патологических лимфоцитов; (v) разработка подходов к индукции толерантности инкапсулированными фрагментами аутоантигенов, а также использования ингибиторов каталитических субъединиц иммунопротеасомы в качестве средства для терапии аутоиммунной нейродегенерации.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Патогенез рассеянного склероза

Рассеянный склероз (РС или MS³) – это хроническое нейродегенеративное заболевание с явным аутоиммунным патогенезом, приводящее к воспалительной демиелинизации и аксональному и нейронному повреждению [3]. РС, впервые описанный в 1868 году [4], является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний центральной нервной системы (ЦНС). Высокое социально-экономическое значение РС обусловлено тем, что симптомы заболевания впервые проявляются у людей в возрасте от 20 до 40, которые являются наиболее трудоспособной прослойкой населения. Количество больных РС варьируется в диапазоне от 10 до 100 пациентов на 100,000 населения в различных странах. В настоящий момент очевидна гендерная предрасположенность – РС чаще встречается у женщин, чем у мужчин, а также важное значение имеет широта проживания – при приближении к экватору частота этого заболевания снижается. Несмотря на то, что уже почти 80 лет выявлено, что иммунные клетки, а не экзогенные патогены ответственны за развитие РС [5], этиология этого заболевания до сих пор остается неясной.

Различают две формы рассеянного склероза: так называемая ремитирующая (RR-MS⁴) – наиболее распространенная форма заболевания (85-90%), характеризующаяся чередованием процессов де- и ремиелинизации с полным восстановлением пациента при ремиссии, а также первично прогрессирующая (PP-MS⁵), диагностируемая в 10-15% случаев, приводящая к перманентному ухудшению состояния больного [6]. Ремитирующая форма в подавляющем большинстве случаев через некоторое время переходит во вторично прогрессирующую форму (SP-MS⁶). Подобное течение болезни, наступающее в среднем через 15 лет, приводит к необратимому повреждению миелинового покрова, все более усиливающемуся со временем.

Чаще всего при РС повреждению подвергается белое вещество вокруг желудочков мозга, в стволе мозга, в мозжечке и в шейном отделе спинного мозга. «Визитной карточкой» и одновременно основой диагностики РС являются очаги демиелинизации (так называемые «бляшки»), которые имеют характерную форму и локализацию (**Рис. 2.1**). В среднем размеры очагов составляют от 1 до 5 мм, в некоторых случаях они достигают 10 мм за счет слияния и отека.

³ от англ. Multiple Sclerosis

⁴ от англ. Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis

⁵ от англ. Primary Progressive Multiple Sclerosis

⁶ от англ. Secondary Progressive Multiple Sclerosis

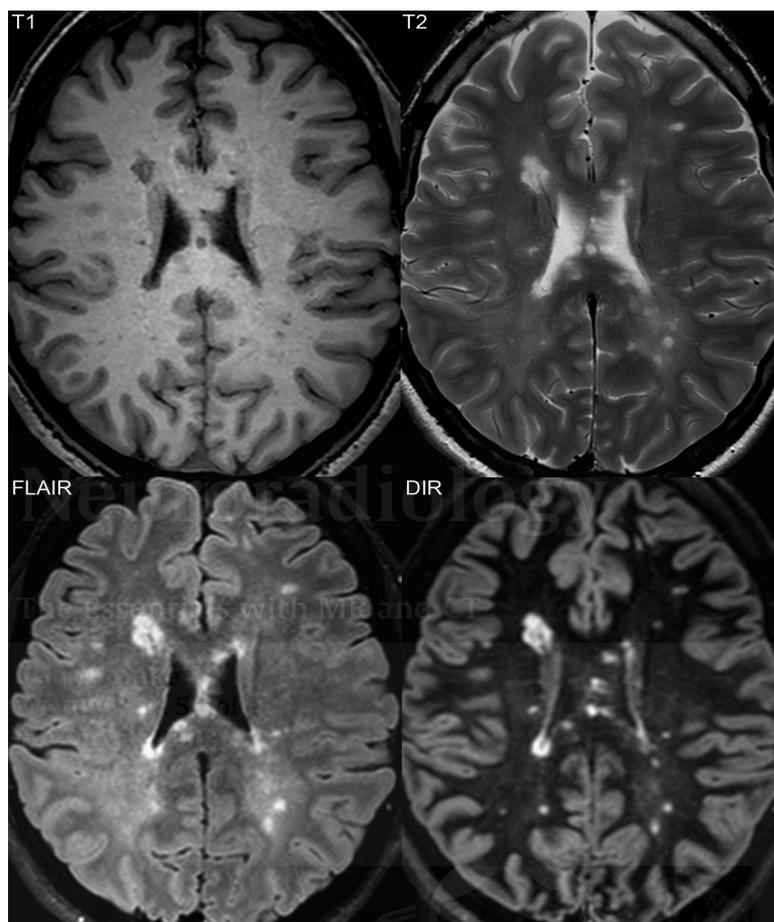


Рисунок 2.1 Бляшки в головном мозге пациента с РС, визуализированные в различных режимах МРТ. При РС повреждению подвергается белое вещество вокруг желудочков мозга, в стволе мозга, в мозжечке и в шейном отделе спинного мозга. Характерными чертами патогенеза РС являются очаги демиелинизации (так называемые «бляшки»), которые имеют характерную форму и локализацию. В среднем размеры очагов составляют от 1 до 5 мм, в некоторых случаях они достигают 10 мм за счет слияния и отека. Различают несколько форм рассеянного склероза: ремитирующая – наиболее распространенная форма заболевания, а также первично прогрессирующая, диагностируемая в 10-15% случаев, приводящая к перманентному ухудшению состояния больного. Ремитирующая форма в подавляющем большинстве случаев через некоторое время переходит во вторично прогрессирующую форму. Симптоматика рассеянного склероза индивидуальна и во многом зависит от области ЦНС, подвергшейся поражению.

Первым в середине 19 века симптоматическую картину РС подробно описал известный французский невропатолог Жан Мартен Шарко. Так называемая «триада Шарко» – наиболее характерные симптомы заболевания – включала в себя подергивание глазных яблок (нистагм), интенционный тремор и прерывистую речь. Через столетие известный американский невропатолог Джон Куртцке с использованием вычислительной техники выявил 685 симптомов, характерных для РС, однако при этом он не охарактеризовал ни одного специфического симптома [7]. Таким образом, симптоматика рассеянного склероза индивидуальна и во многом зависит от области ЦНС, подвергшейся поражению. В целом, для РС описывают ряд генерализованных симптомов, таких как нарушение движений, координации, чувствительности, зрения, тазовых функций, а также различные нейропсихологические нарушения [8]. В свете многоплановости симптоматической картины РС все чаще звучат предложение переклассифицировать РС из заболевания в синдром.

Главный вопрос в изучении РС относится к этиологии этого заболевания. На настоящий момент очевидно, что на риск возникновения РС влияет множество факторов, таких как генетическая предрасположенность, некоторые вирусные инфекции, курение, экологические характеристики зоны проживания и некоторые особенности питания. Генетическая предрасположенность к развитию РС в явном виде не очерчена и определяется в первую очередь

генами главного комплекса гистосовместимости HLA-DR –DQ, а также набором генов, кодирующих рецепторы цитокинов, адгезионные и сигнальные молекулы [9]. Сложность изучения генетической предрасположенности к РС зачастую связана с тем, что наблюдаемый полиморфизм, присущий пациентам с РС, наблюдается в некодирующей области генома, например, в области промоторов или энхансеров. Предположительно, на начальной стадии развития РС происходит активация аутореактивных Т- и В- лимфоцитов собственными белками или же чужеродными вирусными или бактериальными антигенами, схожими с белками миелиновой оболочки. Не совсем ясным остается, по какой причине эти клетки не подвергаются отрицательной селекции в тимусе и красном костном мозге и не попадают под ингибирующее влияние регуляторных Т-клеток. Дальнейшее развитие РС происходит за счет инфильтрации миелин-реактивных лимфоцитов в ЦНС, последующей активации микроглии и притоком гемопоэтических моноцитов.

Вопрос проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) является краеугольным в процессе патогенеза РС. Известно, что при развитии РС проницаемость ГЭБ как для белков с различной молекулярной массой, так и для клеток в значительной степени увеличивается [10]. Проницаемость ГЭБ нарушается главным образом в мозжечке, стволе головного мозга и спинном мозге, в то время как в коре головного мозга и стриатуме ГЭБ остается практически неизменным по сравнению с нормой. Трансмиграция клеток иммунной системы через ГЭБ включает в себя несколько стадий и опосредована взаимодействием поверхностных молекул адгезии сосудистого эпителия и лимфоцитов [11]. К адгезионным белкам относят VCAM-1, ICAM-1, E-селектины и ГКГС второго класса, экспрессия которых в значительной степени возрастает под действием провоспалительных цитокинов, в первую очередь таких как IFN γ и TNF α . Дополнительный эффект провоспалительные цитокины оказывают, модифицируя организацию плотных межклеточных контактов между эндотелиальными клетками, образующих ГЭБ. Важную роль в проникновении клеток иммунной системы в ЦНС играют матриксные металлопротеиназы (ММПs⁷), которые разрушают коллаген типа IV, являющегося основой внеклеточного матрикса [12]. В конечном итоге, в результате стягивания компонентов иммунной системы в ЦНС миелин-продуцирующие клетки, называемые олигодендроцитами, попадают под массивированный удар как адаптивного, так и врожденного иммунитета (**Рис. 2.2**).

⁷ от англ. matrix metalloproteinase

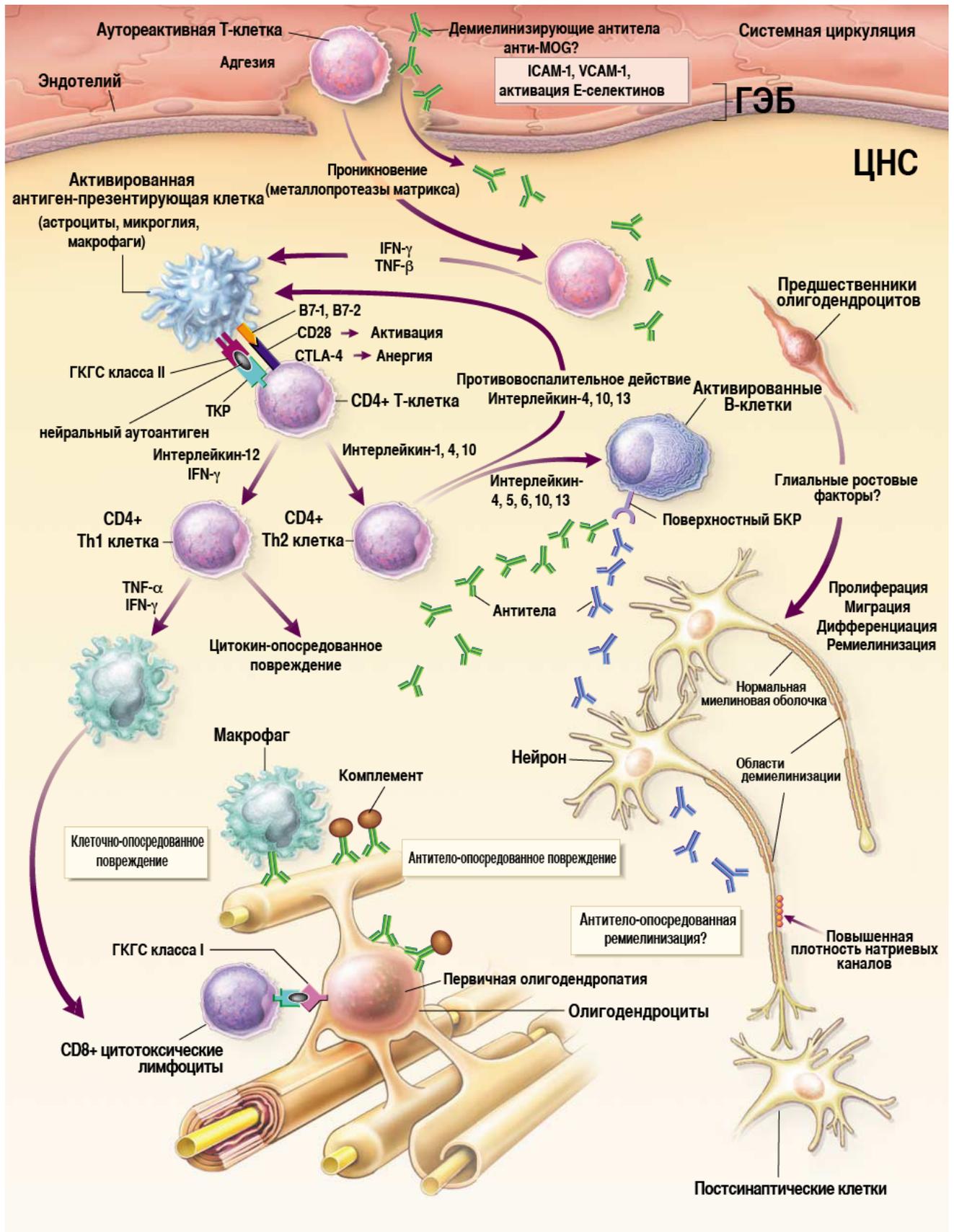


Рисунок 2.2 Молекулярные механизмы, лежащие в основе возникновения РС. Трансмиграция клеток иммунной системы через ГЭБ включает в себя несколько стадий и опосредована взаимодействием поверхностных молекул адгезии сосудистого эпителия и лимфоцитов. В конечном итоге, в результате стягивания компонентов иммунной системы в ЦНС миелин-продуцирующие клетки, называемые олигодендроцитами, попадают под массированный удар как адаптивного, так и врожденного иммунитета.

Отдельного анализа заслуживает гипотеза так называемой молекулярной мимикрии как одного из вариантов возникновения РС [13]. Так, в процессе изучения якорных аминокислотных остатков в последовательности энцефалитогенного пептида МВР, участвующих как в связывании с ГКГС класса II, так и с Т-клеточными рецепторами, исследователям из Гарвардского университета удалось выявить 129 вирусных и бактериальных пептидов со схожим мотивом. Важно отметить, что три из семи клонов Т-клеток, полученных из больных рассеянным склерозом, подвергались активации под воздействием шести вирусных и одного бактериального пептидов из этого списка [14]. В своих уже ставших классическими работах Лэнг и Ли показали, что Т-клеточный рецептор, изолированный из больного рассеянным склерозом, образует устойчивый тримолекулярный комплекс с HLA-DR2b и HLA-DR2a, загруженных энцефалитогенным пептидом МВР и фрагментом ДНК полимеразы (628-641) вируса Эпштейн-Барр [15, 16]. На структурном уровне близость вышеупомянутых комплексов была подтверждена с помощью рентгено-структурного анализа (РСА) [15, 17].

Важно отметить, что компоненты врожденного иммунитета также имеют crucialное значение в терминах развития РС. Достоверно известно, что перманентная активация Toll-подобных рецепторов (TLR⁸) в случае хронического воспаления приводит к ослаблению толерантности к собственным антигенам, активации аутореактивных Т-клеток и как следствие – развитию аутоиммунного заболевания. Так, функции Т-регуляторных клеток в значительной степени ингибируются посредством IL-6, выбрасываемого дендритными клетками в ответ на активацию TLR на их поверхности. Активация TLR9 олигонуклеотидами вызывало появление Т-клеточного ответа на аутоантигены, при этом предварительное введения бактериальной ДНК в значительной степени усиливало протекание экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ⁹) – животной модели РС [6]. С другой стороны, очевидно, что действие TLR не ограничивается патогенной функцией, но может иметь и протекторное влияние. Было показано, что ЕАЕ, индуцируемый в мышах линии C57BL/6, нокаутных по генам TLR4^{-/-} и TLR9^{-/-}, имел более тяжелую степень в сравнении с мышами дикого типа, в то время как нокаут MyD88^{-/-} придавал животным абсолютную устойчивость к развитию ЕАЕ [18].

Без малого 90 лет постулируется, что основными аутоантигенами при РС являются компоненты миелиновой оболочки [5]. Уникальность миелина в сравнении с другими биологическими мембранами проявляется в аномально высоком соотношении липид/белок, составляющее приблизительно 3:1 по массе. Разделение экстрактов миелиновой оболочки человека в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях позволяет идентифицировать

⁸ от англ. Toll-like Receptor

⁹ от англ. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

до 10 полос [19]. Протеолипидный белок (PLP¹⁰) с молекулярной массой около 30 кДа составляет до половины всех белков миелиновой оболочки. Около трети – это основной белок миелина (MBP¹¹), вследствие альтернативного сплайсинга присутствующий в виде трех изоформ 17.5, 18.5 и 21.5 кДа [20]. Минорными компонентами миелина являются миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG¹²) и миелинолигодендроцит гликопротеин (MOG¹³). Миелиновая оболочка вокруг аксонов формируется двумя типами клеток – олигодендроцитами в ЦНС и шванновскими клетками на периферии. Она формируется в результате многократного спирального обвития аксонов мембраной этих клеток (**Рис. 2.3**) таким образом, что как цитоплазматические, так и наружные поверхности мембран плотно соприкасаются друг с другом, образуя так называемые «главную плотную» и «межпромежуточную» линии.

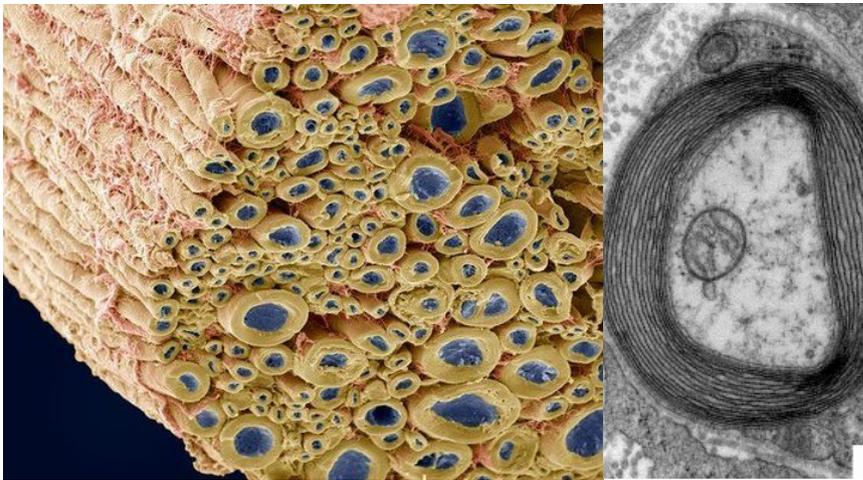


Рисунок 2.3 Сканирующая электронная микроскопия (слева, *Science Photo Library*) и трансмиссионная электронная микроскопия (справа, *Electron Microscopy Facility at Trinity College*) миелинизированных аксонов. Миелиновая оболочка вокруг аксонов формируется в результате многократного спирального обвития аксонов мембраной олигодендроцитов в ЦНС и шванновскими клетками на периферии.

Миелин выполняет ряд важных функций, таких как структурная и защитная, но, безусловно основной является изоляция аксона для эффективного проведения нервного импульса. Было показано, что по миелинизированным волокнам нервный импульс проводится до 10 раз быстрее вследствие плотного соприкосновения намотанных слоёв мембраны олигодендроцита. Аналогично изоляции, применяемой в электротехнике, подобная структура обладает высоким сопротивлением и малой емкостью, таким образом предотвращая продольное распространение импульса [20]. В связи с тем, что эволюционно сложившаяся система проведения нервного импульса требует входа и выхода ионов, приблизительно через каждый миллиметр аксоны прерывается в области так называемых перехватов Ранвье.

¹⁰ от англ. Proteolipid protein

¹¹ от англ. Myelin Basic Protein

¹² от англ. Myelin-associated glycoprotein

¹³ от англ. Myelin oligodendrocyte glycoprotein

2.2 Характеристика компонентов иммунной системы при аутоиммунной нейродегенерации

Адаптивный иммунный ответ, который активируется в ответ на проникновение в организм чужеродного патогена, состоит из трех основных стадий: (1) распознавание антигена функционально незрелыми (наивными) Т- и В-клетками; (2) дифференцировка до зрелых эффекторных клеток и дальнейшая пролиферация; (3) нейтрализация и/или уничтожение патогена в продолжении эффекторной фазы. Адаптивный иммунитет представлен двумя основными типами лимфоцитов, образующих гуморальный и клеточный иммунитет. Известно, что В-клетки продуцируют специализированные защитные молекулы, называемые антителами или иммуноглобулинами, которые нейтрализуют патогены вне клеток. В свою очередь цитотоксические Т-клетки опознают зараженные клетки путем сканирования многообразия внутриклеточных пептидов, представленных на поверхности клетки в контексте ГКГС класса I. класса, представленные на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК).

Т-лимфоциты

Исторически ведущую роль в патогенезе РС отводят аутореактивным CD4⁺ Th1 клеткам [21, 22]. Данное предположение зиждется на изучении ЦСЖ больных РС и бляшек демиелинизации, которые в большом количестве содержат CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки [23, 24], а также данных по индукции ЕАЕ у модельных животных [25]. Классические эксперименты, безапелляционно подтверждающие главенствующую роль Т-клеток в индукции аутоиммунной нейродегенерации у животных, состоят в возможности индуцировать ЕАЕ путем адаптивного переноса сенсибилизированных CD4⁺ Т-клеток от другой особи, уже имеющей ЕАЕ [26, 27]. Хорошо известны данные, свидетельствующие о генетической предрасположенности к рассеянному склерозу, которое реализуется через локусы ГКГС класса II, функция которого состоит в презентации антигенов CD4⁺ Т-клеткам. Трансгенные мыши, в организме которых коэкспрессируются оба типа ГКГС II -DR и -DQ, а также изолированный из больного МВР-специфичный Т-клеточный рецептор (ТКР), развивают как спонтанный, так и индуцированный ЕАЕ [27].

В значительно меньшей степени на развитие РС изучено влияние цитотоксических CD8⁺ Т-клеток. Тем не менее не приходится сомневаться, что аутореактивные CD8⁺ Т-клетки также основательно вовлечены в патогенез РС [28]. Повышенное количество CD8⁺ Т-клеток, специфичных к нейроантигенам, выявлено в крови пациентов с ремитирующей формой РС [29], при этом в сравнении с CD4⁺ Т-клетками в очагах демиелинизации наблюдается до 10 раз больше CD8⁺ Т-клеток [30]. ГКГС I класса, которые опознаются CD8⁺ Т-клетками, экспрессируются на

всех типах церебральных клеток, в то время как только клетки микроглии в достаточном количестве экспрессируют ГКГС класса II, который ассоциирован с CD4+ T-клетками [31].

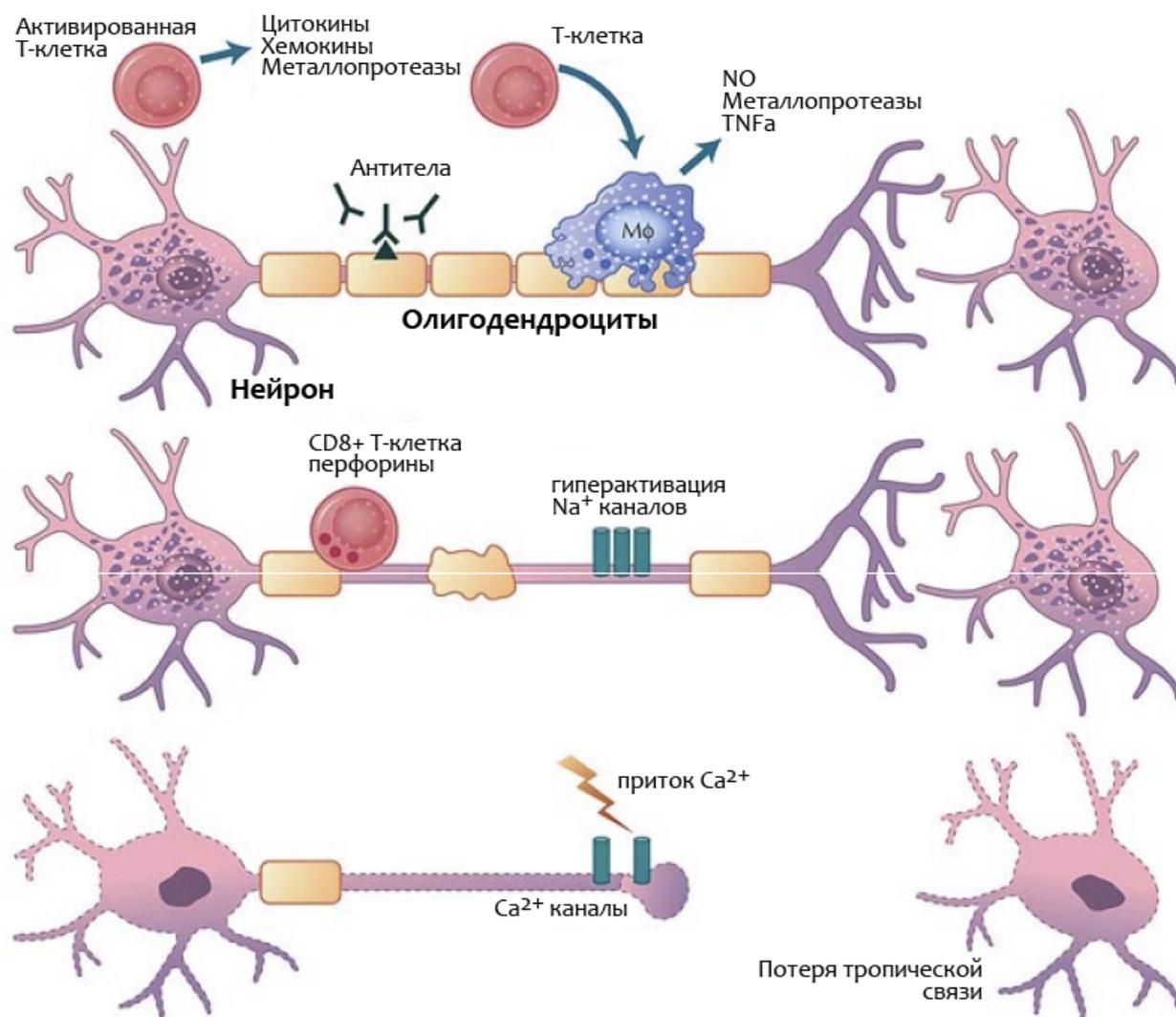


Рисунок 2.4 Каскад событий, предположительно лежащий в основе демиелинизации и дегенерации аксонов при РС. В ЦНС активированные Т-лимфоциты выделяют воспалительные цитокины, хемокины и MMPs. Кроме того, Т-клетки активируют клетки и макрофаги микроглии для усиления фагоцитарной активности, продукции цитокинов и высвобождения токсичных медиаторов, таких как оксид азота (NO). Аутоантитела, пересекающие ГЭБ или локально продуцируемые в ЦНС, способствуют процессу демиелинизации. Аутоантигены активируют каскад комплемента, что приводит к образованию мембранно-атакующего комплекса и последующего лизиса клетки-мишени. CD8+ Т-клетки способны атаковать аксоны и олигодендроциты напрямую. Сочетание токсичных компонентов и нарушенного взаимодействия аксонов с глией открывает путь к аксональной дегенерации. Активация Ca²⁺-зависимых каналов, потеря сигнальной активности и трофической поддержки могут также способствовать дегенерации аксонов в связанных нейронах. Адаптировано из <http://www.multiple-sclerosis.org/news/Apr2003/F.NR03-3-1-03.03.jpg>

Множество экспериментальных данных свидетельствует о протеасом-опосредованном процессинге и презентации миелиновых антигенов, которые узнаются цитотоксическими CD8+ Т-клетками на поверхности олигодендроцитов [32]. Исследование Antel и соавторов

продемонстрировало непосредственный лизис олигодендроцитов человека МВР-специфичными цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ или CTL¹⁴). Наконец, важным свидетельством является способность адаптивно переносимых CTL индуцировать ЕАЕ у модельных мышей. Современное представление о развитии аутоиммунной нейродегенерации подчеркивает кооперативность действия аутореактивных Т-хелперных клеток и цитотоксических лимфоцитов, которые могут наносить удары по своей мишени последовательно (Рис. 2.4).

Необходимо отметить, что механизм развития РС подразумевает, но не ограничивается наличием аутореактивных Т-клеток. Миелин-реактивные клоны были найдены и у условно здоровых индивидуумов, что позволяет говорить о значительно более тонком механизме, лежащем в основе этиологии рассеянного склероза. На настоящий момент появилось понимание значительной роли Т-регуляторных клеток (Tr или Treg) в патогенезе РС [33]. Так, оказалось возможным полностью подавить развитие спонтанного ЕАЕ у трансгенных T/R-мышей, Т-клетки которых экспрессируют исключительно МВР-специфичный Т-клеточный рецептор, путем пересадки CD4⁺CD25⁺ Treg от мышей дикого типа или мышей линии T/R+, в которых лишь часть Т-клеток аутореактивна по отношению к МВР [34]. Механизм действия подобных Treg, по-видимому, включает в себя IL-10-опосредованный сигнальный путь [35].

В-лимфоциты

В-клетки представляют собой уникальный резервуар антител – защитных молекул, достигающих изменчивости до 10¹¹ и поэтому потенциально способных связывать любой возможный антиген. В-клетки и продуцируемые ими антитела активно привлекаются в ЦНС при протекании РС, о чем свидетельствуют наблюдаемые комплемент-зависимые демиелинизирующие иммуноглобулины [36] и обнаружение подобных антител в перехватах Ранвье, индуцирующих повреждение аксонов *in vivo* [37]. Многочисленные данные указывают на наличие аутоантител против миелиновых белковых компонентов в крови [38, 39] и ЦСЖ [40, 41] пациентов с РС. Более того, микроскопический анализ высокого разрешения свидетельствует о наличии миелин-специфических аутоантител в демиелинизирующих бляшках у пациентов с РС и модельных приматов, что указывает на их непосредственный вклад в разрушение миелина [42]. Важность В-клеток в патогенезе ЕАЕ была подтверждена путем создания трансгенных мышей, В-клетки которых экспрессировали тяжелую цепь MOG-специфичного антитела [8.18C5] [43] в паре с эндогенной легкой цепью иммуноглобулина. Важно отметить, что данные мыши с

¹⁴ от англ. cytotoxic lymphocyte

высокой частотой спонтанно развивали ЕАЕ вследствие появления значительной популяции MOG-специфичных В-клеток и, как следствие, высокого титра анти-MOG антител [44].

Функции В-клеток можно разделить на три основные категории: (i) представление антигена с последующей активацией Т-клеток (ii) секрецию антител и (iii) секрецию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [45] (**Рис. 2.5**). Все эти функции в конечном счете связаны

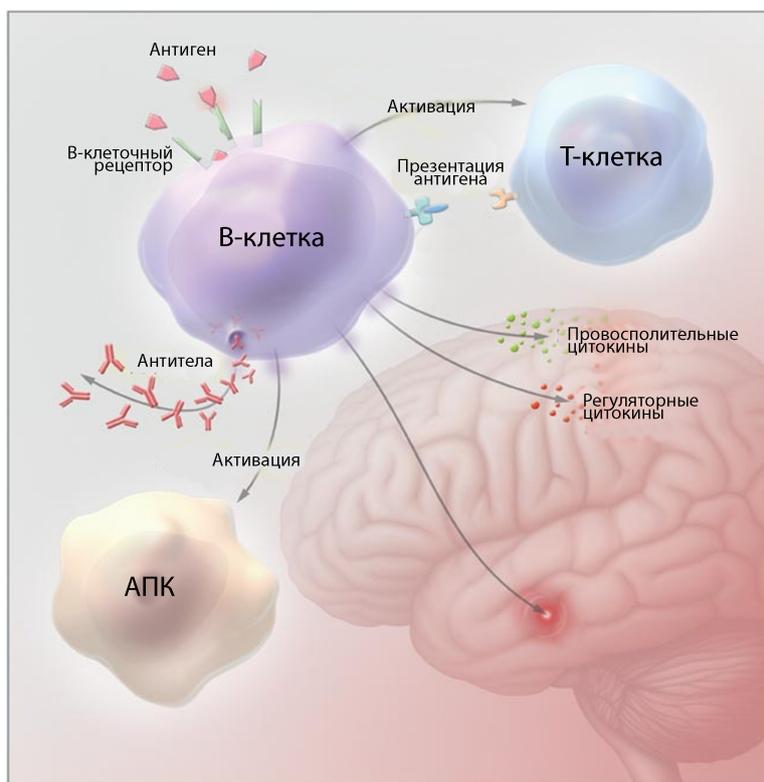


Рисунок 2.5 Роль В-клеток в патогенезе рассеянного склероза состоит в связывании антигенов БКР, их интернализации и последующей презентации, активации Т-клеток, взаимодействии с АПК и выработке антител. В здоровом организме большинство аутореактивных В-клеток, направленных против собственных антигенов, подвергаются деплеции благодаря двум механизмам отрицательного отбора: клональная делеция в красном костном мозге и редактирование рецепторов на периферии. Тем не менее известно, что значимое количество аутоантител продуцируется даже в нормальных физиологических условиях. Весьма вероятно, что это происходит благодаря наличию низкоаффинных аутореактивных переходных В-клеток, которые являются для организма резервом вариативности. Адаптировано из [46].

со структурой В-клеточного рецептора (БКР), который распознает фрагменты антигена и обеспечивает последующую активацию и амплификацию В-клеток [47]. В здоровом организме большинство аутореактивных В-клеток, направленных против собственных антигенов, подвергаются деплеции. Этот процесс происходит благодаря двум механизмам отрицательного отбора: клональная делеция в красном костном мозге и редактирование рецепторов на периферии [48]. Тем не менее недавно было показано, что значимое количество аутоантител продуцируется даже в нормальных физиологических условиях [49]. Весьма вероятно, что это происходит благодаря наличию низкоаффинных аутореактивных переходных В-клеток, которые являются для организма резервом вариативности [48]. Наличие подобных клеток в репертуаре периферических В-клеток позволяет распознавать более широкий спектр чужеродных молекул, потенциально уменьшая негативное воздействие инфекций, особенно на ранних стадиях [50].

Известно, что в норме В-клетки не обладают способностью проникать за ГЭБ, тем не менее вследствие нарушения его проницаемости [6] у больных РС детектируется аккумуляция в ЦНС

клонально родственных В-клеток [51] в виде фолликулярных структур [52] вместе с наличием в тканях мозга и ЦСЖ антител, специфичных к МВР, PLP и MOG [39], а также к ДНК и другим компонентам нервных тканей. Анализ аутореактивных клонов В-клеток свидетельствует о повышенной встречаемости семейств D2, D3, JH4 и зародышевых линий VH1–69, VH4–34 и VH4–39 [53]. Превалирующим иммуногенным компонентом миелина для В-клеток человека является МВР, при этом показано, что у некоторых больных в тканях мозга более 50% от общего пула В-клеток составляют миелин-реактивные лимфоциты [54]. Линии В-клеток из пациентов с РС специфичны к различным эпитомам МВР, в первую очередь к области от 84-го до 102-го аминокислотного остатка. Уоренн и Кац в своих классических работах неоднократно показывали, что внутривенное введение больным рассеянным склерозом иммунодоминантных эпитопов МВР₇₅₋₉₅, приводит к значительному снижению титра анти-МВР антител как в сыворотке, так и в ЦСЖ [55]. Дальнейшие исследования этих авторов [56] по картированию эпитопа миелин-реактивных антител позволили вычлени его в виде пептида ⁸⁵PVVHFFKNIVTP⁹⁶, который с успехом используется для индукции ЕАЕ у модельных животных [57]. Существует мнение, что хотя антитела сами по себе и не вызывают воспаления в ЦНС, миграция антител в ЦНС через поврежденный ГЭБ может усугублять развитие патологии [58, 59]. Иммуноглобулины способны участвовать в разрушении тканей, и подобные демиелинизирующие антитела были обнаружены в сыворотке крови по крайней мере у части пациентов с РС [36]. Имеются данные об обнаружении в сыворотке крови больных РС, а также мышей линии SJL ЕАЕ, каталитических антител к МВР, которые не только связывают, но и гидролизуют этот антиген [60, 61].

Аутоантитела к МВР и MOG довольно давно предложены в качестве биомаркеров РС [62]. Согласно данным МРТ, уровень анти-МВР аутоантител коррелирует с воспалительным процессом в ЦНС [63]. Группой исследователей [64] было показано, что у 72% больных РС в сыворотке детектируются анти-MOG антитела и в 59% случаев обнаруживаются аутоантитела к МВР. Титр миелин-реактивных антител можно использовать в качестве прогностического критерия. Данные об уровне аутоантител к MOG и МВР в группе индивидуумов с высоким риском возникновения РС свидетельствует, что 83% больных с положительным антительным ответом на MOG и 95% на оба антигена были переклассифицированы в CDMS в течение 52 месяцев, в то время как 77% испытуемых, сыворотка крови которых не содержала миелин-реактивных антител, были здоровы [62]. Одной из классических особенностей РС, наряду с другими хроническими инфекциями ЦНС, таких как подострый склерозирующий лейкоэнцефалит (болезнь Ван-Богарта), нейросифилис (сифилис центральной нервной системы) и менингит, является наличие более чем у 90% больных олигоклональных иммуноглобулинов в

головном мозге и ЦСЖ [65]. Интересно, что в случае всех вышеперечисленных заболеваний, специфичность данных антител напрямую связана с патогеном, вызывающим нарушение гомеостаза [66]. При РС специфичность олигоклональных иммуноглобулинов до сих пор остается загадкой.

Существует мнение, что главенствующей ролью В-клеток в развитии аутоиммунных заболеваний, и рассеянного склероза в частности, может быть не продукция антител, а в большей мере их антиген-презентирующая способность [67] и продукция цитокинов [68]. В случае подходящих антигенов эффективность презентации В-клетками может на четыре порядка превосходить подобную функцию у дендритных клеток [69]. Хорошо известен экспериментальный факт, что у мышей, дефицитных по В-системе иммунитета, возможно индуцировать ЕАЕ исключительно пептидом MOG₃₅₋₅₅, но не полноразмерным белком [70]. Данное наблюдение очевидно свидетельствует о необходимости В-клеточной системы для правильного процессинга антигена в терминах индукции аутоиммунной нейродегенерации. В-клетки могут также являться и источником противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10 или TGF- β , таким образом сдвигая равновесие аутоиммунитета в другую сторону. Суммируя все вышесказанное, можно с уверенностью утверждать, что В-клетки играют скорее двойственную, но в любом случае существенную роль в патогенезе аутоиммунной нейродегенерации. В свете этой сентенции установление взаимно-однозначного соответствия паратоп-эпитоп для аутореактивных БКР может быть весьма перспективными как с позиции осознания механизмов развития заболевания, так и для разработки новых подходов терапии РС.

Цитокиновые сети

Почти все без исключения хронические аутоиммунные заболевания и иммунопатологии содержат в своем анамнезе дисрегуляцию цитокинов, поэтому очевидно, что цитокиновый статус играет важную роль в прогрессии РС [71, 72]. Цитокины и хемокины не только подавляют или активируют различные типы иммунных клеток, но и могут способствовать миграции патогенных клеток через ГЭБ [73]. Известно большое количество исследований, описывающих цитокиновый статус пациентов с РС путем прямого измерения уровня цитокинов в крови и ЦСЖ [74, 75], а также определения экспрессии соответствующей мРНК в периферических мононуклеарных клетках крови (PBMCs¹⁵) [76, 77]. В качестве примера наиболее известных исследований участия цитокинов в прогрессии РС можно привести клинические испытания интерферонов. При этом на настоящий момент применение IFN β признано практически полностью безопасным [78, 79] и

¹⁵ от англ. Peripheral Blood Mononuclear Cells

является одним из наиболее распространенных методов лечения РС по всему миру [80], в то время как введение IFN γ может нести непосредственную угрозу не только здоровью, но и даже жизни пациентов [81].

Патогенез РС оказывает сильное влияние на уровень экспрессии многих генов в PBMCs. По сравнению со здоровыми контролями в значительной степени увеличивается экспрессия генов, кодирующих IFN γ , IL-1 β , TNF и других членов этого суперсемейства [77]. Анализ транскриптома периферических лимфоцитов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, включая РС, выявил повышенный уровень экспрессии гена, кодирующего IL-8 [82], что коррелирует с увеличением концентрации IL-8 в ЦСЖ больных РС [83]. Имеющиеся данные свидетельствуют о наличии связи между изменением цитокинового статуса и тяжестью протекания РС [84]. Так, известно, что концентрация IL-6 увеличена у пациентов с РС, при этом уровень IL-6 положительно коррелирует с прогрессией заболевания, но, тем не менее, имеет тенденцию уменьшаться при наличии активных очагов воспаления. Уровень IFN γ у пациентов с РС в целом повышен, также наблюдается корреляция с тяжестью заболевания числом активных бляшек демиелинизации.

Интересная ситуация сложилась с цитокином TNF, который обладает одновременно провоспалительным [85] и противовоспалительным [86, 87] действием при аутоиммунной нейродегенерации. Любопытным фактом, еще более усложняющим интерпретацию данных, является то, что экспрессия TNF подавляется при развитии РС [77], а применение препаратов, ингибирующих синтез TNF, увеличивает риск возникновения РС [88, 89]. Дополнительным свидетельством положительного эффекта TNF на патогенез РС может служить экспериментальный факт увеличения риска развития РС при наличии укороченной формы рецептора TNFR1 [90, 91]. Наконец, в ЦСЖ, но не в сыворотке пациентов с РС уровень TNF в значительной степени повышен и положительно коррелирует с тяжестью развития заболевания [92].

Наряду с физиологической оценкой состояния пациента уровень цитокинов может быть важным диагностическим критерием [93]. Во время клинических испытаний общепринятой практикой является анализ уровней цитокинов в различных физиологических жидкостях. Подобный анализ может пролить свет на патогенез заболевания, механизм действия лекарственного средства и методы их улучшения, а также изменения в стратегии их применения. Было показано, что после длительной терапии IFN β в различных вариантах (авонекс, ребиф и бетаферон) концентрация сывороточного IFN γ уменьшилась [94-96]. Другие исследования свидетельствуют, что лечение IFN β приводит к увеличению уровня TNF и снижению уровня IL-

5, в то время как сочетанная терапия $IFN\beta$ и аторвастатином увеличивает уровень провоспалительного цитокина $IL-12p70$ [97].

Проблематика баланса Т-хелперов первого и второго типа при воспалительных и аутоиммунных заболеваниях занимает умы мирового научного сообщества с конца 80-х годов прошлого века. Основа разрабатываемой теории состоит в том, что цитокины, вырабатываемые Т-хелперами, способны как ингибировать, так и усиливать действие друг друга, в этой связи сдвиг в сторону Th1 или Th2 может иметь решающий эффект. Функционирование клеток типа Th1 в первую очередь связывают с выбросом $IFN\gamma$ и в меньшей степени с $IL-12$, $IL-2$ и TNF , в то время как $IL-4$, $IL-5$ и $IL-10$ являются классическими Th2 цитокинами. На основании значительного массива экспериментальных данных РС считается Th1-опосредованным, тем не менее до сих пор это утверждение периодически подвергается критическому переосмыслению [98, 99]. Значительно повышенное соотношение Th2/Th1 является отличительной чертой введения глатирамера ацетата [100]. В последнее время аналогичный эффект был продемонстрирован у пациентов с РС, получавших моноклональное антитело против $\alpha 4$ -интегрин (натализумаб) [101].

2.3 Проблематика процессинга и презентации аутоантигенов

Презентация антигенов на молекулах главного комплекса гистосовместимости

Молекулы ГКГС двух классов имеют различные, хотя и связанные между собой функции. ГКГС класса I презентируют пептиды Т-клеткам, которые экспрессируют вспомогательную молекулу CD8, а молекулы ГКГС класса II презентируют пептиды CD4-положительным Т-клеткам. Чтобы Т-клетки могли активироваться и участвовать в иммунном ответе, расположенный на их поверхности антиген-специфический рецептор и соответствующие вспомогательные молекулы должны прореагировать с комплексом ГКГС-антигенный пептид. Активированные CD4+ Т-клетки начинают вырабатывать цитокины, обладающие выраженным иммунорегуляторным эффектом. Активированные CD8+ Т-клетки уничтожают зараженные вирусами или трансформированные клетки [102]. На поверхности каждой клетки презентируется приблизительно 10000 различных пептидов, которые представляют практически все клеточные белки; каждому белку соответствует один или несколько пептидов [103]. ГКГС человека также известен под наименованием «лейкоцитарный антиген человека» или HLA¹⁶. Сформулированное выше правило подавляющее, но не абсолютное, так как известны экспериментальные

¹⁶ от англ. human leukocyte antigen

свидетельства презентации экзогенных антигенов на ГКГС класса I, а внутриклеточных антигенов – на ГКГС II класса [104, 105].

Молекулы ГКГС II класса экспрессируются на поверхности клеток практически любого типа; тем не менее, процессинг и презентация внеклеточных антигенов в разных типах клеток идут с заметно различающейся эффективностью. Это позволяет выделять несколько типов клеток: макрофаги, В-лимфоциты и дендритные клетки (DC¹⁷), в особую группу – «профессиональные» антиген-презентирующие клетки [106]. Схематично процесс презентации антигенов на ГКГС класса II представлен на рисунке 2.6. На первом этапе антиген в результате эндоцитоза попадает в фаголизосомы и подвергается действию сериновых и аспарагиновых протеаз, называемыми катепсинами. Параллельно с этим молекулы ГКГС класса II собираются во внутреннем пространстве ЭПР. Комплексы на этом этапе загружены инвариантной цепью, которая препятствует взаимодействию ГКГС с иррелевантными пептидами. Дальнейшее слияние фаголизосомы, содержащей фрагменты антигенов, с вакуолью с ГКГС класса II приводит к протеолитическому расщеплению инвариантной цепи, при этом с ГКГС класса II остается связан только короткий универсальный пептид CLIP¹⁸, оккупирующий антиген-связывающий участок. Далее в процессе, катализируемом особым вариантом HLA-DM, происходит обмен пептида CLIP на фрагмент антигена. Результирующий комплекс ГКГС класса II с пептидом антигена, находящийся внутри секреторной гранулы, транспортируется к клеточной поверхности.

На ГКГС класса I, как правило, экспонируются фрагменты внутриклеточных белков. ГКГС I класса по структуре представляет собой гликозилированный гетеродимер вариабельной тяжелой цепи длиной около 350 аминокислотных остатков и константной легкой цепи около 100 аминокислотных остатков длиной, известной также как β2-микроглобулин. Пептид-связывающий карман размером приблизительно 1x2.5 нм формируется α1 и α2-доменами тяжелой цепи. Связывание пептида осуществляется путем «погружения» боковых групп определенных аминокислотных остатков в составе пептида в «карманы» в структуре ГКГС I класса. При этом N и C-концы пептида также пространственно сближены с аминокислотными остатками молекулы ГКГС и взаимодействуют с ними. Человеческий геном содержит три локуса ГКГС I класса –A –B и –C с суммарной вариативностью в 80 различных аллелей. Таким образом, высокий полиморфизм генов ГКГС класса I обеспечивает различную пептидную специфичность соответствующих аллелей вследствие уникального местоположения и формы связывающих карманов.

¹⁷ от англ. dendritic cells

¹⁸ от англ. Class II-associated Invariant chain Peptide

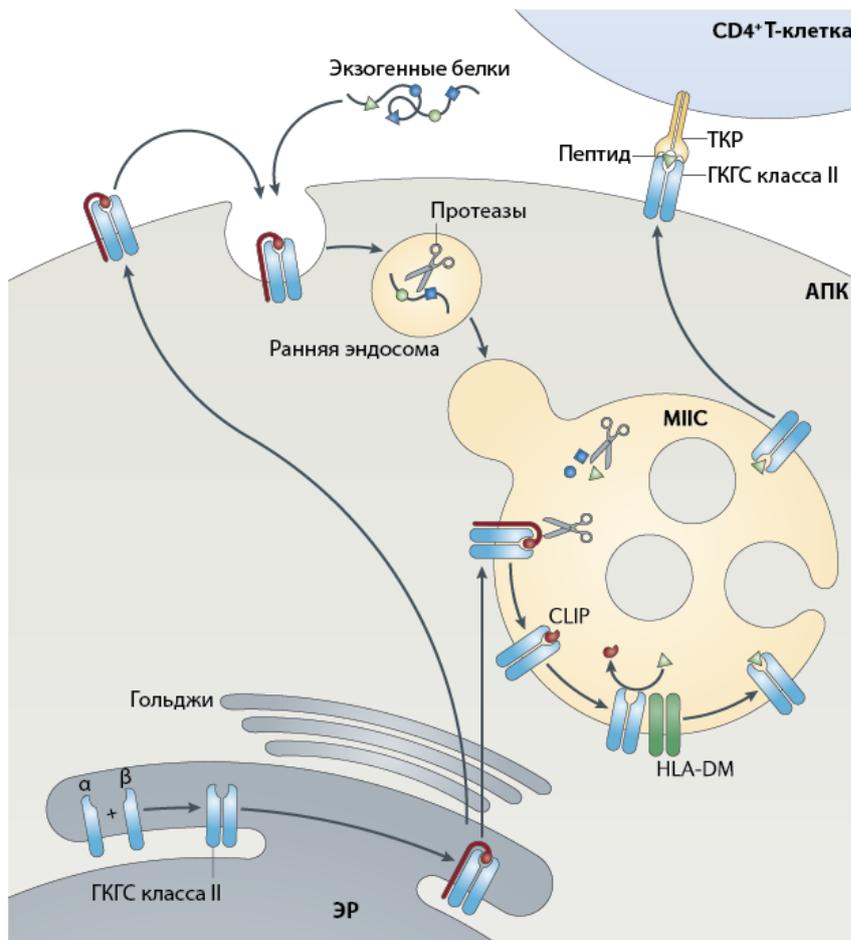


Рисунок 2.6 Механизм процессинга внеклеточных антигенов и их презентация на ГКГС класса II. Антиген в результате эндоцитоза попадает в фаголизосомы и подвергается действию протеаз. Параллельно с этим молекулы ГКГС класса II собираются во внутреннем пространстве ЭПР. Дальнейшее слияние фаголизосомы, содержащей фрагменты антигенов, с вакуолью с ГКГС класса II приводит к протеолитическому расщеплению инвариантной цепи, при этом с ГКГС класса II остается связан только короткий универсальный пептид CLIP, оккупирующий антиген-связывающий участок. Далее в процессе, катализируемом особым вариантом HLA-DM, происходит обмен пептида CLIP на фрагмент антигена. Затем ГКГС класса II, загруженный пептидом антигена транспортируется к клеточной поверхности. Адаптировано из [107].

В стандартных условиях абсолютное большинство презентуемых пептидов являются фрагментами собственных внутриклеточных белков и вследствие этого не опознаются Т-клетками как враждебные. При какой-либо патологии, к примеру заражении клетки вирусом, на ГКГС класса I происходит выброс чужеродных пептидов, которые являются сигналом к уничтожению такой клетки цитотоксическими Т-клетками. Процесс презентации внутриклеточных белков начинается с их убиквитинилирования и дальнейшей фрагментации протеасомой, а также другими протеазами (**Рис. 2.7**). В цитозоле присутствует ряд ферментов, осуществляющих расщепление фрагментированных белков до антигенных пептидов, наиболее важными из которых являются трипептидил-пептидаза II (ТРП II¹⁹), лейцил-аминопептидаза, пурамицин-чувствительная аминопептидаза, блеомицин-гидролаза и тимет-олигопептидаза (ТОР²⁰) [108]. Предполагают, что трипептидил-пептидаза, расщепляющая полипептидную цепь после остатков лизина и обладающая как экзо-, так и эндопротеазной активностью, может

¹⁹ от англ. tripeptidyl-peptidase II

²⁰ то англ. thimet oligopeptidase

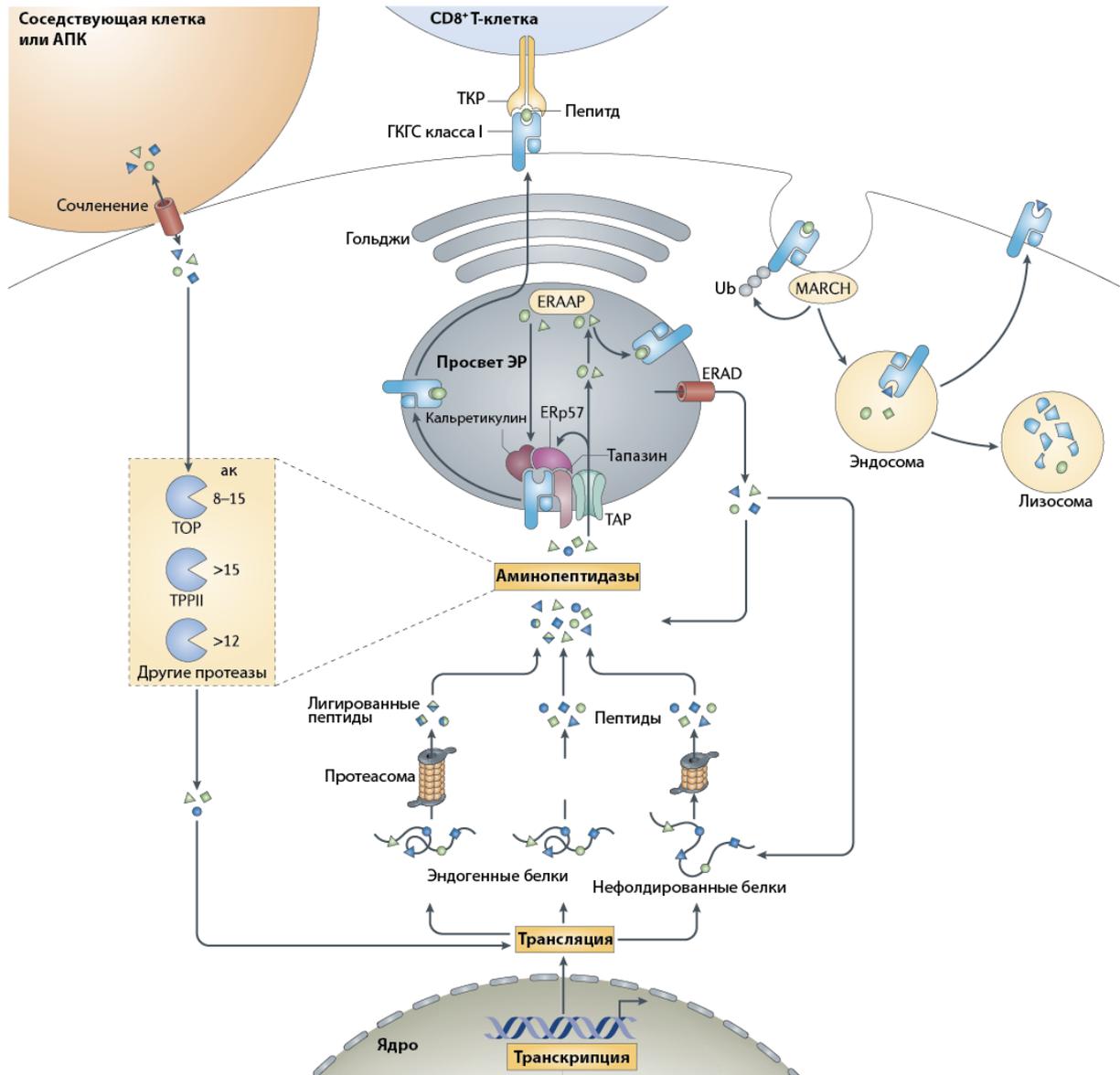


Рисунок 2.7 Схематический процесс представления антигена на ГКГС класса I). Аналогично функциональным белкам, дефектные продукты рибосомы (DRiPs²¹) подвергаются деградации протеасомой в ядре и цитозоле. Протеасома также может создавать новые генетически некодированные антигены путем лигирования. Полученные пептиды являются субстратами для цитозольных аминопептидаз, таких как TOR и TRP2, которые обрезают и уничтожают большинство пептидов. Небольшая часть пептидов избегает терминального разрушения путем транслокации в просвет ЭПР благодаря действию TAP, который является частью комплекса загрузки пептида (PLC²²), который также содержит ГКГС класса I, ERp57, кальретикулин и тапазин). Далее пептиды могут связываться с ГКГС I напрямую, либо после дополнительной обрезки ERAAP. ГКГС класса I, загруженные пептидом, затем отстыковываются от PLC, высвобождаются из ЭПР и переносятся на плазматическую мембрану для представления антигена CD8+ Т-клеткам. Пептиды и молекулы ГКГС класса I, которые не образовали пару друг с другом, переносятся обратно в цитозоль с помощью ЭПР-ассоциированной системы деградации белков (ERAD²³), где разрушаются или подвергаются обрезке. Часть презентуемых пептидов может проникнуть в клетку путем транслокации через щелевые соединения. Поверхностные молекулы ГКГС класса I подвергаются убиквитинилированию белками семейства MARCH для интернализации и деградации. Адаптировано из [107].

²¹ от англ. defective ribosomal products

²² от англ. peptide loading complex

²³ от англ. endoplasmic reticulum-associated degradation

работать как в тандеме протеасомой, отсекая избыточные аминокислоты с N-конца пептида, так и в индивидуальном режиме, создавая эпитопы, альтернативные таковым при гидролизе протеасомой. Экспериментальное подтверждение данной гипотезы получено при изучении презентации некоторых пептидов, которые присутствуют в неизменном количестве в составе ГКГС класса I в случае практически полного ингибирования протеасомы, при этом ингибирование TRP II в значительной степени подавляет их презентацию [109, 110]. Особую роль в генерации внутриклеточных эпитопов играет TOP, расщепляющая внутренние пептидные связи в пептидах длиной 6-17 аминокислотных остатков. Еще одной важнейшей функцией цитозольных пептидаз является расщепление пептидов до аминокислот, так как даже в случае наиболее эффективно представленных внутриклеточных эпитопов из 100 молекула белка, деградированных протеасомой, лишь одна послужит физическим источником пептида, который в дальнейшем будет загружен на ГКГС I класса. При рассмотрении менее эффективно презентируемых эпитопов это соотношение снижается до 1:10000 и даже более [110].

Пептиды – продукты расщепления – перебрасываются с помощью TAP1²⁴ и TAP2 во внутреннее пространство эндоплазматического ретикулума. Известно, что для взаимодействия ГКГС и пептида, последний должен строго соответствовать ряду параметров, таких как длина (8-11 аминокислотных остатков) и расположение якорных аминокислотных остатков. Для придания пептидам необходимой длины во внутреннем пространстве ЭПР присутствует определенный набор ферментов, которые отщепляют одну или несколько аминокислот с N-конца, при этом карбоксипептидазы в просвете ЭПР отсутствуют. Схожие функции имеет аминокислотная пептидаза ERAAP²⁵, которая обрезает поступающие в ЭПР пептиды до нужной длины. В случае если ситуация все же не разрешается положительно, этот фермент классифицирует пептид как неподходящий для загрузки на ГКГС и осуществляет его полное разрушение [111]. На заключительном этапе загруженный пептидом ГКГС I класса перемещается к поверхности клетки через аппарат Гольджи [106].

Фрагментация белков, которая происходит в ЭПР и цитозоле, имеет два принципиальных отличия. В цитозоле своевременная остановка протеолиза для получения пептида корректной длины менее вероятна, тогда как в ЭПР N-концевой экзопротеолиз заканчивается, как только образуется пептид оптимальной длины. Во-вторых, протеолиз в просвете ЭПР является компенсаторным механизмом, нивелирующим различное сродство антигенных пептидов к TAP. Например, показано, что пептиды, имеющие остаток пролина во втором положении, обладают

²⁴ от англ. transporter associated with antigen processing

²⁵ от англ. Endoplasmic Reticulum-Associated AminoPeptidase

наибольшим сродством к TAP, поэтому последовательное удаление N-концевых аминокислот после транслокации пептида в просвет ЭПР позволяет разрешить противоречие между селективностью TAP и ГКГС [110].

Как уже было отмечено, количество и состав пептидов, экспонированных на поверхности клетки в составе ГКГС I класса, в значительной мере определяет её судьбу в терминах прохождения контроля, осуществляемого цитотоксическими лимфоцитами. В базовом состоянии лишь малая часть пептидов избегает разрушительного воздействия аминопептидаз и презентуется на клеточной поверхности. Основная задача системы внутриклеточной деградации в данном случае состоит в гидролизе короткоживущих регуляторных, неправильно свернутых или потенциально токсичных белков до отдельных аминокислот. В случае воспалительного процесса под воздействием провоспалительных цитокинов в значительной степени увеличивается экспрессия каталитических иммуносубъединиц протеасомы, специализированного регулятора PA28 $\alpha\beta$, транспортеров TAP1 и TAP2 [112], а также лейциновой аминопептидазы и ERAAP [113], что позволяет большему количеству пептидов избежать терминального распада и быть загруженными на ГКГС класса I.

Мультикаталитический протеиназный комплекс (протеасома)

Метаболизм более чем половины внутриклеточных белков контролирует сложнейшая и эволюционно совершенная система, состоящая из двух основных компонентов – убиквитин-лигаз и протеасомы (**Рис. 2.8**), именуемая также убиквитин-протеасомная система (UPS²⁶). UPS насчитывает более 1000 индивидуальных представителей, при этом большинство из них имеют критическое значение для функционирования и выживаемости клеток [114].

Схема функционирования UPS представлена на рисунке 2.9. Убиквитин (Ub) синтезируется в виде тандемно-конденсированного полиубиквитина либо в виде слитого белка с рибосомным белком (RP²⁷). Деубиквитирующие ферменты (DUBs²⁸) гидролизуют изопептидную связь между молекулами Ub или Ub и RP для получения свободного Ub. Каскад конъюгации Ub с белком-мишенью состоит из трех классов убиквитин-лигаз: E1 (Ub-активирующий фермент, UBA), E2 (Ub-конъюгирующий фермент) и E3. Ub активируется посредством E1, образуя высокоэнергетическую тиоэфирную связь путем АТФ-зависимой реакции между карбоксилем C-концевого остатка глицина в составе Ub и цистеина в активном сайте E1. Активированный Ub передается к E2, а E3 затем присоединяет Ub к конкретному

²⁶ от англ. ubiquitin-proteasome system

²⁷ от англ. ribosomal protein

²⁸ от англ. DeUBiquitinase

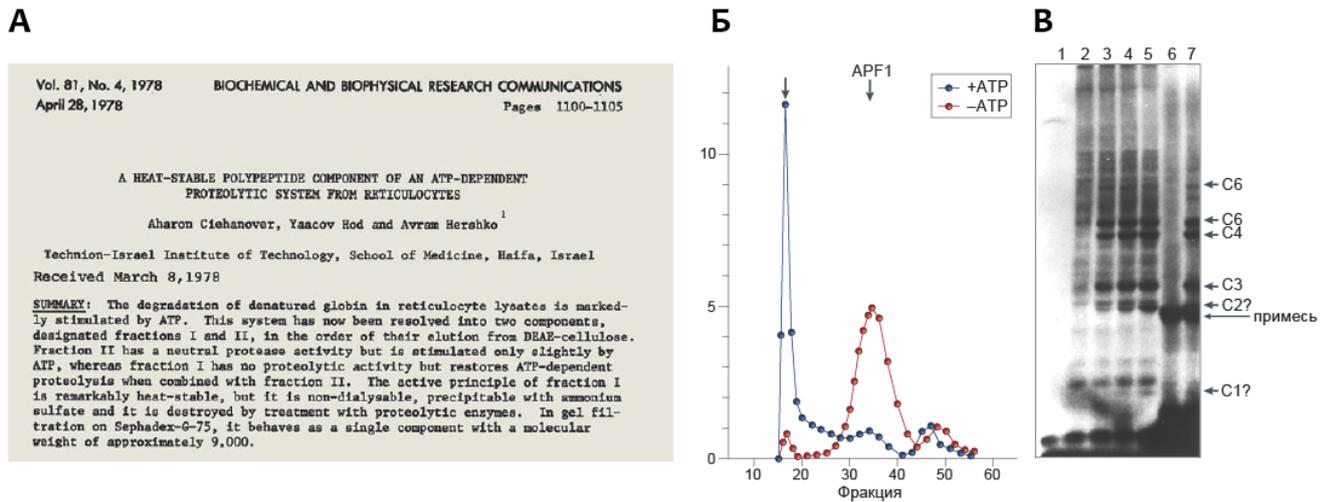


Рисунок 2.8 (А) Название и реферат оригинальной рукописи, которая инициировала дополнительные исследования, приведшие к открытию UPS. В представленной работе описывается фракционирование клеточного экстракта на две комплементарные фракции. Активный компонент в одной фракции был идентифицирован как небольшой белок размером 8.5 кДа (в настоящий момент известный как убиквитин). Понимание того, что активное начало в исходном экстракте состоит из двух физически разделенных компонентов, позже привело к открытию каскада конъюгирующих ферментов и протеолитического аппарата. **(Б)** ^{125}I -меченный АТФ-зависимый протеолитический фактор 1 (APF1²⁹ – позднее идентифицированный как убиквитин), очищенный от фракции I, инкубировали с фракцией II в отсутствие (красная кривая) или присутствии АТФ, и далее смесь разрешали гелепроникающей хроматографией. На графике приведены уровни радиоактивности различных фракций. Добавление АТФ (синяя кривая) привело к смещению практически всей радиоактивности во фракцию, соответствующую свободному объему колонки. **(В)** ^{125}I -меченный APF1, очищенный от фракции I, инкубировали с фракцией II в отсутствие (дорожка 1) или наличии (дорожки 2-5) АТФ. При увеличении количества немеченого лизоцима (дорожки 3-5), появились новые полосы (конъюгаты, обозначенные С1-С6), содержащие меченый APF1. Для демонстрации того, что эти вновь сформированные полосы содержат лизоцим, немеченой APF1 инкубировали с фракцией II и ^{125}I -меченым лизоцимом в отсутствие (дорожка 6) или присутствии (дорожка 7) АТФ. При этом были детектированы полосы, аналогичные таковым в дорожках 3-5. Представлена автордиография разрешенных в полиакриламидном геле (ПААГ) реакционных смесей. Разница в молекулярной массе между соседними конъюгатами соответствует молекулярной массе APF1, что указывает на то, что несколько молекул APF1 конъюгированы с каждой молекулой белковой мишени. Адаптировано из [114] с разрешения автора.

полипептидному субстрату. Ферменты E3 разделяют на два основных класса. E3 типа RING³⁰ одновременно связываются как с E2, так и с субстратом, ассистируя E2 в терминах переноса Ub непосредственно на субстрат, минуя E3. Лигазы E3 типа NECT³¹ сами образуют тиоэфирную связь с активированным Ub, получая его от E2, а затем уже переносят Ub на субстрат. В составе белка-мишени модификации подвергаются остатки лизина, при этом карбоксильная С-концевая группа Ub образует изопептидную связь с ε-аминогруппой остатка лизина. Далее происходит наращивание полиубиквитиновой цепи до 4-8 остатков, в которой каждый следующий Ub соединен с предыдущим через ковалентную связь, аналогичную связи Ub-субстрат. Наиболее

²⁹ от англ. ATP-dependent proteolysis factor

³⁰ от англ. Really Interesting New Gene

³¹ от англ. Homologous to E6AP Carboxyl Terminus E3 ubiquitin ligases

частым акцептором последующего Ub является остаток лизина в положении 48 в составе предыдущего Ub. Полиубиквитиновые субстраты распознаются и подвергаются АТФ-зависимой деградации 26S-протеасомой. В процессе динамического равновесия DUBs осуществляют деубиквитинирование субстратов, а также высвобождают полиубиквитиновые цепи при гидролизе субстратов протеасомой.

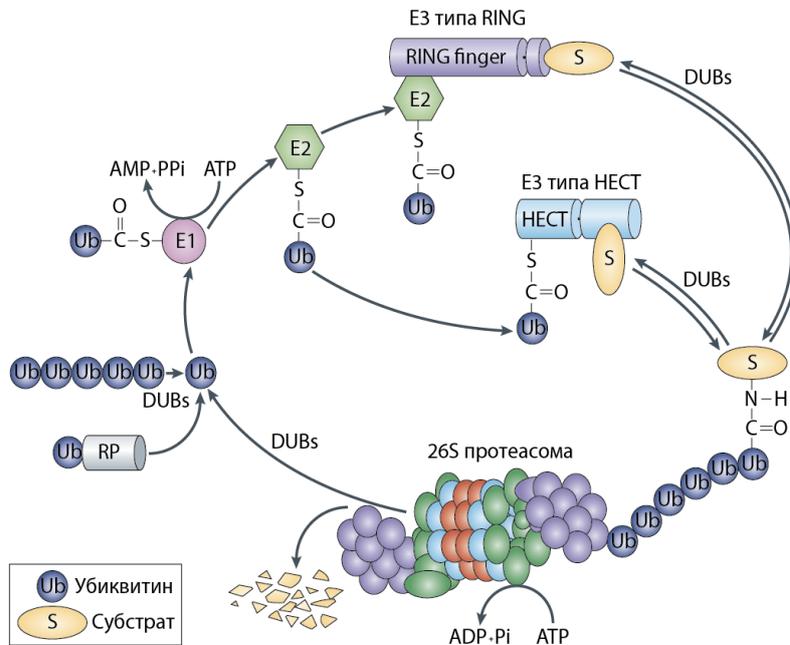


Рисунок 2.9 **Схема функционирования UPS.** Убиквитин (Ub) синтезируется в виде тандемно-конденсированного полиубиквитина либо в виде слитого белка с рибосомным белком (RP). Каскад конъюгации Ub с белком-мишенью состоит из трех классов убиквитин-лигаз: E1, E2 и E3. Ub активируется посредством E1, образуя высокоэнергетическую тиоэфирную связь, далее активированный Ub передается к E2, а затем E3 присоединяет Ub к конкретному полипептидному субстрату. На терминальной стадии субстраты распознаются и подвергаются АТФ-зависимой деградации 26S-протеасомой. Адаптировано из [115].

В классической 26S протеасоме различают две субчастицы, обозначаемые 20S и 19S (Рис. 2.10А). Так называемое «каталитическое ядро» или «коровая» 20S субчастица представляет собой цилиндр, состоящий из четырех гептамерных колец – два внешних α - и два внутренних β -кольца. 19S-регуляторная субчастица (RP³², также известная как PA700³³) состоит из двух десятков белков и подразделяется на «основание» и «крышку», которые состоят из регуляторных частиц трипл-А (Rpt³⁴), обладающих АТФазной активностью, и регуляторных частиц, не являющихся АТФазами (Rpn³⁵). Большинство археи и актинобактерий имеют по одному типу α - и β -субъединиц (Рис. 2.10Б), тем не менее их состав может варьироваться от одной α -типа и двух β -

³² от англ. regulatory particle

³³ от англ. proteasome activator 700

³⁴ от англ. regulatory particle triple-A ATPase

³⁵ от англ. Regulatory Particle, Non-ATPase-like

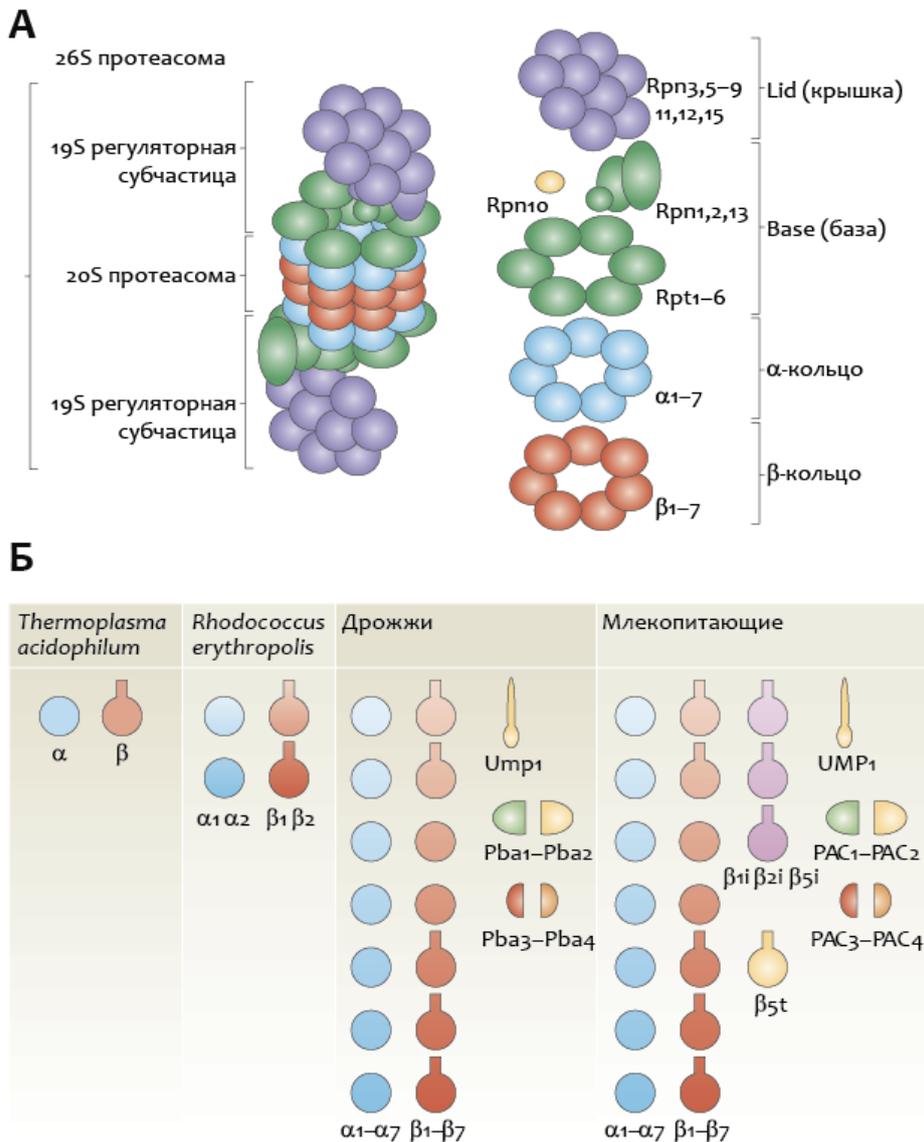


Рисунок 2.10 Строение 26S протеасомы. **(А)** 26S протеасома состоит из каталитического ядра – 20S-протеасомы (стопка из четырех гептамерных колец – два внешних α -кольца и два внутренних β -кольца) и 19S-регуляторной субчастицы (RP, также известную как PA700). Регуляторная частица далее разделяется на подкомплексы, именуемые «основанием» и «крышкой», которые состоят из гексамера АТФаз (RPT1-6) и набора регуляторных частиц, не являющихся АТФазами (RPN). RPN10 окрашена в желтый, так как данная частица расположена на интерфейсе основания и крышки.

(Б) Сборка эукариотических 20S протеасом производится набором шаперонов UMP1³⁶ и PAC1-4³⁷. Адаптировано из [115].

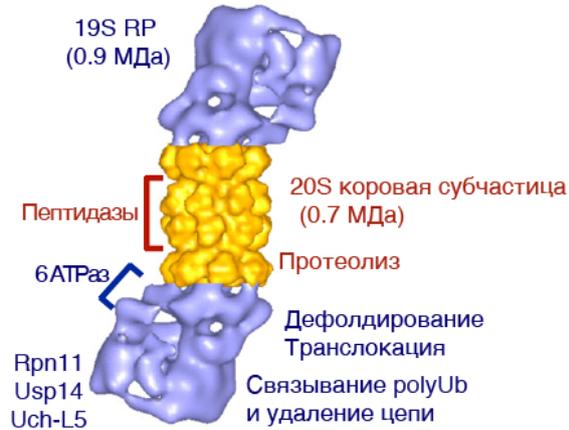
типа, двух α -типа и двух β -типа или же двух α -типа и одной субчастицы β -типа. Среди видов, которые синтезируют две субъединицы β типа, одна из двух β -субъединиц считается неактивной в *Sulfolobus*, *Pyrobaculum* и *Aeropyrum*. Вопреки разнообразию композиций, наблюдаемых у прокариот, все эукариотические 20S-протеасомы от дрожжей до млекопитающих содержат по семь различных α - и β -субъединиц. Функционально 20S субчастица отвечает за протеолитическое расщепление субстрата, основание 19S регуляторной субчастицы, благодаря гидролизу АТФ, обладает способностью разворачивать субстрат и транслоцировать его в каталитическую полость, в то время как крышка 19S регуляторной субчастицы содержит Rpn11,

³⁶ от англ. ubiquitin-mediated proteolysis 1

³⁷ от англ. proteasome assembly chaperone

которая является деубиквитинойзой (**Рис. 2.11А**). Rpn10, Rpn13 и, как показано недавно, Rpn1 являются рецепторами полиубиквитиновой цепочки. Из семи β -субъединиц, только три, $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$, обладают каталитической активностью (**Рис. 2.11Б**). Каталитический механизм расщепления

А 26S (20S+19S) протеасома



Б 20S протеолитическая субчастица

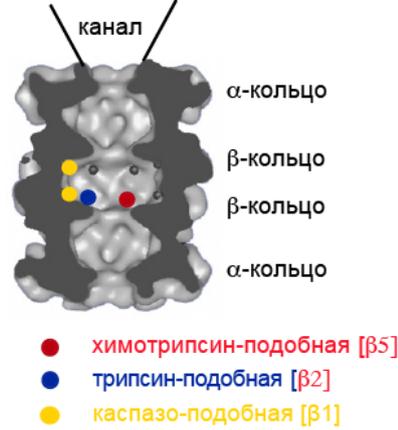
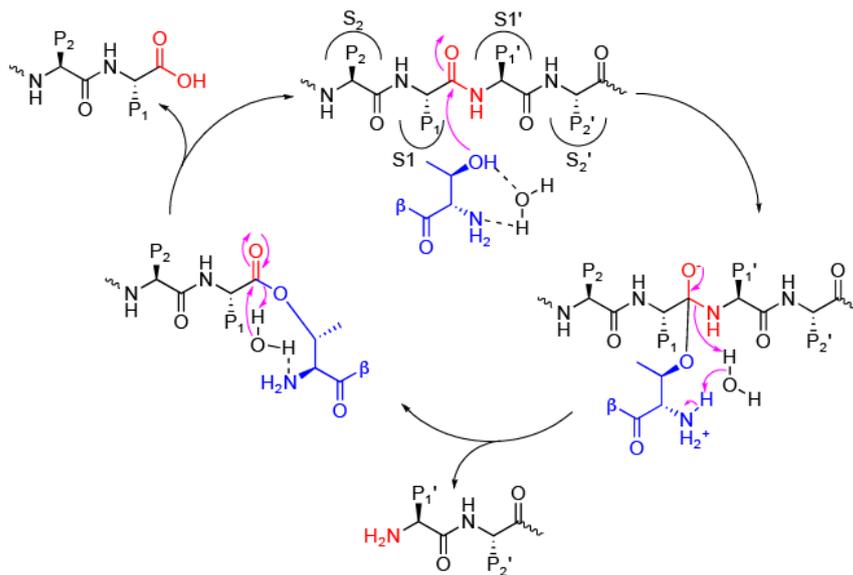


Рисунок 2.11 (А) 26S протеасома. Указаны базовые элементы и их функция.

(Б) Сечение протеолитического ядра 20S субчастицы, показывающее местоположение активных сайтов каталитических субъединиц.

(В) Каталитический механизм расщепления полипептидных субстратов протеасомой. Каталитический остаток треонина субъединицы протеасомы обозначен синим. Полипептидная цепь обозначена черным. Гидролизуемая пептидная связь обозначена красным. Адаптировано из [116].

В каталитический механизм



полипептидной связи включает в себя атаку гидроксила N-концевого остатка треонина каталитической субъединицы протеасомы карбонильного атома углерода (**Рис. 2.11В**) с последующей реактивацией гидроксила молекулой воды. У челюстных позвоночных животных, включая млекопитающих, конститутивные каталитические субъединицы $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ под действием интерферона $IFN\gamma$ заменяются на $\beta 1i$, $\beta 2i$ и $\beta 5i$, что приводит к образованию так называемой иммунопротеасомы. Иммунопротеасома теряет активность по типу каспазы, при этом по сравнению со стандартной протеасомой усиливается трипсиноподобная и химотрипсиноподобная активность. Набор антигенных пептидов, образующихся при действии

иммунопротеасомы, отличается от набора пептидов, образующихся при действии конститутивной протеасомы [117, 118]. Из-за разницы в субстратной специфичности между конститутивной протеасомой и иммунопротеасомой антигенные пептиды, имеющие гидрофобный С-конец и вследствие этого больше подходящие по структуре для загрузки на молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса, производятся главным образом иммунопротеасомой. Клетки, содержащие этот тип протеасомы, представляют антиген на своей поверхности более эффективно [119].

В тимусе присутствует еще одна уникальная каталитическая субъединица, $\beta 5t$, которая вместе с $\beta 1i$ и $\beta 2i$ входит в состав 20S протеасомы взамен $\beta 5$ или $\beta 5i$ (Рис. 2.12). Подобную специализированную протеасому со сниженной химотрипсин-подобной активностью называют тимопроотеасомой, подчеркивая её важную роль в позитивной селекции ГКГС-I-специфических Т-клеток, в результате которой конечный репертуар цитотоксических лимфоцитов значительно расширяется.

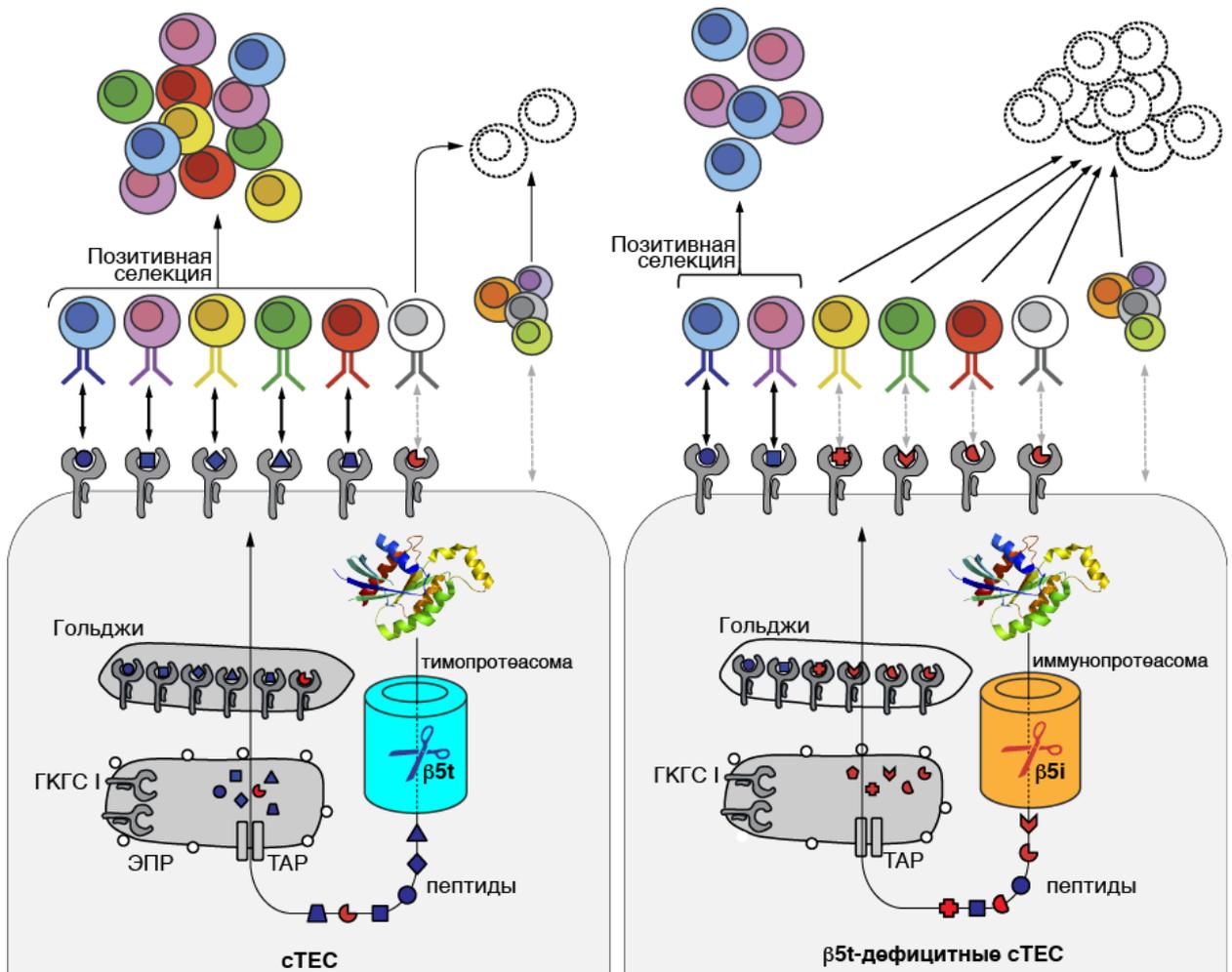


Рисунок 2.12 Уникальная каталитическая субъединица, $\beta 5t$, которая вместе с $\beta 1i$ и $\beta 2i$ входит в состав 20S протеасомы взамен $\beta 5$ или $\beta 5i$, образует тимопроотеасому со сниженной химотрипсин-подобной активностью. Данный тип протеасомы играет важную роль в позитивной селекции ГКГС-I-специфических Т-клеток, в результате которой конечный репертуар цитотоксических лимфоцитов значительно расширяется.

Строение базового регулятора протеасомы представлено на рисунке 2.13. Регулятор PA700 (называемый также 19S регуляторным комплексом и μ -частицей) имеет большую молекулярную массу и сложную структуру, состоит из 19 различающихся между собой белковых субъединиц. В его структуре можно выделить два основных элемента: нижний (базовый) элемент состоит из шести отличающихся по структуре субъединиц, имеющих АТФазную активность (Rpt1-6), структурных субъединиц Rpn1 и Rpn2 и двух убиквитин-связывающих субъединиц Rpn10 и Rpn13. PA700 присоединяется непосредственно к α -кольцу каталитического ядра и обеспечивает разворачивание полипептидной цепи белковых субстратов [120]. Энергия гидролиза АТФ расходуется на разворачивание полипептидной цепи белкового субстрата и транслокацию ее в каталитическую полость. Верхний элемент состоит из 9 не-АТФазных субъединиц: Rpn3, 5–9, 11–12. Rpn11 осуществляет деубиквитинирование субстрата [121].

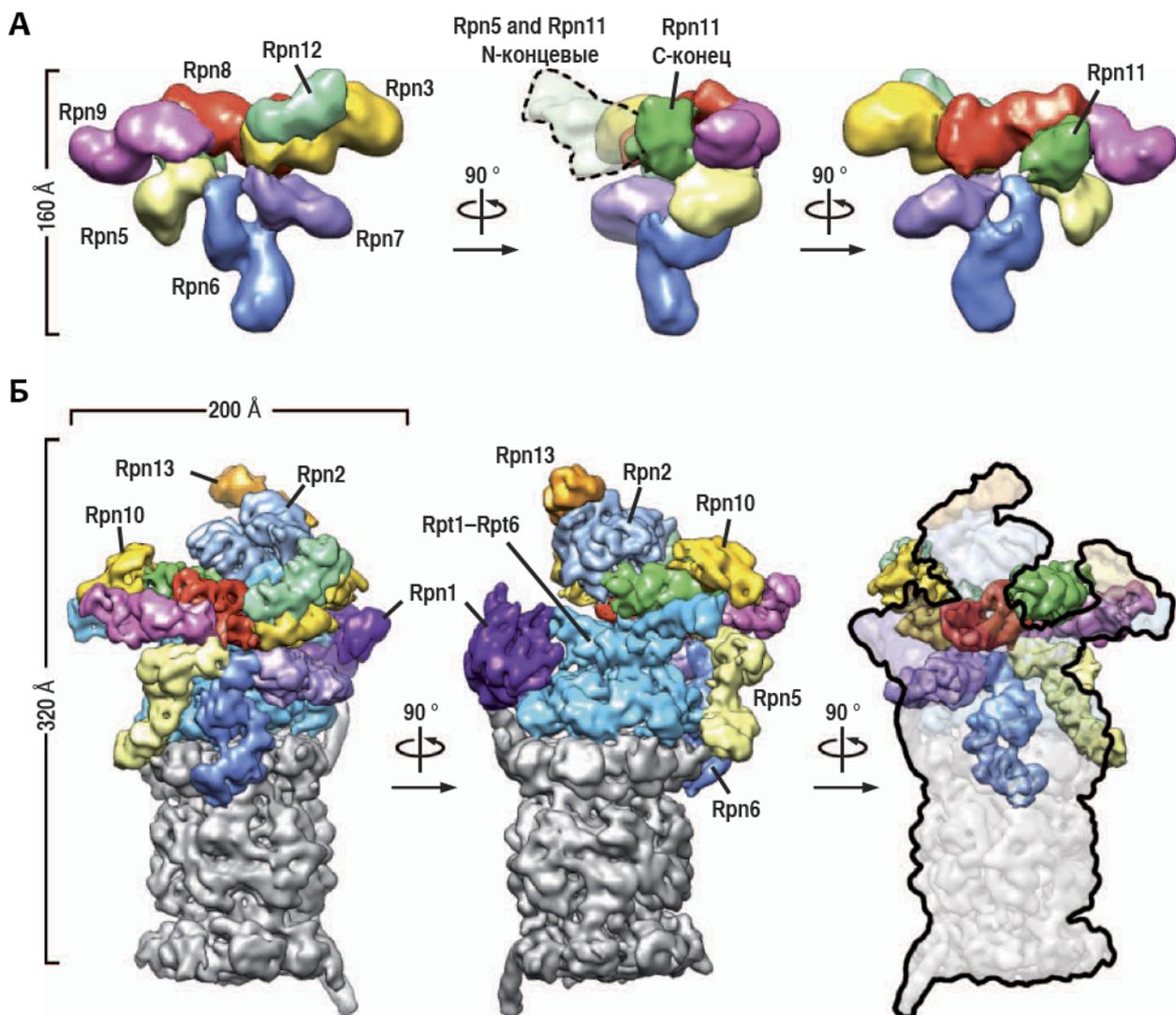


Рисунок 2.13 Структура 19S регулятора. Серым цветом обозначена 20S субчастица. Адаптировано из [121].

Сборка протеасомы из субъединиц – сложный многостадийный процесс (**Рис. 2.14**). β -субъединицы в клетке синтезируются в виде неактивных предшественников, удлинненных с N-конца по сравнению со зрелыми β -субъединицами. N-концевые пептиды являются сигналами для белковых факторов, участвующих в сборке протеасомы, а также предотвращают преждевременную активацию β -субъединиц. При сборке сначала формируются относительно стабильные интермедиаты – «пре-протеасомы», состоящие из одного α -кольца, частично собранного кольца из β -предшественников и вспомогательных факторов. Затем два интермедиата объединяются, формируя 20S протеасому. При этом N-концевые пропептиды отщепляются по аутокаталитическому механизму, высвобождая остатки треонина каталитических центров [122].

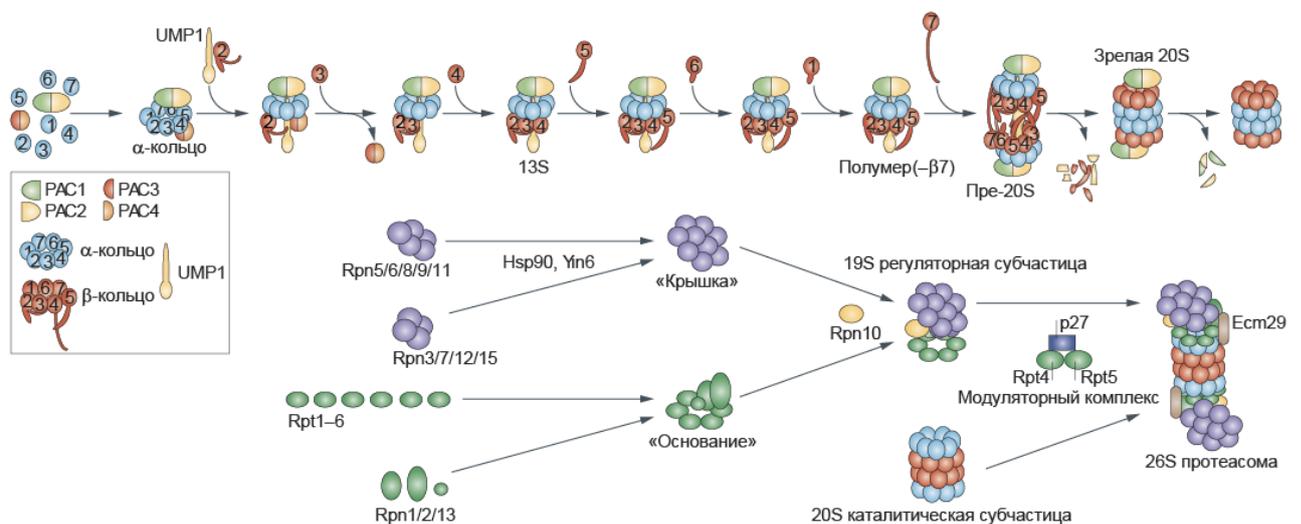


Рисунок 2.14 Молекулярный механизм сборки 20S-протеасом млекопитающих. Гетеродимеры шаперона PAC1 - PAC2 и комплексы PAC3-PAC4 способствуют образованию α -кольца. PAC1-PAC2 подавляет агрегация α -колец. Последовательное включение β -субъединиц начинается с ассоциации β 2 и UMP1 на α -кольце. PAC3-PAC4 высвобождается после ассоциации β 3. Последующее упорядоченное включение других β -субъединиц координируется внутримолекулярными шаперонами, такими как пропептиды β 2 и β 5, и C-концевой частью β 2. Димеризация полупротеасом без субъединицы β 7, инициирует включение β 7 и интеркаляцию её C-концевого полипептидного хвоста в канавку между β 1 и β 2 в составе противоположного β -кольца. За этим следует удаление пропептидов β -субъединиц (β 1, β 2, β 5, β 6 и β 7) и деградация UMP1. PAC1-PAC2 впоследствии также подвергается деградации вновь образованными активными 20S протеасомами. Сборка регуляторной субчастицы 19S (RP) происходит независимо из «основания» и «крышки» и модулируется рядом специфических шаперонов. Адаптировано из [115].

Механизм гидролиза субстратов протеасомой состоит в значительной конформационной реорганизации АТФазных субъединиц Rpt1-Rpt6, которые благодаря каскадному гидролизу АТФ в субстрат-связывающих карманах проворачиваются подобно пропеллеру и выстраиваются в горизонтальной плоскости (**Рис. 2.15А** и **2.15Б**). Подобная глобальная структурная перестройка приводит к выравниванию канала, образуемого АТФазами, и осевой линией 20S каталитического ядра (**Рис. 2.16А** и **2.16Б**). Еще одним важным следствием проворота АТФаз является перемещение деубиквитиназы Rpn11 в позицию непосредственно над входом в каталитическую

полость, что в значительной степени облегчает сканирование полипептидной цепи и последующее отщепление конъюгированного убиквитина (**Рис. 2.15B**).

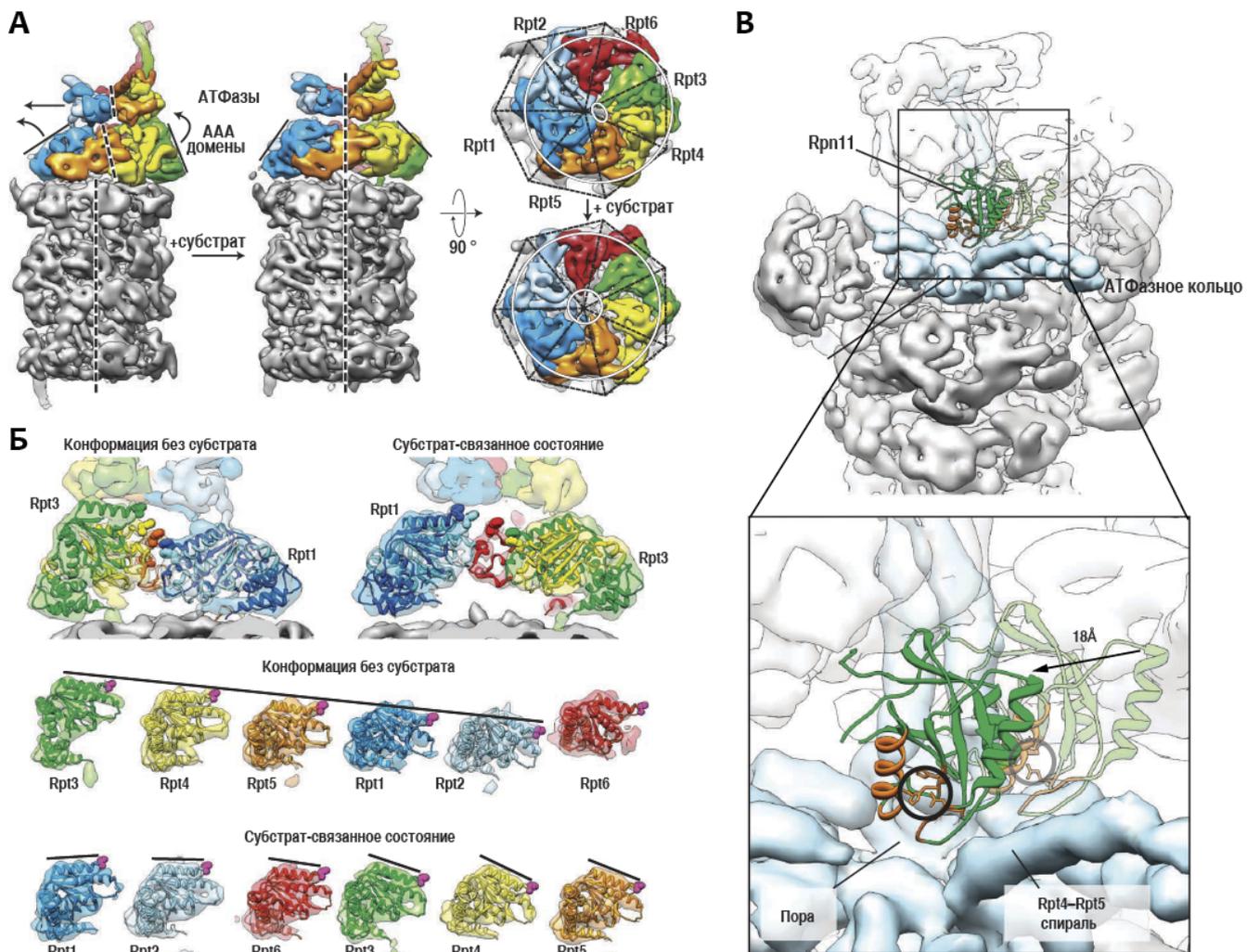


Рисунок 2.15 Конформационная перестройка основания 19S регуляторной субчастицы при связывании субстрата. Адаптировано из [123].

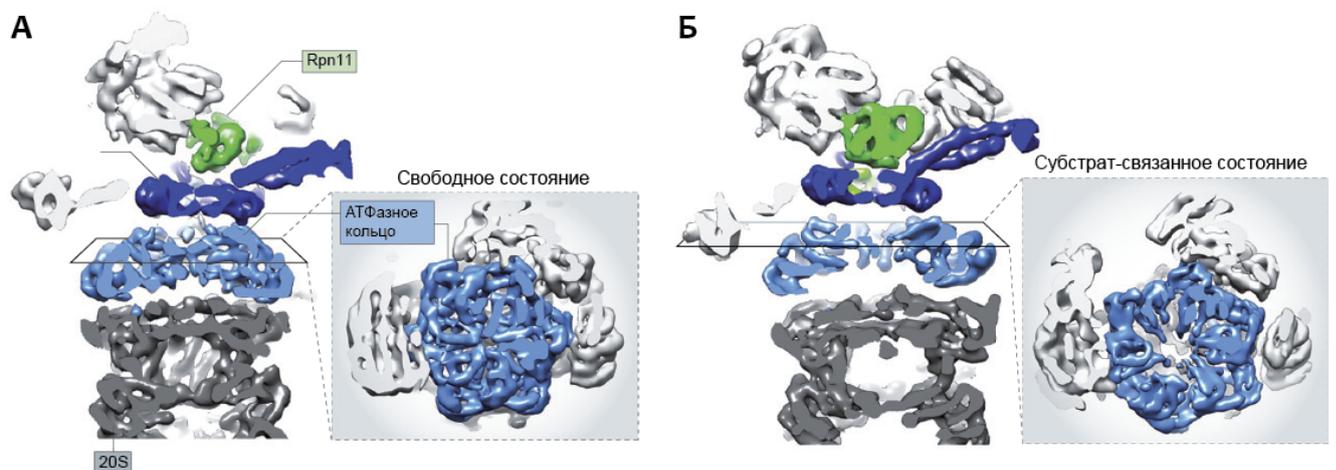


Рисунок 2.16 Уширение и выравнивание канала, образованного АТФазами, при связывании протеасомой субстрата (**Б**) в сравнении с свободным состоянием (**А**).

Резюмируя, на настоящий момент удалось сформулировать молекулярный механизм, который лежит в основе гидролиза полиубиквитинилированных субстратов протеасомой (**Рис. 2.17**).

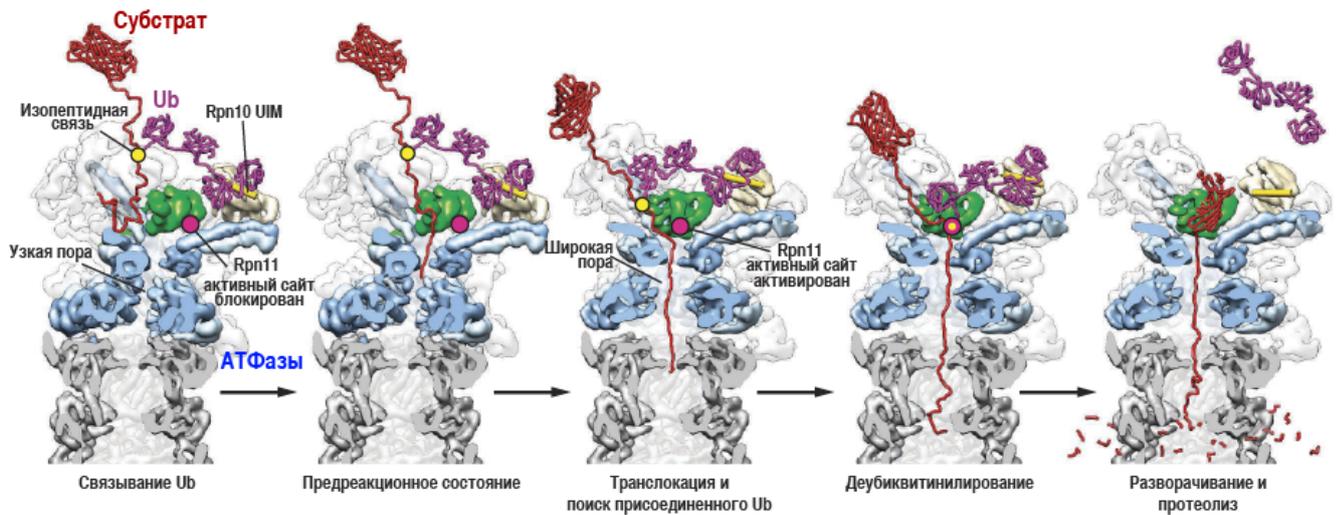


Рисунок 2.17 Структурная модель связывания субстрата 26S протеасомой и его гидролиза. Изображенная в разрезе реконструкция протеасомы со связанным субстратом и без него. На первом этапе субстрат (красный) связывается посредством полиубиквитиновой цепи (фиолетовая) с UIM доменом Rpn10 (желтый цилиндр). В этом состоянии неструктурированный участок субстрата может войти в доступную часть канала и связаться с самыми верхними субъединицами АТФазного кольца. При захвате субстрата АТФазные субъединицы Rpt1-6 перестраиваются в новую конфигурацию, которая открывает вход в канал, ведущий в протеолитическую полость. Канал, образованный АТФазами теперь выровнен со входом в 20S протеасому (серая). Одновременно Rpn11 (зеленая) смещается в центральное положение непосредственно над входом в протеолитическую полость, благодаря чему активный сайт деубиквитиназы (розовая точка) получает возможность удалять убиквитины по мере прохождения субстрата в открытый канал. Таким образом, с субстрата удаляются все убиквитины, так как сайт их присоединения (желтая точка) проходит через Rpn11 при сканировании полипептидной цепи, что облегчает быструю транслокацию, разворачивание и деградацию субстрата. Адаптировано из [123].

Ингибиторы протеасомы

Пептидазная активность протеасомы по одному или сразу нескольким типам может быть заблокирована низкомолекулярными ингибиторами. Большинство известных ингибиторов направлены на химотрипсин-подобную активность, но существуют селективные ингибиторы трипсино- и каспазоподобной активности. Существует несколько различных классов ингибиторов протеасомы, основные примеры которых представлены на рисунке **2.18**. Альдегидные производные пептидов – конкурентные обратимые ингибиторы. Такие соединения легко синтезировать и они эффективно проникают в клетку, однако они не очень специфичны и помимо протеасомы ингибируют также некоторые протеазы, например кальпаин и некоторые катепсины [124]. Винилсульфоновые производные пептидов – известно, что винилсульфон может связывать тиольную группу в активном центре цистеиновых протеаз. Винилсульфовая группа, соединенная с подходящим пептидом, может специфично и необратимо связывать треонин в активном центре протеасомы [125]. Пептидные производные борной кислоты –

медленно связывающиеся обратимые ингибиторы с малой скоростью диссоциации. Их преимущество перед другими типами ингибиторов состоит в малом размере молекулы – всего два аминокислотных остатка, что обуславливает хорошую растворимость и способность проходить через клеточные мембраны. К этому типу ингибиторов относится PS-341 (бортезомиб) – препарат, используемый в терапии множественной миеломы. В наномолярных концентрациях специфично ингибирует химотрипсин-подобную активность *in vitro* и *in vivo*. Эпоксикетон-производные пептидов. Ковалентно и необратимо связываются с протеасомой, образуя морфолиновое кольцо при взаимодействии с N-концевой аминогруппой в активном центре каталитических субъединиц протеасомы. В лабораторной практике широко применяется эпоксомидин (Ac-Ile-Ile-Thr-Leu-эпоксикетон) который в концентрации <100 нМ связывает все каталитические субъединицы протеасомы. Еще один ингибитор этого класса, CFZ (карфилзомиб), связывающий $\beta 5$ и $\beta 5i$ в наномолярных концентрациях, также применяется в терапии множественной миеломы [126]. Производные лактонов блокируют в основном активность по типу химотрипсина, при этом лактонное кольцо необратимо ацилирует треонин в активном центре. Некоторые из этих соединений, например лактацистин, для активации требуют перестройки структуры в активный β -лактон. На практике такая перестройка происходит в водном растворе после 1 часа инкубации при 37°C. Активация лактацистина происходит с отщеплением N-ацетилцистеина [127].

Как уже упоминалось ранее, субъединицы $\beta 1$ и $\beta 1i$, а также $\beta 2$ и $\beta 5i$ отличаются друг от друга по структуре активного центра. Это делает возможным создание ингибиторов, селективно воздействующих на иммуносубъединицы протеасомы. К $\beta 1i$ -специфическим ингибиторам относятся пептидилэпоксикетон UK-101 [128], пептидилальдегид IPSI-001 (Z-LnL-CHO) [129], пептидилэпоксикетон YU-102 [130]. $\beta 5i$ -специфическими ингибиторами являются пептидилэпоксикетон PR-924 и пептидилэпоксикетон ONX0914 (PR-957) [131]. IC₅₀ по отношению к индивидуальным субъединицам протеасомы для этих соединений приведены в **таблице 1**.

Таблица 1. IC₅₀ селективных ингибиторов иммунопротеасомы [132].

Ингибитор	IC ₅₀	
	Конститутивная протеасома	Иммунопротеасома
$\beta 1i$ - специфические	UK-101	14 мкМ (<i>ex vivo</i>)
	IPSI-001	1.03 ± 0.17 (химотрипсин-подобная активность)
	YU-102	209 ($\beta 1$), >5000 ($\beta 2$), >1000 ($\beta 5$)
$\beta 5i$ - специфические	PR-957	~500 ($\beta 5$)
	PR-924	2900 ($\beta 5$)
		2 мкМ (<i>ex vivo</i>)
		105 ± 1.3 (химотрипсин-подобная активность)
		46 ($\beta 1i$), >5000 ($\beta 2i$ и $\beta 5i$)
		~10 ($\beta 5i$)
		22 ($\beta 5i$)

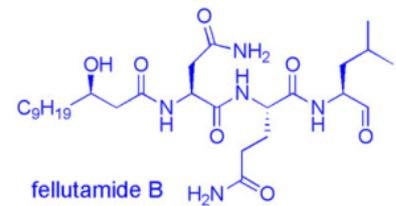
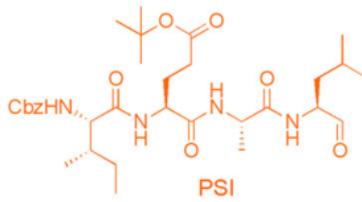
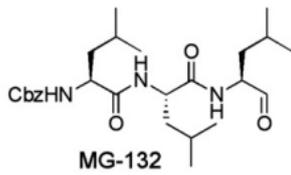
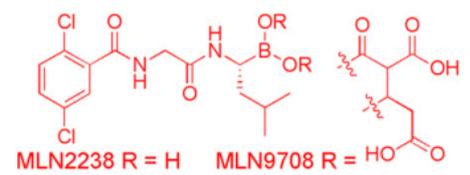
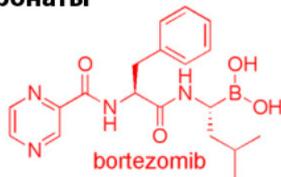
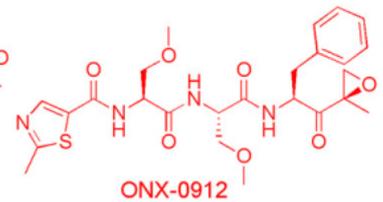
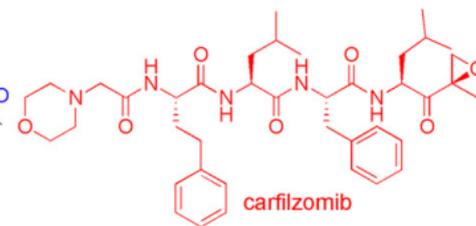
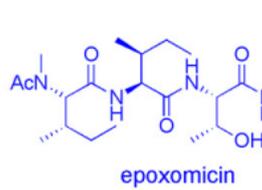
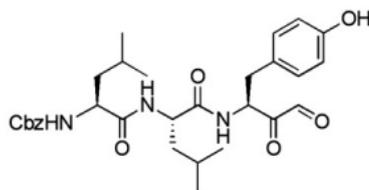
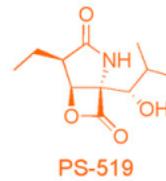
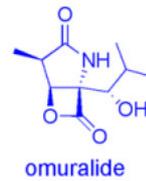
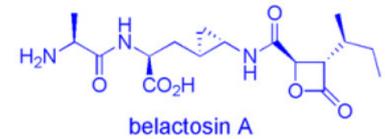
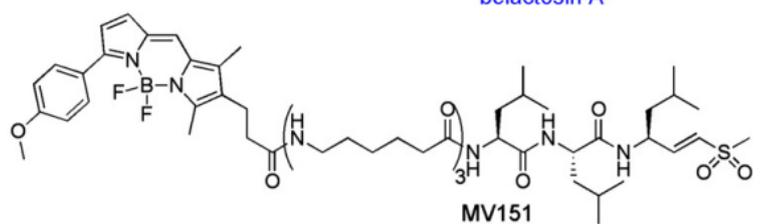
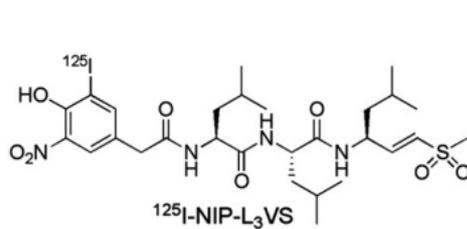
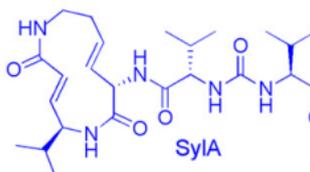
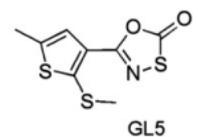
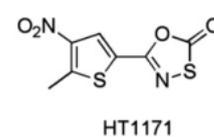
Альдегиды**Боронаты****Эпоксикетоны****Кетоальдегиды****Бета-лактоны****Винил-сульфоны****Syrobactins****Бактериоспецифичные**

Рисунок 2.18 Основные классы ингибиторов протеасомы. Природные вещества обозначены синим цветом, красным и розовым отмечены вещества, применяемые и апробируемые в клинической практике для лечения злокачественных новообразований, оранжевым обозначены вещества, применяемые для лечения других заболеваний. Адаптировано из [116].

В качестве заключения стоит отметить, что подавляющее большинство клеточных белков подвергаются гидролизу протеасомой по убиквитин-зависимому пути [133]. Изначально сформулированная догма утверждала, что белки могут быть гидролизованы протеасомой, только будучи конъюгированы с несколькими, не менее четырех, молекулами убиквитина, связанных друг с другом в цепочку. Существующее на настоящий момент знание гласит, что множественное сопряжение с убиквитиновыми мономерами [134] или даже моноубиквитинилирование [135] является достаточным для гидролиза субстрата протеасомой. Более того, теперь известно, что существует ряд белков, обладающих уникальной способностью к гидролизу протеасомой убиквитин-независимо. Список подобных субстратов [136-141] постоянно пополняется с момента первого обнаружения Мураками и соавторами первого такого примера – орнитиндекарбоксилазы – в 1992 году [142]. Тем не менее, существующие данные очевидно недостаточны для создания разумной теории, охватывающей различные механизмы гидролиза субстратов протеасомой, минуя убиквитинилирование.

На основе значительного массива экспериментальных данных очевидно, что механизмы гидролиза аутоантигенных белков протеасомой играют важную роль в патогенезе и развитии аутоиммунных заболеваний. Из литературы известно, что ингибиторы протеасомы могут быть эффективны в терапии экспериментальных моделей ряда аутоиммунных заболеваний [143-145]. Однако, воздействие на каталитические субъединицы протеасомы оказывает существенное системное воздействие на организм, так как протеасома присутствует во всех видах клеток без исключения и непосредственно участвует во множестве важных клеточных процессов. Более перспективными в этом отношении являются ингибиторы, специфически взаимодействующие с иммуносубъединицами протеасомы, поскольку иммунопротеасома присутствует только в клетках иммунной системы и в очагах воспаления.

2.4 Животные модели рассеянного склероза

Начиная с тридцатых годов XX века стала очевидна потребность в релевантной экспериментальной модели РС. На настоящий момент реализованы десятки подобных моделей на мышах, крысах, морских свинках и даже приматах. Полиморфизм, присущий РС, приводит к тому, что не существует какой-либо универсальной модели, а в каждом конкретном случае приходится использовать определенный вид животных и линию, скрупулёзно подбирая способ индукции ЕАЕ. Вследствие размера, доступности, простоты работы, а также этических норм, наиболее часто ЕАЕ развивают у мышей или крыс [146]. Варьируя линию и способ иммунизации, возможно имитировать различные типы и стадии течения РС (**Табл. 2**). Иммунизация миелиновыми белками в адьюванте Фрейнда является наиболее популярной методикой

индукции ЕАЕ. Так, при подкожном введении полноразмерного внеклеточного домена MOG или фрагмента MOG₃₅₋₅₅ в полном адъюванте Фрейнда, мыши линии C57BL/6 при развивают ЕАЕ, в целом схожий с хроническим прогрессирующим течением РС [147-149]. Релапсирующая форма РС может быть достигнута иммунизацией мышей линии SJL с помощью МВР или пептида МВР₈₄₋₁₀₄ в ПАФ [150], в то время как крысы линии DA способны развивать релапсирующую-ремиттирующую форму ЕАЕ при индукции пептидом МВР₆₃₋₈₁ в ПАФ [151]. В большинстве моделей для нарушения проницаемости ГЭБ используется инъекция *Pertussis toxin* (РТ), что позволяет открыть доступ компонентам иммунной системы в ЦНС. Хорошо известна альтернативная методика индукции ЕАЕ, осуществляемая введением опытному животному активированных Т-лимфоцитов от животного с развитым заболеванием. Данная методика, называемая адаптивным переносом, позволяет увеличить процент заболевших животных, добиться более быстрого наступления ЕАЕ, повысив гомогенность в экспериментальных группах [149].

Таблица 2. Животные модели ЕАЕ на грызунах

Род	Линия	Индукция	Тип заболевания	Источник
<i>Rattus</i>	LEW	МВР/МВР ₆₈₋₈₈ в ПАФ ³⁸	Единичное обострение	[152, 153]
<i>Mus</i>	DA	ГСМ ³⁹ в НАФ ⁴⁰ или MOG ₁₋₁₂₅ в	Ремитирующая/прогрессирующая	[154, 155]
<i>Rattus</i>	DA	МВР ₆₃₋₈₁ в ПАФ	Релапсирующая-ремитирующая форма	[151]
<i>Mus</i>	PL/J	МВР в ПАФ + РТ ⁴¹	Единичное обострение	[156]
<i>Mus</i>	SJL	PLP/PLP ₁₃₉₋₁₅₁ в ПАФ + РТ	Хроническое обострение	[157]
<i>Mus</i>	C57BL/6	MOG/MOG ₃₅₋₅₅ в ПАФ + РТ	Прогрессирующая или острая форма	[147, 148]
<i>Mus</i>	Biozzi	MOG/ MOG ₉₂₋₁₀₆ в ПАФ + РТ	Хроническое обострение	[158]
<i>Mus</i>	NOD	MOG ₃₅₋₅₅ в ПАФ + РТ	Хроническая прогрессирующая форма	[159]
<i>Mus</i>	SJL	Вирус энцефаломиелимита (TMEV ⁴²)	Ремитирующая прогрессирующая	[160]
<i>Mus</i>	SJL	МВР/МВР ₈₄₋₁₀₄ в ПАФ + РТ	Релапсирующая форма	[150]
<i>Mus</i>	SJL	ГСМ в ПАФ + РТ	Релапсирующая форма	[161]
<i>Mus</i>	B10.PL-	Трансгенные животные по ТкР к МВР	Спонтанная острая форма	[162]
<i>Mus</i>	C57BL/6	Трансгенные животные по ТкР к MOG	Оптический неврит	[163]

2.5 Современные подходы к терапии рассеянного склероза

Ключевая проблема в лечении РС состоит в том, что большинство существующих терапевтических средств, которые применяются для снятия симптомов обострения (например, глюкокортикостероиды, циклофосфамид, метотрексат и антигистамины), являются

³⁸ Полный адъювант Фрейнда от англ. Complete Freund's adjuvant

³⁹ гомогенат спинного мозга

⁴⁰ Неполный адъювант Фрейнда от англ. Incomplete Freund's adjuvant

⁴¹ *Pertussis toxin*

⁴² от англ. Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus (TMEV)

неспецифическими супрессорами иммунных функций. В настоящий момент для терапии РС предложено сразу несколько достаточно успешных терапевтических стратегий [164]. Это, в первую очередь, бета-интерфероны [78] и глатирамер ацетата (GA) [165, 166] – препараты, изменяющие течение рассеянного склероза (ПИТРС), с хорошо установленной историей эффективного и безопасного применения в клинической практике. Отрадно отметить, что недавние достижения в создании терапевтических антител к провоспалительным медиаторам [164] являются очевидным шагом вперед. Недавно был предложен целый ряд эффективных моноклональных антител к различным лигандам: натализумаб (natalizumab), который связывается с α 4-интегринами [167]; даклизумаб (daclizumab), который связывается с CD25 [168] и алемтузумабом (alemtuzumab), который связывается с CD52 [169] (Рис. 2.19). Натализумаб и алемтузумаб относительно недавно были одобрены FDA⁴³ для лечения некупируемых форм РС, в то время как одобрение даклизумаба очень вероятно в ближайшем будущем. Необходимо отметить, что несмотря на их эффективность эти препараты ассоциируются с серьезными нежелательными явлениями, что значительно ограничивает их дальнейшее клиническое применение [164]. Используемые иммуноглобулины все еще не способны различить, фокусируется ли их мишени на собственных или на экзогенных антигенах. На настоящий момент применение подобных иммуносупрессоров считается оправданным только в тех случаях, если положительный эффект от лечения превалирует над потенциальным увеличением вероятности заражения инфекционными заболеваниями, злокачественной трансформации или наступления общего гомеостатического дисбаланса.

Новые пероральные методы лечения, включая финголимод (fingolimod) [170], терифлуномид (teriflunomide) [171] и диметилфумарат [172], показали хорошую эффективность и переносимость и были одобрены для лечения пациентов с РС. Механизмы действия этих препаратов в значительной степени разнятся. Финголимод взаимодействует с S1P рецепторами и угнетает способность Т-лимфоцитов мигрировать из лимфоузлов. Терифлуномид селективно ингибирует дигидрооротат-дегидрогеназу – ключевой митохондриальный фермент в пути *de novo* синтеза пиримидина – тем самым приводит к уменьшению пролиферации активированных Т- и В-лимфоцитов, не вызывая при этом гибель этих клеток. Диметилфумарат обладает явными иммуномодулирующими свойствами, в частности индуцирует Th2 сдвиг как во фракции лимфоцитов, так и в микроглиальных клетках. Также важной функцией диметилфумарата является индукция экспрессии белков антиоксидантного стресса, путем активации эритроидного ядерного фактора NRF2.

⁴³ от англ. Food and Drug Administration

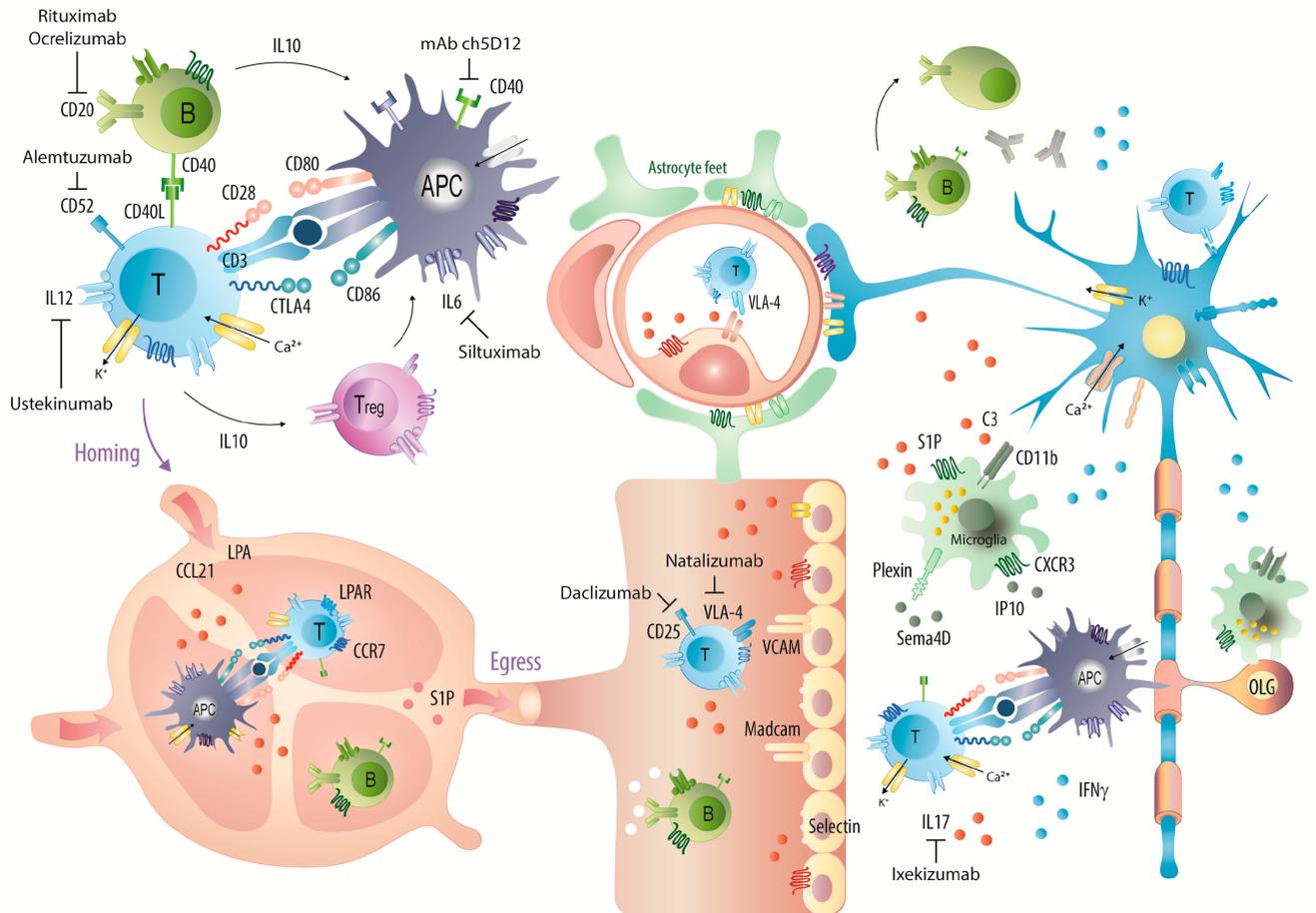


Рисунок 2.19 Современные подходы к терапии РС с применением моноклональных антител. Адаптировано из [173].

К сожалению, ряд пациентов вследствие высокой гетерогенности РС остаётся резистентными ко всем существующим препаратам. В этой связи, поиск новых вариантов антиген-специфической иммунотерапии РС является весьма востребованным [174]. Альтернативой существующим способам является метод, успешно применяемый для лечения аллергии путем гиперстимуляции аллергенами [также известный как специфическая иммунотерапия (SIT⁴⁴)], который был впервые опробован еще в начале прошлого века [175]. Восемь прошедших десятилетий доказали жизнеспособность этой парадигмы в терминах лечения аутоиммунных нарушений [176]. Современный уровень знания позволяет предположить, что терапевтический эффект подобного лечения основан на хорошо описанном парадоксе анергии Т-клеток при введении сверхвысоких доз антигена [176]. Одним из ключевых объектов подобной терапии является МВР – структурный компонент миелиновой мембраны [177]. В настоящий момент исследователями предложен целый ряд методов, позволяющих индуцировать толерантность к МВР и его структурным компонентам [178-182], включая

⁴⁴ от англ. Specific ImmunoTherapy

использование дендритных клеток, накачанных МВР [183].

Сополимеры (антагонисты HLA)

Исторически считалось, что терапевтическая эффективность сополимеров основана на конкуренции с МВР за связывание ГКГС класса II. Однако, в настоящее время им приписывается индукция популяции регуляторных Т-клеток. Глатирамера ацетат или копаксон (Coracone, Cop-1 или GA) – первый и пока единственный сополимер, применяемый в клинической практике, представляет собой случайный полимер из четырех аминокислот $\text{poly}(\text{YEAK})_n$ [184], способный связывать молекулы HLA-DR [185], индуцировать Th2-сдвиг [186, 187] и образование $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ регуляторных Т-клеток [188, 189]. GA связывается с несколькими молекулами ГКГС класса II, включая HLADR2b, ассоциированными с РС, *in vitro* [190], и таким образом конкурирует с Т-клеточными эпитопами МВР, тем самым уменьшая активацию МВР-специфических клонов (Рис. 2.20).

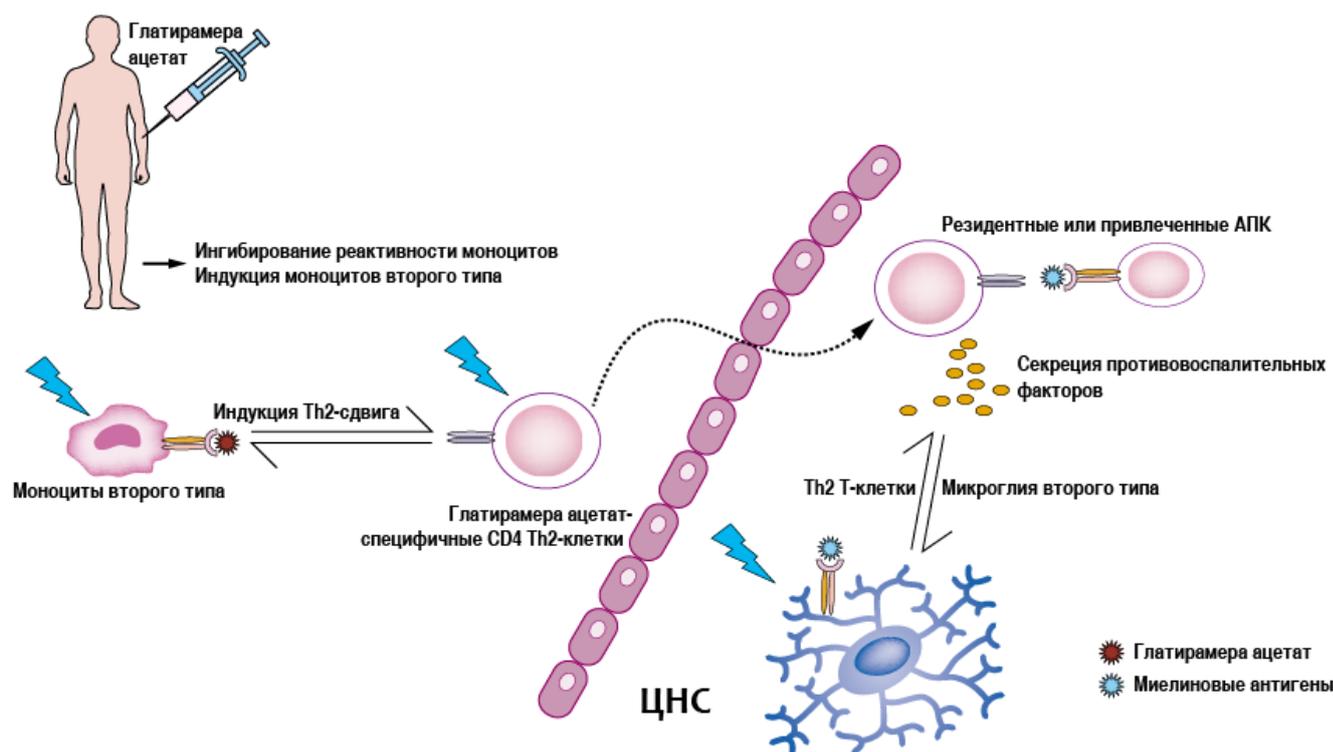


Рисунок 2.20 Принцип действия глатирамера ацетата. Адаптировано из [191]

Клинические испытания показали, что GA снижает частоту рецидивов РС [165], а его эффективность в терминах безопасности и стоимости лечения в целом аналогична $\text{IFN}\beta$ [192-194]. Стоит отметить, что недавно опубликованный метаанализ рандомизированных контролируемых исследований GA свидетельствует о том, что активное лечение не показало существенных преимуществ по сравнению с плацебо [195], тем не менее 15-летнее открытое

исследование с использованием GA для терапии рецидивирующего РС подтвердило его терапевтическую эффективность [196]. Последние клинические данные свидетельствуют о том, что применение GA оправданно для пациентов, не отвечающих на другие виды ПИТРС [197], и задерживает конверсию клинически изолированного синдрома (CIS⁴⁵) в клинически подтвержденный рассеянный склероз (CDMS⁴⁶) [198]. Интересно отметить, что GA, по-видимому, обладает способностью ингибировать каталитические антитела, специфические к миелину [61, 199].

После разработки GA было исследовано несколько других подобных аминокислотных композиций [200]. Сополимеры второго поколения, poly(YFAK)_n, в сравнении с GA способны еще более эффективно швартоваться в субстрат-связывающих карманах HLA-DR2, продемонстрировали способность подавлять развитие EAE у мышей линии SJL [201]. В экспериментах с использованием трансгенных мышей HLA-DR-TCR авторам удалось показать анергию трансгенных HLA-DR2-реактивных Т-клеток при введении (VWAK)_n, в то время как введение poly(FYAK)_n индуцировало образование противовоспалительных Th2-клеток, секретирующих IL-4 и IL-10 [202]. Авторами было высказано предположение, что ряд 15-мерных пептидов, аналогичных сополимерам, подавляет EAE, по крайней мере, так же эффективно, как и собственно сополимеры [203]. Более поздние результаты свидетельствуют, что регуляторные Т-клетки, индуцированные введением сополимеров, лишены Foxp3, секретируют IL-10 и IL-13, при этом выделяют лишь незначительные количества IL-4. Как было показано, подобные Т-клетки способны подавлять EAE независимо от природы энцефалитогенного агента [204]. Более того, имеются наблюдения, что взаимодействие поли(YFAK)_n с АПК, которые в свою очередь активируют регуляторные Т-клетки [205], может быть ГКГС-независимым и происходить вследствие заряд-опосредованного связывания с экспонированными на поверхности гепарансульфатами и гликопротеином 96 [206].

Пептиды – структурные элементы рецепторов Т-клеток (ТКР) и костимулирующих молекул

Другой подход подавления развития EAE, изначально предложенный Vandenberg с соавторами, использует профилактическую иммунизацию модельных животных синтетическими пептидами, соответствующими вариабельной области аутоиммунного ТКР, который распознает фрагменты МВР [207]. Авторы продемонстрировали более замедленное развитие EAE у грызунов, которым вводили пептид TCR-Vβ 8-39-59 при проявлении первых клинических признаков EAE [208]. Аналогичные результаты были получены в исследованиях, в

⁴⁵ от англ. Clinically Isolated Syndrome

⁴⁶ от англ. Clinically Defined Multiple Sclerosis

которых использовались синтетические пептиды, соответствующие идиотипическим детерминантам ТКР в области VDJ β-цепи и J-α-областей [209]. Последующие эксперименты показали, что иммунизация CDR3-пептидами индуцирует образование регуляторных CD4⁺Foxp3⁺ Т-клеток, которые контролируют экспансию и активность аутореактивных Т-клеток [210].

Кластер дифференцировки CD4 является альтернативной мишенью для прерывания взаимодействия ТКР-ГКГС. Развитие ЕАЕ удалось эффективно ингибировать введением пептидов, соответствующих CDR3-подобному участку CD4 [211], а также области D1-CC' петли [212]. Белок периферической мембраны В7, обнаруженный на активированных АПК, является мишенью другой группы пептидных ингибиторов. Эти пептиды содержат мотив MYPPPY из консервативной области CD28 и, как было показано, подавляют ЕАЕ у мышей линии В10.PL [213]. К сожалению, значительными ограничениями подобной терапии является системное влияние на глобальный иммунный статус организма-реципиента вследствие нарушения базового взаимодействия АПК-Т-клетка.

Структурные фрагменты белков миелиновой оболочки

Известны многочисленные попытки индуцировать толерантность к МВР и его структурным компонентам [178-183]. Пептид МВР 83-99 был успешно протестирован в клинических испытаниях фазы I [214], однако последующие клинические испытания не выявили положительного эффекта по сравнению с плацебо [215], более того введение пептида вызвало сильное обострение у ряда пациентов [216]. Интересно, что ряд микробных пептидов, структурно сходных с МВР 87-99, действуют сходно так называемым измененным пептидным лигандам (APL⁴⁷), подавляя развитие ЕАЕ [217]. Yeste с соавторами показали подавление развития ЕАЕ путем введения наночастиц золота, покрытых пептидом MOG₃₅₋₅₅ и низкомолекулярным активатором арильного углеводородного рецептора [218]. Имеются экспериментальные свидетельства, что APL на основе MOG₃₅₋₅₅, имеющие замены аминокислот, распознаваемых аутореактивными ТКР, ингибируют развитие ЕАЕ у мышей линии C57BL/6 [219]. Другой компонент миелина – PLP – также активно рассматривается в качестве основы терапевтических средств [220-224]. Kuchroo с соавторами успешно использовали рациональный дизайн для создания антагонистов ТКР. Было показано, что пептидный аналог PLP₁₃₉₋₁₅₁ с мутациями, предотвращающими взаимодействие с ТКР, но в то же время способный связываться с ГКГС II класса, подавляет индукцию ЕАЕ у модельных животных [223]. Другие данные свидетельствуют

⁴⁷ от англ. Altered Peptide Ligands

о индукции антиген-специфической Т-клеточной толерантности и подавлении развития ЕАЕ у мышей SJL/J путем введения PLP₁₃₉₋₁₅₁, конъюгированного с биodeградируемыми наночастицами на основе поли-лакто-ко-гликолевой кислоты (PLGA⁴⁸) [225]. Экспериментально показано, что бифункциональный пептидный ингибитор, состоящий из двух ковалентно связанных пептидов – энцефалитогенного эпитопа PLP₁₃₉₋₁₅₁ и пептида 237-246, полученного из α -L-интегрина CD11a, связывающего межклеточную адгезионную молекулу-1 (ICAM-1⁴⁹), ингибирует развитие ЕАЕ в мышцах линии SJL/J [226].

Kv1.3 каналo-блокирующие иммуномодулирующие пептиды

Относительно недавно было показано, что ассоциированные с заболеванием аутореактивные эффекторные Т-клетки памяти (⁵⁰T_{EM}) у пациентов с различными аутоиммунными аномалиями, включая РС, содержат значительно повышенное количество потенциал-чувствительных калиевых каналов (Kv) типа 1.3 (Kv1.3) [227]. Введение селективных ингибиторов Kv1.3 подавляет пролиферацию T_{EM} и продукцию ими цитокинов, тогда как остальная популяция Т-клеток остается интактной вследствие наличия каналов KCa3 вместо Kv1.3 [228]. В паразитических червях наблюдается одно из самых представительных семейств пептидов, подобных Helianthus toxin (ShK), – селективных ингибиторов Kv1.3 [229]. В этой связи интересен факт тенденции к увеличению частоты аутоиммунных заболеваний в развитом мире, который частично связывают с резко сниженной частотой инфицирования паразитарными червями [230]. В соответствии с этим, Corgeale с коллегами сообщают о значительно меньшем числе обострений, а также о минимальном изменении показателей инвалидности и о снижении динамики изменений по МРТ у пациентов с РС, инфицированных паразитами, по сравнению с неинфицированными индивидуумами [231]. Chhabra с соавторами недавно опубликовали сообщение о 2 пептидах, AcK1 из *Ancylostoma caninum* и BmK1 из *Brugia malayi*, которые ингибируют нативный Kv1.3 в Т-клетках человека в наномолярно-микромолярном диапазоне и избирательно подавляют пролиферацию CCR7-негативных T_{EM} крысы [229]. В работе [232] авторы сообщают о мутантных вариантах токсина HsTX1 со значительно повышенным сродством к Kv1.3 (Рис. 2.21).

⁴⁸ от англ. Poly(lactic-co-glycolic) acid

⁴⁹ от англ. InterCellular Adhesion Molecule-1

⁵⁰ от англ. T cell Effector Memory

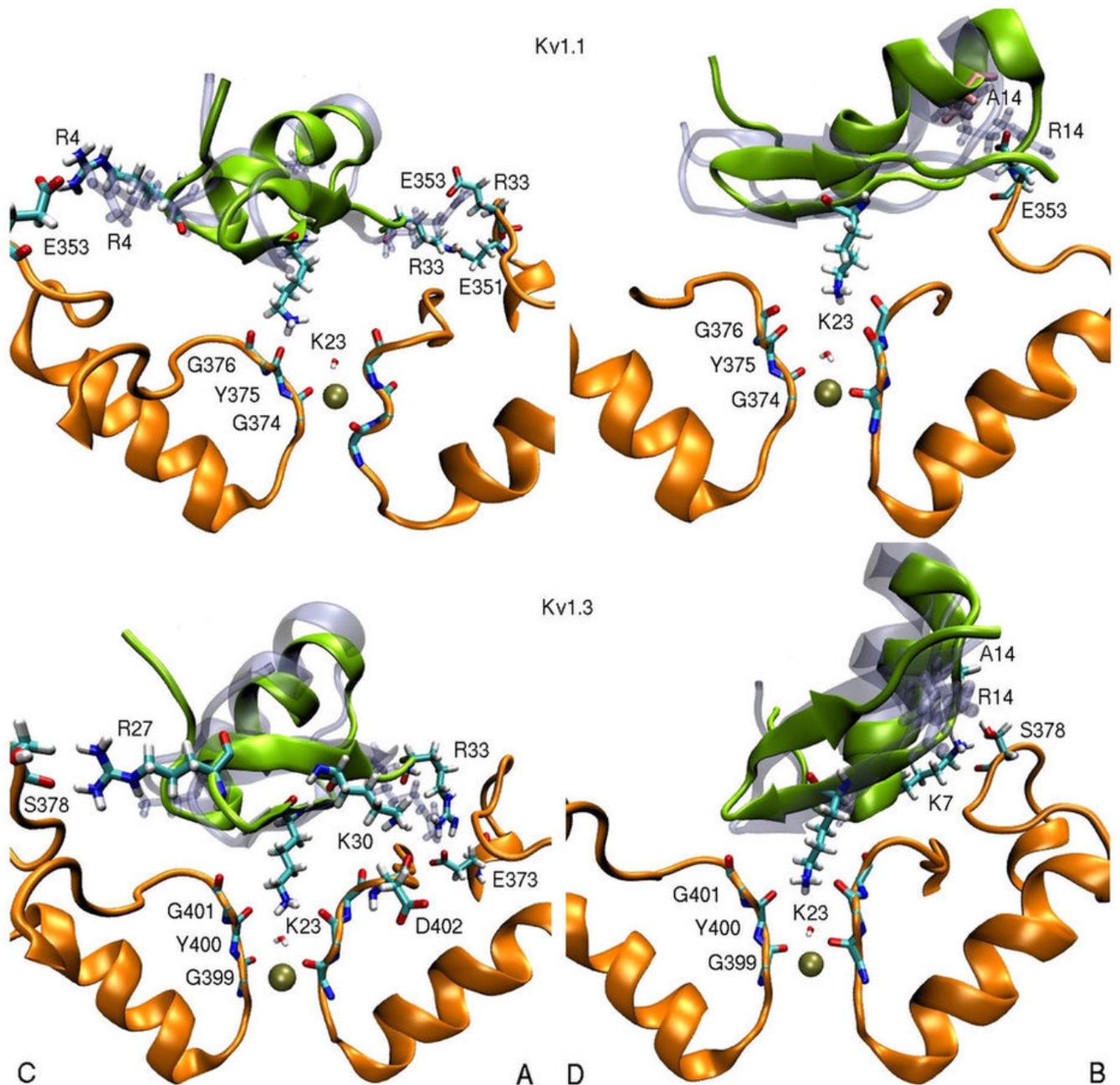


Рисунок 2.21 Сравнение моделей связывания HsTx1 [R14A] (зеленый с цветными боковыми цепями) и HsTx1 (прозрачный серый) с и потенциал-чувствительными калиевыми каналами Kv1.1 и Kv1.3. Мутация R14A приводит к небольшому сдвигу токсина в обоих комплексах, что приводит к некоторой перегруппировке контактных пар. Адаптировано из [232].

Терапия, направленная на В-клетки

В настоящее время существует три терапевтические стратегии для лечения аутоиммунных нарушений, направленных на В-клетки: (i) введение истощающих антител, нацеленных на специфические поверхностные молекулы, присущие В-клеткам; (ii) воздействие на сигнальные пути БКР, что приводит к апоптозу В-клеток; и (iii) инактивация факторов, способствующих выживанию и активации В-клеток. Схожие подходы были предложены для ограничения подвижности Т клеток (**Рис. 2.22**). Первый подход был отработан несколькими

исследовательскими группами [233-235] с использованием антител против поверхностных молекул В-клеток CD19, CD20, CD21, CD22 и CD23. Эти антитела успешно использовались для терапии *in vivo*. Однако, в конечном итоге только ограниченное число из этих антител было одобрено для клинических испытаний: ритуксимаб [236] (человеческое/мышинное химерное анти-CD20 (hCD20) моноклональное антитело), отатумумаб [237] (анти-CD20 моноклональное антитело) и окрелизумаб [238] (гуманизированное анти-CD20 моноклональное антитело).

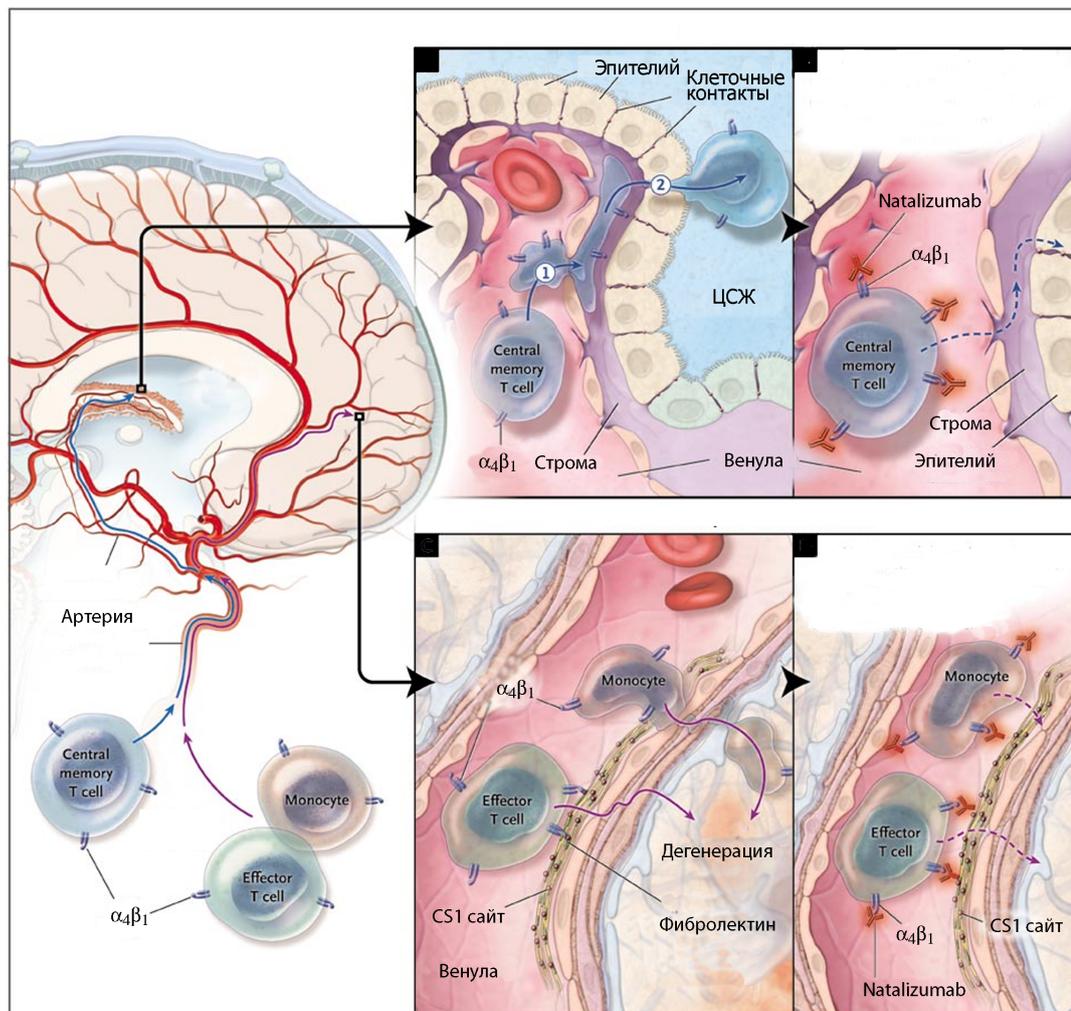


Рисунок 2.22 Эффект моноклональных антител Natalizumab на проникновение мононуклеарных клеток в ЦНС. Адаптировано из [239].

При очевидной терапевтической эффективности, массовая гибель В-клеток приводит к значительному числу побочных явлений. Известно, что CD20-опосредованная деплеция В-клеток до индукции ЕАЕ у животных существенно усугубляло симптомы болезни и увеличивало инфильтрацию энцефалитогенных Т-клеток в ЦНС [240]. Подобный эффект исследователи связывают с истощением редкого подмножества IL-10-продуцирующих CD1d^{hi}CD5+ регуляторных В-клеток (клетки типа В10), так как адаптивный перенос селезеночных клеток В10 до индукции нормализовал протекание ЕАЕ у мышей с предварительно удаленными В-клетками

[240]. Известны данные, свидетельствующие, что лечение ритуксимабом вызывает множество серьезных побочных явлений, таких как остановка сердца, синдром лизиса опухоли, приводящий к острой почечной недостаточности, реактивацию гепатита В и других вирусных инфекций, а также прогрессирующую мультифокальную лейкоэнцефалопатию (ПМЛ) [241].

Вторая стратегия основана на антителах, специфичных к БКР-ассоциированным трансмембранным сигнальным белкам CD79a и CD79b, которые почти исключительно находятся на поверхности В-клеток [242]. Примером третьего подхода является снижение жизнеспособности и ингибирование пролиферации В-клеток путем блокирования взаимодействия между CD40 и CD40L [243]. Два представителя семейства TNF, BAFF (фактор активации В-клеток) и APRIL (лиганд, индуцирующий пролиферацию), также могут использоваться в качестве мишеней для опосредованного антителом прерывания сигнального пути BAFF/APRIL [244]. Было показано, что введение белимумаба (belimumab) – гуманизированного моноклонального антитела против растворимого BAFF – является клинически оправданным в случае пациентов с умеренным и тяжелым ревматоидным артритом [245].

В качестве заключения можно отметить, что, рассматривая современное состояние проблемы аутоиммунной нейродегенерации, становится очевидными наличие существенных побелов в фундаментальном понимании механизма «запуска» заболевания и его прогрессии. Именно с этим связано отсутствие конкретных предложений по повышению специфичности лечения РС. Настоящая работа призвана пролить свет на этиологию и прогрессию данной патологии. Нами также сделаны попытки внести вклад в разработку новых стратегий лечения РС, а также предоставлению молекулярных основ, обосновывающих эти стратегии.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Методики работы с клетками бактерий

Получение электрокомпетентных клеток бактерий

Клетки из музея истощающим штрихом высевали на чашку Петри с LB-агаром без антибиотика и далее инкубировали 14 часов при 37°C в воздушном термостате. Единичную колонию переносили и инкубировали в 5 мл 2xYT без антибиотика для получения ночной культуры и растили при 37°C с хорошей аэрацией. 250 мкл и 750 мкл ночной культуры высевали с разбавлением 1:1000 и 1:333, соответственно, в две конические колбы, содержащие по 250 мл среды SOB, и растили при 37°C с хорошей аэрацией до оптической плотности 0.4 ОЕ, но не более двух часов. Затем клетки охлаждали во льду около десяти минут, стерильно переносили в охлажденные центрифужные стаканы на 250 мл, центрифугировали 10 минут 4000 об/мин при 0°C на центрифуге Beckman J-21. Клетки растворяли в небольшом объеме ледяной стерильной деионизированной воды, переносили в стерильные охлажденные центрифужные стаканы объемом 35 мл, доливали водой до верха, центрифугировали в тех же условиях. Промывку водой повторяли еще 2 раза, затем клетки отмывали охлажденным 10% глицерином. Осадок растворяли в 2-3 мл 10% глицерина, разносили по 100 мкл в стерильные охлажденные эппендорфы, после чего замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. Компетентность клеток проверялась трансформацией плазмидой с известной концентрацией и принималась равной количеству выросших колоний поделенной на количество плазмиды в мкг.

Трансформация клеток *E.coli* методом электропорации

Электропорацию проводили на приборе фирмы Genetronics согласно инструкции производителя. Использовали 1 мм кюветы фирмы BioRad. К размороженной на льду аликвоте (100 мкл) электрокомпетентных клеток добавляли раствор плазмиды или очищенную и обессоленную лигазную смесь, перемешивая, переносили клетки в охлажденную кювету и осуществляли непосредственно электропорацию (1.2-1.4 кV / 5.19-5.22 мс). Затем клетки переносили в 1 мл теплой среды SOC без антибиотиков, инкубировали в воздушном термостате при 37°C 1 час для репарации клеточной стенки и начала экспрессии генов устойчивости к селективным антибиотикам. Далее высевали (100 мкл при трансформации плазмидой, 1 мл при трансформации лигазной смесью) на чашку Петри с LB-агаром с добавлением селективных антибиотиков и помещали в воздушный термостат на 37°C на 14-16 часов.

Проведение ПЦР для клональной селекции

Аmplификацию проводили на приборе DNA Cycler 480 Perkin-Elmer (США) по следующей схеме. Готовили инкубационную смесь следующего состава: 2.5 мкл десятикратного буфера для Taq-полимеразы; по 10 пМ прямого и обратного праймера; по 2 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата; вода до 24 мкл. Раствор разносили по пробиркам по 22 мкл. Бактериальные колонии переносили петлей в пробирки и одновременно делали штрихи на свежей размеченной чашке Петри с твердой питательной средой. Пробирки помещали в прибор, проводили денатурацию при 94°C 3 минуты, на последней минуте первого цикла по пробиркам разносили Taq-полимеразу. Далее осуществляли 25 циклов ПЦР (денатурация: 94°C 30 сек, отжиг праймера $X = 2^{\circ}\text{C} \times (A+T) + 4^{\circ}\text{C} \times (G+C) - 5^{\circ}\text{C}$ 30 сек, элонгация 72°C 30-90 сек). Продукты полимеразной цепной реакции анализировали электрофорезом в агарозном геле.

Ночная культура

Бактериальную колонию помещали в 5 мл среды LB или 2xYT с добавлением селективного антибиотика, наращивали клетки при 37°C и интенсивной аэрации около 12-14 часов.

Приготовление музейного штамма

Из отдельной колонии бактерий выращивали ночную культуру, далее непосредственно в ростовую среду добавляли глицерин до концентрации 12-14%, инкубировали 20 минут при комнатной температуре, делили на аликвоты по 1 мл и замораживали их в жидком азоте. Далее хранение осуществляли при температуре -70°C. Штамм из музея рассевали истощающим штрихом на чашку Петри, содержащую среду LB-агар, и инкубировали 14-16 часов при 37°C в воздушном термостате.

Получение химически компетентных клеток бактерий

Клетки из музея высевали на чашку Петри с 2xYT-агаром без антибиотика и далее инкубировали 14-20 часов при 37°C в воздушном термостате. Отдельную колонию высевали в 5 мл 2xYT без антибиотика для получения ночной культуры и растили при 37°C. Ночную культуру высевали в конические колбы, содержащие по 250 мл среды SOB, и растили при 37°C до оптической плотности 0.3-0.6 ОЕ, но не более двух часов. После этого клетки охлаждали и переносили в пробирки объемом 1,5 мл. Центрифугирование производили при 10000 об/мин в течение 20-60 секунд. После удаления надосадочной жидкости к клеткам добавляли 80-100 мкл холодного раствора 50 мМ CaCl₂, 10 мМ MgCl₂ и 20% глицерина, в котором растворяли осадок. Далее клетки замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

Трансформация клеток *E. coli* методом теплового шока

К размороженной на льду аликвоте (100 мкл) химически компетентных клеток добавляли раствор плазмиды или очищенную и обессоленную лигазную смесь, перемешивали. Далее клетки ставили в термостат на 42°C на 45 сек и после этого в лед на 3-5 минут. Далее клетки переносили в 1 мл теплой среды SOC без антибиотиков, инкубировали в воздушном термостате при 37°C. Далее высевали на чашку Петри с 2хYT-агаром с добавлением селективных антибиотиков и помещали в воздушный термостат на 37°C на 14-16 часов.

3.2 Методики работы с культурами клеток млекопитающих

Поддержание в культуре эукариотических клеток линии HEK и HeLa.

Клетки растили в среде DMEM, содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки и 2мМ L-глутамин, в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ во флаконах (25 см²). При достижении монослоя клетки рассеивали. Отбирали культуральную среду, клетки промывали 5 мл стерильного однократного PBS, потом добавляли 0.5 мл 0.25% раствора трипсина в изотоническом буфере и инкубировали 3-5 минут при 37°C до открепления клеток. Открепившиеся клетки смывали и перерастворяли в 4.5 мл среды DMEM с 10% бычьей фетальной сыворотки. Затем клетки рассеивали 1/5 по объему суспензии.

Получение культуры зрелых олигодендроцитов

Культуру зрелых олигодендроцитов получали из головного мозга мышат возрастом 2-3 дня по методике, описанной в [246]. Мелко порезанные ткани головного мозга обрабатывали последовательно трипсином и ДНКазой, отделяли отдельные клетки центрифугированием и далее высевали на культуральные флаконы, покрытые поли-L-лизинном и культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки и 10 мкг/мл гентамицина. Через 7 дней олигодендроциты отделяли от остальных клеток по принципу различной силы адгезии, качая культуральные флаконы на орбитальной качалке со скоростью 200 оборотов/мин и амплитудой 2.5 см сначала 1 час, затем 16-20 часов. Полученные олигодендроциты высевали на 48-луночные культуральные планшеты, покрытые поли-орнитином с молекулярной массой 30-70 кДа и культивировали 14-20 дней в среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки, 10 мкг/мл гентамицина, 0.1% BSA, 50 мкг/мл апотрансферрина, 5 мкг/мл инсулина, 30 нМ селенита натрия, 10 нМ биотина, 10 нМ гидрокортизона, 10 нг/мл цилиарного нейротрофического фактора (CNTF) и 15 нМ трийодтиронина (Т3).

Получение активированных CD8+ Т-клеток

CD8+ Т-клетки получали по методике, описанной в [247]. Мононуклеарные клетки выделяли из периферической крови мышей путем центрифугирования цельной крови, наложенной на раствор фикола Ficolл Paque Plus (GE Healthcare, Великобритания). CD8+ клетки изолировали с помощью набора для негативной селекции Dynabeads Untouched Mouse CD8 Cells negative isolation kit (Life Technologies) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные Т-клетки перерастворяли в культуральной среде advanced RPMI, содержащей 10% фетальной сыворотки, 10 мкг/мл гентамицина и 10 нг/мл рекомбинантного IL-7 мыши, и культивировали совместно с дендритными клетками в соотношении 4:1 (Т-лимфоциты к АПК). Дендритные клетки получали по методике, описанной в [248], обрабатывая селезенки мыши коллагеназой D с последующим разделением клеток по принципу различной адгезии на пластике. Перед добавлением к CD8+ Т-клеткам дендритные клетки обрабатывали пептидами ENPVVHFF (MBP₈₃₋₉₀) или FNFTAPFI (эпитоп вируса энцефаломиеелита Тейлера, GeneCust, Luxembourg) в концентрации 10 мкг/мл в течение 90 минут при 37°C. На третий день культивирования 50% культуральной среды заменяли на свежую и добавляли 50 МЕ/мл рекомбинантного IL-2 мыши. На 7 день каждой последующей недели культивирования среду, содержащую суспензионные Т-лимфоциты отбирали, центрифугировали (350g, 8 минут), Т-лимфоциты ресуспендировали в свежей культуральной среде, содержащей IL-7, и добавляли к вновь выделенным свежим дендритным клеткам. Через 3 дня после этого среду частично заменяли на свежую с добавлением IL-2. Суммарное время культивации Т-клеток составило 4 недели.

Получение первичной культуры астроцитов

Астроциты получали из головного мозга мышат линии СЗН/Не возрастом 3 дня. Все процедуры с мышами проводились в соответствии с протоколами Комиссии ИБХ РАН по контролю за содержанием и использованием животных по методике, описанной в [201]. Первичную культуру, содержащую астроциты и олигодендроциты, культивировали в течение 8 дней. Далее астроциты отделяли от остальных клеток, как описано в [201]. Разделение происходило по принципу различной силы адгезии при качании культуральных флаконов на орбитальной качалке со скоростью 250 оборотов/мин и амплитудой 2.5 см в течение 12 часов. Клетки, находившиеся в суспензии, содержащие олигодендроциты, удаляли, а адгезионные клетки промывали средой. Клетки снимали с флакона при помощи EDTA и далее высевали на 48-луночные культуральные планшеты в концентрации $3 \times 10^4 / \text{см}^2$. Полученные клетки культивировали в сбалансированной соляной среде Basal Medium Eagle's, содержащей 15% фетальной сыворотки, 0.1% глутамина и 0.6% глюкозы. Клетки в трех независимых повторностях

обрабатывали рекомбинантным мышинным IFN γ (Sigma, кат. I4777, St. Louis, MO, USA) в концентрации 250 IU/мл или бензтропином в концентрации 2.0 мкМ за 48 часов до анализа.

Приготовление музея клеток млекопитающих

При достижении 100% плотности монослоя клетки открепляли от поверхности обработкой раствором трипсина. Клеточную суспензию помещали в стерильные полипропиленовые центрифужные пробирки и центрифугировали при 800 g и температуре 10°C в течение 5 минут. Отделяли надосадочную жидкость и далее клеточный осадок незамедлительно перерастворяли в смеси 90% бычьей фетальной сыворотки и 10% DMSO из расчета 1 мл на 2-3 миллиона клеток. Клеточную суспензию переносили в заранее подписанные криовials и помещали на -20°C на 1-2 часа до полного замораживания. Затем криовials на 2-3 недели переносили на -80°C. На длительное хранение клетки переносили в танк с жидким азотом.

Выведение линии эукариотических клеток из заморозки

Криовиал с клетками размораживали в водяной бане с температурой 37°C в течение 1-2 минут. Клеточную суспензию незамедлительно переносили в стерильную центрифужную пробирку с 20-30 мл холодной бессывороточной среды и центрифугировали при 800 g и температуре 10°C в течение 5 минут. Отделяли надосадочную жидкость и далее клеточный осадок незамедлительно перерастворяли в смеси 5 мл теплой среды с 10% бычьей фетальной сыворотки. Суспензию клеток переносили в культуральный флакон (25 см²) и помещали в инкубатор при 37°C, 5% CO₂ и влажности 98%.

Трансфицирование эукариотических клеток методом липофекции

Перед проведением трансфекции плазмидные ДНК дополнительно очищали от примесей РНК и солей. Липофекцию проводили с использованием Lipofectamine Reagent и Plus Reagent (Invitrogen, США) согласно рекомендации производителя. За день до проведения трансфекции высевали 2-6x10⁴ клеток в лунки 24-луночного планшета в 500 мкл среды DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащей 10% фетальной сыворотки. Растворяли 0.4 мкг ДНК в 25 мкл среды opti-MEM без сыворотки и антибиотиков, добавляли 0.4 мкл Plus Reagent, перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Добавляли 2 мкл Lipofectamine Reagent в 25 мкл среды opti-MEM без сыворотки и антибиотиков, перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Смешивали полученные растворы и добавляли по 50 мкл к клеткам. Результаты трансфекции анализировали через 24-72 часа. Для трансфицирования клеток малыми интерферирующими РНК (siRNA) использовали Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, США) согласно рекомендации производителя. Растворяли

10 пмоль siRNA в 25 мкл среды opti-MEM без сыворотки и антибиотиков. Также в 25 мкл среды opti-MEM без сыворотки и антибиотиков добавляли 3 мкл реагента Lipofectamine RNAiMAX, растворы смешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем полученные растворы добавляли к клеткам из расчёта по 50 мкл на 1 лунку 24-луночной плашки. При необходимости трансфицирования клеток плазмидной ДНК и siRNA в одном эксперименте, сначала трансфицировали клетки siRNA, затем через 24 часа меняли культуральную среду на свежую, проводили трансфекцию плазмидной ДНК и через 24 часа после этого клетки анализировали.

Определение цитотоксической активности CD8+ Т-клеток

Способность CD8+ Т-лимфоцитов лизировать целевые клетки определяли с помощью набора DELPHIA cytotoxicity assay kit (Perkin-Elmer) в соответствии с инструкциями производителя. Олигодендрциты обрабатывали реагентом BATDA в течение 30 минут при 37°C, промывали PBS 5 раз и добавляли CD8+ Т-лимфоциты в соотношении [эффektorные]:[таргетные] клетки 10:1. Через 2.5 часа культуральную среду отбирали и смешивали с раствором, содержащим соли европия Eu^{2+} . Флуоресценцию измеряли методом TRF⁵¹ на приборе Varioskan Flash (Thermo, США) со следующими параметрами: длина волны возбуждения 340 нм, длина волны эмиссии 615 нм; задержка по времени 50 мкс, время интеграции 800 мкс, общее время измерения 5 с.

Изучение эффективности интернализации липосомированных пептидов дендритными клетками

Дендритные клетки изолировали из крови крысы в соответствии с протоколом, описанным в [249]. Клетки в количестве 5×10^4 инкубировали 120 мин. с маннозилированными и неманнозилированными липосомами, содержащими с-тус пептид. Концентрацию липосом варьировали от 0 до 20 мг/мл. После инкубации клетки дважды отмывали фосфатным буфером, а затем лизировали в буфере на основе трис основания, содержащем 0.1 % NP-40, 0.25 мМ PMSF, 10 мкМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ ЭДТА. Клеточный лизат наносили на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond C, Amersham). Мембрану блокировали 2% БСА в фосфатном буфере и затем гибридизовали с анти-с-тус или анти-актин антителами 1 час при 37°C. Далее мембрану трижды отмывали в фосфатном буфере, содержащем 0.1% Tween-20, добавляли антитела, специфичные к константному домену иммуноглобулина козы, конъюгированные с пероксидазой хрена, и инкубировали еще 1 час при 37°C. После очередной отмывки, мембрану проявляли с помощью

⁵¹ от англ. time-resolved fluorescence

набора ECL Prime Western blotting Detection Reagent (GE Healthcare, США) и визуализировали на приборе VersaDoc (BioRad, США).

Оценка цитотоксического действия иммунотоксинов на модельные линии клеток

Количество клеток линии С-МУС и 1В4F4 подсчитывали в камере Горяева. Затем клеточную суспензию центрифугировали 10 минут 800 об/мин и доводили концентрацию клеток до 1 миллиона/мл. Клеточную суспензию разносили по 0.5 мл в 6 лунок 24х луночного планшета (Nunc, США) в среде RPMI-DMEM advanced с добавлением антибиотика-антимикотика и L-глутамин (Gibco). Готовили разведения иммунотоксинов, которые затем фильтровали через стерильные фильтры 0.22 мкм (Millipore). Инкубацию клеток с иммунотоксинами проводили 72 часа при 37°C и 5% CO₂. В случае инкубации с белками Fc-linker-с-мус и Fc-linker клеточная среда содержала 1% человеческую сыворотку. По истечении 72 часов инкубации проводили МТТ тест.

МТТ тест

24х луночные планшеты центрифугировали 800 об/мин, культуральную среду отбирали и к клеткам добавляли 1 мл Locke's буфера (154 mM NaCl; 5.6 mM KCl; 1.3 mM CaCl₂; 3.6 mM NaHCO₃; 5.6 mM глюкоза; 10 mM HEPES), содержащем 0.25 мг/мл метилтиазолилдибензилтетразолиум бромид (МТТ). Клетки инкубировали с МТТ 3 часа при 37°C, после чего центрифугировали 5000 об/мин 10 минут. Осадок перерастворяли в 1 мл изопропанола и центрифугировали 5000 об/мин. Далее измеряли оптическое поглощение надосадочной жидкости при 540 нм. Интенсивность поглощения соответствовала количеству живых клеток.

Оценка цитотоксического действия иммунотоксинов на культуру спленоцитов, содержащую популяцию с-мус специфичных В-клеток

Селезенки иммунизированных и интактных мышей линии BALB/c изолировали на 24 день с момента первой иммунизации. Изолированные селезенки переносили в чашки Петри и гомогенизировали для получения суспензии спленоцитов. Изолированные спленоциты перерастворяли в культуральной среде DMEM (Gibco) и подсчитывали в камере Горяева. Далее клетки разносили в лунки 24х луночной плашки по 1 мл в концентрации 3×10^6 клеток на 1 мл. Иммунотоксины добавляли в лунки в следующих концентрациях: барназа и барназа-с-мус (0.55 мкМ), Fc-linker и Fc-linker-с-мус (0.1 мкМ). В лунки с молекулами Fc-linker и Fc-linker-с-мус добавляли 1% человеческой сыворотки. Инкубацию проводили в течение 72 часов, отбирая образцы каждые 24 часа.

Проточная цитофлуориметрия

Один миллион спленоцитов центрифугировали 10 минут 400g, осадок дважды отмывали PBS. К спленоцитам, изолированным из мышей линии BALB/c, иммунизированных KLH-с-тус, добавляли раствор БСА-ФИТЦ-с-тус и антитела анти-B220-APC (eBioscience, США) в фосфатном буфере, содержащем 1% БСА. Клетки инкубировали 40 минут при +4°C, далее центрифугировали 10 минут 400g и перерастворяли в FACS буфере (0.1% БСА, 0.02% азида натрия, 50 мкг/мл пропидиум йодида в фосфатном буфере) и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSDiva (Becton Dickinson, США). Для экспериментов на спленоцитах, изолированных из мышей линии SJL с индуцированным ЕАЕ, к клеткам добавляли раствор биотинилированных пептидов MBP (7-TQDENPVVHFFKNIIVTRTPPPS или 12-DAQGTLISKIFKLGGRDSRSGSPMARR) в фосфатном буфере, содержащем 1% БСА. Клетки инкубировали 40 минут при +4°C, центрифугировали 10 минут 400g и перерастворяли в физиологическом буфере. К клеточной суспензии добавляли анти-B220-APC антитела (eBioscience, США) и конъюгат Streptavidin-Pacific Blue, инкубировали 40 минут при +4°C, далее центрифугировали 10 минут 400g и перерастворяли в FACS буфере (0.1% БСА, 0.02% азида натрия, 50 мкг/мл пропидиум йодида в фосфатном буфере) и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSDiva (Becton Dickinson, США).

3.3 Методики работы с экспериментальными животными

Иммунизация мышей линии BALB/c конъюгатом KLH-с-тус

Самкам мышей линии BALB/c производили подкожные инъекции эмульсии, содержащей 75 мкг KLH-с-тус в ПАФ. На 21 день после иммунизации мышей дополнительно бустировали эмульсией, содержащей 75 мкг KLH-с-тус в ПАФ.

Индукция и терапия ЕАЕ в крысах линии DA

Эксперименты проводили в медицинском центре им. Асаф Арофе (Израиль) с соблюдением всех регламентированных этических норм. Индукцию ЕАЕ проводили в 8-9 недельных самках крыс линии Dark Aguti с SPF⁵² статусом. Крысам подкожно вводили в основание хвоста 200 мкл эмульсии, содержащей 50 мкг пептида MBP₆₃₋₈₁ (ANASPEC, США) в смеси физиологического буфера с ПАФ (1:1). Для экспериментов отбирали животных, у которых развивались первичные симптомы ЕАЕ. Сформированным экспериментальным группам на 6 день после индукции ЕАЕ

⁵² от англ. specific pathogen free

делали ежедневные подкожные инъекции (суммарно 6 инъекций) в основание хвоста липосом с различными композициями пептидов, препарата глатирамера ацетата или же плацебо.

Терапия ЕАЕ в мышцах линии SJL с применением иммунотоксинов

Эксперименты проводили в научном центре Centre de Recherche des Cordeliers de Jussieu (CRC) (Франция) с соблюдением всех регламентированных этических норм. ЕАЕ индуцировали в самках мышей линии SJL с SPF статусом в возрасте от 6 до 8 недель в соответствии с протоколом [250] путем двукратного введения 100 мкг гомогената спинного мозга мыши (ГСММ) в ПАФ, содержащем туберкулин в концентрации 4 мг/мл. Инъекции ГСММ на 1-й день производили подкожно в двух точках, вдоль позвоночного столба, а на 3-й день в подошвы задних лап. Дополнительно в день инъекций ГСММ в ПАФ, мышам производили внутривенные инъекции раствора *Pertussis toxin* (Calbiochem, США) в количестве 500 нг/мышь. Мышей с индуцированным ЕАЕ разделили на 5 групп по 10 голов в каждой: без инъекций; животным однократно вводили 200 мкг Сорахоне (Teva); животным в каждой группах рFm, рFm-7, или рFm-11 дважды внутривенно вводили 50 мкг на 5 и 10 день с момента индукции ЕАЕ.

Индукция ЕАЕ в мышцах линии C57BL/6

Эксперименты проводили в медицинском центре им. Асаф Арофе (Израиль) с соблюдением всех регламентированных этических норм. Самок мышей линии C57BL/6 с SPF статусом иммунизировали в соответствии с установленным протоколом [148]. Животным вводили 100 мкг внеклеточного домена MOG в ПАФ, содержащем 0.5 мг/мл туберкулина.

Терапия ЕАЕ в мышцах линии SJL с применением ингибиторов протеасомы

Эксперименты проводили в медицинском центре им. Асаф Арофе (Израиль) под руководством Д. Меламеда либо в питомнике лабораторных животных ФИБХ РАН под руководством Г.Б. Телегина с соблюдением всех регламентированных этических норм. ЕАЕ индуцировали в самках мышей линии SJL в возрасте от 6 до 8 недель с SPF статусом в соответствии с протоколом [250] путем двукратного введения 100 мкг ГСММ в ПАФ, содержащем туберкулин в концентрации 4 мг/мл. Инъекции ГСММ на 1-й день производили подкожно в 2х точках, вдоль позвоночного столба, а на 3-й день в подошвы задних лап. Дополнительно в день инъекций ГСММ в ПАФ, мышам производили внутривенные инъекции раствора *Pertussis toxin* (Calbiochem, США) в количестве 500 нг/мышь. Введение ингибиторов осуществляли внутривенно по установленной схеме.

Оценка тяжести протекания ЕАЕ

Тяжесть развития аутоиммунной патологии определяли ежедневно в соответствии со следующей шкалой: 0 - норма, 1 – потеря тонуса хвоста, 2 – слабость задних ног или их паралич, 3 – сильный паралич конечностей, 4 – полный паралич (неспособность двигаться), 5 – смерть.

3.4 Секвенирование ДНК и транскриптомный анализ

Рутинное секвенирование плазмидной ДНК проводили при помощи автоматического секвенатора ABI PRISM.

Широкомасштабное секвенирование генов переменных участков V_H/V_L из фаг-дисплейных библиотек

Изначальная фаг-дисплейная библиотека иммуноглобулинов при РС и 4 под-библиотеки, обогащенные на разные антигены (MBP, MOG, LMP1, двойное обогащение LMP1/MBP), были амплифицированы в клетках TG-1 *E. Coli*. ПЦР проводили с использованием Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Fermentas). Реакционная смесь содержала 5 нг плазмиды ДНК в качестве матрицы и 10 пмоль фланкирующих праймеров. ПЦР-продукты очищали с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, USA) и лигировали с адаптарами NEBNext Multiplex Oligos (New England Biolabs, UK), используя NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, UK). Далее библиотеки анализировали с помощью Qubit (Invitrogen) – количественно и 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) – качественно. Библиотеки нормализовали до концентрации 10 нМ и далее смешали в эквимольном соотношении. Амплификацию образцов проводили в соответствии с протоколом Illumina с использованием MiSeq с Reagent Kit v2 (2x250). Объединение и выравнивание связанных прочтений было сделано на базе GW CLC Bio. Финальная идентификация переменных фрагментов иммуноглобулинов на основе данных широкомасштабного секвенирования была проведена с использованием онлайн ресурса IMGT/HighV-QUEST [251].

Параметры фильтров для анализа встречаемости гипервариабельных участков

Результаты выравниваний последовательностей, полученных методом широкомасштабного секвенирования, после анализа с помощью программы IMGT/V-QUEST [252] были отфильтрованы по следующим критериям: поле "Functionality" выравнивания должно быть "productive" (конкретная последовательность антитела должна быть оценена программой как продуктивная); идентичность аллели V-гена с аллелью зародышевого сегмента из базы IMGT должна быть не менее 70%; для последовательностей легких цепей не принимались в расчёт цепи, идентифицированные программой IMGT/V-QUEST как тяжелые цепи.

Транскриптомный анализ с помощью микрочиповой системы Affymetrix

Выделение мРНК осуществляли, как описано в [195]. Образцы мРНК, выделенные из трех независимых образцов клеточной культуры, были смешаны в одинаковом соотношении. Процедура синтеза и мечения кДНК была выполнена с использованием кита Ambion WT Expression Kit (Life Technologies, Darmstadt, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве материала использовали 500 нг тотальной РНК, как описано в [196]. Фрагментацию целевой ДНК, гибридизацию на микрочипе Affymetrix GeneChip Mouse Gene 2.0 ST, промывку чипа, окрашивание и сканирование проводили согласно протоколу [197]. Данные сканирования микрочипов были конвертированы в CEL файлы с использованием программного обеспечения сканера и затем были обработаны в Affymetrix Expression Console (build 1.4.1.46) с использованием метода RMA. Достоверная граница кратности изменения была принята равной 1.5. Набор пробосетов, не соответствующих аннотированной открытой рамке считывания, был исключен из анализа. Необработанные данные размещены в Gene Expression Omnibus под учетным номером GSE96899.

3.5 Методы масс-спектрометрического анализа

Тандемный хромато-масс-спектрометрический анализ

Эксперименты проводили в сотрудничестве с А.С. Кононихиным в Центре масс-спектрометрии РАН под руководством профессора Е.Н. Николаева. Тандемный хромато-масс-спектрометрический анализ (ESI-MS, совмещенная с жидкостной хроматографией) осуществляли на приборе Agilent 1100 series (Agilent Technologies, США) с хроматографической колонкой Reprosil-PurBasic C₁₈, (Dr. Maisch HPLC, Германия). После нанесения 2 мкл образца проводили элюцию линейным градиентом ацетонитрила с 3% до 50% в течение 45 минут, и затем 90% в течение 15 минут в воде с 0.1% муравьиной кислотой. Элюент направляли в масс-спектрометр 7-Tesla Finnigan LTQ-FT Ultra (Thermo Electron, Германия) с самодельным наноэлектроспрейным источником ионизации. Масс-спектрометрический анализ фракций пептидов осуществляли при помощи программы X-calibur (Thermo Electron, Бремен, Германия) в двухстадийном режиме автоматического измерения спектров. На первой стадии в масс-спектрометре измеряли точные массы пептидов в диапазоне m/z 300-1600 с разрешением R=50000 для m/z 400 (число ионов в ячейке 5×10⁶). На второй стадии из масс-спектра выбирали три максимальных пика, для которых производили столкновительно-индуцированную фрагментацию (CID⁵³). Фрагментация CID и измерение спектров CID фрагментов происходили

⁵³ от англ. collision-induced dissociation

в линейной квадрупольной ионной ловушке (число ионов 3×10^4). В режиме автоматического двухстадийного анализа пептиды, для которых фрагментация уже была проведена, динамически исключали из рассмотрения на 30 секунд.

Для количественного LC-MS/MS⁵⁴ анализа с применением $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$, непосредственно после ионообменной хроматографии фракцию, содержащую 26S протеасому, подвергали диализу против буфера Г на основе H_2^{18}O или H_2^{16}O . После диализа измеряли активность по субстрату Suc-LLVY-АМС и образцы протеасомы разводили до одинаковой активности на единицу объема. Лиофилизированный MBP разводили в 20 мМ Tris-HCl pH 7.5 на основе ^{18}O - или ^{16}O -воды. Смесь 26S протеасомы (20 мкг/мл) и MBP (100 мкг/мл) инкубировали при 37°C. Реакции останавливали, добавляя PS-341 до концентрации 5 мкМ, и сразу же замораживая. Непосредственно перед LC-MS/MS анализом, эквивалентные количества образцов на основе ^{18}O - и ^{16}O смешивали и анализировали по вышеописанной методике. Интенсивности пиков, соответствующих ^{18}O -меченым пептидам, были скорректированы с учетом вклада природного изотопного распределения кислорода по уравнению 1

$$(1) \quad I[^{18}\text{O}] = \left(I_2 - \frac{M_2}{M_0} \cdot I_0 \right)$$

I_0 = измеренная относительная интенсивность моноизотопного пика; I_2 = измеренная относительная эффективность пика с массой + 2 Да; M_0 = теоретическая относительная интенсивность моноизотопного пика; M_2 = теоретическая относительная интенсивность моноизотопных пиков с массой +2Да. Для количественного анализа с использованием изотопно-меченного пептида MBP₈₃₋₉₀ [ENPVVHFF*] ($\text{F}^* = {}^{13}\text{C}_9\text{H}_9{}^{15}\text{NO}$) (Peptide Protein Research, Великобритания), меченый пептид смешивали с гидролизатами MBP различными типами протеасомы в одинаковых соотношениях (5 мкл раствора пептида на 5 мкл образца). Каждый образец (10 мкл) содержал 2.5 нг ENPVVHFF*. 2 мкл этого образца наносили на колонку с помощью автоматического дозатора и подвергали LC-MS/MS анализу. Количество природного пептида определяли по соотношению меченого и немеченого пептида на масс-спектре. Относительные интенсивности пиков определяли по масс-хроматограмме при помощи программы X-calibur (Thermo Electron, США).

Масс-спектрометрический анализ полноразмерного MBP (Top-down)

Эксперименты проводили в сотрудничестве с А.С. Кононихиным в Центре масс-спектрометрии РАН под руководством профессора Е.Н. Николаева. Для анализа модификаций

⁵⁴ от англ. liquid chromatography tandem-mass spectrometry

нативного очищенного МВР использовали метод масс-спектрометрии высокого разрешения с электроспрейной ионизацией на приборе Bruker APEX Ultra FTICR (Bruker Daltonics, США), который оснащен сверхпроводящим соленоидом 7-Тесла и источником ионизации Apollo II. Для создания электроспрея использовались следующие условия: скорость потока 2 мкл/мин; положительная мода; напряжение на входном элетроде 3.5 kV; напряжение капилляра 4 кВ. Для внешней калибровки масс-спектрометра использовали стандартную смесь (Agilent, reorder № G2421A).

Масс-спектрометрия с мониторингом множественных реакций

Эксперименты проводили в сотрудничестве с С.И. Ковальчуком в лаборатории протеомики ИБХ РАН, а также в лаборатории протеомного анализа НИИ физико-химической медицины под руководством профессора В.М. Говоруна. MRM⁵⁵ анализ проводили на масс-спектрометре QTRAP 4500, оснащенном источником ионов NanoSpray III (ABSciex, Канада) и совмещенном с нано-поточной хроматографической системой nanoLC 400 (Eksigent, США). ВЭЖХ система использовалась в конфигурации предколонка – разделяющая колонка. Для хроматографического разделения использовались следующие буферные растворы: буфер для загрузки образца на предколонку и буфер А – 98.9% H₂O, 1% метанол, 0.1% муравьиная кислота (v/v); буфер В – 99.9% ацетонитрил, 0.1% муравьиная кислота (v/v). Образцы наносили на предколонку Chrom RP C₁₈ 0.5x0.3 mm (Eksigent, США) при скорости потока 3 мкл/мин в течение 10 мин. Разделение осуществляли на колонке C₁₈ RP 75 мкм x 150 мм (Eksigent, США) при скорости потока 300 нл/мин в линейном повышающемся градиенте буфера В от 5 до 50% за 20 мин. Колонку и предколонку регенерировали после каждого анализа промывкой 95% буфера В в течение 7 мин и уравнивали 5% буфером В в течение 25 мин. Для исключения вероятности неполной отмывки предыдущего образца между образцами через колонку и предколонку пропускали 5 коротких (5 мин) градиентов от 5 до 95% буфера В с 3 мин промывкой 95% буфером В в конце. Масс-спектрометр использовался в режиме анализа положительно-заряженных ионов. Фрагментацию проводили методом столкновительной диссоциации с использованием азота. Параметры MRM для анализируемого пептида были оптимизированы в процессе прямого ввода раствора пептида в источник ионизации: родительский ион m/z 494.8 (z=+2), потенциал декластеризации 150 В, время накопления сигнала для каждого фрагмента 100 мс, m/z фрагментных ионов (энергия столкновительной диссоциации, В): 745.5 (20), 648.4 (22), 549.3

⁵⁵ от англ. multiple reaction monitoring

(20), 450.2 (19), 433.2 (29), 580.3 (26). Анализ и обработку результатов проводили в программе SkyLine (Mac Coss Lab).

3.6 Методики работы с бактериофагами

Аmplификация фаг-дисплейной библиотеки

Сток библиотеки в TG-1 клетках (2 мл) инокулировали в 500 мл 2xYT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 1% глюкозы. Клетки подращивали при 37°C до плотности $A_{600}=0.5$, после этого 25 мл культуры ($\sim 1 \times 10^{10}$ бактериальных клеток), инфицировали фагами-помощниками M13K07 в соотношении бактериальных клеток к фагам-помощникам 1:20, инкубировали 30 мин при 37°C без качания. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин, осадки перерастворяли в 30 мл среды 2xYT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл канамицина, разводили этой же средой до объема 500 мл и растили в течение 14 – 16 часов при интенсивной аэрации при 30°C. Культуру центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин, к полученной надосадочной жидкости, содержащей бактериофаги, добавляли 1/5 объема ПЭГ/NaCl и оставляли во льду на 1 час. Фаговую суспензию осаждали центрифугированием при 12000 g в течение 40 мин. Осажденный фаговый преципитат перерастворяли в 40 мл воды и, добавив 8 мл ПЭГ/NaCl, инкубировали на льду не менее 20 мин, после чего вновь проводили осаждение фагового преципитата при 12000 g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость вместе с остатками полиэтиленгликоля тщательно удаляли и перерастворяли осадок в 2 мл PBS. Для удаления клеточного дебриса пробирки центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. Выход фаговых частиц составлял приблизительно 10^{11} - 10^{13} к.о.е.

Процедура обогащения фаг-дисплейной библиотеки

MBP и его гидролизат, растворенный в PBS в концентрации 10 мкг/мл, наносили на поверхность полистироловых пробирок (Nunc immunotube) в течение ночи при +4°C. Далее поверхность блокировали 5% раствором сухого обезжиренного молока в PBS в течение 2 часов при комнатной температуре. Фаговые частицы (3×10^{11} к.о.е./мл) прединкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в растворе 5% сухого обезжиренного молока в PBS. Связывание между фаговыми частицами и MBP и его гидролизатом в растворе проводили в течение 2 часов при 37°C или при комнатной температуре. После инкубации все пробирки промывали 10-20 раз раствором PBS, содержащим 0.1% Tween 20, и 10 раз раствором PBS. Связавшиеся фаговые частицы элюировали раствором 100 мМ триэтиламина в течение 15 минут при комнатной температуре. После каждого раунда селекции определяли титр фаговых частиц в экспериментальных и контрольных пробирках и рассчитывали их соотношение. Полученным

элюатом инфицировали клетки *E. coli* TG1, находящиеся в экспоненциальной фазе роста. Клетки инкубировали 30 мин при 37°C, после чего центрифугировали при 3000 g 10 мин и высевали на чашку Петри (24×24 см) с агаризованной средой 2xYT, содержащей 1% глюкозу и 100 мкг/мл ампициллина. Чашки инкубировали в термостате при 30°C в течение ночи. На чашку с выросшими колониями добавляли 1-2 мл среды 2xYT, содержащей 20% глицерина, и шпателем собирали колонии. 50 мкл смывых бактериальных клеток использовали для инокуляции 50 мл 2xYT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 1% глюкозы. Оставшиеся смывые бактериальные клетки замораживали в жидком азоте и хранили глицериновый сток при -70°C. Культуру клеток подращивали до $A_{600}=0.4$. К 10 мл культуральной среды добавляли 5×10^{10} фагов-помощников и инкубировали 30 мин при 37°C без качания. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин, осадки перерастворяли в 50 мл среды 2xYT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, 25 мкг/мл канамицина и 0.1% глюкозы. Культуру растили в течение 14 – 16 часов при интенсивной аэрации при 30°C. Культуральную среду центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин и фаговые частицы осаждали 1/5 объема ПЭГ/NaCl. Полученные фаговые частицы переосаждали ПЭГ/NaCl и использовали для дальнейших раундов селекции.

3.7 Приготовление липосомальных композиций

Маннозилированные однослойные липосомы (SUV) были реконструированы из смеси фосфатидилхолина животного происхождения и синтетического маннозилированного DOG (в молярном соотношении 1:100) методом гомогенизации высоким давлением [253]. Липидную смесь (100 мг/мл) в CHCl_3 упаривали и затем перерастворяли в воде до конечной концентрации липидов 50 мг/мл с последующей гомогенизацией высоким давлением (10 циклов при давлении 600-1200 атм.). Полученные SUV смешивали с пептидами в массовом соотношении 330:1, соответственно, и подвергали криогенной сушке. После вторичной регидратации полученные SUV осаждали ультрацентрифугированием. Полученный осадок растворяли в PBS. Включение пептидов было установлено методом высокоэффективной обращено-фазовой хроматографии. Средний поверхностный заряд и диаметр липосом был измерен на приборе Brookhaven ZetaPlus zeta sizer при 25°C путем разбавления 20 мкл суспензии липосом 0.001 M раствором PBS.

3.8 Методики работы с нуклеиновыми кислотами

Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции

Рестрикцию ДНК проводили согласно рекомендациям производителя соответствующих ферментов в водном термостате при 37°C/30°C. При рестрикции плазмидной ДНК в последние

10 минут инкубации добавляли панкреатическую рибонуклеазу до конечной концентрации 1 мкг/мл.

Лигирование фрагментов ДНК

Для лигирования использовали лигазный кит (Fermentas, Литва) согласно инструкции производителя. Лигирование проводили в объеме 20 мкл, при молярном соотношении вектора и вставки 1:10, в течение 2-20 часов при комнатной температуре. Затем в лигазную смесь добавляли 1/10 объема тРНК (соосадителя), обрабатывали равным объемом хлороформа, и переосаждали водную фазу 3 объемами этанола. Центрифугировали 10 минут на скорости 13200 об/мин при комнатной температуре, промывали осадок 70% спиртом, затем растворяли в 6 мкл воды.

Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК в большинстве случаев проводили по [254] с некоторыми модификациями. Одну бактериальную колонию инокулировали в 5 мл LB или 2xYT с добавлением селективного антибиотика и далее растили при 37°C с хорошей аэрацией в течение 18-22 часов. Клетки осаждали центрифугированием 3 минуты на скорости 5000 об/мин при комнатной температуре последовательно в один эппендорф. Перерастворяли осадок в 200 мкл лизирующего буфера (50 мМ глюкоза, 25 мМ Трис-HCl pH 8.0; 10 мМ ЭДТА), инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Добавляли 400 мкл свежеприготовленного раствора 0.2 М NaOH, 1% ДСН, перемешивали переворачиванием и далее инкубировали на льду 5 минут. Затем быстро нейтрализовали 300 мкл ледяного 7.5 М NH₄Ac pH 7.6, перемешивали переворачиванием и 10 минут инкубировали при комнатной температуре до образования белого осадка, который осаждали центрифугированием на скорости 13200 об/мин при комнатной температуре в течение 5 минут. Супернатант переносили в новый эппендорф с 0.6 объема (540 мкл) изопропанола, перемешивали переворачиванием до образования взвешенного белого осадка, 10 минут центрифугировали на скорости 13200 об/мин при комнатной температуре. Осадок суспендировали в 100 мкл ледяного 2 М NH₄Ac pH 7.4 на льду и инкубировали в течение 5 минут при 0°C. Затем центрифугировали 5 минут в тех же условиях, супернатант переносили в пробирку с 100 мкл изопропанола. 10 минут инкубировали при комнатной температуре, центрифугировали 10 минут в тех же условиях. Осадок промывали 300 мкл соленого спирта, подсушивали на воздухе, растворяли в 20 мкл TE или воды.

Выделение плазмидной ДНК для секвенирования проводили согласно приведенной выше методике со следующими модификациями. Осадок, полученный после второго переосаждения изопропанолом, повторно перерастворяли в 100 мкл ледяного 2 М NH₄Ac pH 7.0, инкубировали

5 минут при 0°C и центрифугировали 5 минут на скорости 132500 об/мин при комнатной температуре. Далее супернатант пересаждали изопропанолом, как описано выше. Осадок, полученный после третьего пересаживания изопропанолом, растворяли в 49 мкл ТЕ, добавляли 1 мкг/мл панкреатической РНКазы и инкубировали 15 минут при 37°C. Добавляли 25 мкл 2 М NH₄Ac pH 7.4 и 75 мкл изопропанола, инкубировали 10 минут при комнатной температуре и центрифугировали на скорости 13200 об/мин при +4°C. Осадок трижды промывали 300 мкл соленого спирта, затем 1 раз 500 мкл перегнанного этанола, подсушивали на воздухе и растворяли в 20 мкл ТЕ или воды.

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для проведения электрофореза использовали 1% агарозный гель, приготовленный на однократном ТВЕ с бромистым этидием в концентрации 0.5 мкг/мл. Пробы смешивали в соотношении 1:10 с буфером нанесения, содержащим 0.1% бромфенолового синего, 0.5% ДСН, 0.1 М ЭДТА, pH 8.0 и 50% глицерина. Электрофорез проводили в буфере ТВЕ при напряжении 5 В/см. По окончании электрофореза ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм.

Электрофорез ДНК в полиакриламидном геле

Для проведения электрофореза использовали 5% полиакриламидный гель (соотношение акриламида и бисакриламида 19:1), приготовленный на однократном ТВЕ. Толщина аналитического геля составляла 0.75 мм, препаративного – 1.5 мм. В течение 10 минут проводили предварительный форез при 90-110 В. Пробы смешивали в соотношении 1:10 с буфером нанесения, содержащим 0.1% бромфенолового синего, 0.5% ДСН, 0.1 М ЭДТА, pH 8.0 и 50% глицерина и наносили на гель. Начинали электрофорез при 90 В до вхождения проб в гель, после этого поднимали напряжение до 130-140 В. По окончании электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали в ультрафиолетовом свете.

Электроэлюция фрагментов ДНК из геля

Фрагменты ДНК элюировали из однопроцентных агарозных или пятипроцентных полиакриламидных гелей. После завершения электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали в ультрафиолетовом свете, далее вырезали нужный фрагмент геля и помещали его в диализный мешок с 50-80 мкл однократного ТВЕ. Затем осуществляли электроэлюцию в форезной камере при 100 В в ТВЕ в течение 20 минут. Перемещение ДНК из геля в раствор контролировали в ультрафиолетовом свете.

К элюату ДНК добавляли раствор NaCl до 0.14 М, обрабатывали смесью фенол-хлороформ 1:1, перемешивали и центрифугировали 5 мин на скорости 13200 об/мин при комнатной температуре. Водную фазу осаждали 3 объемами этанола, центрифугировали 10 мин на скорости 13200 об/мин при комнатной температуре, осадок промывали соленым спиртом, высушивали и растворяли в 20 мкл ТЕ или воды.

Создание генетических конструкций, кодирующих МВР и его варианты

Фрагменты ДНК, кодирующие полноразмерный МВР или другие использованные в работе белки, были наработаны методом ПЦР с использованием перекрывающихся специфических олигонуклеотидов. Полученные ПЦР-продукты были обработаны эндонуклеазами рестрикции *NcoI/XhoI* или *KpnI/XhoI*, очищены с помощью электроэлюции, а затем клонированы в вектор pET22N либо pBudCE.EF, обработанные рестриктазами *NcoI/XhoI* или *KpnI/XhoI*, соответственно. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* штамма XL2Blue. Первичный отбор клонов на наличие вставки нужного размера проводили методом ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидов T7rev и T7for или EFfor и Bghrev, комплементарных последовательности плазмидной ДНК. Отобранные положительные клоны проверяли с помощью рестрикции по соответствующим сайтам. Плазмиду, содержащую фрагмент нужного размера, выделяли и далее определяли ее нуклеотидную последовательность.

Создание генетических конструкций для экспрессии рекомбинантных одноцепочечных антител

На базе вектора pET22-N (Invitrogen) была создана конструкция с тегом 3Flag (вставку проводили по сайтам *XhoI/SalI*), получившая название pET22N/Flag. Далее ПЦР-продукты, соответствующие вариabельным фрагментам отобранных одноцепочечных антител, были переклонированы в вектор pET22N/Flag по сайтам рестрикции *NcoI/NotI*.

Создание генетических конструкций для экспрессии рекомбинантных полноразмерных антител

Экспрессионный вектор для тяжелой цепи был получен на основе вектора pBudCE4.1 (Invitrogen) путем удаления последовательности EF промотора, используя рестрикцию по сайтам *NheI/XhoI* и дальнейшее лигирование по невыступающим концам (вектор pBudCE4.1/CMV). Нуклеотидная последовательность, кодирующая лидерный пептид тяжелой цепи IgG (MERHWIFLSLLSVIAGVHS), была интегрирована в вектор pBudCE4.1/CMV по сайтам рестрикции *HindIII/PstI* (вектор pBudCE4.1/CMV/LeadH). Далее два фрагмента ДНК, соответствующие константному региону C γ 1 человека были амплифицированы с помощью ПЦР

с четырех специфических праймеров, используя геномную ДНК человека в качестве матрицы. Полученные фрагменты были последовательно вставлены в вектор pBudCE4.1/CMV/LeadH. Последовательности переменных фрагментов тяжелых цепей отобранных антител амплифицировали с векторов pET22N/Flag/scFv, где scFv соответствует определенному отобранному одноцепочечному антителу, и далее переставляли в экспрессионный вектор pBudCE4.1/CMV/LeadH/γ по сайтам рестрикции *Acc65I*(*Bsp1407I*) и *XhoI*.

Экспрессионный вектор для легкой цепи (pBudCE 4.1/EF/LeadL/λ-2) был получен на основе вектора pBudCE4.1 (Invitrogen) путем удаления последовательности CMV промотера, используя рестрикцию по сайтам *SpeI/XbaI* и дальнейшее лигирование невыступающих концов (вектор pBudCE4.1/EF). Нуклеотидная последовательность, кодирующая лидерный пептид легкой цепи Ig (MVSTPQFLVFLLEFWIPASRG), была интегрирована в вектор pBudCE4.1/EF по сайтам рестрикции *NotI/KpnI* (вектор pBudCE4.1/EF/LeadL). ДНК линкер с фланкирующими сайтами рестрикции, соответствующими части лидера легкой цепи и началу J-фрагмента, был получен из четырех перекрывающихся олигонуклеотидов. Полученный продукт был интегрирован в pBudCE4.1/EF/LeadL по сайтам рестрикции *BglIII/XbaI* (получен вектор pBudCE4.1/EF/LeadL/Linker). Далее два фрагмента ДНК, соответствующие константному региону Cλ-2 человека, были амплифицированы с помощью ПЦР с четырех специфических праймеров, используя геномную ДНК человека в качестве матрицы. Полученные фрагменты были последовательно интегрированы в вектор pBudCE4.1/EF/LeadL/Linker. Последовательности переменных фрагментов легких цепей отобранных антител амплифицировали с векторов pET22N/Flag/scFv, где scFv соответствует определенному отобранному одноцепочечному антителу, и далее переставляли в экспрессионный вектор pBudCE4.1/EF/LeadL/λ-2 по сайтам рестрикции *XbaI/HindIII*.

3.9 Хроматографическое разделение белков и их комплексов

Выделение протеасомы из клеток млекопитающих

Клетки осаждали из ростовой среды центрифугированием на 800 g. Суспензию клеток перерастворяли в равном объеме буфера А, гомогенизировали в стеклянной ступке, три раза проводили цикл замораживания и размораживания в жидком азоте. Центрифугировали от дебриса на 1500 g при +4°C в течение 30 минут, затем надосадочную жидкость отделяли и центрифугировали на 13200 g при +4°C в течение 30 минут. Полученную надосадочную жидкость осаждали с помощью $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в концентрации 40% от насыщения в течение одного часа при +4°C. Центрифугировали на 13200 g при +4°C в течение 30 минут, осадок отделяли. При добавлении к полученной надосадочной жидкости $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до концентрации 70% от

насыщения в осадок выпадала фракция, содержащая 20S протеасому. Осадок, полученный высаливанием 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, перерастворяли в буфере Б, полученный раствор центрифугировали на 13200 g при $+4^\circ\text{C}$ в течение 10 минут. Полученный таким образом раствор наносили на колонку Superose 6, уравновешенную буфером Б, и проводили элюцию буфером Б на скорости 0.3 мл/мин. Собранные фракции анализировали на присутствие протеасомы, измеряя скорость гидролиза модельного пептидного субстрата Suc-LLVY-MCA.

Фракции, содержащие протеасому, диализовали против буфера Е, содержащего 0.275 M NaCl. Полученный раствор наносили на колонку MonoQ, уравновешенную буфером Е, содержащего 0.275 M NaCl, и промывали 10 объемами данного буфера, затем проводили элюцию градиентом NaCl 0.275 – 1 M в 20-25 объемах колонки. Собранные фракции анализировали на присутствие протеасомы, измеряя скорость гидролиза Suc-LLVY-MCA. Фракции, содержащие протеасому, переводили в буфер для хранения (буфер Г, содержащий 10% глицерина) с помощью диализа.

Получение и очистка МВР и его производных

Для проведения препаративной экспрессии компетентные клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) трансформировали методом электропорации конструкцией, содержащей нуклеотидную последовательность необходимого рекомбинантного белка в составе вектора рЕТ-32b(+). Культуру клеток выращивали в течение 1.5 часов при 37°C до оптической плотности 0.6, с последующей индукцией добавлением 1 mM IPTG 3 часа при 37°C . Поскольку рекомбинантные белки содержали $(\text{His})_6$ кластеры, их выделение из клеточного лизата проводили с применением металл-хелатной хроматографии. Дальнейшую очистку осуществляли гель-проникающей хроматографией на колонке Superdex75. Гомогенность полученных препаратов контролировали электрофоретически с последующим окрашиванием Кумасси или иммуноблоттингом.

Для препаративной экспрессии в тельцах включения культуру клеток выращивали в течение 1.5 часов при 37°C до оптической плотности 0.6, с последующей индукцией 1 mM IPTG 1.5 часа при 42°C . Через полчаса после индукции к клеткам добавляли антибиотик рифампицин до концентрации 200 мкг/мл для ингибирования прокариотических РНК-полимераз и тем самым для увеличения экспрессии белка. Практически весь экспрессированный белок содержался в нерастворимой форме в тельцах включения.

Дополнительно нами была оптимизирована схема очистки рекомбинантного основного белка миелина и его делеционных мутантов. На первой стадии нами была использована металл-хелатная хроматография клеточных лизатов на колонке Ni-NTA в денатурирующих условиях. Далее все белки экстрагировали из элюата смесью хлороформ-метанола (1:3), после этого

осаждали насыщенным сульфатом аммония и переосаждали ацетоном в присутствии соляной кислоты. Дальнейшую очистку проводили с использованием обращенно-фазовой хроматографии на колонке C₄. Гомогенность полученных препаратов контролировали электрофоретически с последующим окрашиванием Кумасси и методом иммуноблоттинга. Чистота белка составляла более 95%.

Выделение и очистка полноразмерных антител

Выделение поликлональных и рекомбинантных моноклональных антител человека класса G проводили с применением следующей методики. Глобулиновую фракцию изначально получали трехкратным высаливанием 50% сульфатом аммония или методом ультрафильтрации на приборе Pellicon (Millipore). Дальнейшую очистку IgG осуществляли на аффинной колонке HiTrap Protein-G Sepharose (GE Healthcare) в буфере, содержащем 20 mM трис-HCl, 50 mM NaCl pH 7.6. Колонку промывали до прекращения дрейфа базовой линии, но не менее чем 100 объемами буфера нанесения. Антитела элюировали 100 mM раствором глицин-HCl pH 2.5 и немедленно нейтрализовали 2 M раствором трис основания до pH 7.6. Все растворы для хроматографической очистки перед использованием стерилизовали автоклавированием. Непосредственно перед использованием колонку очищали 15 объемами 100 mM раствора глицина-HCl pH 2.5 и 2 M LiCl. На заключительном этапе проводили гель-фильтрацию на колонке Superdex 200 в буфере PBS на скорости 0.8 мл/мин. Отсутствие видимых белковых примесей в очищенных препаратах антител контролировали электрофоретически с последующим окрашиванием Кумасси синим.

Очистка рекомбинантных одноцепочечных антител (scFv)

Ночную культуру клеток, трансформированных необходимой генетической конструкцией, высевали в среду 2xYT в разведении 1:100, подращивали до достижения оптической плотности $A_{600}=0.6$ единиц на 37 °C (1 ч. 40 мин. - 2 ч.). Экспрессию рекомбинантных белков индуцировали добавлением IPTG до 0.1 mM. Растили культуру при +30°C в течении 6 часов. Клетки из 250 мл среды осаждали центрифугированием в течение 5 минут на скорости 5000 об/мин при 4°C. Осадок перерастворяли в примерно в 1/20 исходного объема (12-15 мл) буфера, содержащего 20 mM Трис-HCl pH 8.0. Добавляли 1/50 объема свежеприготовленного раствора лизоцима до концентрации 0.2 мг/мл и держали на льду 25-30 мин. Затем добавляли 1/100 объема 10% раствора Triton X100 и инкубировали, помешивая, 10 минут при 37°C. Добавляли раствор ДНКазы I до концентрации 5 мкг/мл и MgCl₂ до 8 mM и далее инкубировали около 10 минут при 37°C до полного исчезновения вязкости. Центрифугировали на скорости 10000 об/мин 10-20 минут при 4°C. Надосадочную жидкость наносили на предварительно

уравновешенный буфером металл-хелатный сорбент Talon Superflow (BD, США) на скорости 0.5 мл/мин. Затем колонку промывали 100 объемами раствора, содержащего 50 мМ фосфата натрия, 300 мМ NaCl, pH 7.0. Элюцию рекомбинантного белка проводили 150 мМ раствором имидазола в 50 мМ фосфатном буфере pH 8.0 на скорости 0.5 мл/мин. Образец после металл-хелатной хроматографии диализовали против буферного раствора 10 мМ Tris-HCl pH 8.0. Дальнейшую очистку проводили на аффинной смоле a-Flag agarose с элюцией белков раствором глицина-HCl pH 2.5. Скорость потока составляла 0.8 мл/мин. На заключительном этапе белки очищали гель-проникающей хроматографией на колонке Superdex 75 (GE Healthcare) в буфере PBS на скорости 0.8 мл/мин.

Выделение и очистка рекомбинантных белков, слитных с тиоредоксином

Ночную культуру клеток, трансформированных необходимой генетической конструкцией, высевали в среду 2xYT в разведении 1:100, подращивали до достижения оптической плотности 0.6-0.8 единиц на 37°C в течение 2-3 часов. Индуцировали экспрессию рекомбинантных белков добавлением 1 мМ IPTG на 2.5-3 часа при 30°C. Клетки из 250 мл среды осаждали центрифугированием в течение 5 минут на скорости 5000 об/мин при 4°C. Осадок перерастворяли в примерно в 1/20 исходного объема (12-15 мл) буфера, содержащего 20 мМ Tris-HCl pH 8.0. Добавляли 1/50 объема свежеприготовленного раствора лизоцима до концентрации 0.2 мг/мл и держали на льду 25-30 мин. Затем добавляли 1/100 объема 10% раствора Triton X100 и инкубировали, помешивая, 10 минут при 37°C. Далее лизат на льду обрабатывали ультразвуком до исчезновения вязкости. Центрифугировали на скорости 10000 об/мин 10-20 минут при 4°C. Надосадочную жидкость отбирали в чистую пробирку, добавляли равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и оставляли на 12-14 часов при 4°C. Далее суспензию осаждали на скорости 10000 об/мин 15 минут при 4°C, растворяли в 12-15 мл хроматографического буфера, содержащем 50 мМ фосфата натрия, 300 мМ NaCl pH 8.0 и еще раз центрифугировали 15 минут на скорости 10000 об/мин. Полученный раствор наносили на предварительно уравновешенный буфером металл-хелатный сорбент Talon Superflow (BD, США) на скорости 1 мл/мин. Затем колонку промывали 100-120 объемами раствора, содержащего 50 мМ фосфата натрия, 300 мМ NaCl pH 7.0. Элюцию рекомбинантного белка проводили 50 мМ раствором ЭДТА на скорости 0.5 мл/мин. На заключительном этапе белки очищали с использованием гель-фильтрации на колонке Superdex 75 (GE Healthcare) в растворе гидрокарбоната аммония на скорости 0.8 мл/мин. Полученный раствор белка разносили на аликвоты и далее лиофилизовали. Рекомбинантный внеклеточный домен MOG получали согласно [61]. Остальные белки, экспрессированные в клетках штамма BL21(DE3), выделяли как

тельца включения, согласно [255]. Тельца солюбилизировали 8 М раствором мочевины и далее проводили металл-хелатную хроматографию. Фракции очищенных белков диализовали против воды или PBS.

Выделение белков, содержащих Fc домен антитела человека класса G

Выделение иммунотоксинов, содержащих Fc домен человеческого антитела класса G, проводили по следующей схеме. Первоначально отбирали культуральную среду от клеток СНО, трансфицированных плазмидами, содержащими нуклеотидные последовательности константных доменов антитела, слитных с последовательностью пептидов. Отобранную фракцию центрифугировали 10 минут на 13000 об/мин. Далее полученный раствор наносили на аффинную хроматографическую колонку с иммобилизованным белком G (HiTrap Protein-G Sepharose (Amresham, США)) в буфере PBS на скорости 0.5 мл/мин. Затем колонку промывали 80-100 объемами PBS на скорости 2.5 мл/мин для отделения неспецифически сорбированных белков. Фракцию иммунотоксинов элюировали с колонки 100 мМ раствором глицин-HCl pH 2.5 и незамедлительно нейтрализовали 2 М раствором трис-основания до pH 7.5. Все хроматографические стадии выделения проводились на приборах для скоростной и высокоэффективной жидкостной хроматографии (FPLC, HPLC) фирм Gilson, Waters (Millipore), а также системе DuoFlow BioRad. Верификацию препаратов белков Fc-linker, Fc-linker-c-мус, pFm, pFm-7, pFm-11 и оценку их чистоты проводили с помощью метода денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием серебром и иммуноферментным анализом.

Выделение и очистка рекомбинантных иммунотоксинов, слитных с c-мус пептидом

Ночную культуру клеток, трансформированных необходимой генетической конструкцией, высевали в среду 2xYT в разведении 1:100, подращивали до достижения оптической плотности 0.6-0.8 единиц при 37°C в течение 2-3 часов. Индуцировали экспрессию рекомбинантных белков добавлением 1 мМ IPTG в течение 2.5-3 часов при 37°C. Клетки из 250 мл среды осаждали центрифугированием в течении 5 минут на скорости 5000 об/мин при 4°C. Осадок перерастворяли примерно в 1/20 исходного объема (12-15 мл) буфером 20 мМ Трис-HCl, pH 8.0. Добавляли к суспензии коктейль ингибиторов протеаз (до 1 мМ) и 1/50 объема свежеприготовленного раствора лизоцима до концентрации 0.2 мг/мл, затем держали на льду 25-30 мин. К раствору добавляли 1/100 объема 10% раствора Triton X-100, инкубировали, помешивая, 10 минут при 37°C. Далее лизат на льду обрабатывали ультразвуком до исчезновения вязкости. Центрифугировали на скорости 10000 об/мин в течение 10-20 минут при 4°C. Раствор отбирали в чистую пробирку, добавляли равный объем насыщенного раствора сульфата аммония

и оставляли на 12-14 часов при 4°C. Далее суспензию осаждали на скорости 15000 об/мин в течение 15 минут при +4°C, растворяли в 12-15 мл хроматографического буфера, содержащего 50 мМ фосфата натрия, 300 мМ NaCl, pH 8.0 и еще раз центрифугировали 15 минут на скорости 18000 об/мин. Далее раствор наносили на предварительно уравновешенный буфером металл-хелатный сорбент Talon Superflow (BD, США) на скорости 0.5 мл/мин. Затем колонку промывали 100-120 объемами раствора, содержащего 50 мМ фосфата натрия, 300 мМ NaCl pH 7.0. Элюцию рекомбинантного белка проводили 50 мМ раствором ЭДТА на скорости 0.5 мл/мин. Образец после металл-хелатной хроматографии разбавляли буфером, содержащем 50 мМ ацетата натрия, pH 5.0. Дальнейшую очистку проводили на гель-фильтрационной колонке Superdex75 (Amersham, США) в буфере PBS на скорости 0.5 мл/мин.

Обращенно-фазовая хроматография

Обращенно-фазовую хроматографию проводили с использованием аналитической колонки C₄ 4.0/150 (Dr. Maisch GmbH, Германия) и препаративной колонки C₄ 10/250 (Mashery-Nagel, Германия) на HPLC-хроматографе Waters 1525 (Millipore, США) в градиенте ацетонитрила 0-40% или 0-80% в 15 объемах колонки. Во всех растворах присутствовала 0.1% трифторуксусная кислота в качестве ион-парного агента.

3.10 Метод поверхностного плазмонного резонанса

Измерения на приборе Biacore T200 optical biosensor (GE Healthcare) проводили в Научно-образовательном центре нанотехнологий РАН Санкт-Петербургского академического университета с любезного разрешения академика РАН М.В. Дубины. Все процедуры выполнялись при 25°C с использованием стандартных чипов для иммобилизации CM5 sensor chips и фирменного буфера HBS (pH 7.4, 0.01 М HEPES, 0.15 М NaCl, 0.05% сурфактанта P-20). Лиганды иммобилизовали на чипе до достижения относительного сигнала иммобилизации ~3500 RU с использованием NHS-EDC кита, следуя рекомендациям производителя. Аналиты добавляли в диапазоне концентраций от 1 нМ до 100 мкМ. Поверхность чипов регенерировали между различными аналитами промывкой 10 мМ глициновым буфером с pH 2.5. Полученные сенсограммы анализировали для определения динамических констант (K_D , k_a , k_d), применяя кинетическую модель связывания Langmuir 1:1 (одна молекула аналита взаимодействует с одной молекулой лиганда).

3.11 Методики изучения убиквитин-протеасомной системы

Получение очищенного препарата протеасомы

За основу была взята методика выделения протеасомы, описанная в [256]. Головной мозг мышей промывали буфером А, нарезали на небольшие куски, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в трех объемах ледяного буфера А и три раза проводили цикл замораживания-размораживания в жидком азоте. Центрифугировали от дебриса на 1500 g при 4°C в течение 30 минут, затем надосадочную жидкость отделяли и центрифугировали на 13200 g при 4°C в течение 30 минут. Далее осуществляли процедуру очистки протеасомы, описанную в п. 3.9. Если активность выделенной протеасомы по модельному субстрату была недостаточной, то проводили концентрирование на микроколонках Microcon до концентрации 40 мкг/мл (около 16 нМ). Концентрацию протеасомы определяли по методу Брэдфорда.

Фракционирование протеасомы ультрацентрифугированием

Гомогенат головного мозга мыши в буфере А центрифугировали от дебриса на 1500 g при 4°C в течение 30 минут, затем надосадочную жидкость отделяли и центрифугировали на 16000 g при 4°C в течение 30 минут. Далее наносили 0.8 мл полученной смеси на градиент глицерина 10-55% в 24 мл в буфере 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT и 4 mM АТФ. Центрифугировали на 125000 g при 6°C в течение 16 часов. Далее отбирали фракции по 1 мл и определяли в них присутствие протеасомы по активности расщепления флуорогенного субстрата Suc-LLVY-AMC в присутствии 0.02% SDS (активация 20S протеасомы и ингибирование 26S протеасомы) и в отсутствии 0.02% SDS (активация 26S протеасомы и ингибирование 20S протеасомы)

Убиквитинилирование белков *in vitro*

Для убиквитинилирования *in vitro* использовали набор Ubiquitin Conjugation kit (Enzo Life Sciences, США) на основе S100-экстракта из клеток линии HeLa или цитоплазматический S100-экстракт, полученный из клеток линии HeLa или головного мозга мышей линии BALB/c по методике [257]. Реакционная смесь (12.5 мкл) содержала 20 mM Tris (pH 7.5), 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, S100-экстракт (60 мкг), убиквитин или метилированный убиквитин (5.0 мкг), АТФ (1.0 mM), систему регенерации АТФ (фосфокреатин 10 mM и креатинфосфокиназа 4 ME/мл), в некоторых случаях добавляли UbA1 (0.5 мкг), MG132 (200 мкМ), PS-341 (1.0 мкМ), очищенную 26S протеасому (0.25 мкг). Смесь инкубировали при 37°C и реакцию останавливали добавлением буфера нанесения для электрофореза по Лэммли.

Протеолиз белков протеасомой *in vitro*

Гидролиз белков (1-3 мкг) протеасомой осуществляли в объеме реакции 12.5 мкл в реакционной смеси, содержащей 20 мМ Tris (pH 7.5), 1 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, и очищенную 26S протеасому (0.25 мкг). Реакционную смесь инкубировали при 37°C, реакцию останавливали добавлением буфера для нанесения образцов для электрофореза по Лэммли. Образцы анализировали методом электрофореза по Лэммли с последующим окрашиванием красителем Кумасси R-250. Гидролиз МВР протеолитическими ферментами производили, инкубируя их с 2 мкг МВР в молярном соотношении [фермент]:[субстрат] = 1:100 в объеме реакции 20 мкл в течение 3 часов при 37°C в реакционном буфере 50 мМ Tris (pH 7.5), 5 мМ CaCl₂. Олигопептиды отделяли от компонентов с высокой молекулярной массой на микроколонках Microcon YM-10000 (Merck Millipore, США) и далее анализировали масс-спектрометрически.

Анализ активности протеасомы

Очищенный препарат 26S протеасомы выделяли из клеток линии EL4 или НЕК293Т по методике, описанной в [8]. К протеасоме (10 мкг/мл в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитола и 1 мМ АТФ) добавляли ингибиторы в указанных концентрациях и инкубировали 30 минут при 37°C. После этого в реакционную смесь добавляли пептидный субстрат Suc-LLVY-4-амино-7-метилкумарин и измеряли скорость его гидролиза по увеличению флуоресценции (поглощение 360 нм, эмиссия 430 нм).

Определение кинетических параметров ингибирования протеасомы

Для изучения ингибирования протеасомы из головного мозга мыши использовали следующие концентрации ингибиторов: PS-341 0.1-1000 нМ, MG132 0.1-1000 нМ, β1i-специфический пептидилэпоксикетон 2-100 мкМ. Кинетические параметры обратимого ингибирования измеряли с использованием пептидного субстрата Suc-LLVY-MCA, при гидролизе образующего флуоресцентный продукт – 7-амино-4-метилкумарин. Измерение интенсивности флуоресценции проводили при длине волны поглощения 360 нм и длине волны испускания 465 нм при 37°C на приборе Tecan Genios (Tecan, Швейцария). Препарат протеасомы смешивали с растворами ингибитора и субстрата в буфере Г, инкубировали 20 мин при 37°C, после чего измеряли интенсивность флуоресценции каждые 30 секунд в течение 45 минут. По увеличению флуоресценции определяли скорость реакции гидролиза для всех комбинаций из 3 концентраций субстрата и 6 концентраций ингибитора. Результаты измерений обрабатывали в программе Sigma Plot 11.0 с модулем Enzyme Kinetics 1.3. Кинетические параметры необратимого ингибирования β1i-специфическим пептидилэпоксикетоном определяли с

использованием набора для определения химотрипсин-подобной активности протеасомы Proteasome-Glo Chymotrypsine-Like bioluminescent assay system (Promega, США) на спектрофлуориметре Varioskan Flash (Thermo Scientific) в черной 384-луночной плашке при 37°C. Реагенты для измерения протеолитической активности протеасомы готовили в соответствии с инструкцией производителя, финальная концентрация пептидного субстрата Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-aminoluciferin составляла 20 мкМ, концентрация протеасомы 0.1 нМ. Измерение люминесценции начинали сразу же после добавления ингибитора. Значения $k_{obs}/[I]$ были получены с использованием программы SigmaPlot 11.0 аппроксимацией экспериментальных данных нелинейным методом наименьших квадратов к уравнению 2

$$(2) \quad L_t = L_s + (L_0 - L_s) \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t)$$

где L_0 - начальная интенсивность люминесценции, с течением времени приближающаяся к конечной интенсивности люминесценции L_s , с константой скорости k_{obs} . Для определения $k_{obs}/[I]$ реакцию проводили с 5 различными концентрациями ингибитора 3 раза с каждой концентрацией.

3.12 Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА) в планшетном формате проводили по классической схеме sandwich ELISA. В 96-луночные планшеты (MaxiSorp-Nunc) на лунку вносили по 50 мкл раствора, содержащего 0.25 мкг исследуемого субстрата в карбонатном буфере pH 9.6, и инкубировали 14 часов при 4°C. Лунки 3 раза промывали раствором PBS-0.15% Tween 20, блокировали 1 час раствором 2% БСА в карбонатном буфере при 37°C. Далее блокирующий раствор удаляли, лунки 3 раза промывали раствором PBS - 0.15% Tween 20. Вносили разведения изучаемых белков и контрольных образцов в диапазоне от 1 до 0.0005 мкг в 50 мкл раствора PBS, содержащего 0.1% Tween-20 и 0.5% БСА. Планшеты инкубировали 1 час при 37°C, после чего снова трижды промывали. Затем добавляли по 50 мкл конъюгата специфических антител в разведении 1:4000 в конъюгатном буфере. Инкубировали час при 37°C и далее промывали пять раз. Процедуру повторяли, используя соответствующие антивидовые антитела. Окрашивание проводили, добавляя во все лунки по 50 мкл раствора ТМВ, и оставляли на 2-5 мин в темноте. Реакцию останавливали 10% фосфорной кислотой и измеряли абсорбцию при длине волны 450 нм на планшетном спектрофотометре (Tecan, Genios, Австрия).

Иммунопреципитация антителами к FLAG эпитопу

Иммунопреципитацию осуществляли с помощью ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich, США). Все процедуры проводили в соответствии с инструкциями производителя. Смолу ANTI-FLAG M2 Affinity Gel брали из расчета 40 мкл на пробу и промывали один раз RIPA буфером. Затем, от исследуемых клеток отбирали среду, промывали их PBS, после чего добавляли 1 мл RIPA буфера и инкубировали на льду в течение 20 минут. Далее клеточные лизаты переносили в другие пробирки и 200 мкл смеси отбирали в отдельную пробирку (input), к остальной части смеси добавляли промытую смолу и перемешивали на шейкере при 4°C в течении 1 часа. После этого смолу 3 раза промывали RIPA буфером. Элюировали добавлением 100 мкл однократного буфера для нанесения образцов для электрофореза по Леммли. Элюат прогревали при 95°C и наносили на полиакриламидный гель по 25 мкл. К исходной смеси (input) добавляли 50 мкл четырехкратного буфера для нанесения и наносили по 35 мкл. Далее проводили иммуноблоттинг по методике, описанной ниже.

Иммунопреципитация протеасомы

Образцы 26S протеасомы (50 мкг/мл) обрабатывали PS-341 (15 мкМ) в течение 10 минут, затем инкубировали с MBP (1 мг/мл) в течение 30 минут при +4°C, затем в смесь добавляли антитело анти-Rpn10 (H00005710-B01P, Abnova, Тайвань) или анти-MBP (ab7349, Abcam, Великобритания) и инкубировали еще 45 минут при +4°C. Затем добавляли смолу Protein A Sepharose (Pharmacia Biotech, Швеция), перемешивали на шейкере 45 минут при 4°C, промывали PBS и элюировали преципитированные белки буфером глицин-HCl 0.1 М глицин, pH 3.0.

Иммуноблоттинг

Проводили гель-электрофорез белков в денатурирующих условиях по Лэммли с использованием предокрашенного маркера (Fermentas, Литва). Отделяли разделяющий гель и проводили перенос на мембрану HyBond C extra (Amersham, США) на приборе для полусухого электропереноса Bio-Rad Trans-blot Turbo (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя. Для этого вырезали мембрану, 3 листа бумаги Whatman 3MM размером с гель и 3 листа ватмана на 1 см больше с каждого края, смачивали все листы буфере для переноса. Помещали на нижний электрод установки для переноса стопку бумаги Whatman 3MM (листы большего размера), сверху мембрану, затем гель, стопку бумаги Whatman 3MM, накрывали верхним электродом и проводили электроперенос в течение 1 часа при силе тока 0.8 мА/см². По окончании процесса мембрану помещали в блокирующий раствор, содержащий 5% BSA в TBS или обезжиренного сухого молока в воде, на качающуюся платформу. Инкубацию вели 1 час при комнатной

температуре или 12-24 часа при 4°C. Далее мембрану отмывали 3 раза по 5 минут в TBS, содержащем 0.05% Tween 20. Гибридизацию с первичными антителами проводили в течение часа в конъюгатном буфере, после чего опять трижды отмывали. Затем мембрану час инкубировали со вторичными антивидовыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в том же буфере и отмывали 5 раз по 5 минут. Проявление мембраны проводили с помощью кита ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham, США). Денситометрический анализ результатов вестерн-блоттинга, а также электрофореза по Лэммли, проводили с помощью программы Quantity One.

3.13 Иммуногистохимия

Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга мышей линии SJL

Эксперименты проводили в сотрудничестве с Ю.В. Люпиной и Я.Д. Карповой в лаборатории биохимии процессов онтогенеза под руководством Н.П. Шаровой в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН). Животных перфузировали через сердце сначала 0.02 М PBS до вымывания крови из сосудов, а затем 4% раствором параформальдегида на основе 0.02 М PBS в течение 15 минут при 4°C. Далее у животных изолировали головной мозг и проводили дофиксацию иммерсией (погружением в раствор) в том же фиксаторе 2-4 часа при комнатной температуре. Затем головной мозг помещали в 25% раствор сахарозы для криопротекции при +4°C. После этого замораживали в изопентане при температуре -45°C и хранили при -20°C не более месяца. Криостатные срезы мозга толщиной 12 мкм монтировали на стекла, на которых далее проводили двойное иммуногистохимическое окрашивание. Криостатные срезы последовательно инкубировали в 0.5% тритоне X-100 с 5% BSA в PBS в течение 40 мин при 20°C и далее в первичных антителах в PBS с 0.2% тритоном X-100 и 5% BSA в течение 18 часов при комнатной температуре. Отмывали три раза по 5 минут и обрабатывали вторичными антителами в PBS в течение 2 часов при 20°C. Затем срезы тщательно отмывали, заключали в Mowiol и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM RXA2 (Германия) или конфокального микроскопа Leica TCS SP (Германия). Специфичность вторичных антител подтверждали с помощью контролей, при которых окрашивание проводили в отсутствие первичных антител. Возможность перекрестной реакции между первичными и вторичными антителами была исключена путем дополнительных контролей специфичности антител, при которых проводили инкубацию каждого из первичных антител со вторичными антителами, выработанными к другому животному – то есть моноклональные антитела мыши инкубировали со вторичными антителами против иммуноглобулинов кролика, и наоборот. Отсутствие флуоресценции на срезах свидетельствовало о специфичности реакции.

Гистологический и анализ и иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга крыс линии DA

Изолировали спинной мозг здоровых крыс и животных с индуцированным ЕАЕ, далее его фиксировали, дегидратировали и заключали в парафин. Для определения степени глиозиса и демиелинизации гистологические срезы окрашивали с помощью красителей гематоксилин-эозин и luxol fast blue, соответственно. Степень глиозиса определяли в соответствии со следующей шкалой: 0 (нет глиозиса), 1 (легкий глиозис, 5-10 клеток/поле), 2 (средний глиозис, 10-50 клеток/поле), 3 (сильный глиозис, более 50 клеток/поле). Степень демиелинизации измеряли от 0 (нет повреждений), до 3 (сильная демиелинизация). Иммуногистохимическое окрашивание цитокинов производили с помощью антител, специфичных к IL-2 (sc-7896, Santa Cruz Biotechnology, США), IFN γ (ab-9657, Abcam, Великобритания) и BDNF (ab-72439, Abcam, Великобритания).

Иммуноцитохимическое окрашивание первичных культур олигодендроцитов

Для иммуноцитохимического окрашивания олигодендроциты культивировали на круглых покровных стеклах диаметром 12 мм, покрытых поли-L-лизин. Для окрашивания стекла с прикрепленными олигодендроцитами промывали PBS и фиксировали раствором 4% параформальдегида в PBS в течение 20 минут при комнатной температуре. Пермеабелизовали 1 час при комнатной температуре раствором PBS, содержащем 5% BSA и 0.2% Triton X-100. Далее блокировали 30 минут при комнатной температуре 50% лошадиной сывороткой в PBS. Окрашивание первичными антителами проводили в реакционном буфере на основе PBS, содержащем 1 mM CaCl₂, 1% BSA, 0.1% Triton X-100 в течение 1 ч при комнатной температуре или 16-20 ч при 4°C. Вторичными антивидовыми антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями, окрашивали в том же буфере 30-60 минут при комнатной температуре, затем добавляли 1 мкг/мл красителя Hoechst 33342 на 3 мин. Промывали PBS 5 раз и фиксировали на предметных стеклах с помощью реагента ProLong Gold Antifade Reagent (Life Technologies, США).

3.14 Методики электрофоретического разделения

Денатурирующий электрофорез полипептидов в полиакриламидном геле

Электрофорез проводили по стандартной методике Лэммли [258]. Готовили двухкомпонентный гель следующего состава: концентрирующий гель – 5% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% SDS, 0.125 М Трис-НCl pH 6.8; разделяющий гель – 10-15% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% SDS, 0.375 М Трис-НCl, pH 8.9.

Для полимеризации сначала добавляли N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин до концентрации 0.1%, а затем персульфат аммония до 0.1%. Образцы белковых препаратов смешивали с буфером нанесения в соотношении 1:1, прогревали 5 минут при 95°C, наносили на гель и вели электрофорез при напряжении 90 В до перемещения красителя в разделяющий гель, после чего выставляли силу тока 20 мА на 1 пластину геля и вели электрофорез до момента выхода краски из разделяющего геля. По окончании электрофореза отделяли разделяющий гель, который затем окрашивали Кумасси синим R-250.

Окрашивание ПААГ Кумасси синим R-250 с усилением контраста солью меди

Разделяющий гель 5 минут инкубировали в горячем растворе, содержащем 10% этанола и 10% уксусной кислоты. Далее его помещали на 10 минут в горячий раствор следующего состава: 15% этанола, 25% уксусной кислоты, 0.3 г/л красителя Кумасси синий R-250 и 0.45 г/л пентаводного сульфата меди. Затем гель многократно отмывали в горячем растворе, содержащем 10% этилового спирта и 10% уксусной кислоты, до полного исчезновения фонового окрашивания.

Электрофорез протеасомальных комплексов в неденатурирующих условиях

Анализ состава препаратов протеасомы с помощью нативного электрофореза проводили по методике, описанной в [259]. Состав форезного буфера совпадал с составом буфера для гелей. Использовали 4% разделяющий гель и 2.5% концентрирующий гель, соотношение акриламид:бис-акриламид составляло 37.5:1, для полимеризации к раствору добавляли 0.1% N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин и 0.1% персульфата аммония. В каждую лунку наносили 2-4 мкг протеасомы в буфере для хранения. Электрофорез вели при 100-150 В при температуре 4°C в течение 2 часов. После этого гели инкубировали в 10 мл 100 мкМ раствора Suc-LLVY-AMC в буфере Г и визуализировали на приборе Versa Doc imaging system (Bio-Rad, США). Нативный электрофорез основного белка миелина проводили при pH 4.5 в полиакриламидном геле на основе ацетатного буфера по методике, описанной в [260], с последующим окрашиванием гелей Кумасси R-250.

3.15 Анализ кроссреактивности антител с использованием технологии Lumindex

Все измерения производили на системе BioPlex MAGPIX (Bio-Rad). Антигены ковалентно иммобилизовали на магнитные микросферы Bio-Plex Pro Magnetic COOH Beads с использованием амин-сшивающего кита Bio-Rad amine coupling kit, следуя рекомендациям производителя. Исследуемые антитела инкубировали с антигенами, иммобилизованными на микросферах, в течение 1 часа при 20°C с постоянным деликатным помешиванием. Связавшиеся

антитела детектировали с помощью козьих антител к человеческим IgG (специфичные к γ -цепи), конъюгированных с R-фиикоэритрином (Sigma-Aldrich).

3.16 Модификация и функциональный анализ рекомбинантных белков

Тест РНКазной активности рекомбинантных белков барназа и барназа-с-тус

К 6 мкг тотальной дрожжевой РНК, растворенной в PBS, добавляли 50 нг рекомбинантных белков на основе РНКаз или панкреатической РНКазы А. Образцы инкубировали 1 час при 37°C. Затем в пробы вносили аликвоту этидиум бромид до конечной концентрации 5 мкг/мл. Полученные пробы разносили в 96 луночную плашку и измеряли флуоресценцию раствора при длине волны 615 нм, возбуждая светом длиной волны 340 нм, на планшетном сканере Varioscan Falsh (Thermo).

Связывание C1q компонента системы комплемента рекомбинантными белками Fc-linker и Fc-linker-с-тус

В лунки 96 луночной плашки разносили рекомбинантные белки Fc-linker, Fc-linker-с-тус, Fc домен антитела и полноразмерное антитело класса IgG в концентрации 10 мкг/мл в карбонатном буфере pH 9.5 и инкубировали ночь при 4°C. На следующий день лунки отмывали буфером PBS-0.5% Tween и блокировали раствором БСА в карбонатном буфере 1 час при 37°C. Затем лунки снова отмывали и далее добавляли очищенный по методике C1q компонент системы комплемента [261] в различных концентрациях. После 1 часа инкубации при 37°C лунки отмывали, а затем вносили антитела, специфичные к C1q, конъюгированные с пероксидазой хрена, и инкубировали 1 час при 37°C. После этого лунки отмывали и в них вносили по 50 мкл ТМБ, а затем реакцию останавливали внесением 50 мкл 15% фосфорной кислоты.

Получение конъюгата БСА-ФИТЦ-с-тус

Конъюгат БСА-ФИТЦ был синтезирован в соответствии с протоколом производителя ФИТЦ (Sigma, США). Далее к 3 мл раствора БСА-ФИТЦ с концентрацией 1.5 мг/мл в фосфатном буфере pH 7.4 прибавили 100 мкл MBS (3-Maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester, Sigma, США) с концентрацией 10 мг/мл в ДМСО. Инкубацию проводили в течение 40 минут при 20°C. Далее образец обессоливали на колонке Desalt (GE Healthcare, США) в фосфатном буфере pH 6.0. К конъюгату БСА-ФИТЦ-MBS добавляли 500 мкл раствора пептида с-тус (SEQKLISEEDL, синтезирован в ИБХ РАН) с концентрацией 10 мг/мл. После 3 часов инкубации при 20°C образцы диализом переводили в фосфатный буфер. Для подтверждения функциональной активности конъюгат БСА-ФИТЦ-с-тус инкубировали с 100 мкг анти-с-тус

антителами в течение 1 часа при 37°C. После инкубации образец разделяли методом геле-фильтрации на колонке Superdex 200 (GE Healthcare, США). Хроматографические фракции наносили на 12% ПААГ и далее визуализировали флуоресценцию ФИТЦ на приборе VersaDoc (BioRad), затем гель окрашивали Кумасси.

Получение конъюгата KLH-с-мус

600 мкл раствора белка KLH в фосфатном буфере pH 7.4 с концентрацией 6 мг/мл инкубировали 40 минут при 20°C с 50 мкл раствора MBS с концентрацией 10 мг/мл в ДМСО. Далее образец обессоливали на колонке Desalt (GE Healthcare, США) в фосфатном буфере pH 6.0. Конъюгат KLH-MBS далее добавляли к 300 мкл раствора пептида с-мус с концентрацией 10 мг/мл. После 3 часов инкубации при 20°C образцы диализом переводили в фосфатный буфер.

Выделение, ацелирование и деиминирование MBP

MBP выделяли из головного мозга коровы по методике, описанной в [198], методом химической экстракции с последующей обращенно-фазовой хроматографией на препаративной колонке C₄ 10/250 (Mashery-Nagel, Германия) на HPLC-хроматографе Waters 1525 (Millipore, США) в градиенте ацетонитрила 0-80% в 15 объемах колонки. Во всех растворах присутствовала 0.1% трифторуксусная кислота в качестве ион-парного агента. Чистоту полученного препарата MBP определяли электрофорезом в ПААГ по Лэммли. Для некоторых экспериментов очищенный MBP ацелировали уксусным ангидридом в различных молярных соотношениях по методике, описанной в [262]. MBP энзиматически деиминировали по методике, описанной в [263], инкубируя MBP с пептидиларгининдеиминазой (PAD) (Sigma Aldrich, США) при 52°C в буфере, содержащем 50 мМ HEPES, 5 мМ CaCl₂, 2 мМ DTT, pH 7.6. Реакцию останавливали кипячением в течение 5 минут. После ацелирования или деиминирования MBP очищали на аналитической колонке C₄ 4.0/150 (Dr. Maisch GmbH, Германия) на HPLC-хроматографе Waters 1525 (Millipore, США) в градиенте ацетонитрила 0-40% в 15 объемах колонки. Во всех растворах присутствовала 0.1% трифторуксусная кислота в качестве ион-парного агента.

In vitro транскрипция-трансляция

Белки rhMBP и p105 транслировали *in vitro* в присутствии L-[³⁵S]-метионина с использованием кита TnT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, USA) в соответствии с инструкциями производителя.

Получение и фракционирование лизата ретикулоцитов

Ретикулоциты получали из кроликов, далее лизаты подготавливали и фракционировали на DEAE целлюлозе на фракцию I и II, как описано в [200].

Убиквитинилирование MBP *in vitro*

Конъюгацию белков осуществляли в объеме 12.5 мкл. реакционная смесь содержала 20 mM Tris pH 7.5, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, а также следующие компоненты, если это было необходимо: фракция II (60 мкг), экстракт HeLa или BALB/c (60 мкг), убиквитин (5.0 мкг), E1 (0.25 мкг), рекомбинантный UbcH5c с 6xHis-эпитопом (0.75 мкг), ATP γ S (2.0 mM), ATP (1.0 mM), MG-132 (200 мкM), PS-341 (1.0 мкM) и очищенную протеасому (0.25 мкг). Смеси инкубировали при температуре 37°C, реакцию останавливали добавлением буфера для нанесения проб на ПААГ. Белки разделяли электрофоретически и визуализировали различными методами в зависимости от начальной концентрации субстрата: [³⁵S]-меченые белки (10,000 cpm) с помощью PhosphorImager (Fuji, Japan), 0.1 мкг белка с использованием иммуноблоттинга, и 1.5 мкг белка – окрашивание Кумасси.

Изучение подавления *in vitro* трансляции под влиянием иммунотоксинов

Тестирование энзиматической активности рекомбинантного псевдомонадного и шигаподобного токсина *in vitro* производили в лаборатории регуляции белкового синтеза НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова под руководством Дмитриева С.Е.. Трансляцию в системе S30 из клеток асцитной карциномы Кребс-2 проводили в конечном объеме 10 мкл, содержащем 5 мкл экстракта, трансляционный буфер (20 mM Hepes-KOH pH 7.6, 1 mM DTT, 0.5 mM спермидин-HCl, 0.6 mM Mg(CH₃COO)₂, 8 mM креатинфосфат, 1 mM ATP, 0.2 mM GTP, 90 mM KCH₃COO и по 25 мкM каждой из 20 аминокислот), 2 ед. ингибитора рибонуклеаз HPRI («Fermentas») и 0.25 пмоль мРНК. К экстракту с трансляционным буфером добавляли 1/5 часть растворов барназы, псевдомонадного и шигаподобного токсина в PBS. Инкубировали 5 минут при 30°C, затем добавляли раствор мРНК, кодирующей люциферазу светлячка. В реакционную смесь добавляли разведения барназы, шигаподобного или псевдомонадного токсина, инкубировали 2.5 часа и измеряли активность люциферазы Fluc с помощью набора DLA (Promega).

3.17 Пациенты с рассеянным склерозом

Замороженные образцы сыворотки крови и цельная кровь пациентов с достоверным диагнозом РС были любезно предоставлены Московским городским центром рассеянного

склероза при Городской клинической больнице №11 и Институтом неврологии РАН. Средний возраст больных составил 36.3 года (от 25 до 55 лет). В соответствии с расширенной шкалой инвалидизации EDSS тяжесть поражения ЦНС у данных пациентов варьировались от 0 до 6 (при градации от 0 до 10) [264]. Все пациенты имели ремитирующий или вторично-прогрессирующий тип течения с обострениями. Данные пациенты не получали кортикостероидные препараты в течении месяца, предшествовавшего забору крови. В соответствии с этическим комитетом лечебных учреждений и согласно указаниям Министерства Здравоохранения РФ от всех пациентов было получено подтверждающее информационное согласие после подробного разъяснения экспериментов лечащим врачом.

3.18 Химические реактивы, буферные растворы и сопутствующие материалы.

В работе использовали следующие реактивы и материалы: трис-гидроксиметиламинометан (трис), персульфат аммония, тетраборат натрия, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), одно- и двузамещенный фосфат натрия, хлорид натрия, ацетат натрия, хлорид магния, глицин, β-меркаптоэтанол, диметилсульфоксид (ДМСО), дитиотреитол (ДТТ), аденозин-5'-трифосфат (АТФ), креатинфосфат (Sigma Aldrich, США); акриламид, N',N'-метиленбисакриламид, додецилсульфат натрия (SDS), мочевины sequence grade, нитроцеллюлозную мембрану Hybond C extra (Amersham, США); nonidet P-40 (NP40) (Difco, Великобритания), ядерный краситель Hoechst 33342 (Life Technologies, США). Остальные реактивы отечественного производства марки "осч" (особо чистые), бактериальный агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco, Великобритания); металлохелатный сорбент Talon (BD, США); глицин, изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG) (Fermentas, Литва); раствор ТМВ (тетраметилбензидина) (США); полный адъювант Фрейнда (Sigma, США). Pertussis toxin (Calbiochem, США); Культуральные среды и их компоненты (Gibco, США); 3-Maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester (MBS, Sigma, США); ФИТЦ (Sigma, США); Панкреатический ингибитор РНКазы А (Fermentas, Литва); Туберкулин (BD Difco, США); бычий сывороточный альбумин (BSA), маркеры молекулярной массы белков (Fermentas, Литва), ростовые среды DMEM, Opti-MEM и advanced RPMI. Вода, содержащая изотоп кислорода с массовым числом 18, была произведена в Национальном исследовательском центре «Курчатовский институт».

Генетические конструкции, кодирующие убиквитин с HA и мус эпителиями, K0-убиквитин с HA и мус эпителиями, с-Мус с HA-эпитопом, были любезно предоставлены Dr. Kazuhiro Iwai (Высшая школа Медицины, Университет Осака, Осака, Япония). Генетические конструкции, кодирующие p105 с FLAG-эпитопом и Ubс6, были любезно предоставлены Dr. Aaron Ciechanover (Лаборатория метаболизма белка, Технион, Хайфа, Израиль). Генетическая конструкция,

кодирующая рекомбинантную орнитиндекарбоксилазу с FLAG-эпитопом, была любезно предоставлена Dr. Chaim Kahana (Вайзманн институт, Реховот, Израиль). Плазмидные вектора: pGEM5Z; pET22N; pET28a+; модифицированный вектор pBud.CE4 (Promega), содержащий CMV промотор; pFUSE (Invivogen, США).

Малые интерферирующие РНК к убиквитин-лигазе E1, субъединицам протеасомы, а также некодирующая siRNA были произведены Dharmacon RNAi, GE Healthcare, Великобритания. Малые интерферирующие РНК к субъединицам протеасомы были синтезированы в сотрудничестве с лабораторией профессора Е.Л. Черноловской.

Ферменты: термостабильная ДНК-зависимая ДНК-полимераза, щелочная фосфатаза, Rapid DNA Ligation kit (Fermentas, Литва), эндонуклеазы рестрикции и соответствующие стандартные буферные растворы (Fermentas, Литва); дезоксирибонуклеаза I (Biozyme Laboratories Ltd, США); трипсин, лизоцим (Merck, Германия); маркеры размера фрагментов ДНК и молекулярной массы: GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; GeneRuler™ 1 k DNA Ladder, Protein Molecular Weight Marker 14.4-116.0 кДа, Prestained Protein Molecular Weight Marker 19.0-118.0 кДа (Fermentas, Литва); низкомолекулярный маркер 2.5-16.9 кДа (Amresham, США); конъюгат Streptavidin-Pacific Blue (BD, США); креатинфосфокиназа из мышц кролика, трипсин из поджелудочной железы коровы, химотрипсин из поджелудочной железы коровы, рекомбинантная матриксная металлопротеаза 3 (MMP-3), рекомбинантная матриксная металлопротеаза 9 (MMP-9), кальпаин из плазмы крови человека, коллагеназа D из *Clostridium histolyticum* (Roche Life Science, Германия), ДНКазы из поджелудочной железы коровы (Sigma Aldrich, США).

Другие белки: ингибитор трипсина из соевых бобов (GERBU Biotechnik GmbH, Германия), бычий сывороточный альбумин, актин из мышц свиньи, лизоцим из куриного яйца, кальмодулин из мозга коровы (Sigma Aldrich, США), рекомбинантный убиквитин, рекомбинантный K-48 тетраубиквитин, рекомбинантный метилированный убиквитин (Boston Biochem, США), копаксон (глутирамера ацетат) (Teva, Израиль), Рекомбинантный гистон H1.3 любезно предоставлен П.В. Кругляковым (ЗАО «Фармсинтез»).

Ингибиторы и субстраты протеасомы: MG132 (карбоксибензоил-L-лейцил-L-лейцил-L-лейцинал) (Boston Biochem, США), ингибитор протеасомы PS-341 (PS-341) (LC laboratories, США), β5i-специфический пептидилэпоксикетон был синтезирован в группе синтеза природных соединений ИБХ РАН под руководством И.В. Ямпольского по методике, описанной в [128], субстрат N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Sigma Aldrich, США), наборы для определения трипсин-подобной, химотрипсин-подобной и каспазоподобной протеолитической активности протеасомы Proteasome-Glo kits (Promega, США).

Реактивы для получения клеточных культур и культивирования клеток: рекомбинантные IL-2 и IL-7 мыши, селенит натрия, апо-трансферрин, рекомбинантный цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), рекомбинантный инсулин, биотин, гидрокортизон, трийодтиронин (Т3), рекомбинантный интерферон-гамма мыши и человека (Sigma Aldrich, США). Ростовые среды DMEM, opti-MEM и advanced RPMI, фетальная бычья сыворотка (Gibco, США), раствор гентамицина (ПанЭко, Россия), раствор фикола Ficolл Paque Plus (GE Healthcare, Великобритания), набор для выделения CD8⁺ Т-клеток мыши Dynabeads Untouched Mouse CD8 Cells Kit (Life Technologies, США).

Антитела и конъюгаты: антитела к с-тус эпитопу, продуцируемые гибридомой С-МУС, антитело мыши к β-актину, антитело крысы к CD3 (Santa Cruz Biotechnology, США), антитела мыши к субъединицам протеасомы Rpt6, α, β5; антитела кролика к субъединицам протеасомы β1i, β5i, β1, Rpn13, антитела кролика к убиквитин-лигазе E1 и к полиубиквитиновым конъюгатам (Enzo life sciences, США), антитела мыши к маркеру олигодендроцитов O4, антитела козы к Fc-фрагменту IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела козы к IgM мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела козы к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела кролика к MBP, антитела мыши к FLAG-эпитопу, конъюгированные с пероксидазой хрена, (Sigma Aldrich, США), антитела осла к IgG кролика, IgG крысы, IgG мыши и IgM мыши, конъюгированные с флуоресцентными красителями (Alexa 405, Alexa 488, Alexa 594) (Life Technologies, США), антитела мыши к NeuN (Millipore, США), антитела крысы к MBP, антитела кролика к MBP, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела кролика к субъединице протеасомы Rpn10, антитела курицы к HA-тэгу, конъюгированные с пероксидазой хрена (Abcam, Великобритания). Антитела козы к Fc-фрагменту IgG мыши и человека, антитела козы к Fc-фрагменту IgG мыши и человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США); анти-B220-APC антитела (eBioscience, США); анти-IL-2 (sc-7896, Santa Cruz Biotechnology, США); анти-IFN γ (ab-9657, AbCam, Великобритания); анти-BDNF (ab-72439, AbCam, Великобритания).

Бактериальные штаммы *E. coli*: DH5 α - supE44, delta lacU169 (phi 80 lacZ delta M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 (Gibco, Великобритания); BL21(DE3) - F- *ompT hsdS_B* (r-m-) *gal dcm* (DE3) (Novagen, США).

Животные: мыши линии BALB/c, мыши линии SJL, мыши линии СЗН, мыши линии C57BL/6 (Питомник ФИБХ г.Пушино, Россия); мыши линии SJL, крысы линии DA (Harlan, Израиль).

Растворы

Все растворы готовились на воде особой чистоты из установки “Milli-Q” (Millipore).

PBS: 8.0 г/л NaCl, 0.2 г/л KCl, 1.15 г/л Na₂HPO₄, 0.2 г/л KH₂PO₄, pH 7.2.

TBS: 20 mM Трис-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5

RIPA буфер: 50 mM Трис-HCl pH 5,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% диоксихолат натрия

Конъюгатный буфер для вестерн-блоттинга: TBS, 0.5% BSA или обезжиренное сухое молоко, 0.05% Tween-20

Двухкратный буфер нанесения образцов для электрофореза по Леммли: 5% 2-меркаптоэтанола, 4% SDS, 0.25 M Трис-HCl, pH 6.8; 4 mM ЭДТА, 10% глицерина, 0.25 мг/мл бромфенолового синего

Пятикратный электродный буфер для электрофореза по Леммли: глицин 72 г/л, SDS 5 г/л, Трис-HCl 6.5 г/л, pH 8.3

Буфер переноса для иммуноблоттинга: 39 mM глицин, 48 mM Трис-HCl, 0.0375% SDS, 20% этанол

Буфер для нативного электрофореза: 0.09 M Tris (pH 8.3), 0.09 M H₃BO₃, 5 mM MgCl₂, 1 mM АТФ, 1 mM DTT

KRB (Буфер Кребса-Рингера): 122 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM K₂HPO₄, 25 mM NaHCO₃, 14 mM глюкоза, 0.01 мг/мл феноловый красный

Карбонатный буфер: 1.5 г/л Na₂CO₃, 29.3 г/л NaHCO₃, pH 9.6.

Глицин-HCl: 0.1 M глицина, pH 2.5.

TBE десятикратный: 0.89 M трис-основание, 0.89 M борная кислота, 20 mM ЭДТА, pH 8.0

TE: 10 mM Трис-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 8.0

Соленый спирт: 70% EtOH, 30% 0.14M NaCl

Бактериальные среды.

LB: 10 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl

LB-агар: LB, 18 г/л агара

2xYT: 16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl

SOB: 20 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0.5 г/л NaCl, 250 mM KCl, 10 mM MgCl₂

SOC: SOB, 50 mM глюкоза

Антибиотики.

Раствор ампициллина в воде с концентрацией 50-100 мг/мл

Раствор зеоцина в воде с концентрацией 50-100 мг/мл

Буферные растворы для выделения протеасомы:

Буфер А: 20 mM Трис-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM АТФ, 10% глицерин, pH 7.5

Буфер Б: 20 мМ Трис-НСl, 250 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, 1 мМ АТФ, 20% глицерин, рН 7.5

Буфер Г: 20 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, 1 мМ АТФ, рН 7.5

Буфер Е: 20 мМ Трис-НСl, 0.1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT, 0.1 мМ АТФ, 10% глицерин, рН 7.8

Буфер для хранения протеасомы: буфер Г + 10% глицерина

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ АУТОИММУННОЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

4.1.1 Структурно-функциональный анализ репертуара аутореактивных иммуноглобулинов к нейральным антигенам.

Для решения одной из центральных задач данной диссертации, а именно выявления триггерных механизмов индукции РС, необходимо было разработать подходы для исследования структурных особенностей репертуаров аутоантител при данной патологии. В силу аномально большого положительного заряда МВР методически достаточно трудно исследовать его взаимодействие с аутоантителами. В этой связи нами были предложены комбинаторные подходы по двумерному скринингу иммунных репертуаров, а именно – скринингу библиотеки генов иммуноглобулинов больных рассеянным склерозом и библиотеки пептидов – фрагментов МВР – одного из основных аутоантигенов при РС.

Выявление эпитопов МВР, характерных для поликлональных аутоантител из сыворотки крови пациентов с РС и модельных животных с ЕАЕ

Ранее в нашей лаборатории была разработана библиотека эпитопов МВР, состоящая из фрагментов этого нейроантигена, слитого с тиоредоксином в качестве белка-носителя [265]. В настоящем исследовании мы использовали библиотеку эпитопов МВР, чтобы выявить и сравнить характер связывания аутоантител, содержащихся в образцах сыворотки крови пациентов с ремитирующим типом течения РС и грызунов с ЕАЕ. Результаты этого исследования обобщены на **рисунке 4.1**. Как и в наших предыдущих исследованиях, аутоантитела из сыворотки крови пациентов с РС связывали фрагменты МВР 42-65, 84-100 и 115-170. При анализе сыворотки крови трех линий грызунов, развивающих ЕАЕ, мы выявили наличие аутоантител к одной иммунодоминантной области (МВР124-147) у мышей C57/BL6, к двум областям (МВР24-44 и МВР72-139) у мышей линии SJL/J, и также две области (МВР40-60 и МВР107-170) у крыс линии DA⁵⁶. Исходя из профиля связывания аутоантител очевидно, что DA крысы с индуцированным ЕАЕ являются наиболее релевантной моделью РС.

⁵⁶ от англ. Dark Agouti

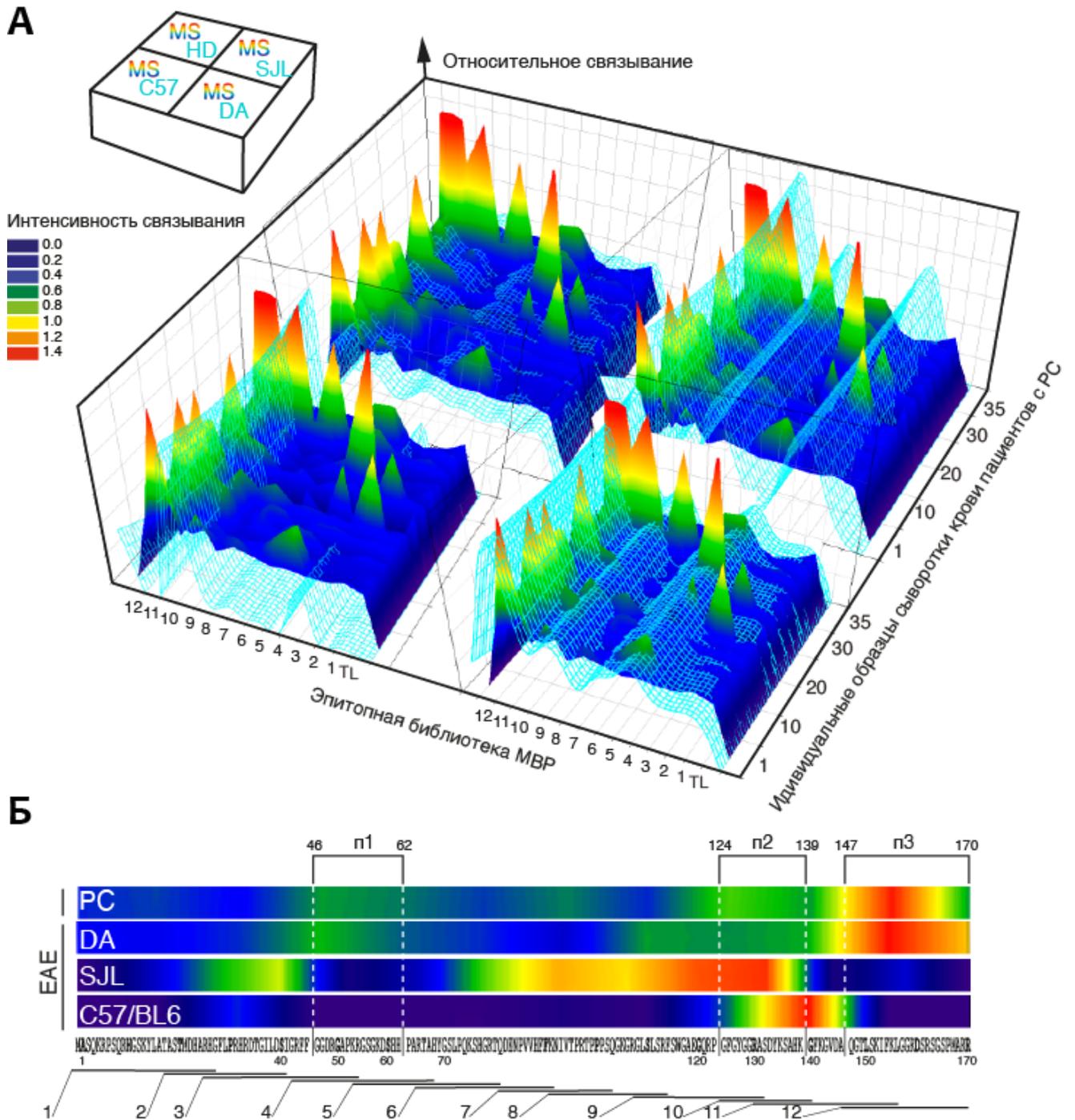


Рисунок 4.1 Паттерны связывания сывороточных аутоантител, изолированных из пациентов с РС. Интенсивность связывания обозначена цветовым градиентом. На панели (А) присутствует наложение паттерна связывания аутоантител из сыворотки крови животных с индуцированным ЕАЕ (голубая поверхность). На панели (Б) показано интегральное значение связывания аутоантител из различных источников в размерности аминокислотной последовательности МВР. Указаны пептиды, составляющие эпитопную библиотеку МВР.

Следующим этапом работы был поиск альтернативного протокола иммунизации DA-крыс для получения воспроизводимо высоких уровней аутоантител не только к С-концевой части МВР, но и к его энцефалитогенному фрагменту. В ранее опубликованных экспериментах с

фрагментами основного белка миелина (GPBP⁵⁷) было показано, что только GPBP₆₂₋₈₄ и в существенно меньшей степени GPBP₆₈₋₈₈ способны индуцировать EAE у крыс DA. Мы провели иммунизацию крыс DA пептидом MBP₆₃₋₈₁, и в ходе анализа циркулирующих антител обнаружили значительный аутоиммунный ответ на три фрагмента MBP: MDHARHGFLPRH, QDENPVVHFFKNIV и IFKLGGRDSRSGSPMARR. Эпитопы поликлональных IgG идентифицировали в соответствии с уровнем их связывания с библиотекой эпитопов MBP (по результатам ИФА) с последующими теоретическими расчетами, основанными на выравнивании перекрывающихся пептидов (Рис. 4.2А).

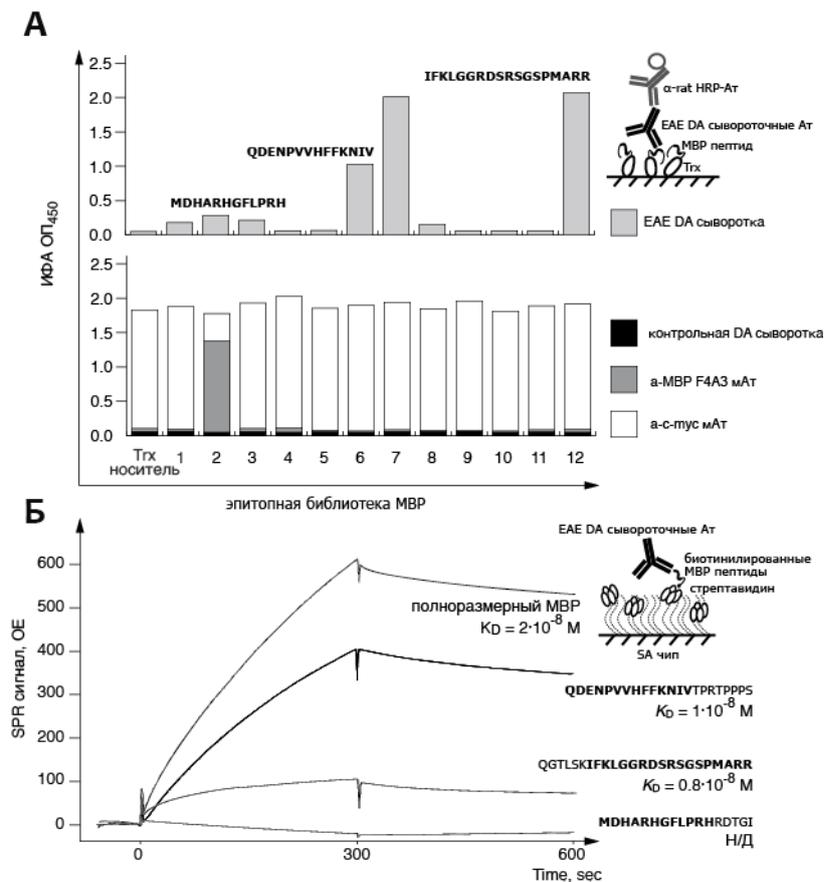


Рисунок 4.2 (А) Иммуноферментный анализ специфичности связывания аутоантител из сыворотки крови крыс линии DA, развивающих EAE, с эпитопной библиотекой MBP. Снизу представлено связывание антител из сыворотки крови неиммунизированных животных, моноклональных антител к тус эпитопу, а также моноклональных антител к MBP (клон F4A3). **(Б)** SPR-анализ аффинности аутоантител из сыворотки крови крыс линии DA с EAE к полноразмерному MBP и его фрагментам.

Чтобы получить количественные характеристики распознавания эпитопов аутоантителами и подтвердить их предсказанные последовательности, мы использовали метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR⁵⁸) для измерения сродства циркулирующих в кровотоке крыс DA с EAE поликлональных анти-MBP антител к биотинилированным пептидам MBP, содержащим указанные эпитопы (Рис. 4.2Б). Значения эффективных констант диссоциации в случае

⁵⁷ от англ. Guinea Pig Basic Protein

⁵⁸ от англ. Surface Plasmon Resonance

полноразмерного белка, а также его энцефалитогенного и С-концевого фрагментов находились в наномолярном диапазоне, подтверждая их роль в качестве основных В-клеточных эпитопов.

Получение фаговой библиотеки переменных фрагментов антител пациентов с рассеянным склерозом

Для получения фаговой библиотеки переменных фрагментов антител человека (scFv⁵⁹) были объединены периферические лимфоциты, изолированные из восьми пациентов с обострением РС (тип течения RR⁶⁰). В фагемидный вектор pHEN2 была интегрирована полилинкерная область, содержащая уникальные сайты для клонирования генов VL⁶¹ и VH⁶² с 5' и 3' сторон от гибкого Ser-Gly линкера, соответственно. Полученные переменные фрагменты находились в единой рамке считывания с геном рIII. Нуклеотидная последовательность вектора, включающая lac-промотор, лидер PelB и последовательности гексагистидиновых кластеров, осталась неизменной. Репертуар VH-генов был интегрирован в модифицированный вектор pHENt, в результате была получена библиотека VH-генов с оценочной переменностью 1.8×10^7 клонов. Полученную библиотеку VH-генов использовали для клонирования амплифицированного репертуара VL-генов. Эффективность клонирования контролировали после каждого этапа с помощью обработки ПЦР фрагментов пятидесяти случайно выбранных клонов мелкощепящими эндонуклеазами рестрикции. Репрезентативность финальной библиотеки была оценена в 8×10^9 уникальных комбинаций VH-VL.

Селекция МВР-связывающих одноцепочечных антител

Установлено, что аутоантитела к МВР имеют низкие константы связывания со своей мишенью [266], при этом высокий положительный заряд МВР приводит к большому числу ложно-положительных сигналов при проведении ИФА [38, 60, 267]. Данное свойство МВР также способствует неспецифическому связыванию с нитевидным фагом M13KO7 из-за ионного взаимодействия с поверхностью фага вследствие наличия отрицательно заряженного кластера на N-конце основного белка оболочки р8. Для уменьшения неспецифического взаимодействия было предложено использование буферных растворов с высокой ионной силой и ион-парные агенты, а также ряд манипуляций с фаговыми носителями, в частности, применение полипептидной «обертки» polyLys₁₈ для экранирования бактериофага или применение мутантного бактериофага M13K07+ с дополнительным остатком лизина в каждой

⁵⁹ от англ. single chain Fragment variable

⁶⁰ от англ. Relapsing-Remiiting

⁶¹ от англ. Variable Light

⁶² от англ. Variable Heavy

копии р8. Подобный модифицированный бактериофаг продемонстрировал значительное снижение неспецифического связывания [268]. В работе [38] авторы предложили модифицированный иммуоферментный метод детекции анти-МВР антител с применением гепарина, нейтрализующего высокий положительный заряд этого нейроантигена. Основываясь на этих данных, в настоящей работе мы использовали три методики (Рис. 4.3А) отбора: (1) ограниченный гидролиз МВР трипсином для размежевания положительно заряженных кластеров; (2) использование нативного МВР с добавлением гепарина, нейтрализующего избыточный положительный заряд белка; (3) селекцию в присутствии буферного раствора с высокой ионной силой (0.5 М NaCl). Для реализации первой методики отбора был выбран оптимальный уровень гидролиза МВР (Рис. 4.3Б, вставка), чтобы минимизировать связывание бактериофага М13К07 в ИФА (Рис. 4.3Б). Концентрацию трипсина варьировали от 0.001 до 10 мкг на мг МВР. В качестве положительного контроля использовали мышинные поликлональные анти-МВР антитела для контроля целостности связывающих эпитопов. Нами было показано, что обработка МВР трипсином в соотношении 0.12 мкг на мг белка в течение 1 часа была оптимальной. Далее, в зависимости от выбранного подхода, мы осуществили до пяти раундов фагового отбора. В результате с применением всех описанных методик было отобрано 13 моноклональных анти-МВР scFv.

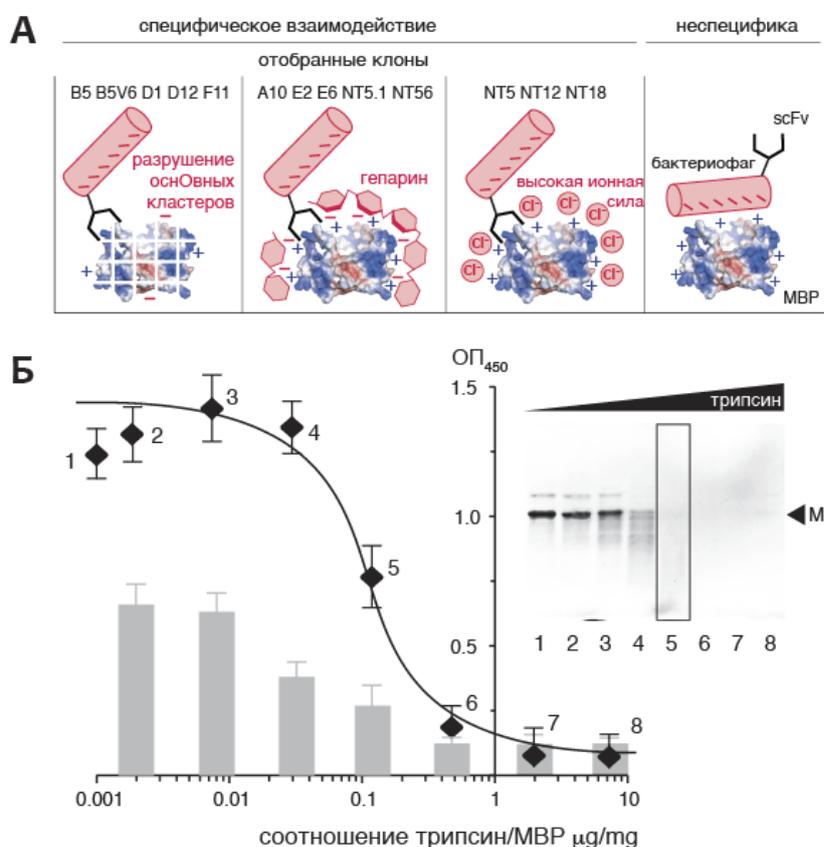


Рисунок 4.3 (А) Схема фаг-дисплейной селекции миелин-реактивных антител в различных условиях. Указаны отобранные клоны. **(Б)** ИФА связывания поликлональных миелин-реактивных антител (черная кривая) и бактериофага М13К07 дикого типа (серые столбцы) с МВР, обработанным различным количеством трипсина. Во врезке представлена электрофореграмма в ПААГ гидролизатов МВР. Оптимальным было признано соотношение 0.12 мкг трипсина на мг МВР.

Анализ эпитопной специфичности отобранных антител в виде растворимых scFv

Широкий спектр антител с неизвестной специфичностью, ассоциированных с РС, присутствующих в крови или ЦСЖ пациентов, ранее наблюдался несколькими группами [269, 270]. Было показано, что большинство РС-ассоциированных антител, изолированных из ЦСЖ, способны окрашивать миелин на срезах ткани мозга, тем не менее конкретные антигены обнаружить не удалось [271]. Антигенную специфичность отобранных scFv было признано разумным тестировать в индивидуальной растворимой форме, отдельно от фаговых частиц. Для увеличения уровня экспрессии отобранных scFv, соответствующие им нуклеотидные последовательности перенесли в плазмиду на основе вектора pET22b под контроль сильного промотора T7. Кластер 3FLAG был интегрирован на С-конец всех белков для более чувствительной детекции. Нам удалось получить пять растворимых scFv (E2, F11, B5V6, E6 и D1) в количествах, достаточных для функционального анализа. Полученные scFv тестировали на анти-MBP-активность с использованием ИФА. Все отобранные scFv показали статистически значимый уровень связывания с MBP по сравнению с отрицательным контролем – иррелевантным scFv, полученным в тех же условиях (**Рис. 4.4А**). С целью охарактеризовать сродство scFv к MBP, мы оценили K_D комплексов scFv-MBP с помощью прибора Biacore T-200 на основе SPR (**Рис. 4.4Б**). Нами было обнаружено, что клоны E2 и F11 взаимодействуют с MBP с K_D близкими к наномолярному диапазону (3.9×10^{-9} и 4.0×10^{-9} М, соответственно), тогда как scFv B5V6 взаимодействует с MBP с $K_D \sim 1.2 \times 10^{-8}$ М. Константы диссоциации не удалось корректно определить для клона D1 из-за слабого связывания, а в случае клона E6 – из-за вероятного присутствия нескольких конформационных изоформ. Чтобы определить эпитопы MBP, специфически узнаваемые scFv, мы осуществили так называемый «2D-скрининг» и проанализировали эффективность связывания пяти полученных scFv с эпитопной библиотекой MBP [265] (**рис. 4.4В**). Мы не обнаружили значимого взаимодействия клонов scFv E2 и F11 с библиотекой эпитопов MBP, в то время как клоны E6 и D1, слабо обнаруживаемые с применением SPR, специфически связывали фрагменты MBP₆₅₋₉₂ и MBP₁₃₀₋₁₅₆, что указывает на их способность распознавать линейные эпитопы, расположенные в этих фрагментах белка. Детальный анализ последовательности MBP показал, что эти эпитопы, возможно, расположены внутри двух локальных полипептидных мотивов (**рис. 4.4Г**). Антитело B5V6 взаимодействовало как с полноразмерным MBP, так и с его линейным фрагментом 130-156, что свидетельствует о доступности данного эпитопа в случае полноразмерной молекулы MBP.

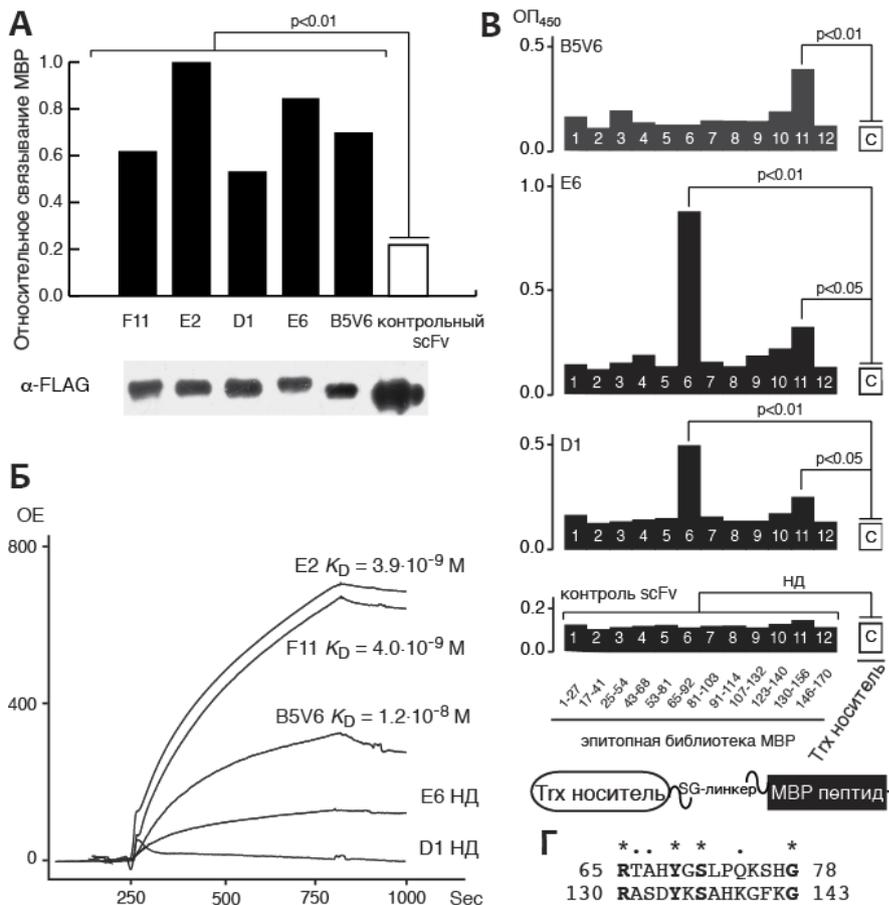


Рисунок 4.4 (А) Связывание отобранных scFv с MBP по результатам ИФА. Снизу представлен вестерн-блоттинг, свидетельствующий о равной концентрации вносимых образцов. (Б) SPR анализ связывания scFv с полноразмерным MBP. (В) Связывание отобранных scFv с эпитопной библиотекой MBP по результатам ИФА. (Г) Наличие повторяющегося супермотива в последовательности MBP.

Таким образом, проведенный анализ функциональной активности растворимых scFv показал, что мы выбрали антитела из трех основных популяций. Клон D1 предпочтительно распознает линейные MBP-эпитопы, F11 взаимодействует с нативным белком, а scFv E2, E6 и B5V6 связываются как с денатурированным, так и с нативным MBP. Слабое связывание клона D1 с нативным MBP может быть объяснено использованием гидролизованного MBP в качестве антигена во время процедуры его селекции.

Поиск известных гомологов анти-MBP антител

В настоящем исследовании нам удалось определить нуклеотидную и соответствующую ей аминокислотную последовательность 13 переменных фрагментов антител, связывающих MBP. Из них 11 представляли собой комбинации VH-VL и два клона содержали индивидуальные тяжелые цепи (Табл. 3). Нуклеотидные последовательности VH и VL далее анализировали с

применением ресурса IgG BLAST⁶³ для определения ближайших сегментов гена зародышевой линии.

Таблица 3. Гомология тяжелых и лёгких цепей отобранных одноцепочечных антител с антителами (по литературным данным) из ЦСЖ больных РС и антителами отобранными на связывание LMP1 из фаг-дисплейной библиотеки Гриффина 1. Антитела специфичные к *lmp1*, отобранные ранее из фаг-дисплейной библиотеки Гриффина 1 помечены курсивом [272]. Антитела из ЦСЖ больных РС отмечены жирным шрифтом [271].

отобранные scFv	зародышевая линия тяжелой цепи	гомологичные антитела	зародышевая линия тяжелой цепи	родственные зародышевые линии
E2	HV3-11*	MS2	HV3-11*	HV3-48*
NT12	HV4-61*	<i>EBV_H3</i>	HV7-b*-01	HV7 -61*/-39*/-59*/-28*
A10	HV4-59*			
E6	HV5-51			
B5	HV1-8*	<i>EBV_G5</i>	HV1-2*-04	HV1 -46*/-8*/-3*/-18*
NT56	HV1-18*			
B5V6	HV1-8*			
NT5	HV3-23*	<i>EBV_F5</i>	HV3-23*	HV3 -43*/-64*/-53*/-48*
D1	HV3-23*			
D12	HV3-23*			
NT18	HV3-53*			
NT5.1	HV3-48*			
F11	HV1-69*	MS1	HV1-69*	
отобранные scFv	зародышевая линия лёгкой цепи	гомологичные антитела	зародышевая линия лёгкой цепи	родственные зародышевые линии
NT12	LV3-19*	<i>EBV_G5</i>	LV3-19*-01	
E6	LV3-19*			
B5V6	LV6-57*			
B5	LV2-14*	<i>EBV_A4</i>	LV2-14*-01	LV2 -23*/-8*/-11*
E2	LV2-14*	MS2	LV2-11*	
NT5	KV1-6*			
F11	LV1-44*	<i>EBV_F5, B8,E2</i>	LV1-47*-01	LV1-44*
D12	LV1-44*			
D1	KV3-20*			
NT5.1	KV1-12*	<i>EBV_H3</i>	KV1-39*-01	KV1 -12*/-8*/-16*
NT56	LV4-69*	MS1	LV4-69*	
NT18	No Lc			
A10	No Lc			

Дополнительно мы провели сравнение аминокислотных последовательностей, соответствующих найденным переменным фрагментам, с другими известными антителами с использованием ресурса Protein BLAST. Среди тяжелых цепей преимущественно встречались семейства HV1 и

⁶³ от англ. Basic Local Alignment Search Tool <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

HV3 (4 и 6 из 13, соответственно). Особенно интересной нам показалась найденная гомология (до 95%) между отобранными scFv и переменными областями антител, специфичных к латентному мембранному белку 1 (LMP1⁶⁴) вируса EBV⁶⁵ [272] и аутоантител, ранее обнаруженных в ЦСЖ пациентов с РС [271] (**Рис. 4.5 и Табл. 3**).

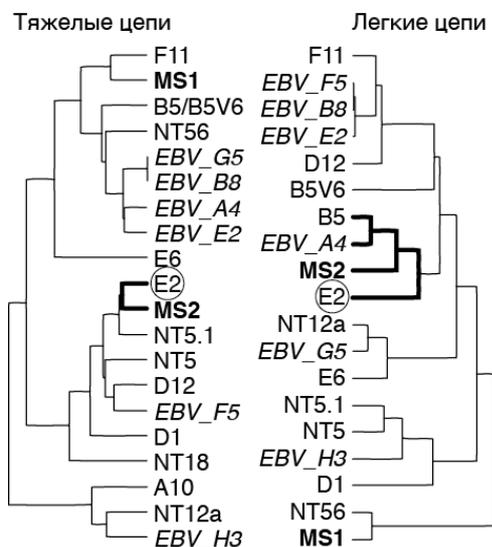


Рисунок 4.5 Филогенетическое древо переменных фрагментов отобранных scFv, а также их гомология с антителами к белку LMP1 EBV (показаны курсивом) и последовательностями антител, выявленных по результатам секвенирования одиночных В-клеток из ЦСЖ пациентов с РС (обозначенных жирным шрифтом).

Десять тяжелых и семь легких цепей из 13 scFv были гомологичны с таковыми у антител, связывающих LMP1 антител. Обе цепи клона D12 имели сходную зародышевую линию с антителом F5, связывающим LMP1. Клоны NT5.1, NT12 и B5 состояли из комбинаций тяжелых и легких цепей соответствующим различным анти-LMP1 антителам. Интересно, что клон NT56 состоял из комбинации тяжелой цепи, соответствующей анти-LMP1 антителу, и легкой цепи антитела из ЦСЖ пациента с РС. Клон F11, в свою очередь, содержал тяжелую и легкую цепи, соответствующие антителу из ЦСЖ пациента с РС и LMP1-специфичному антителу. Одним из наиболее интересных клонов был клон E2, который был гомологичен как антителу MS2 из пациента с РС, так и антителу A4, связывающему LMP1. В целом эти наблюдения свидетельствуют о том, что нам удалось «выловить» из фаг-дисплейной библиотеки ряд антител, очень близких по своей структуре природным.

Экспериментальное подтверждение существования моноклональных миелин-реактивных аутоантител, способных связывать вирусный антиген

Нами был осуществлен анализ связывания растворимого scFv E2 с белками MBR и LMP1 методом Вестерн-блоттинга (**Рис. 4.6А, левая панель**). Для этой цели мы использовали эукариотическую клеточную линию НЕК293, экспрессирующую рекомбинантный LMP1, и

⁶⁴ от англ. Latent membrane protein 1

⁶⁵ от англ. Epstein-Barr virus

нетрансфицированные клетки в качестве отрицательного контроля. Мы показали, что scFv E2 взаимодействует как с LMP1, так и с MBP (Рис. 4.6Б). Следует отметить, что в последнее время EBV стал одним из ведущих кандидатов среди нескольких альтернативных потенциальных вирусных триггеров РС [273, 274]. Эта гипотеза подтверждается множественными эпидемиологическими, иммунохимическими и клеточными данными.

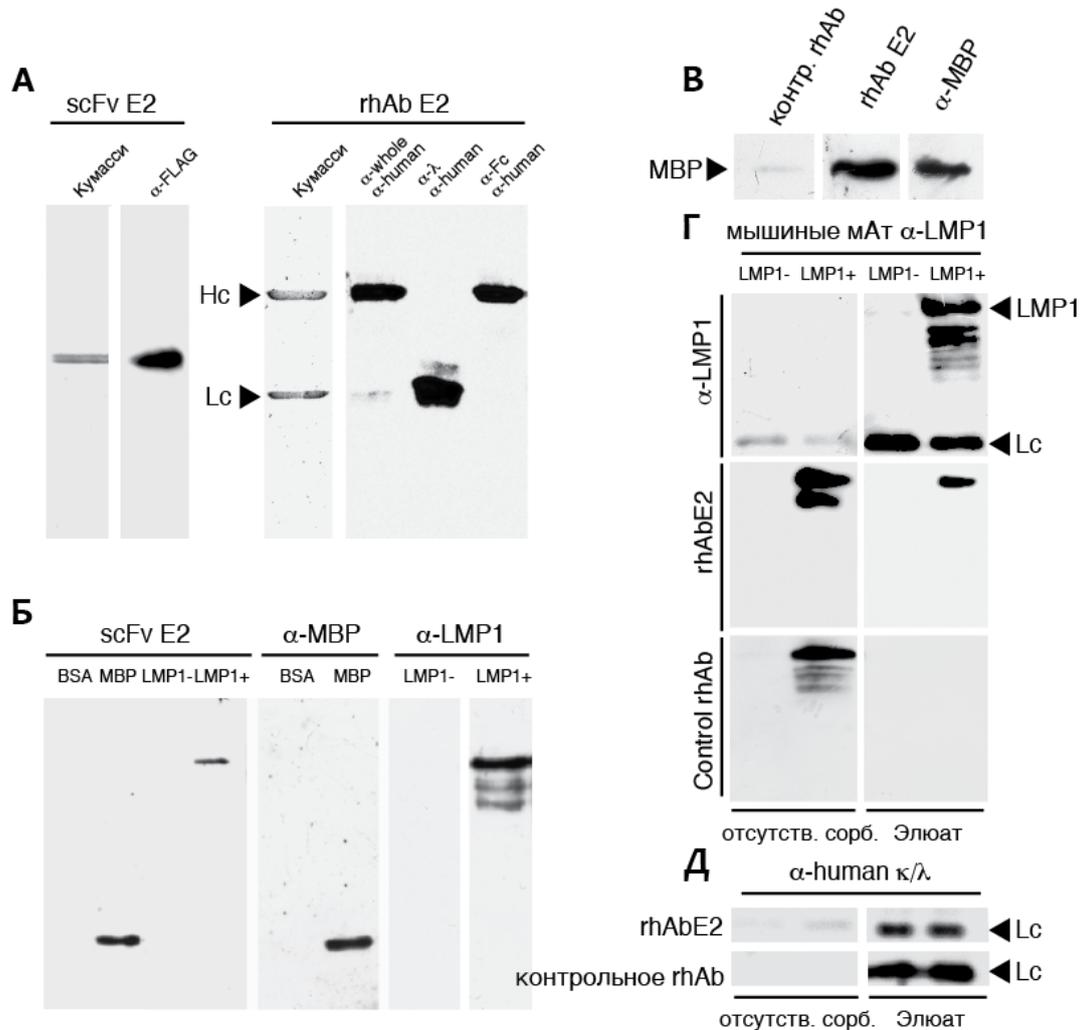


Рис.4.6 (А) Очищенный растворимый scFv E2 (левая панель) и полноразмерное человеческое антитело, несущее его переменные фрагменты (rhAb E2, правая панель), подвергли разделению в ПААГ и далее окрашивали Кумасси или анализировали Вестерн-блоттингом. **(Б)** Вестерн-блоттинг анализ связывания scFv E2 с белками MBP и LMP1. **(В, Г)** Рекombинантное человеческое антитело rhAbE2 связывает MBP на вестерн-блоттинге **(В)** и иммунопреципитирует LMP1 из раствора **(Г)**. Рекombинантное человеческое антитело rhAbE2 и контрольное человеческое рекombинантное антитело, полученное в той же системе экспрессии (Control rhAb), а также анти-LMP1 антитело мыши, инкубировали с клеточными лизатами клеток линии HEK293, трансфицированными и нетрансфицированными LMP1 с последующим осаждением PrA-агарозой. Далее фракции разделяли в ПААГ и анализировали Вестерн-блоттингом. **(Д)** Контрольное прокрашивание антивидовыми антителами.

Несколько групп показали, что пациенты с историей инфекционного мононуклеоза – клинического проявления EBV – в анамнезе, находятся в группе повышенного риска развития РС [275, 276]. Чтобы убедиться, что такая комбинация легкой и тяжелой цепей может существовать и быть функциональной по своей природе, мы интегрировали переменные

области клона E2 в полноразмерное антитело человека (**Рис. 4.6А, правая панель**). Полученное IgG rhAb⁶⁶ E2 также взаимодействовало с МВР на Вестерн-блоттинге (**Рис. 4.6В**) и преципитировало LMP1 из раствора (**Рис. 4.6Г,Д**).

Изучение факторов, обеспечивающих стабильность аффинности моноклональных аутоантител к МВР

В рамках развития понимания физиологической значимости найденных переменных последовательностей миелин-реактивных антител нами был проведен анализ комбинаций VH и VL этих антител в терминах их аффинности к МВР и перекрестной реактивности против панели потенциальных аутоантигенов. С этой целью мы интегрировали переменные области клонов A10, B5, B5V6, E2 и F11 в соответствующие плазмидные векторы, кодирующие последовательность полноразмерных цепей иммуноглобулина человека, а затем провели трансфекцию клеток CHO всеми возможными комбинациями VH-VL. Анти-МВР-связывающую активность всех антител тестировали с помощью ИФА. Все изученные комбинации показали статистически значимый уровень связывания с МВР, в отличие от отрицательного контроля (иррелевантного антитела человека, полученного в тех же условиях), а также в клонах с чужеродной VL, а именно E2-a17, E2-Th, F11-a17 и F11-th, где «th» обозначает антитела против тиреоглобулина.

Метод SPR позволил более детально описать сродство иммуноглобулинов к МВР (**Рис. 4.7, табл. 4**). Анализ констант динамической ассоциации и диссоциации (k_a и k_d) привел к двум основным выводам: во-первых, кластеры, образованные иммуноглобулинами с одним и тем же VH, но с разными VL доменами (**Рис. 4.7А**), характеризуются более низким рассеянием значений k_a и k_d по сравнению с кластерами иммуноглобулинов с одинаковым VL, но с разными VH доменами (**Рис. 4.7Б**); во-вторых, значения k_a в обоих случаях колеблются в более широком диапазоне, чем значения k_d . Таким образом, кластеры антител с различными легкими цепями, в отличие от антител с разными тяжелыми цепями, не перекрываются и в основном распределены вдоль, а не перпендикулярно изобарам K_D , что свидетельствует об устойчивости их результирующей аффинности. Это явление может быть частично объяснено компенсацией частного k_a/k_d в том случае, когда структура антитела обеспечивает более эффективное динамическое связывание и, одновременно, более легкое высвобождение лиганда. Интересно, что диапазон флуктуаций k_a градиентно уменьшался с увеличением длины третьего

⁶⁶ от англ. recombinant human antibody

гипервариабельного участка, определяющего комплементарность (H-CDR3⁶⁷), а также степени зрелости антител (Рис. 4.7В).

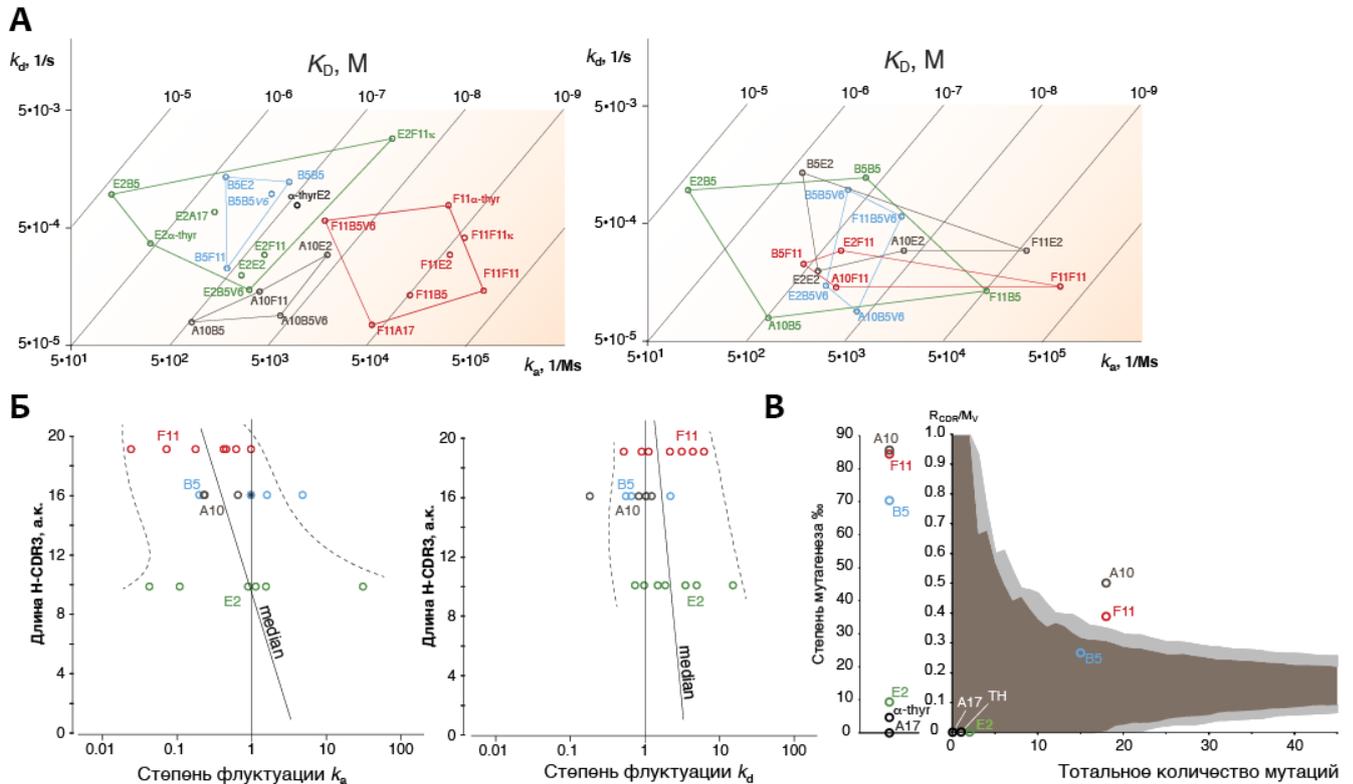


Рисунок 4.7 (А) Изменение аффинности к МВР при варьировании тяжелых и лёгких цепей согласно результатам ППР (SPR). **(Б)** Степень флуктуации k_a и k_d в зависимости от длины HCDR3. **(В)** Частота соматических мутаций на 1000 п.о. (левый рисунок) и анализ антиген-направленного созревания антител (правый рисунок). Отношение мутаций в H-CDR1 и H-CDR2 (RCDRL) к общему числу мутаций в варибельном регионе (M_V) относительно M_V . Серая и коричневая области соответствуют 95% и 90% вероятности случайной мутации. Расположение точки над верхней границей доверительного интервала, является признаком антиген-направленного созревания.

Ряд ранее обнародованных исследований показал, что различные пептиды, главным образом вирусного происхождения, могут потенциально имитировать эпитопы МВР [14, 15, 277-279]. В этой связи мы поставили перед собой задачу оценить профиль перекрестной реактивности вариантов анти-МВР антител. Используя технику Bio-Plex/Luminex, мы проанализировали связывание комбинаций VH-VL с основными аутоантигенами при РС (МВР, MOG, PLP1, дцДНК), пептидной библиотекой МВР, потенциальными аутоантигенами, ассоциированными с глаукомой (ENO-1, GST, α -фодрин, актин, α -кристаллин, GAPDH, тимозин β 4, hEGF), вирусными белками (EBV LMP1, HBsAg, CMVpP38, HSV-1 gG) и белками с высоким pI (лизоцим и гистон H1), которые похожи на МВР с точки зрения высокого положительного заряда.

⁶⁷ от англ. Heavy – complementary determining region 3,

Таблица 4. Константы диссоциации комплекса МВР-антитело

Комбинация антитела	$k_a, 1/Ms$	$k_d, 1/s$	K_D, M
A10-B5	8.0×10^2	7.9×10^{-5}	9.9×10^{-8}
A10-B5V6	6.1×10^3	9.0×10^{-5}	1.5×10^{-8}
A10-E2	1.8×10^4	3.0×10^{-4}	1.7×10^{-8}
A10-F11	3.8×10^3	1.5×10^{-4}	3.8×10^{-8}
F11-B5	1.2×10^5	1.4×10^{-4}	1.1×10^{-9}
F11-B5V6	1.7×10^4	5.9×10^{-4}	3.5×10^{-8}
F11-E2	3.0×10^5	3.0×10^{-4}	1.0×10^{-9}
F11-F11 λ_2	6.5×10^5	1.5×10^{-4}	1.7×10^{-9}
F11-F11	4.2×10^5	4.2×10^{-4}	1.0×10^{-9}
F11-A17	5.0×10^4	7.5×10^{-5}	1.5×10^{-9}
F11-th	2.9×10^5	8.0×10^{-4}	2.8×10^{-9}
TH-E2	9.0×10^3	8.0×10^{-4}	8.9×10^{-8}
E2-th	3.1×10^2	3.8×10^{-4}	1.2×10^{-6}
E2-A17	1.4×10^3	7.0×10^{-4}	5.2×10^{-7}
E2-B5	1.3×10^2	1.0×10^{-3}	7.9×10^{-6}
E2-B5V6	3.0×10^3	1.5×10^{-4}	5.0×10^{-8}
E2-E2	2.5×10^3	2.0×10^{-4}	8.0×10^{-8}
E2-F11 λ_2	4.3×10^3	3.0×10^{-4}	7.1×10^{-8}
E2-F11	8.0×10^4	3.0×10^{-3}	3.8×10^{-8}
B5-B5	7.5×10^3	1.3×10^{-3}	1.7×10^{-7}
B5-B5V6	5.0×10^3	1.0×10^{-3}	2.0×10^{-7}
B5-E2	1.8×10^3	1.4×10^{-3}	8.0×10^{-7}
B5-F11	1.8×10^3	2.3×10^{-4}	1.3×10^{-7}
A17-E2	—	—	—

Анализ кросс-реактивности моноклональных аутоантител к МВР

Как показано на **рисунке 4.8А**, большинство аутоантител перекрестно реагируют в большей степени с основными белками и пептидами: более 70% всех VH-VL комбинаций связывают лизоцим (pI 9.4) и PLP1 (pI 8.7), тогда как перекрестная реактивность со стрептавидином (pI 5.5) и ENO-1 (pI 6.4) проявлялось в существенно меньшей степени. Сравнение вариантов аутоантител с одной и той же тяжелой цепью показало, что их перекрестная реактивность в основном определялось парной легкой цепью. Более детальный анализ активности связывания LMP1 подтвердил это наблюдение, показав, что легкая цепь в определенной степени изменила сродство МВР-реактивных аутоантител к LMP1 (**Рис. 4.8Б**).

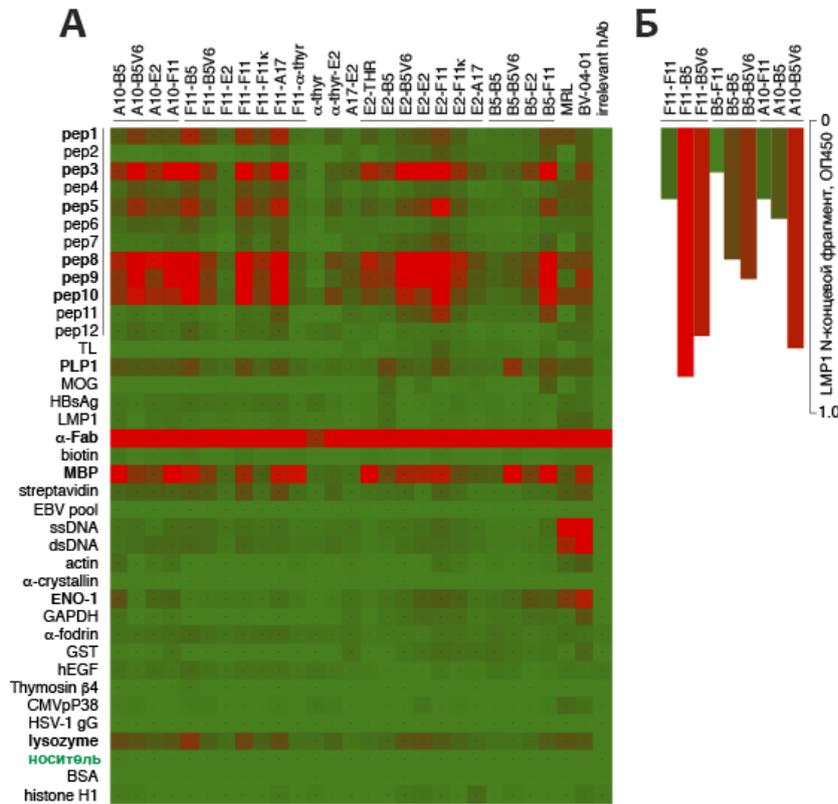


Рисунок 4.8 Профиль кросс-реактивности аутоантител к МВР. Представлены изменения профиля кросс-реактивности в зависимости от замены лёгких цепей связывания с эпипептидной библиотекой МВР и с 23 потенциальными аутоантигенами, проанализированные с помощью технологии Bio-lex/Luminex. Изменение цвета от зеленого до красного соответствует увеличению силы связывания. Заглавными и строчными буквами обозначены VH и VL соответственно.

Широкомасштабный анализ репертуаров иммуноглобулинов, предобогатщенных на вирусные и миелиновые антигены.

Для более детального анализа репертуаров иммуноглобулинов к миелиновым и вирусным антигенам нами был проведен фаговый отбор библиотеки scFv на антигены MBP, LMP1, MOG и последовательно на LMP1-MBP (Рис. 4.9А). Десять различных ампликонов, полученных путем ПЦР с селектированных бактериофагов с использованием праймеров к константным участкам вектора pHent, анализировали методом NGS с использованием оборудования Illumina. После объединения парных прочтений в единый ампликон, данные обрабатывались с помощью программного обеспечения IMG/CLUSTAL [251]. Проведенный анализ позволил однозначно идентифицировать локусы IgV, IgHD и IgJ, а также последовательность CDR3 тяжелой и легкой цепи. Последовательности без CDR3 были исключены из дальнейшего анализа. В итоге было проанализировано 221786 и 245010 последовательностей, соответствующих VH и VL. Основные количественные характеристики обнаруженных гермлайнов IgHV, IgKV и IGLV приведены на рисунке 4.9Б. В целом (из пяти библиотек) мы получили в среднем $(44 \pm 9) \times 10^3$ последовательностей тяжелой цепи Ig и $(49 \pm 4) \times 10^3$ последовательностей легкой цепи Ig, включая $(24 \pm 3) \times 10^3$ для κ - и $(25 \pm 2) \times 10^3$ для λ -цепей. После удаления повторяющихся последовательностей в дальнейшую разработку были приняты 20674 уникальных VH и 26242 уникальных VL последовательностей. Количество уникальных последовательностей в

библиотеке варьировалось от 2499 до 10074 для фрагмента VH и от 857 до 8466 для фрагмента VL, соответственно.

В результате проведенного анализа зародышевые линии IGHV1-3*01, IGHV1-18*04, IGLV10-54*01, IGLV1-47*01 были идентифицированы как LMP1-реактивные; IGHV1-69*01, IGHV5-51*01, IGHV6-1*01 и IGLV3-19*01, IGKV1-39*01, как MBP-реактивные; IGHV4-59*07 показала кросс-реактивные свойства; и IGHV1-8*01 была классифицирована как полиреактивная. Предварительный анализ показал, что распределение длины H-CDR3 (**рис. 4.9B**) соответствовало предыдущим данным об особенностях вариабельных областей антител против MBP. Наиболее часто встречающаяся длина H-CDR3 MBP-реактивных и кроссреактивных-LMP1-MBP scFv составляла 16 аминокислот, в случае MOG-специфичных scFv длина составляла 18 аминокислот. Интересно, что распределение длин H-CDR3 имело очевидный провал в зоне средних длин CDR (**рис. 4.9B**). Общее количество идентифицированных генов IgHV варьировалось от 36 до 54, включая 4 псевдогена и 12 «попсого» генов, то есть генов, которые встречались только у части ранее исследованных индивидов [280, 281]. Значительное увеличение частоты по сравнению с ранее опубликованными данными нормального распределения [281] наблюдалось для сегментов IGHV1-24, IGHV1-69, IGHV1-8, IGHV5-51 и IGHV6-1. Сравнительный анализ показал, что в случае антигенов MBP и LMP1 спектр зародышевых линий VH обычно соответствует их частоте в исходной библиотеке MS. Проведенный количественный анализ демонстрирует, что VH MOG-специфичных антител принадлежали главным образом к сегментам IGHV1-8 и IGHV1-69, тогда как анти-MBP и анти-LMP1 VH – в основном к IGHV4-59, IGHV5-51, IGHV3-23 и IGHV4-59.

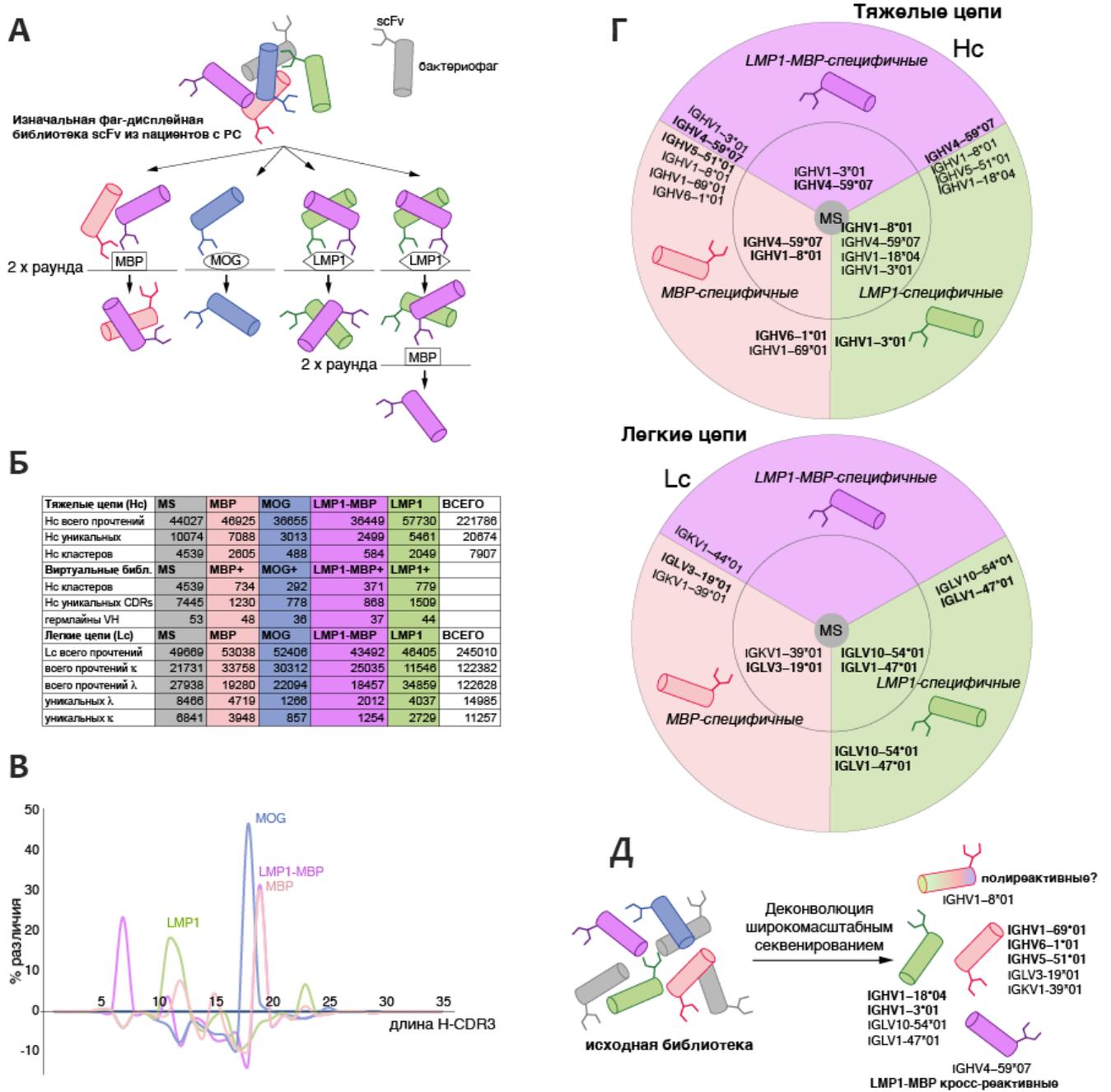


Рисунок 4.9 Описание фаг-дисплейных библиотек одноцепочечных антител, обогащенных на MBP, LMP1 и MOG, с помощью метода широкомасштабного секвенирования. (А) Схема обогащения фаг-дисплейной библиотеки одноцепочечных антител. (Б) Основные характеристики отсекуированных IGHV и IGLV для каждой из полученных библиотек. (В) Распределение длин H-CDR3 в отобранных библиотеках. (Г) Преобладание специфических зародышевых семейств в отобранных библиотеках по сравнению с исходной для VH (верхняя диаграмма) и VL (нижняя диаграмма). (Д) Отображение специфических зародышевых семейств, для которых выявлена тенденция к взаимодействию с различными антигенами.

Оценка состоятельности гипотезы вирусной этиологии рассеянного склероза

Патогенная роль миелин-реактивных антител при РС активно обсуждается в течение последних 20 лет [265, 282-284]. Необходимо отметить, что в ряде исследований каких-либо потенциальных антигенов для моноклональных антител при РС так и не было выявлено [269]. С

использованием рекомбинантных Fab⁶⁸-фрагментов авторам в работе [285] удалось продемонстрировать специфичность к МВР клонально размножившихся в ЦСЖ В-клеток. В свете не до конца понятной специфичности аутоантител при РС гипотеза развития РС, предполагающая вирусную инфекцию в качестве потенциального триггерного агента представляется особенно интересной [270, 286]. Среди длинного списка кандидатов на эту роль, включающих HHV6, HSV1, VZV, JCV и Torque Teno [270, 287, 288], EBV определенно играет первую скрипку [289-291]. Большое количество клинических наблюдений явно свидетельствует о вовлеченности EBV в патогенез РС. Пациенты с РС часто имеют в анамнезе факт EBV-опосредованного инфекционного мононуклеоза [292]; тяжелые формы инфекционного мононуклеоза в подростковом возрасте коррелируют со значительно повышенным риском развития РС [275, 286, 293]; наличие специфических антител к EBNA-1, VCA и BRRF2 [273, 294, 295] у пациентов с РС; наличие вируса EBV [296] и EBV-инфицированных В-клеток [296-299] в постмортальных образцах головного мозга пациентов с РС. Дополнительное преимущество вирусу EBV придает способность инфицировать В-клетки памяти [274].

Наиболее острый вопрос к этой концепции можно сформулировать следующим образом: почему такой широко распространенный вирус, как EBV, на наше счастье приводит к появлению РС в относительно небольшом проценте населения? Генетическая предрасположенность индивидуумов, а также аномалии клеточного иммунитета, в частности дефицит CD8 Т-клеток, нацеленных на EBV-инфицированные В-клетки, рассматриваются как основное объяснение этого феномена [300, 301]. С нашей точки зрения в настоящий момент остро не хватает именно структурных доказательств, которые напрямую связали бы EBV и РС. Предлагаемый в настоящем исследовании двухэтапный подход, основанный на скрининге репертуаров антител, представленных на фаговых частицах, и дальнейшей их реконструкции в виде полноразмерных человеческих антител, имеет несколько преимуществ по сравнению со скринингом ЦСЖ. Использование в анализе поликлональных антител зачастую приводит к ложноположительным сигналам, тогда как в нашем случае перекрестная реактивность моноклонального антитела к нейтральному аутоантигену и вирусному белку может быть доказана на структурном уровне. Несомненно, представленный подход сильно зависит от качества библиотеки, ее представительности и способа отбора антител.

Наши данные однозначно свидетельствуют о существовании в организме человека антител, способных перекрестно узнавать МВР и вирусный белок LMP1. Большинство опубликованных данных о гуморальном и клеточном иммунном ответе при РС указывают на особую значимость

⁶⁸ от англ. Fragment antigen-binding

EBNA как специфического антигена EBV [291], при этом LMP1 в большей степени связывают с протеканием злокачественной трансформации [302, 303]. Этот белок имитирует активированный CD40-рецептор в латентной фазе EBV-инфекции и может участвовать в сигнальном пути В-клеток [300, 304]. Было показано, что LMP1 обладает низкой иммуногенностью [300, 305], однако, подобное наблюдение может быть связано с подавлением цитотоксического Т-клеточного ответа к инфицированным В-клеткам. Детальное понимание участия EBV в развитии РС может иметь важное применение для лечения этого заболевания. Известно, что противовирусная терапия показала свою эффективность в некоторых случаях рецидивирующего РС [306]. В этой связи превентивное снижение риска масштабной инфекции EBV у индивидуумов, генетически предрасположенных к РС, может снизить частоту развития данного заболевания. В качестве альтернативы можно предложить направленную элиминацию В-клеток, продуцирующих патогенные кросс-реактивные антитела, с использованием направленных «В-клеточных убийц».

В настоящем исследовании мы установили, что тяжелая цепь антитела, по-видимому, является основой связывания MBP. Используя методику SPR, мы обнаружили, что вариации константы диссоциации, наблюдаемые в комбинаторных вариантах антител, объясняются изменениями скорости ассоциации антитела с MBP. Более того, стабильность сродства антитела к MBP при комбинации с альтернативными легкими цепями коррелирует с длиной CDR3 тяжелой цепи. Как было показано недавно, H-CDR3 длиной более 21 аминокислот характеризуются повышенной перекрестной реактивностью вследствие так называемой структуры «головки молотка»⁶⁹ [307]. Наши данные свидетельствуют о том, что даже 19 аминокислот в составе H-CDR3 достаточно для обеспечения стабильности аффинитета, который уже мало зависит от последовательности легкой цепи. Существующие данные о связи между РС с различными патогенами [308-311] также нашли подтверждение в настоящем исследовании, которое свидетельствует о перекрестной реактивности, связанной главным образом с основными белками и пептидами.

В результате проведенных экспериментов было показано, что антитела зародышевых линий IGHV5-51*01 и IGHV6-1*01 реагируют с MBP; IGHV1-18*04 и IGHV1-3*01 – с LMP1; IGHV1-69 – с MOG, в то время как антитела, соответствующие IGHV4-59*07, проявляли отчетливую перекрестную реакцию (**Рис. 4.9Г и 4.9Д**). Эти результаты хорошо согласуются с данными о том, что зародышевые линии IGHV4-39, IGHV4-59 и IGHV4-61 чрезмерно представлены в большинстве образцов ЦСЖ пациентов с РС [312]. Данные широкомасштабного секвенирования

⁶⁹ от англ. hammerhead

убедительно свидетельствуют о перекрытии VH, но не VL MBP- и LMP1-связывающих антител, что очередной раз подтверждает гипотезу о главенствующей роли тяжелой цепи антитела в узнавании как основного, так и кросс-реактивного антигена.

4.1.2 Изучение молекулярного механизма убиквитин-независимой внутриклеточной деградации основного белка миелина.

Анализ необходимости в модификации убиквитином для протеасомной деградации MBP в клетках млекопитающих

Внутриклеточную деградацию MBP тестировали на клетках HEK293, трансфицированных кДНК, кодирующей белки MBP и GFP⁷⁰ (Рис. 4.10А). MBP иммунопреципитировали из трансфицированных клеток HEK293, обработанных ингибитором протеасомы PS-341 (Bortezomib, Velcade) или ДМСО (Рис. 4.10Б). Анализ вестерн-блоттинга показал, что MBP не был убиквитинилирован, несмотря на накопление других полиубиквитинилированных белков в клетках, обработанных ингибитором протеасомы. Затем трансфицированные клетки обрабатывали циклогексимидом (СНХ) в присутствии или в отсутствии PS-341 и далее подвергали анализу вестерн-блоттингом (Рис. 4.10В). Количество MBP в клеточных лизатах быстро уменьшалось после добавления циклогексимиды, в присутствии же PS-341 белок был стабилен. Полученные данные явным образом свидетельствовали, что MBP подвергается гидролизу протеасомой *in vivo*. Количество белка GFP, который не является субстратом для протеасомы, существенно не менялось в клетках, обработанных циклогексимидом или PS-341.

⁷⁰ от англ. Green Fluorescent Protein

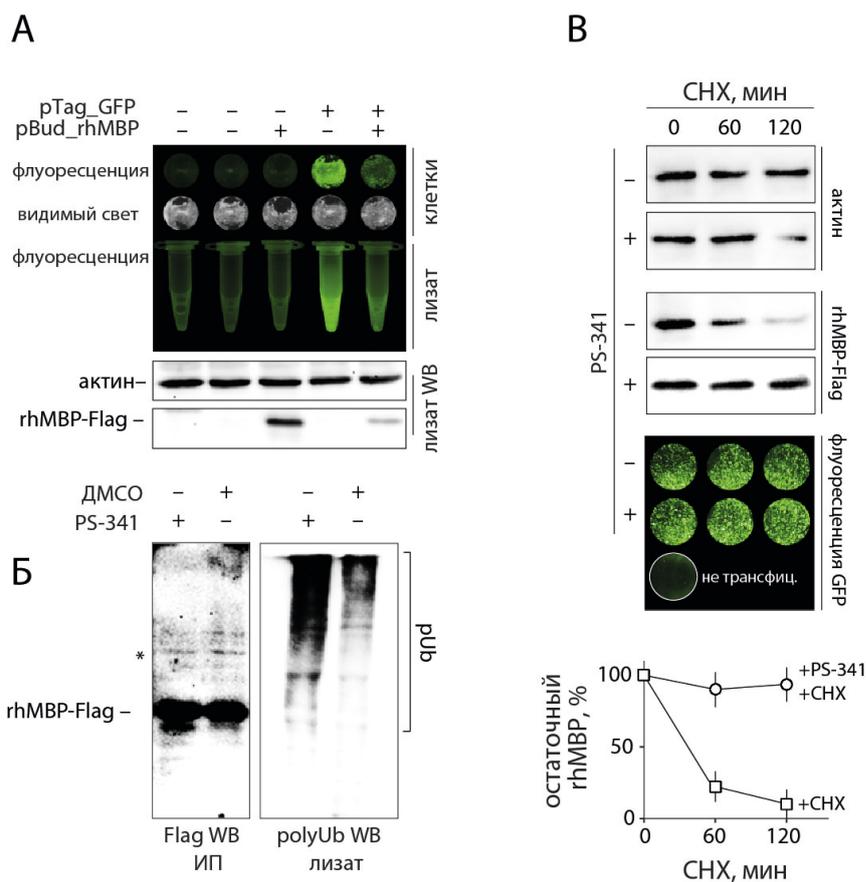


Рисунок 4.10 (А) Клетки НЕК, трансфицированные и не трансфицированные генетическими конструкциями, кодирующими рекомбинантный МВР человека (rhMBP) или GFP и вестерн-блоттинг (ВБ) их лизатов. В качестве контроля процедуры нанесения применяли гибридацию этой же мембраны с моноклональными антителами к β -актину (актин) **(Б)** Клетки НЕК трансфицировали генетической конструкцией, кодирующей МВР, через 24 обработали PS-341 или ДМСО, лизировали и провели иммунопреципитацию (ИП) с использованием антитела к FLAG-эпитопу. Вестерн-блоттинг элюатов (слева), гибридация с анти-FLAG антителом. Вестерн-блоттинг исходных лизатов (справа), гибридация с антителом к полиубиквитиновым конъюгатам. **(В)** Определение скорости протеолиза белков в клетке с использованием циклогексимида (CHX).

В случае деградации белка протеасомой в подавляющем большинстве случаев он предварительно подвергается модификации убиквитином (Ub) до его распознавания комплексом 26S. Чтобы определить, подвергается ли МВР убиквитинилированию *in vivo*, МВР, слитный с 3FLAG эпитопом, иммунопреципитировали из клеток, которые были котрансфицированы кДНК, кодирующей HA-меченый убиквитин (**Рис. 4.11**). HA-Ub случайным образом внедряется во вновь образованные полиубиквитиновые цепи и затем может быть обнаружен с помощью вестерн-блоттинга. В качестве положительного контроля использовали белок p105 – компонент комплекса NF- κ B, который подвергается конъюгированию с убиквитином. После обработки клеток ингибитором протеасомы MG132 мы не обнаружили следов полиубиквитинилирования в преципитатах, содержащих МВР, в отличие от результатов, полученных с контрольным белком p105. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что в клетках млекопитающих МВР подвергается протеасомальной деградации, скорее всего, в отсутствие полиубиквитинилирования.

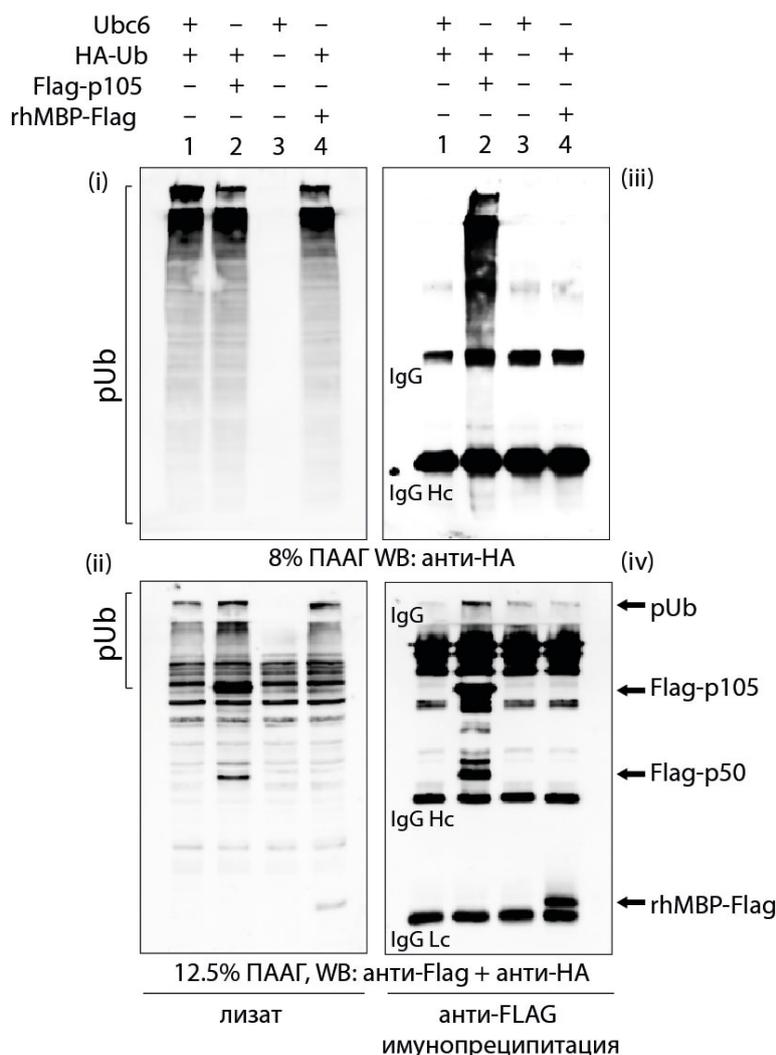


Рисунок 4.11 Клетки линии HEK293 трансфицировали генетическими конструкциями, кодирующими белки, указанные в таблице вверху, лизировали и подвергли иммунопреципитации анти-FLAG антителом. Исходные лизаты (слева) и соответствующие им элюаты после иммунопреципитации (справа) анализировали методом вестерн-блоттинга с окрашиванием анти-FLAG и анти-НА антителами. ПААГ – полиакриламидный гель, IgG – присутствующее в элюате анти-FLAG антитело, IgG Hc – его тяжелая цепь, IgG Lc – его легкая цепь.

Исследование протеасомной деградации MBP в клетках млекопитающих в присутствии UbK0 и подавления экспрессии E1 (UBA1)

Чтобы подтвердить отсутствие необходимости полиубиквитинилирования для гидролиза MBP в клетках млекопитающих, мы провели ряд экспериментов с использованием тус-слитного UbK0 и малых интерферирующих РНК (siRNA) к E1. UbK0 представляет собой неполимеризуемый вариант убиквитина дикого типа и предотвращает рост полиубиквитиновых цепей, вследствие замены всех функциональных лизинов на аргинин. Лигаза E1 или UBE1⁷¹ известна как активирующий Ub фермент и является первым белком в каскаде полиубиквитинилирования. Клетки HEK293 трансфицировали кДНК, кодирующими Ub или UbK0 (Рис. 4.12А), или же siRNA к E1 (Рис. 4.12В). Спустя 24 часа клетки трансфицировали кДНК, кодирующими MBP, онкобелок с-Мус или орнитиндекарбоксилазу ODC⁷², и далее

⁷¹ от англ. ubiquitin-activating enzyme

⁷² от англ. ornithine decarboxylase

подвергали воздействию циклогексимида. Мы выбрали с-Мус и ODC в качестве функциональных контролей, поскольку протеасомальная деградация с-Мус происходит строго Ub-зависимо, тогда как ODC подвергается гидролизу протеасомой в присутствии белка антизима (AZ^{73}) без участия убиквитина. Как и ожидалось, ко-трансфекция UbK0 или E1 siRNA проводила к ингибированию протеасомального гидролиза и вызывала накопление белка с-Мус. Напротив, деградация ODC была независима от воздействия на систему убиквитинилирования. Более того, по сравнению с белком с-Мус, количество ODC сильно уменьшается в клетках, трансфицированных UbK0, что, скорее всего, связано с отсутствием конкуренции за протеасому со стороны полиубиквитинилированных субстратов.

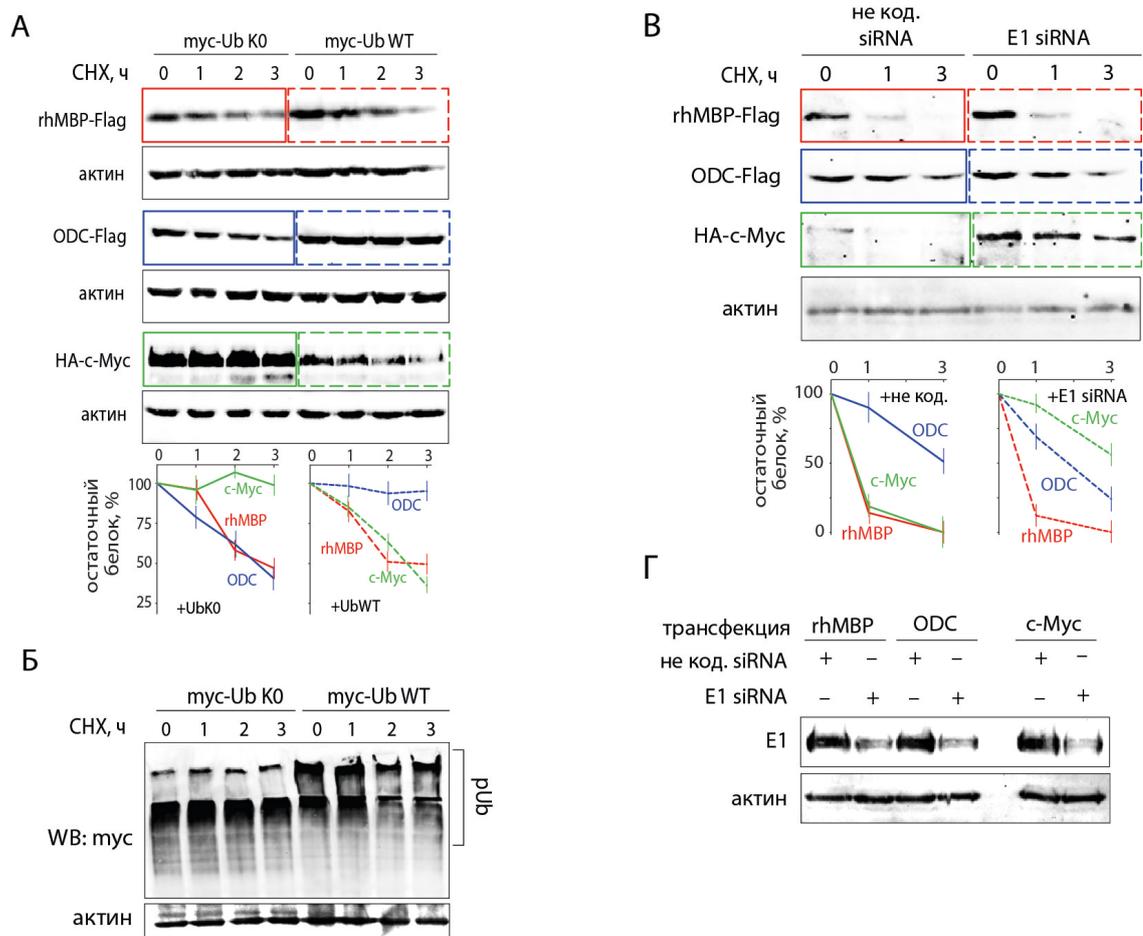


Рисунок 4.12. (А) Вестерн-блоттинг лизатов клеток линии НЕК, трансфицированных генетическими конструкциями, кодирующими вариант убиквитина K0 (UbK0) или убиквитин дикого типа (UbWT), слитных с мус-эпитопом, а также генетическими конструкциями, кодирующими MBP (rhMBP-Flag), с-Мус (HA-c-Мус) или орнитиндекарбоксилазу (ODC-Flag). Здесь и далее приведены различные временные точки обработки клеток циклогексимидом. В качестве контроля процедуры нанесения применяли гибридизацию этой же мембраны с моноклональными антителами к β -актину (актин). (Б) Вестерн-блоттинг тех же клеточных лизатов, что и в (А), гибридизация с анти-мус антителом для наблюдения за накоплением и протеолизом полиубиквитиновых конъюгатов. (В) Вестерн-блоттинг лизатов клеток линии НЕК, трансфицированных генетическими конструкциями, кодирующими MBP, с-Мус или ODC, а также контрольной siRNA и E1 siRNA. (Г) Вестерн-блоттинг тех же клеточных лизатов, что и в (В), гибридизация с антителом к лигазе E1.

⁷³ от англ. antizyme

В соответствии с нашими предыдущими наблюдениями, МВР подвергался деградации протеасомой при любых условиях, независимо от ингибирующего воздействия на её отдельные компоненты.

Для исследования протеасомной деградации МВР в клетках, являющимися специализированными носителями этого белка в организме, мы использовали зрелые мышинные олигодендроциты. Культивированные клетки преимущественно экспрессировали олигодендроцит-специфический белок (OSP⁷⁴), тогда как присутствие глиального фибриллярного кислого белка (GFAP⁷⁵) – маркера астроцитов – наблюдалось в значительно меньшей степени. Олигодендроциты были транзистентно котрансфицированы кДНК, кодирующей МВР или с-Мус, вместе с кДНК, кодирующей UbWT и UbK0. Аналогично экспериментам в клетках НЕК293, МВР подвергался гидролизу протеасомами с равной скоростью в присутствии неполимеризуемого UbK0 и Ub дикого типа (Рис. 4.13А). Напротив, деградация с-Мус в значительной степени замедлялась в присутствии UbK0. В совокупности наши данные убедительно свидетельствуют о способности МВР, подобно ОДС, подвергаться гидролизу протеасомой в клетках млекопитающих без предварительного убиквитинилирования.

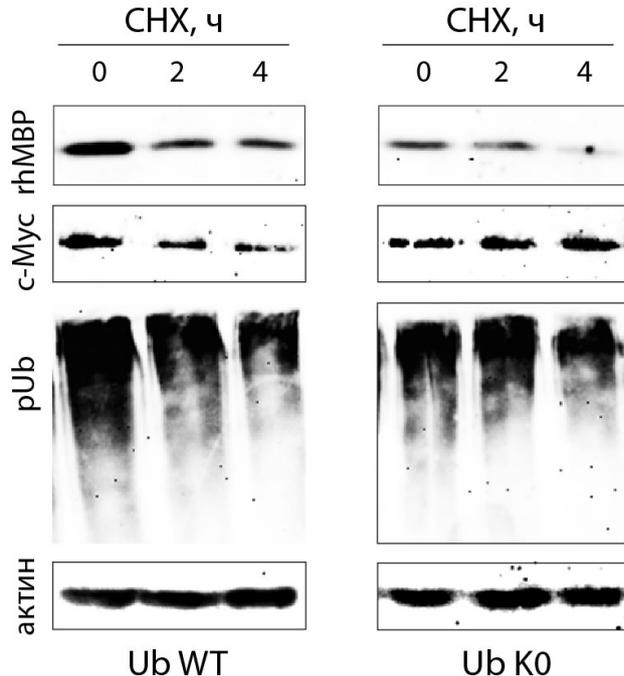


Рисунок 4.13 Протеолиз МВР в культуре олигодендроцитов. Вестерн-блоттинг лизатов олигодендроцитов, трансфицированных генетическими конструкциями, кодирующими вариант убиквитина K0 (UbK0) или убиквитин дикого типа (UbWT), слитных с тус эпитопом, а также генетическими конструкциями, кодирующими белки rhMBP-Flag или HA-с-Мус. pUb. – гибридизация с антителом, специфичным к полиубиквитиновым конъюгатам.

⁷⁴ от англ. Oligodendrocyte-specific protein

⁷⁵ от англ. Glial Fibrillary Acidic Protein

Определение концентрационного диапазона, в котором возможен Ub-независимый протеолиз MBP протеасомой

На следующем этапе мы оценили, может ли MBP быть модифицирован Ub *in vitro* в восстановленной бесклеточной системе. Нами было показано, что ни экстракт клеток HeLa, ни экстракт головного мозга BALB/c не были способны в значительной степени подвергать бычий MBP убиквитинилированию (**Рис. 4.14А**). Тем не менее, вестерн-блоттинг показал наличие полиубиквитиновых конъюгатов, не связанных с MBP, что подтверждает, что в целом система полиубиквитинилирования функционировала. Мы смогли обнаружить следы моно- и ди-убиквитинилированных производных MBP только в присутствии убиквитин-альдегида (UbAl⁷⁶) – высокоэффективного ингибитора DUBs. Чтобы обнаружить возможную связь между убиквитинилированием MBP и протеасомной деградацией, мы далее исследовали процесс деградации MBP протеасомой в бесклеточной системе. В соответствии с нашими предыдущими наблюдениями, *in vitro* протеолиз MBP в присутствии экстракта HeLa не зависел от добавления рекомбинантного убиквитина (**Рис. 4.14Б**). Было высказано предположение, что концентрация эндогенного убиквитина в экстрактах HeLa достаточна для поддержания протеолиза MBP протеасомой. Далее мы показали отсутствие эффекта от добавления неполимеризуемого метилированного убиквитина на деградацию очищенного рекомбинантного MBP человека в присутствии экстракта мозга BALB/c (**Рис. 4.14В**). Чтобы исключить так называемое поли-моно-убиквитинилирование, аналогичное процессингу p105, мы использовали максимально упрощенную бесклеточную систему для протеолиза *in vitro* с использованием трехкомпонентной смеси: MBP, АТФ и высокоочищенной 26S-протеасомы. Наши данные свидетельствуют, что MBP, в отличие от других белков, эффективно подвергается гидролизу протеасомой в отсутствие каких-либо компонентов системы убиквитинилирования и собственно убиквитина (**Рис. 4.14Г**). Контрольные белки BSA, тиоредоксин и лизоцим, последний из которых особо чувствителен к малейшим следам системы убиквитинилирования, в аналогичных условиях проявляли полную устойчивость к протеасом-опосредованному протеолизу в течение 24 часов.

⁷⁶ от англ. Ubiquitin-Aldehyde

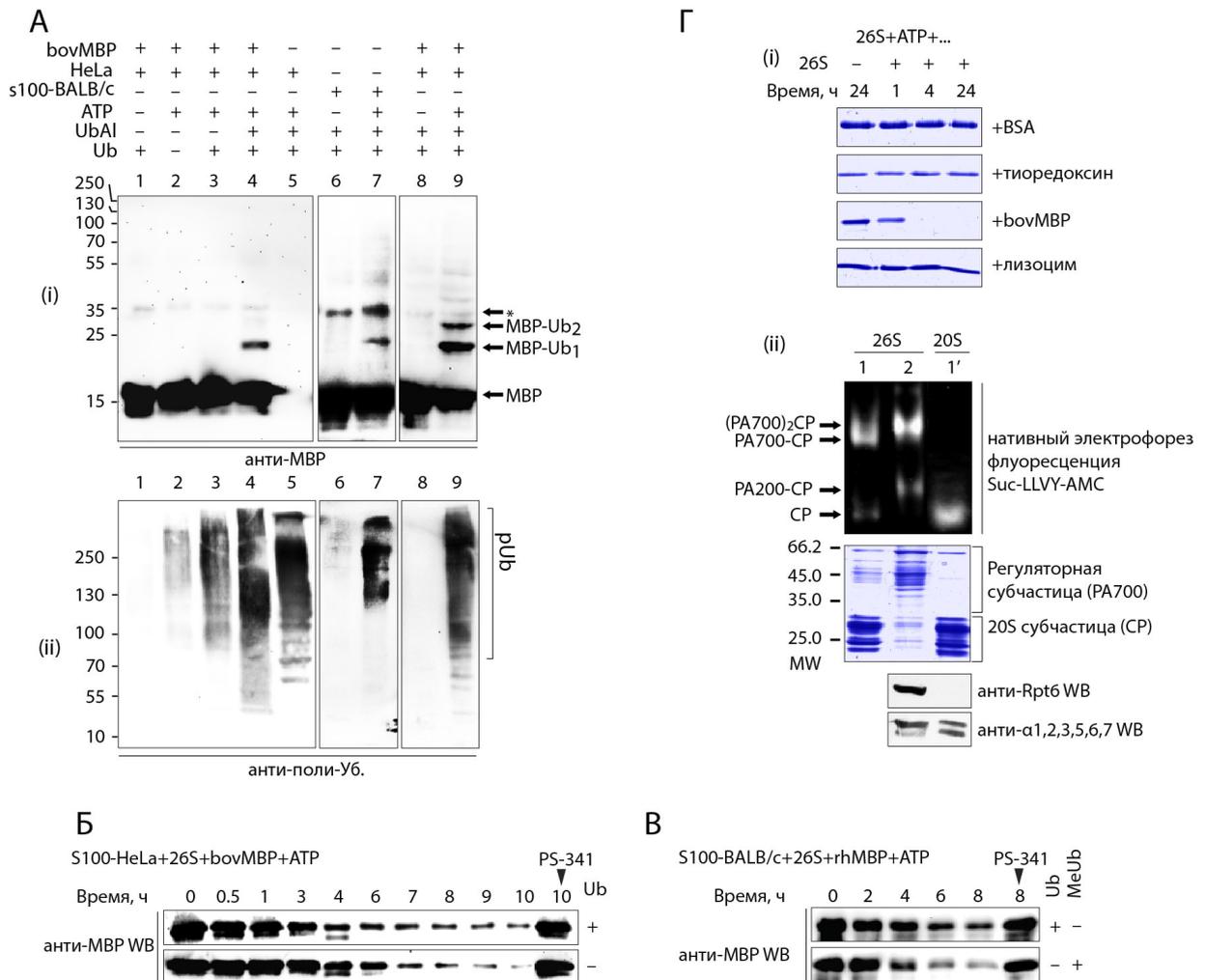


Рисунок 4.14. (А) Вестерн-блоттинг продуктов реакции *in vitro* убиквитинилирования. Состав реакционной смеси для каждого случая обозначен в таблице сверху: bovMBP – MBP из мозга коровы, HeLa – S100-экстракт из клеток линии HeLa, S100-BALB/c – S100-экстракт из головного мозга мышей линии BALB/c, UbAl – убиквитин-альдегид, Ub – убиквитин. Приведена гибридизация с антителами, специфичными к MBP (вверху) и полиубиквитиновым конъюгатам (внизу) (Б) Гидролиз MBP 26S протеасомой *in vitro* в присутствии системы убиквитинилирования с добавлением (сверху) или без (снизу) убиквитина. (В) Гидролиз MBP 26S протеасомой *in vitro* в присутствии системы убиквитинилирования с добавлением немодифицированного (Ub) и метилированного (MeUb) убиквитина (Г) (i) Электрофоретическое разделение в ПААГ гидролизатов различных белков очищенным препаратом 26S протеасомы (ii) Анализ состава субъединичного состава очищенных препаратов протеасомы, сверху-вниз электрофоретическое разделение в нативном и денатурирующих ПААГ, вестерн-блоттинг с использованием соответствующих антител.

Анализ зависимости скорости гидролиза MBP от его концентрации в реакционной смеси выявил значительное снижение скорости расщепления MBP протеасомой при его концентрации менее 200 нМ. Ранее опубликованные данные свидетельствуют об ускорении деградации MBP протеасомой при его модификации убиквитином, что предположительно объясняется наномолярной концентрацией йодированного MBP в реакционной смеси. Чтобы выяснить чувствительность MBP к протеасомному гидролизу в диапазоне наномолярных концентраций, мы получили белки MBP и p105, меченые ^{35}S -Met (Рис. 4.15А). MBP при концентрациях в пределах десятков наномолей на литр не подвергался протеолизу и убиквитинилированию в

присутствии рекомбинантных убиквитин-лигаз E1 и E2(5c) или экстракта HeLa (**Рис. 4.15Б**). Чтобы прояснить, не является ли отсутствие убиквитинилирования причиной стабильности МВР, нами был проведен поиск условий, в которых полиубиквитинирование МВР возможно. Мы обнаружили, что экстракт HeLa с добавлением экзогенной лигазы E1 обеспечивал полиубиквитинирование МВР (**Рис. 4.15В**). Детальное исследование этого процесса показало, что, как и в случае p105, полиубиквитинирование МВР является АТФγS-зависимым и находится в прямой зависимости от добавления экзогенного убиквитина (**Рис. 4.15Г и 4.15Д**). Гидролиз МВР протеасомой в найденных условиях также был убиквитин-зависим (**Рис. 4.15Е**). Таким образом, наши данные свидетельствуют, что МВР эффективно подвергается гидролизу протеасомой в отсутствие Ub при концентрациях более 200 нМ, тогда как при более низких концентрациях возникает необходимость в его полиубиквитинировании.

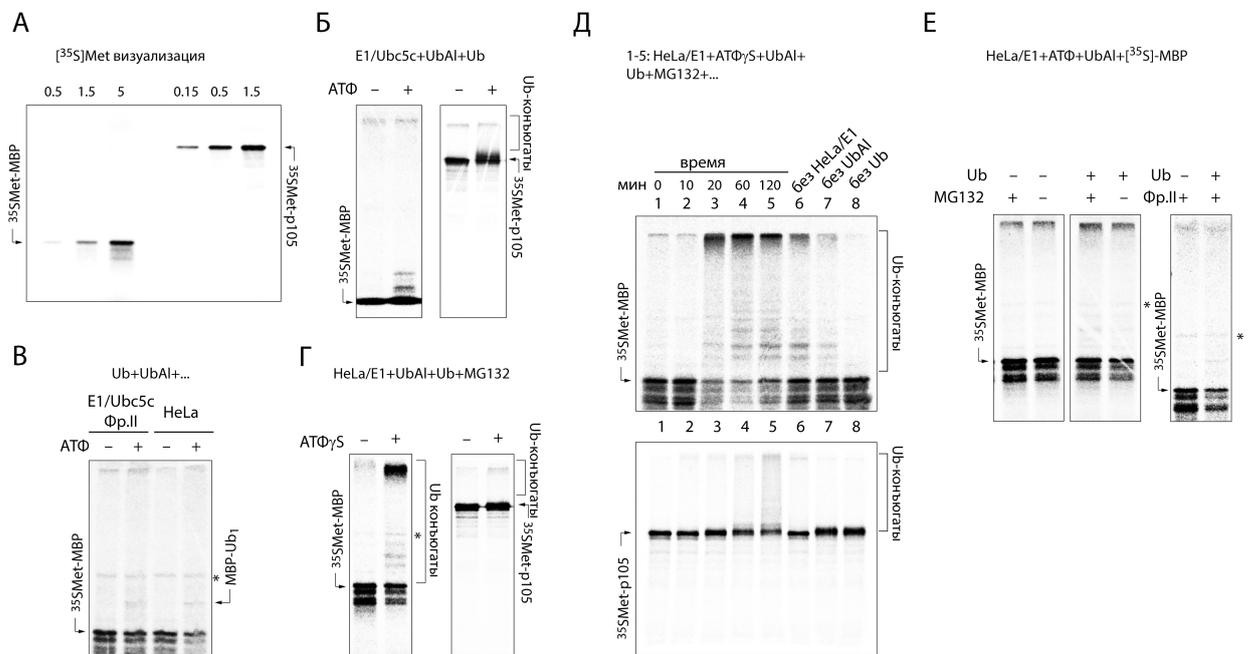


Рисунок 4.15 (А) Бесклеточная Т7-ТnТ экспрессия белков p105 и rhMBP. Реакционные смеси наносили на ПААГ, высушивали и визуализировали с помощью PhosphorImager. (Б-Г) К рекомбинантным rhMBP и p105, меченных метионином [35S]Met, добавляли E1/Ubc5c вместе с Ub и убиквитин-альдегидом в присутствии или отсутствии АТФ (Б); E1/Ubc5c вместе с Ub, фракцией II и убиквитин-альдегидом в присутствии или отсутствии АТФ (В, слева); и экстракт клеток HeLa вместе с E1, Ub, убиквитин-альдегидом и MG-132 в присутствии или отсутствии АТФγS (Г). (Д) Рекомбинантные rhMBP и p105 убиквитинировали в бесклеточной системе в присутствии экстракта клеток HeLa с добавлением E1, АТФγS, убиквитин-альдегида, Ub и MG-132. Реакцию останавливали в указанных временных точках и реакцию наносили на ПААГ (дорожки 1-5). В дорожках 6-8 нанесены реакционные смеси (120 мин) без указанных компонентов. (Е) Деградация рекомбинантного rhMBP протеасомой в бесклеточной системе, содержащей экстракт клеток HeLa или E1, а также фракцию II, в присутствии или отсутствии Ub или MG-132.

Изучение эффекта химической и ферментативной модификации МВР на его гидролиз протеасомой.

МВР имеет аномальное значение изоэлектрической точки (pI^{77}) более 11.5, что указывает на возможное участие заряда белка в реакции протеасомного гидролиза. Увеличение ионной силы реакционной смеси путем добавления 20 мМ $MgCl_2$ полностью подавляло деградацию МВР, опосредованную протеасомой. МВР является субстратом пептидиларгининдеиминазы (PAD^{78}) [313], а деиминированный МВР является отличительной чертой острых форм РС [314]. Чтобы дополнительно валидировать эффект снижения положительного заряда МВР, мы осуществили химическое ацетилирование и ферментативное деиминирование МВР путем обработки PAD (Рис. 4.16). Детектированное нами увеличение времени удерживания и сдвиг полосы белка в нативном полиакриламидном геле подтвердили факт снижения положительного заряда МВР, обработанного уксусным ангидридом и PAD . Оба метода понижения общего заряда МВР приводили к повышению резистентности МВР к протеасомному гидролизу.

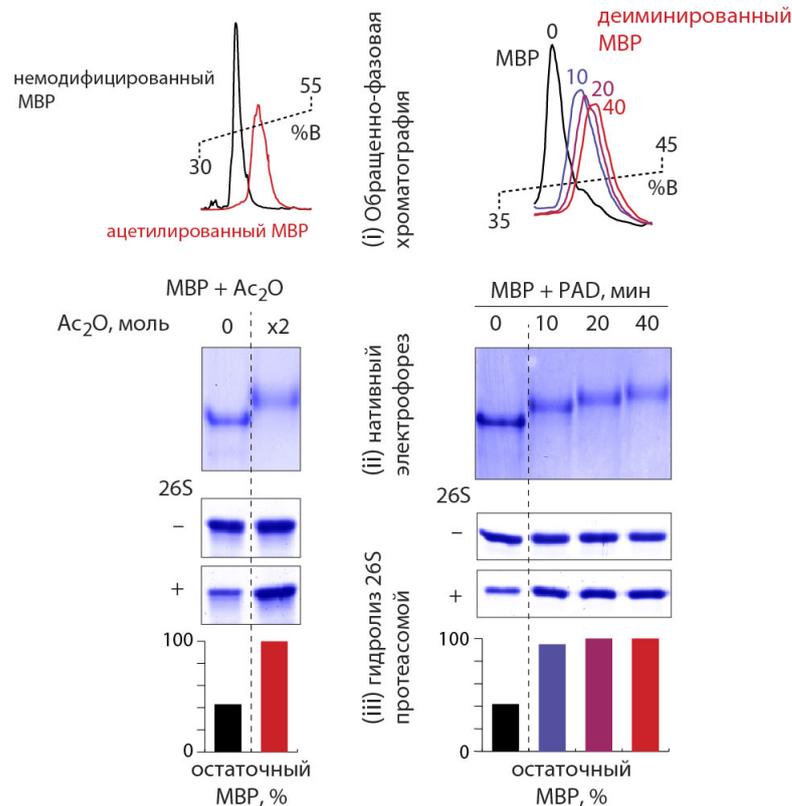


Рисунок 4.16. Снижение поверхностного положительного заряда МВР путем ацетилирования (слева) и деиминирования (справа) и гидролиз полученных модифицированных форм МВР очищенным препаратом 26S протеасомы. Степень протеолиза определяли электрофоретическим разделением реакционной смеси в ПААГ с последующим денситометрическим анализом.

⁷⁷ от англ. Isoelectric point

⁷⁸ от англ. peptidylarginine deiminase

Поиск структурных детерминант в составе МВР, опосредующих его захват протеасомой.

Для более явного подтверждения, является ли основной заряд движущей силой гидролиза МВР протеасомой, мы создали три варианта МВР (**Рис. 4.17А**): (i) вариант МВР тип [R], в котором все 12 остатков лизина были замещены на остатки аргинина, (ii) вариант МВР тип [6Q], который является рекомбинантным «квази-дииминированным» аналогом природного изомера МВР С8 и имеет шесть замен остатков аргинина на остатки глутаминовой кислоты в позициях, где обнаруживается цитруллин у пациентов с РС, и (iii) вариант МВР [9Q], который представляет собой «рационально квази-дииминированный» вариант МВР с девятью заменами остатков аргинина на остатки глутамина. Варианты МВР были наработаны в бактериальных клетках и далее очищены. Электрофорез в ПААГ, проведенный в нативных условиях (**Рис. 4.17Б**) подтвердил, что, как и ожидалось, общий основной заряд вариантов МВР уменьшался в порядке [R] - [WT] - [6Q] - [9Q]. Инкубация вариантов МВР с очищенной протеасомой выявила, что скорость их гидролиза положительно коррелирует со значением их основного заряда (**Рис. 4.17В**). Вариант МВР [R] подвергался деградации быстрее, чем [WT], тогда как скорость гидролиза вариантов [6Q] и [9Q] была значительно снижена. Чтобы создать альтернативу МВР – совершенно другой белок с точно таким же аминокислотным составом, мы получили кДНК, кодирующую последовательность МВР в обратном порядке от С- до N-конца. Важно отметить, что сам МВР и его «зеркальный» двойник были одинаково восприимчивы к внутриклеточной протеасомной деградации (**Рис. 4.17Г**).

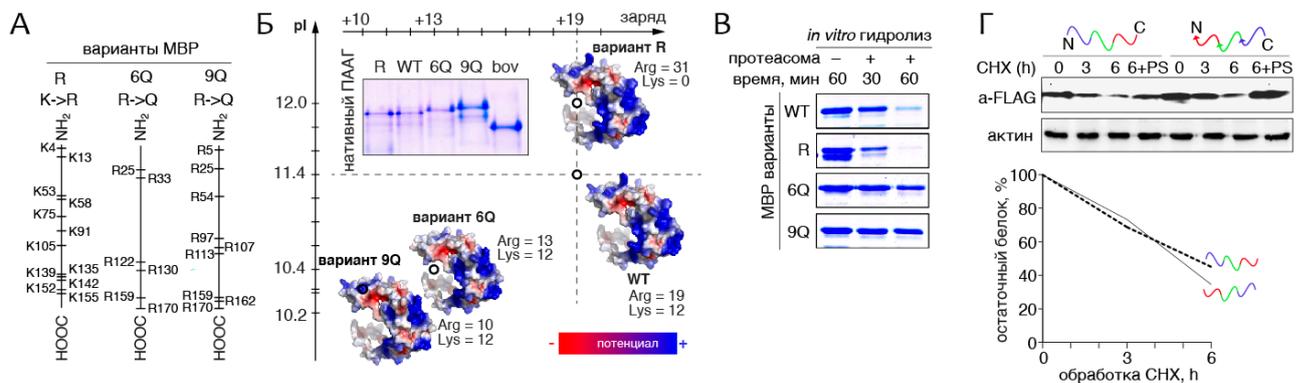


Рисунок 4.17 (А) Аминокислотные замены в полученных вариантах МВР по сравнению с белком дикого типа. (Б) Варианты МВР, расположенные в координатах тотального заряда белка и теоретической изоэлектрической точки. Структуры, созданные программным обеспечением PyMOL (предсказанная модель основного белка миелина человека, PDB ID 1QCL), демонстрируют поверхностный электростатический потенциал вариантов МВР. (В) Гидролиз рекомбинантного человеческого МВР дикого типа и его вариантов очищенными протеасомами *in vitro*. (Г) Клетки НЕК293 трансфицировали кДНК, кодирующей МВР и его «зеркальным» вариантом. Через 24 часа клетки обрабатывали циклогексимидом и инкубировали указанное время, далее клетки лизировали и анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против 3FLAG-эпитопа и актина.

MBP принадлежит к большой когорте так называемых природно неупорядоченных белков (IDP⁷⁹) [315], его пространственная структура все еще не определена и, вероятно, никогда не будет разрешена [316]. Чтобы определить в структуре MBP местоположение прямого протеасомного сигнала (DPS⁸⁰), опосредующего Ub-независимый гидролиз MBP протеасомой, мы выделили в его составе три участка 1-55 (MBP1), 56-110 (MBP2) и 111-170 (MBP3). Слияние каждого из этих трех фрагментов MBP с дигидрофолатредуктазой (DHFR⁸¹) [317] приводило к разрушению DHFR протеасомой. MBP1 и MBP3 эффективно перенацеливали слитый белок на протеасомную деградацию, тогда как гидролиз MBP2-DHFR-EMB1 протеасомой был детектируемым, но значительно менее эффективным (**Рис. 4.18А**).

Затем мы создали ряд вариаций фрагментов MBP 1-3, в которых мы уменьшили (MBP1 и MBP3) или, наоборот, увеличили (MBP2) основной заряд. Замена основных аминокислот на нейтральные или анионные значительно снижала скорость внутриклеточного гидролиза вариантов MBP1 и MBP3 (**Рис. 4.18Б i, iii**), тогда как обратное замещение анионных аминокислот на основные в значительной степени усиливало деградацию фрагмента MBP2 (**Рис. 4.18Б ii**). Важно отметить, что равномерное распределение основного заряда вместо генерации одного сильно заряженного кластера было более эффективным в терминах протеасомного гидролиза (**Рис. 4.18В**). В целом эти данные свидетельствуют о том, что имеется по меньшей мере два участка DPS, расположенных в N- и C-концевых частях MBP, которые зависят от брутто состава аминокислот, и в существенно меньшей степени от их линейной последовательности.

На следующем этапе мы исследовали наиболее оптимальное позиционирование DPS относительно белка-носителя. Для этого мы отслеживали деградацию DHFR, слитую на N-конце с активным сигналом деградации MBP1, помещенным до или после пассивного фрагмента MBP2. Порядок фрагментов MBP, слитых с DHFR-EMB1, значительно изменил его результирующую стабильность. Например, химера MBP1-MBP2, за которыми следует DHFR-EMB1, была значительно более стабильна по сравнению с MBP2-MBP1-DHFR-EMB1 (**Рис. 4.18Г**). Частично фрагментированные продукты в случае внутриклеточной деградации MBP2-MBP1-DHFR-EMB1, явно отсутствующий в случае MBP1-DHFR-EMB1, соответствуют N-концевому усечению протеасомой фрагмента MBP2.

⁷⁹ от англ. Intrinsically Disordered Proteins

⁸⁰ от англ. Direct Proteasome Signal

⁸¹ от англ. dihydrofolate reductase

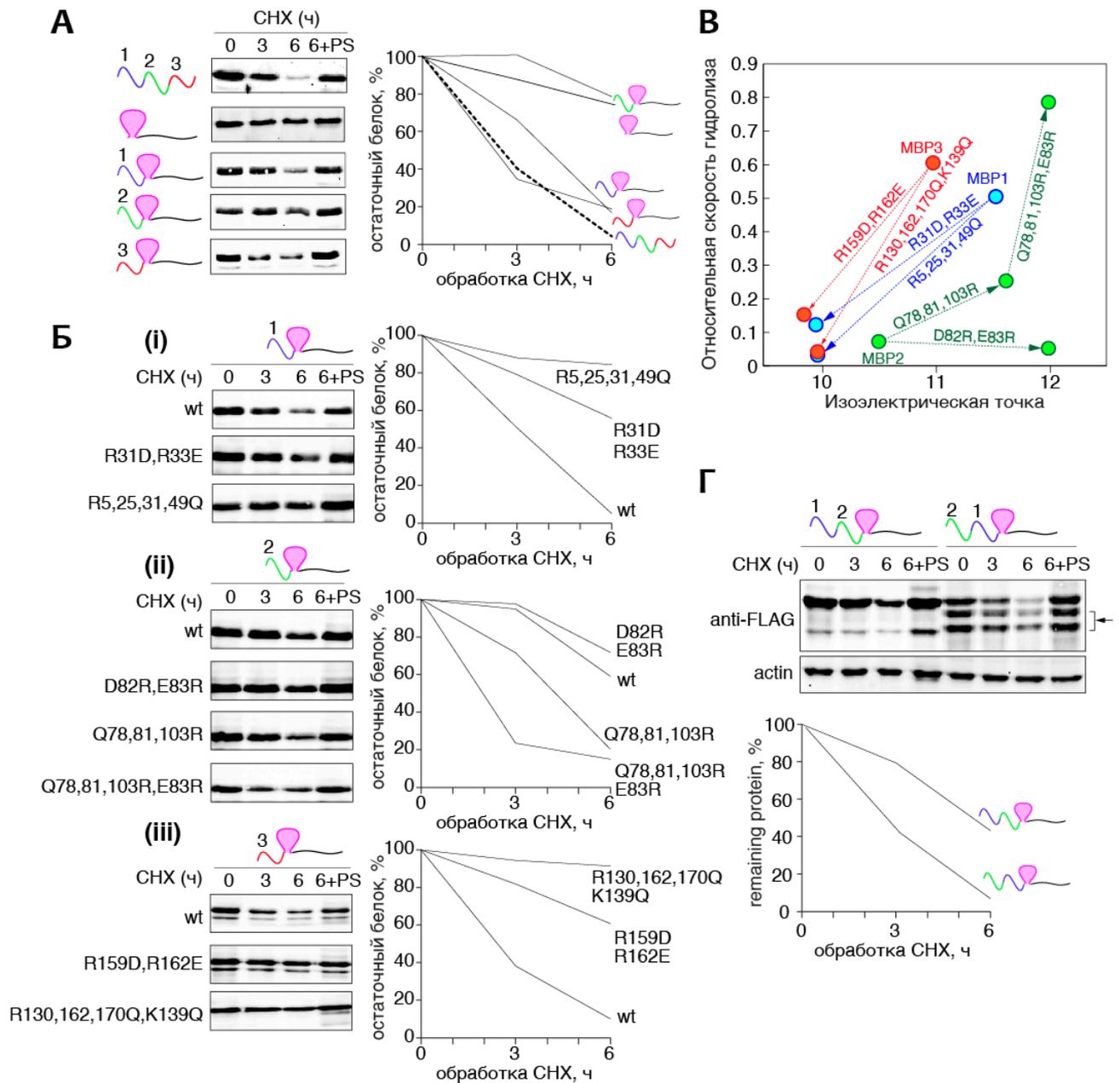


Рисунок 4.18 (А и Б) Клетки HEK293 трансфицировали кДНК, кодирующей фрагменты MBP и их варианты, слитные с DHFR, через 24 часа клетки обрабатывали циклогексимидом и инкубировали указанное время, далее клетки лизировали и анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антител против 3FLAG-эпитопа и актина. **(В)** График зависимости между относительной скоростью гидролиза слитных белков фрагментов MBP с DHFR и Emb1(1-60) от изоэлектрической точки. **(Г)** Клетки HEK293 трансфицировали кДНК, кодирующей слитные белки фрагментов MBP1 и MBP2, расположенные в разной последовательности, с DHFR и Emb1(1-60), и далее анализировали как описано выше.

Конструирование искусственных миелин-подобных дегронов.

В настоящей работе мы показали, что композиция аминокислот нежелательно конкретная аминокислотная последовательность приводит к способности MBP подвергаться Ub-независимому гидролизу протеасомой. На следующем этапе мы попытались разработать искусственный MBP-подобный DPS. Для этого мы проанализировали аминокислотный состав MBP (**Рис. 4.19А**) в сравнении с нормальным распределением аминокислот в протеоме человека

[318]. Для создания искусственного DPS использовались аминокислоты, процент которых был аномально высоким (**Рис. 4.19А, вставка**). Белок DHFR, удлинённый с С-конца 60-аминокислотным неструктурированным фрагментом белка EMB1, использовали в качестве носителя искусственного DPS, состоящего из девяти повторов 7-аминокислотного фрагмента, названного BEAD⁸² (**Рис. 4.19Bi**). Нами была исследована деградация двух типов BEAD, содержащих в качестве основных якорей остатки лизина и аргинина (тип [KR]) или исключительно аргинин (тип [R]) (**Рис. 4.19Bii**). BEADs обоих типов [R] и [KR] успешно придали DHFR способность подвергаться гидролизу протеасомой. В то же время замена остатков аргинина на глутамин (тип [Q]) значительно уменьшала скорость внутриклеточной деградации слитной с DHFR химеры. Внутриклеточная деградация DHFR, слитной с BEADs, подобно UBL, не зависела от ко-трансфекции кДНК, кодирующей UbK0. В полном соответствии с этими наблюдениями полиубиквитинилирование BEADs-содержащих химерных белков не было обнаружено.

Чтобы определить минимальное количество повторов BEADs, достаточное для взаимодействия с протеасомой, мы создали панель субстратов, представляющих собой DHFR, слитную с различным количеством повторов BEAD (**Рис. 4.19Bi**). Мониторинг их внутриклеточной деградации показал, что 3 повтора BEAD были минимальным сигналом деградации, тогда как оптимальное количество повторов BEADs оценивалось от 3 до 7, что в свою очередь соответствует 21-49 аминокислотам (**Рис. 4.19Bii**). Интересно, что ингибирование протеасомы в процессе внутриклеточной деградации BEAD-DHFR приводило к накоплению частично процессированного субстрата, наиболее вероятно представляющего собой DHFR с полностью транскрированными повторами BEADs.

Манипуляции с зарядом фрагментов MBP показали, что распределенный по последовательности основной заряд более выгоден с точки зрения гидролиза протеасомой, чем объединенный аргининовый кластер. Чтобы проверить, воспроизведется ли это наблюдение в случае BEADs, мы создали две вариации BEADs типа [R], в которых 6 аргининов были расположены в центре 35-аминокислотного DPS или, альтернативно, были равномерно распределены по его длине. В соответствии с полученными данными можно однозначно утверждать, что кластеризация положительно заряженных якорных остатков существенно менее предпочтительна в сравнении с их делокализацией (**Рис. 4.19Biii**).

⁸² от англ. Basic Elementary Autonomous Degron

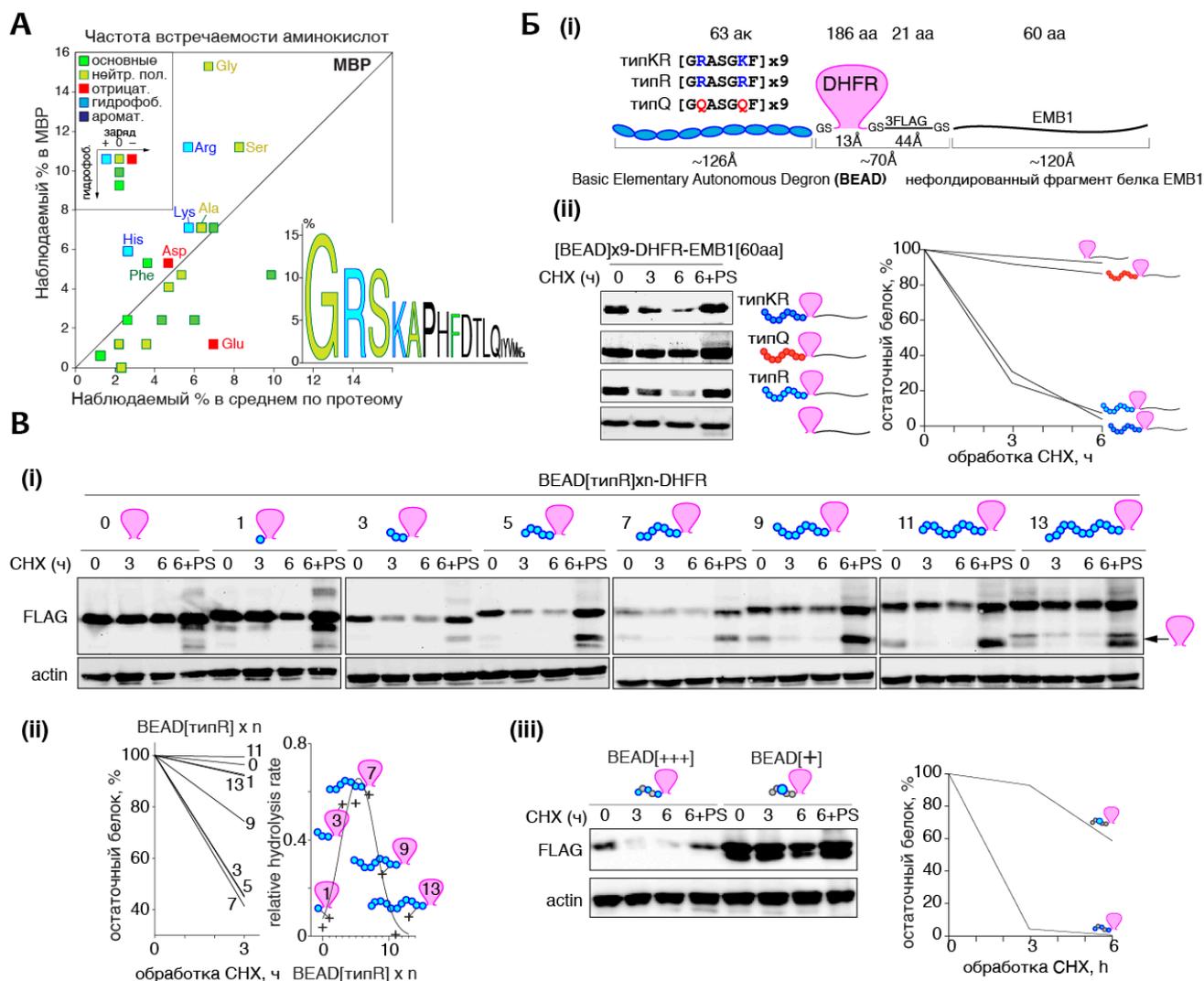


Рисунок 4.19 (А) Анализ частоты встречаемости аминокислот в последовательности MBP по сравнению с протеомом человека. **(Б) (1)** Дизайн модельных субстратов, содержащих созданные дегроны, слитые с DHFR и Emb1(1-60). **(2)** Клетки HEK293 трансфицировали кДНК, кодирующими слитые белки разработанных дегронов с DHFR и Emb1(1-60), через 24 часа клетки обрабатывали CHX, далее клетки лизировали в указанные временные промежутки и анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антител против 3FLAG-эпитопа. Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка. **(В) (i)** Клетки HEK293 трансфицировали генетическими конструкциями, кодирующими слитые белки DHFR с различным количеством BEAD повторов ($n=0-13$), через 24 часа клетки обрабатывали CHX и инкубировали указанные временные промежутки, далее клетки анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против 3FLAG-эпитопа. **(ii)** Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка. **(iii)** Клетки HEK293 трансфицировали генетическими конструкциями, кодирующими слитые белки DHFR с делокализованными [+++] и кластеризованными [+] остатками аргинина, через 24 часа клетки обрабатывали CHX и инкубировали указанные временные промежутки, далее клетки анализировали, как указано в **(А)**.

Определение типа регуляторной субчастицы и субъединицы протеасомы, осуществляющей первичное связывание MBP.

На следующем этапе нашей задачей было найти субъединицу протеасомы, которая осуществляет прямой захват MBP. Чтобы гарантировать, что наши последующие манипуляции не изменят общую экспрессию белка и глобальный клеточный метаболизм, MBP-кодирующая последовательность ДНК была интегрирована в кассету, содержащую внутренний сайт посадки

рибосомы (IRES⁸³), фланкированную последовательностью ДНК, кодирующей зеленый флуоресцентный белок ZsGreen (Рис. 4.20А). В результате экспрессия MBP была синхронизирована с экспрессией ZsGreen. Чтобы исключить возможность ингибирования или активации общего пула протеасом, мы получили клетки линии HEK293, экспрессирующие искусственный Ub-зависимый субстрат – белок ZsGreen1, N-терминально слитый с Ub. Внутриклеточная экспрессия химерного белка Ub-ZsGreen ожидаемо изменялась в ответ на добавление циклогексимида, анисомицина, ингибитора протеасомы PS-341 и ингибитора DUBs PYR-41 (Рис. 4.20Б).

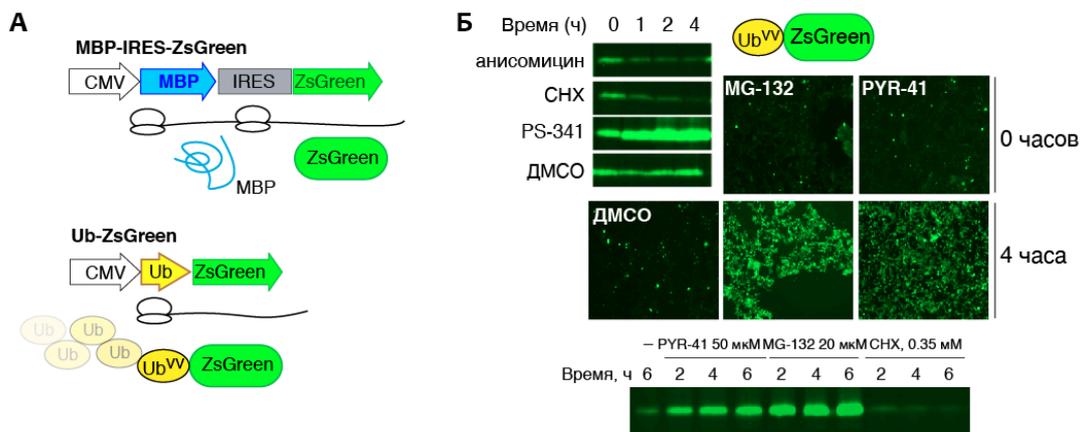


Рисунок 4.20 (А) Упрощенная схема лентивирусных конструкций MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen1. **(Б)** Клетки HEK293 трансфицировали указанными генетическими конструкциями, через 24 часа клетки обрабатывали циклогексимидом, анисомицином, PS-341 или ДМСО и инкубировали указанные промежутки времени, затем клеточные лизаты анализировали с помощью визуализации флуоресценции в ПААГ.

Далее мы проверили, требуется ли АТФ для внутриклеточного гидролиза MBP. Чтобы выяснить это, мы истощали внутриклеточный АТФ путем введения смеси 2-дезоксид-Д-глюкозы и 2,4-динитрофенола. В отличие от белка Ub-ZsGreen, гидролиз MBP все еще обнаруживался, и что еще более удивительно, истощение АТФ приводило к значительной потере стартового количества внутриклеточного MBP (Рис. 4.21А). Ингибирование протеасомы путем добавления PS-341 на фоне недостатка АТФ приводило к значительному количеству процессированного MBP, усеченного на N-конце – продукту, который мы не обнаружили ни в каких других условиях.

Наблюдаемая Ub- и АТФ-независимость протеасом-опосредованной деградации MBP свидетельствует о об отсутствии значимости 19S-регуляторной субчастицы в этом процессе. Саката с соавторами [319] показали, что 26S-протеасома, лишенная Rpn10 или Rpn13, несет в основном тот же 19S регуляторный комплекс, тогда как подавление экспрессии hRpn2 приводит

⁸³ от англ. Internal Ribosome Entry Site

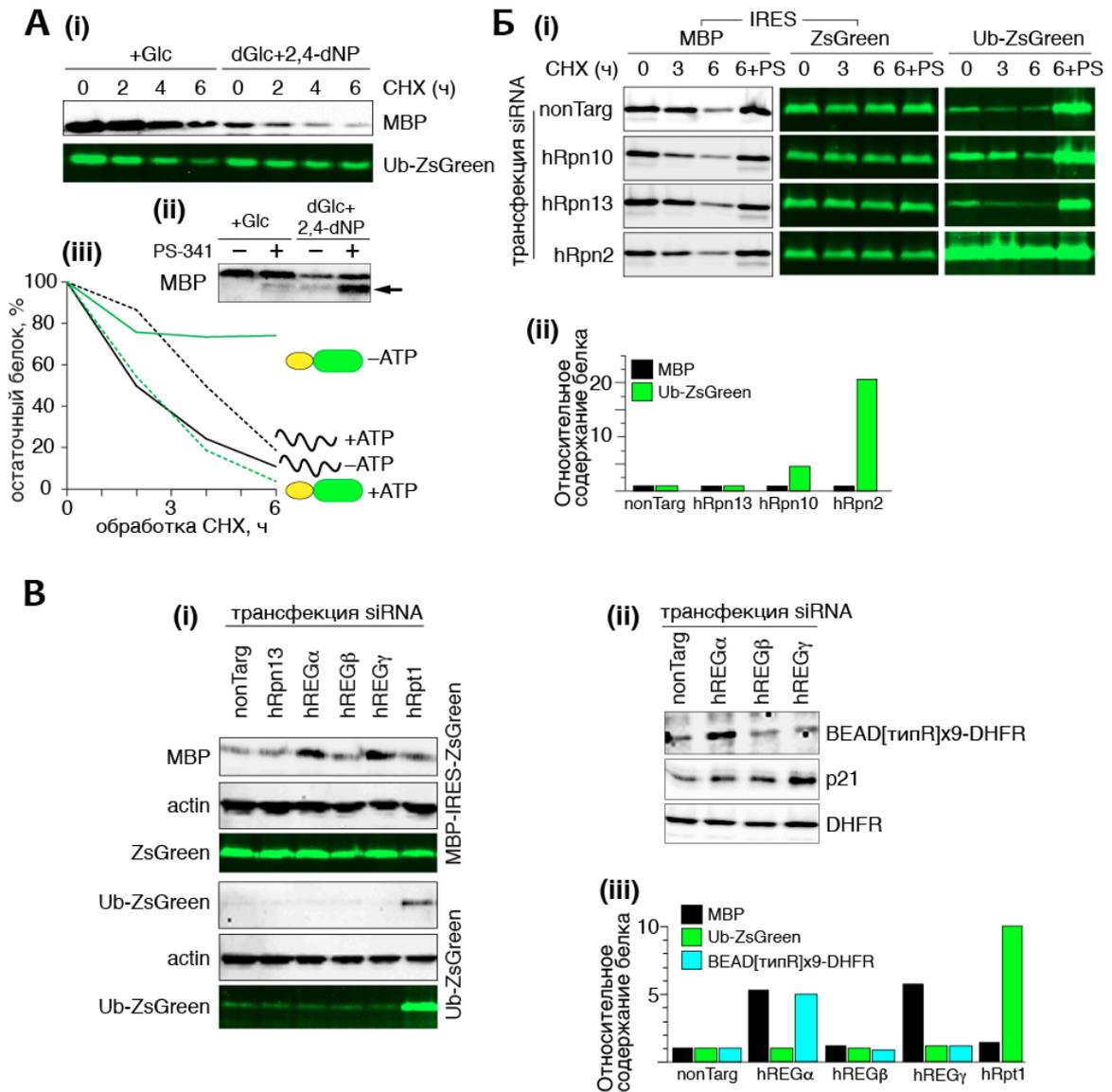


Рисунок 4.21 (А) (i) Внутриклеточный гидролиз MBP и Ub-ZsGreen1 в клетках HEK293 в нормальных условиях (Glc) и при удалении ATP [инкубация с 2-дезоксид-глюкозой (dGlc) и 2,4-динитрофенолом (2,4-dNP)]. (ii) Образование частично процессированного продукта MBP. (iii) Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка. **(Б)** (i) Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen, трансфицировали siRNA к указанным субъединицам 19S регуляторного комплекса. Через 48 часов клетки обработали циклогексимидом и инкубировали в течение указанных промежутков времени. Далее клеточные лизаты анализировали на предмет флуоресценции в ПААГ, а также иммуноблоттингом с использованием антител против 3FLAG-эпитопа. (ii) Относительное количество белка рассчитывали как отношение количества белка в клетках, трансфицированных соответствующими siRNA, к количеству белка в клетках, трансфицированных контрольными siRNA (nonTarg). **(В)** (i) Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen, трансфицировали siRNA к указанным субъединицам REG, а также субъединицам Rpt1 и Rpn13. Через 48 часов клетки обработали циклогексимидом и инкубировали в течение указанных промежутков времени. Далее клетки анализировали как указано выше; (ii) Клетки HEK293, трансфицировали конструкциями, кодирующими p21, DHFR или BEAD[R]-DHFR, через 24 часа клетки дополнительно трансфицировали siRNA к субъединицам REG и далее анализировали, как указано выше. (iii) Оценку относительного количества белка проводили, как описано выше.

к появлению протеасомного комплекса, содержащего только гексамерное АТФазное кольцо [320] – аналога дрожжевого PAN⁸⁴. Мы провели трансфекцию клеток НЕК293 siRNA, подавляющих экспрессию человеческих ортологов Ub-рецепторов hRpn10, hRpn13 или hRpn2. Как и ожидалось, Ub-ZsGreen в значительной степени накапливался при трансфекции siRNA, подавляющих экспрессию hRpn10 и hRpn2, тогда как количество белка ZsGreen было стабильным в присутствии всех исследованных siRNA (**Рис. 4.21Б**). Подавление экспрессии ни одной из трех субъединиц hRpn2/10/13 не оказало заметного влияния на протеасомальный гидролиз MBP (**Рис. 4.21Б**).

Затем мы проверили вклад других регуляторных частиц, известных как PA28 или 11S/REG, образующих гептамер [321], который стыкуется с 20S протеолитическое ядром в АТФ-независимом режиме. Результаты трансфекции siRNA, подавляющих экспрессию REG, свидетельствуют, что MBP накапливается в случае siRNA к REG α и REG γ , но не REG β (**Рис. 4.21Bi**). Количество Ub-ZsGreen, наоборот, не изменялось при ингибировании синтеза субъединиц REG, тогда как подавление синтеза АТФазы Rpt1 значительно увеличивало его внутриклеточную концентрацию (**Рис. 4.21Bi**). Затем мы оценили, зависит ли деградация BEADs от REG субъединиц. Подобно MBP, количество BEADs-DHFR было увеличено в клетках, трансфицированных REG α siRNA, тогда как белок p21, который, как известно, подвергается гидролизу REG γ -20S протеасомами [141], накапливался только при подавлении экспрессии REG γ (**Рис. 4.21Bii**).

Трансфекция клеток НЕК293, экспрессирующих MBP, различными количествами кДНК, кодирующими субъединицы REG, показала, что суперэкспрессия REG α и REG γ очевидно увеличивала скорость внутриклеточного гидролиза MBP (**Рис. 4.22А**). Известно, что α - и β -субъединицы субчастицы REG образуют гетерогептамер, поэтому мы ко-трансфицировали кДНК, кодирующую REG α/β субъединицы, тем не менее каких-либо синергетических эффектов на внутриклеточный гидролиз MBP не наблюдалось.

Детальный анализ аминокислотной последовательности субъединиц REG типа (**Рис. 4.22Б**) и доступной пространственной структуры гептамера REG α [321] показал, что гибкие петли каждого из семи REG-мономеров обогащены полярными аминокислотами, включая кластеры аспартата и глутамата с результирующим $pI \approx 5.0$. Эти данные натолкнули нас на мысль, что основной заряд, присущий MBP и BEADs, должен иметь антипода в структуре REG анионного характера. Трансфекция MBP-экспрессирующих клеток линии НЕК293 кДНК, кодирующей REG α без гибкой полярной петли, замещенной SG-линкером (REG $\alpha\Delta$), по сравнению с REG α

⁸⁴ от англ. Proteasome-Activating Nucleotidase

дикого типа, привела к повышению стабильности MBP (**Рис. 4.22В**). При этом важно отметить, что и дикий тип, и REG $\alpha\Delta$ активируют протеасому с одинаковой эффективностью (**Рис. 4.22Г**).

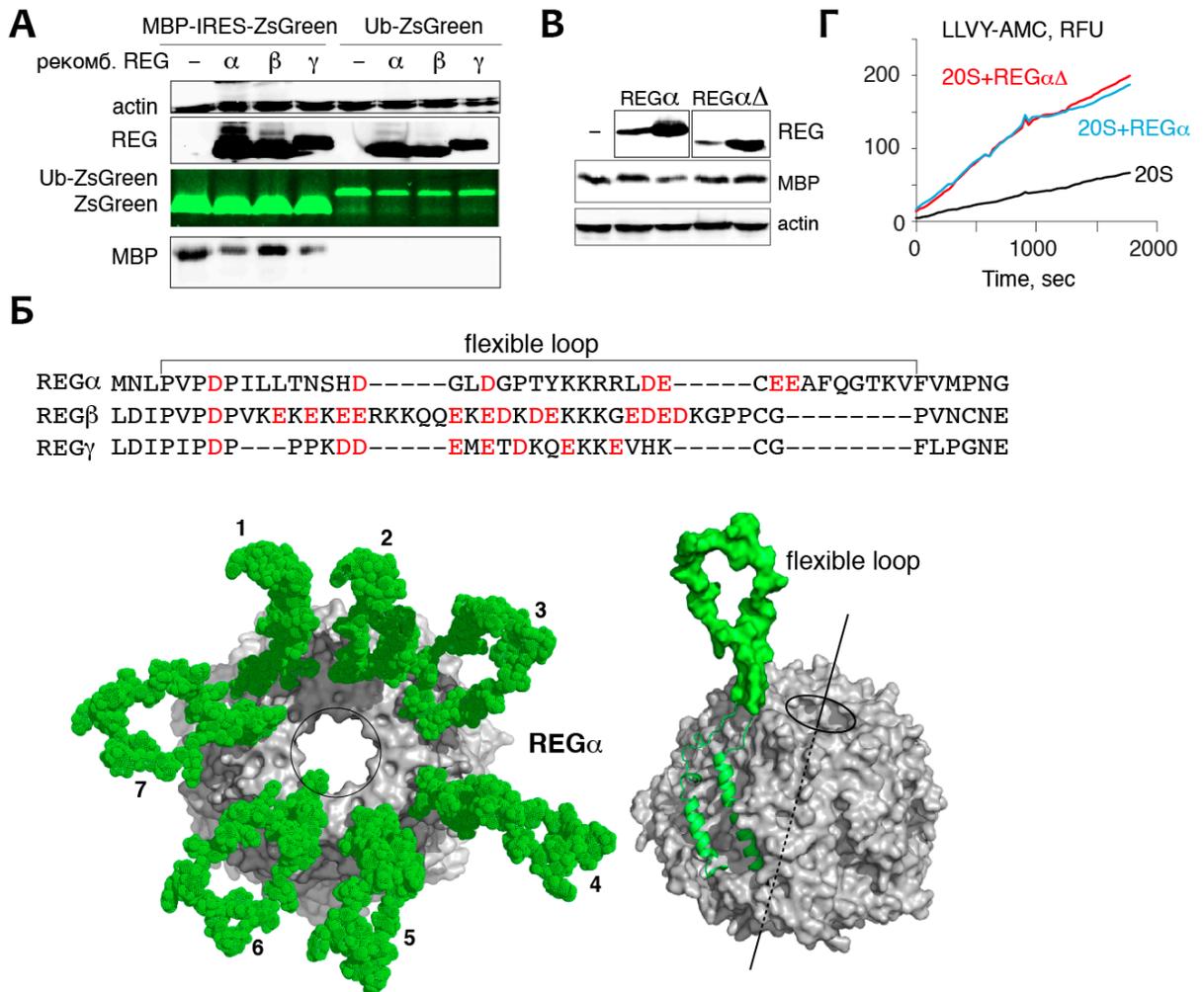


Рисунок 4.22 (А) Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen, трансфицировали генетическими конструкциями, кодирующими субъединицы REG, как указано. Через 48 часов клеточные лизаты анализировали на предмет флуоресценции в ПААГ, а также вестерн-блоттингом с использованием антител против 3FLAG-эпитопа и актина. **(Б)** Аминокислотные последовательности петли субъединиц REG. **(В)** Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen, трансфицировали генетическими конструкциями, кодирующими субъединицы REG дикого типа и с заменой полярной петли на линкер (G₄S)₆ (REG $\alpha\Delta$). Через 48 часов клеточные лизаты анализировали на предмет флуоресценции в ПААГ, а также иммуноблоттингом с использованием антител против FLAG-эпитопа и актина. **(Г)** Анализ активности протеасомы при добавлении REG дикого типа и REG $\alpha\Delta$.

Анализ гидролиза MBP протеасомами *in vitro* показал, что добавление REG α и REG γ к 20S протеасоме значительно ускоряло гидролиз MBP, тогда как регуляторная частица 19S и REG β имели лишь умеренный эффект (**Рис. 4.23А**). Интересно, что усиление химотрипсиновой активности 20S протеасомы, нагруженной различными регуляторами (**Рис. 4.23Б**), не имело явной корреляции со скоростью гидролиза MBP (**Рис. 4.23В**). Наиболее явная разница была получена в случае REG γ , которая активировала протеасому по меньшей мере в три и в два раза

менее эффективно, чем $REG\alpha$ и $REG\beta$ соответственно, и в то же время усиливала гидролиз MBP более эффективно, чем $REG\beta$, и сравнимо с $REG\alpha$.

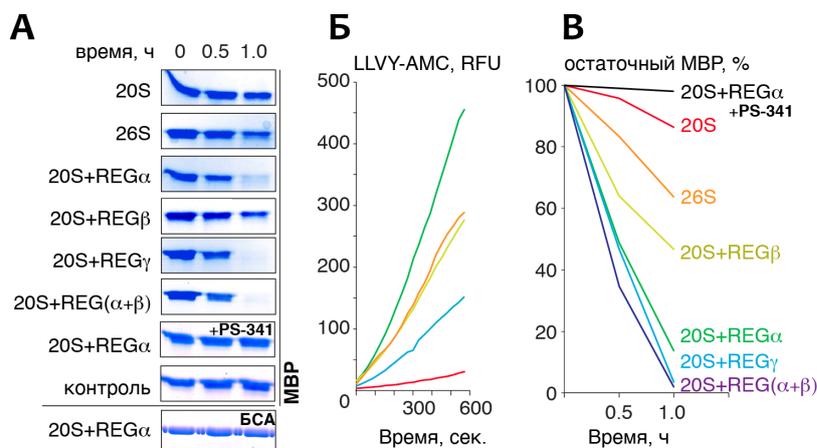


Рисунок 4.23 (А) Гидролиз MBP очищенными препаратами 20S и 26S протеасомы, а также 20S протеасомой с различными регуляторами REG in vitro. Отмечена реакция с добавлением PS-341. BSA, инкубированный с комплексом 20S- $REG\alpha$ в аналогичных условиях, показан снизу. (Б) Активность протеасом с различными регуляторами, измеренная с использованием субстрата LLVY-AMC. (В) Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные моменты времени к исходному количеству белка.

Чтобы исследовать силу взаимодействия MBP с REG, мы использовали метод SPR. Субъединица $REG\alpha$, слитая с мальтозосвязывающим белком (MaltBP), пропусклась через сенсорный чип, содержащий иммобилизованный MBP. В отличие от белка-носителя, MaltBP- $REG\alpha$ в той же концентрации связывал MBP, генерируя SPR-сигнал в десять раз выше, чем MaltBP (**Рис. 4.24А**). Нами была определена константа диссоциации комплекса MBP с $REG\alpha$, которая составила 0.2 мкМ (**Рис. 4.24Б и 4.24В**), что в два раза слабее взаимодействия Ub₄-hRpn10 и в десять раз сильнее взаимодействия MBP-hRpn10 (**Рис. 4.24Г и 4.24Д**). Важно отметить, что «квазидеиминированный» вариант MBP [9Q] связывал $REG\alpha$ значительно менее эффективно при результирующей K_D 2 мкМ (**Рис. 4.24В**).

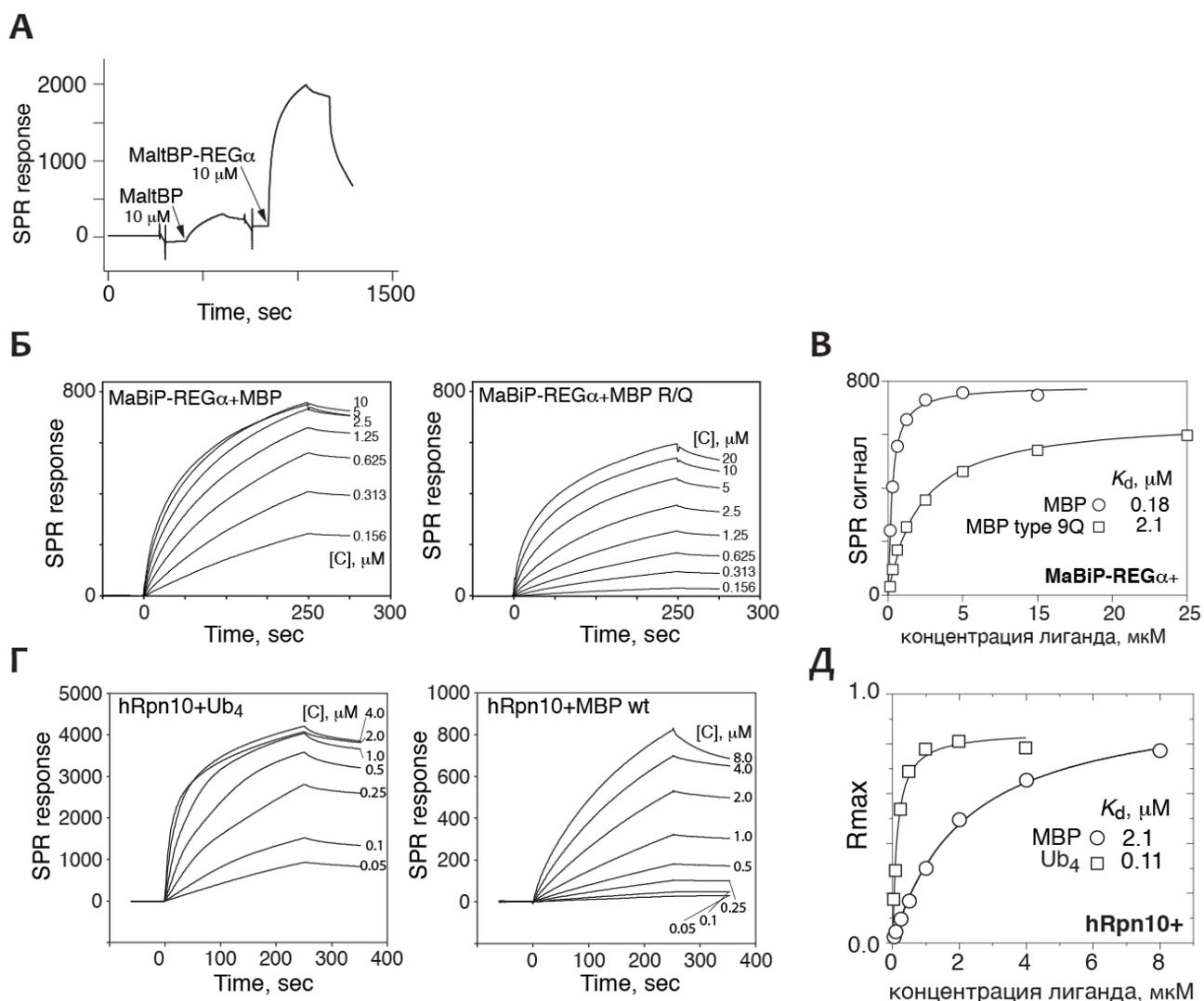


Рисунок 4.24 (А) Кривая, полученная методом поверхностного плазмонного резонанса, демонстрирующая связывание MaBiP или слитого белка MaBiP-REG α в концентрации 10 мкМ с иммобилизованным MBP. (Б) Сенсограммы титрования иммобилизованного MBP или варианта MBP R/Q белком MaBiP-REG α (156 нМ - 20 мкМ). (В) Кривые насыщения, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса, отражающие взаимодействие между иммобилизованным на чипе MBP или «псевдо-деиминированным» MBP (6Q) с MaBiP-REG α . (Г) Кривые титрования, отражающие взаимодействие между иммобилизованным на чипе MBP или тетраубиквитином с субъединицей протеасомы hRpn10. Rmax – уровень максимального насыщения, рассчитанный для каждой кривой, исходя из теории мономолекулярной адсорбции Ленгмюра 1:1. (Д) Кривые насыщения иммобилизованного MBP или тетра-убиквитина субъединицей протеасомы hRpn10.

Исследование химической модификации основными производными в качестве способа создания Ub-независимых субстратов

Теоретическое осмысление принципа заряд-опосредованного гидролиза MBP протеасомой без убиквитина приводит к выводу, что подобного эффекта возможно добиться не только основными аминокислотами, но и различными катионными химическими веществами. Для проверки этой гипотезы мы осуществили химическую конъюгацию BSA со спермином, 1,3-диаминопропаном и 3-аминопропанолом через бифункциональный NHS-PEG $_6$ -малеимидный линкер (Рис. 4.25А). Анализ *in vitro* гидролиза очищенных конъюгатов BSA изолированной 20S протеасомой (Рис.

4.25Б) с или без REG α показал, что конъюгация с спермином и в значительно меньшей степени 1,3-диаминопропаном в отличие от 1,3-диаминопропанола конвертирует BSA в Ub-независимый протеасомный субстрат (**Рис. 4.25В**).

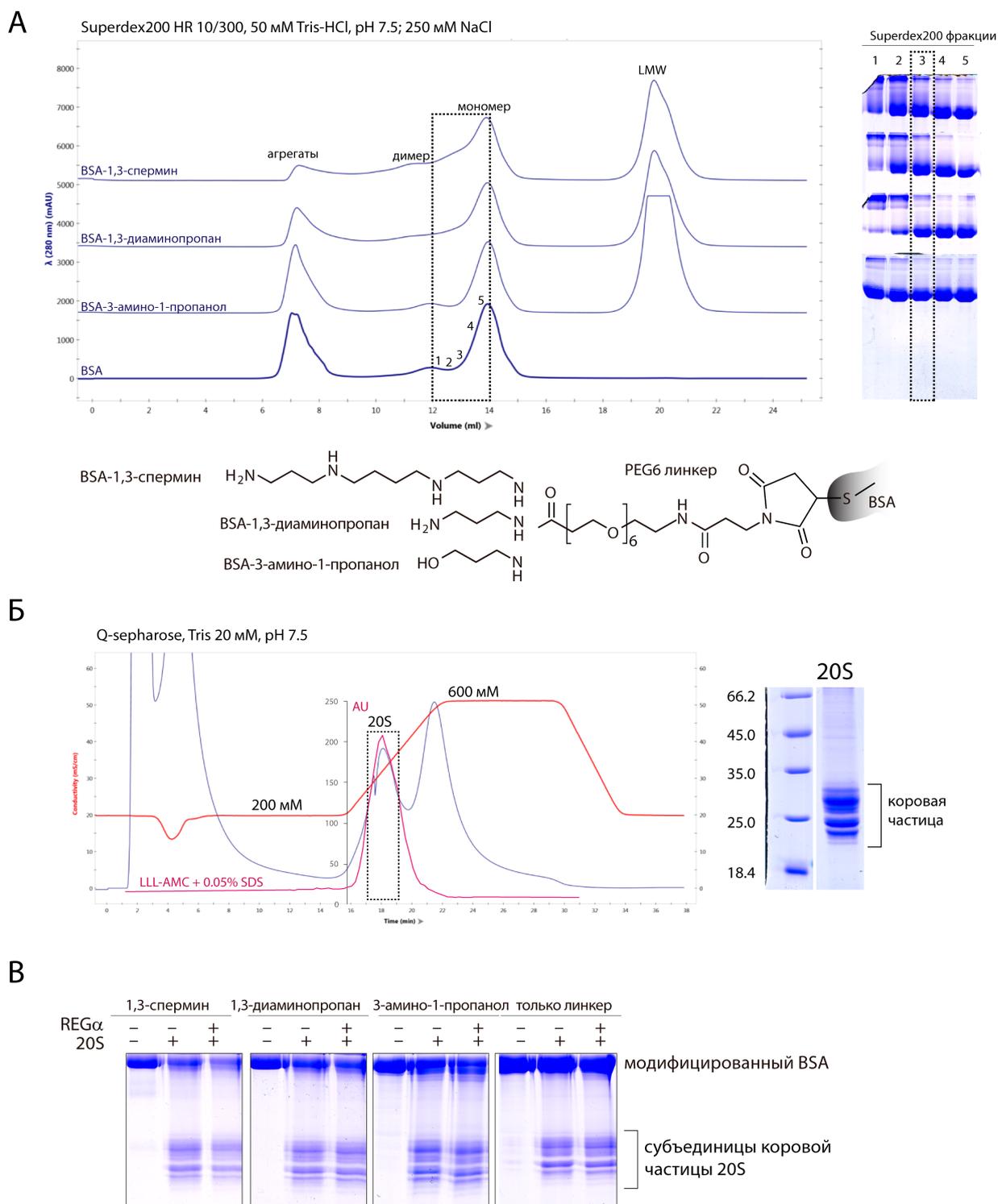


Рисунок 4.25 (А) Очитка конъюгатов BSA на колонке Superdex200 (слева). Анализ собранных фракций в ПААГ (справа). **(Б)** Очистка 20S протеасомы из печени мыши на колонке Q-Sepharose. Разделение препарата очищенной протеасомы в ПААГ. **(В)** Конъюгаты BSA со спермином, 1,3-диаминопропаном и 3-аминопропанолом инкубировали с протеасомой в присутствии и отсутствии REG α . Реакционные смеси анализировали электрофоретически в ПААГ.

Связь Ub-независимой деградации МВР протеасомой с его физиологической функцией.

Важно отметить, что наблюдаемая Ub-независимая деградация МВР протеасомой, по-видимому, находится в физиологически значимых концентрациях МВР. Согласно исследованию Барбарезе и Пфайффера [322], олигодендроциты могут накапливать МВР со скоростью 0.2 фмоль в день на олигодендроцит и достигать динамического равновесия в 1 фмоль МВР на клетку. Вместе с недавними данными [323], в которых сообщается, что объем зрелого олигодендроцита составляет приблизительно 1.7 пл, и, предполагая, что МВР равномерно распределен в клетке, концентрация МВР внутри олигодендроцита составляет 0.6 мМ. Даже если учесть, что только 10% от общего МВР является не ассоциированным с мембраной [322], эта концентрация заведомо больше той, которая необходима для Ub-независимого протеолиза МВР. Недавно было показано, что МВР образует амилоид-подобные фибриллы [324]. Таким образом, возможно, что избыток свободного МВР потенциально сильно токсичен для клетки. Таким образом, протеасомы могут защищать олигодендроциты от избытка «свободного» МВР, гидролизуя его без предварительного убиквитинилирования. Более того, в случаях воспаления или повреждения ЦНС олигодендроциты будут компенсировать потерю МВР путём массивного накопления этого белка, что приводит к значительному увеличению его внутриклеточной концентрации [325]. В этих условиях деградация МВР преодолевает барьер убиквитинилирования, и далее, когда концентрация МВР возвращается к наномолярному диапазону, МВР теряет свою способность быть непосредственно распознанным протеасомой.

Протеасомная деградация и дальнейшая презентация миелиновых антигенов, которые являются мишенью миелин-специфических цитотоксических лимфоцитов [28], несомненно, очень важны в этиологии и патогенезе РС. В своем исследовании Antel с соавторами показали лизис олигодендроцитов человека МВР-специфичными CTL [247]. Более того, введение таких CTLs способно индуцировать ЕАЕ у мышей [326]. Таким образом, полученные данные имеют важное физиологическое значение, поскольку для МВР известно значительное количество ПТМ, многие из которых напрямую ассоциированы с протеканием РС [327]. В ряде сообщений авторы утверждают, что потеря заряда увеличивает восприимчивость МВР к ферментативному гидролизу [263, 328]. Наши наблюдения, напротив, показывают, что МВР сохраняет свое свойство как протеасомный субстрат только в том случае, когда он обладает высоким положительным зарядом. Мы полагаем, что, приводя к потере МВР в целом [329], деиминирование МВР может действовать как система самозащиты, которая энзиматически утилизирует МВР, таким образом ограничивая его контакт с протеасомой.

В настоящем исследовании мы обнаружили, что МВР представляет собой протеасомный субстрат, содержащий множество независимо действующих композиционно-зависимых

дегронов. Аномально высокий катионный заряд МВР, по-видимому, функционирует как «встроенный» убиквитин, делающий возможным непосредственную ассоциацию МВР и протеасомы. Взаимодействие между МВР и протеасомой явно не связано с вовлечением каких-либо конкретных детерминант в молекуле МВР и опосредуется ионными комплексами между основными аминокислотами в составе МВР с кислыми кластерами в протеасоме.

Являются ли остатки лизина и аргинина эквивалентными в этом связывании? Недавние исследования термодинамики взаимодействий основных и отрицательных аминокислот свидетельствуют, что аргинин образует две водородные связи с аспаратом или глутаматом вместо одной в случае лизина. Таким образом, аргинин связывает отрицательно заряженные аминокислоты, по крайней мере, в 100 раз сильнее, чем лизин, с результирующей $\Delta G \approx 10$ ккал/моль и константой связывания $K_b > 10^7$ [330]. В этой связи мы полагаем, что остатки аргинина, а не остатки лизина, являются основными якорями, которые обеспечивают «швартовку» МВР к протеасоме, тогда как остатки аланина, глицина и серина обеспечивают гибкость основной цепи.

Ранее сообщалось, что белок может эффективно подвергаться протеасомной деградации, если он содержит сайт инициации гидролиза и физически связан с убиквитинилированным партнером [331]. Было показано, что в случае искусственных протеасомных субстратов [332] наиболее эффективный гидролиз достигается, когда сигнал деградации и область инициации в 30-40 аминокислот разделены расстоянием в 70-80 Å. Установленное нами оптимальное количество повторов BEADs оценивается от 3 до 7, что соответствует в среднем 35 аминокислотам или 70 Å. Эти расчёты свидетельствуют о том, что заряженные субстраты связывают протеасому вблизи входной полости или, наоборот, сканируют ее поверхность до тех пор, пока они не будут захвачены протеолитическим ядром 20S.

Матискеда с соавторами [123], описывая конформационные перестройки 26S протеасомы при связывании субстрата, предположили, что связывание Ub в первую очередь требуется для эффективного притяжения субстрата, поскольку при этом возрастает локальная концентрация субстрата на поверхности протеасомы, что в свою очередь значительно увеличивает вероятность того, что гибкий сегмент субстрата будет захвачен АТФазным кольцом. Подобно классическим субстратам, МВР обладает способностью связывать протеасому, однако, из-за открытой конформации REG, сигнал протеасомной деградации в МВР, по-видимому, является бифункциональным, то есть анкерный фрагмент субстрата сам по себе может быть захвачен протеолитическим 20S ядром.

Наши исследования эффективности гидролиза субстратов протеасомой в зависимости от положения BEADs свидетельствуют о том, что зона непосредственно перед белком-носителем

является оптимальной позицией основного DPS. Это экспериментальное наблюдение позволяет предположить, что усиление вращения дистально закрепленных субстратов снижает вероятность их захвата коровой 20S субчастицей. Предпочтительное N-концевое расположение BEADs может быть объяснено необходимостью положительного заряда на конце полипептидной цепи для закрепления во внутреннем канале протеасомы. Другое возможное объяснение состоит в том, что С-концевая карбоксильная группа взаимодействует с близкорасположенными аргининами, образуя внутримолекулярную петлю, которая препятствует проникновению в протеолитический канал.

Еще один интригующий вопрос состоит в том, почему abortивный протеолиз субстратов, содержащих BEADs, значительно усиливался в случае ингибирования протеасом? Наиболее разумное объяснение состоит в том, что PS-341, который ингибирует только химотриптическую активность протеасомы, не оказывает значимого влияния на две остальные, включая триптическую. Из-за наличия этой активности, BEADs, обогащенные остатками аргинина и лизина, все еще подвергаются расщеплению, в то же время потеря способности гидролизовать полипептидную цепь после гидрофобных и ароматических остатков приводит к остановке протеасомы при достижении DHFR. Подобная гипотеза достаточно хорошо объясняет чрезвычайно избирательный внутриклеточный процессинг MBP в случае истощения внутриклеточного АТФ. Как было показано в данной работе (Раздел 4.1.3), R33 является одним из основных сайтов протеасомного гидролиза в MBP. При одновременном истощении АТФ и введении PS-341 19S регуляторы обмениваются на гептамеры REG α , которые за счет триптической активности могут разрезать MBP по R33 с последующим высвобождением частично процессированного MBP (Рис. 4.26).

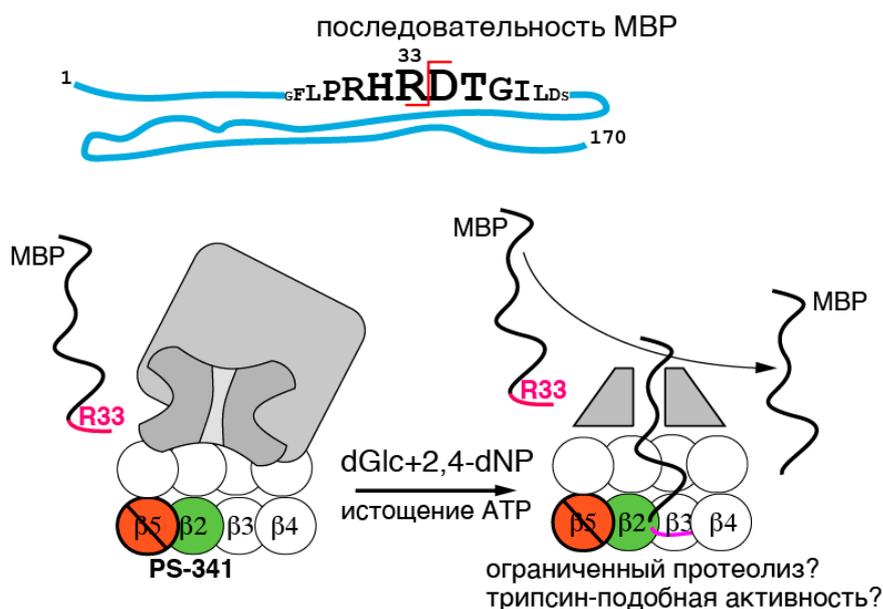


Рисунок 4.26. Молекулярный механизм образования частично процессированных форм MBP при одновременном ингибировании протеасомы и истощении внутриклеточного АТФ

Константа диссоциации комплекса 19S с цепями полиубиквитина составляет порядка нескольких десятков нМ [333], тогда как, согласно нашим результатам, деградация MBP протеасомами является Ub-независимой для концентраций MBP выше 100 нМ. Чтобы обосновать роль REG α в качестве медиатора гидролиза MBP каталитической 20S субчастицей, K_D комплекса MBP-REG α должна быть значительно выше наномолярного диапазона и быть близкой к микромолярной. Действительно, мы обнаружили, что K_D комплекса MBP-REG α составляет 0.2 мкМ, что соответствует силе взаимодействия Ub₄-Rpn10-UIM [334].

Считается, что MBP существует в глобулярной форме в липидной мембране и в менее компактной и более вытянутой конформации с радиусом гирации 59 Å (максимальный диаметр 200 Å). Важным выводом, следующим из наших данных, является требование к распределению основного заряда, в предположении многоточечного связывания основного субстрата и протеасомы. В этой связи мы полагаем, что развернутые «щупальца» REG α «heptopus» (*idem regtopus!*) могут кооперативно перехватывать MBP и тем самым промотировать его Ub-независимый протеасомный гидролиз, подобно 19S регуляторной субъединице, удерживающей полиубиквитиновую цепь в нескольких местах Ub-рецепторами, такими как Rpn10, Rpn13 [335] и недавно обнаруженной субъединицей Rpn1 [336]. Также представляется возможным механизм, при котором гептамеры REG могут стимулировать Ub-независимый гидролиз основных субстратов не только прямым связыванием, но и путём открытия некоторых ранее недоступных участков в основном канале каталитической субчастицы.

В рамках данной работы мы показали, что MBP может в полуспецифической манере взаимодействовать с кислотными субъединицами 19S регуляторной частицы, такими как Ub-рецепторы hRpn10 и hRpn13. В этой связи мы предполагаем, что гептамеры REG могут не иметь монополии на захват основных субстратов. Кислотная природа большинства субъединиц, составляющих регуляторную субчастицу 19S [337], по-прежнему сохраняет возможность того, что этот холофермент может взаимодействовать с основными субстратами. Подобно этим идеям, MBP может связывать альфа-кольцо 20S каталитической субчастицы, в особенности высококислые экспонированные растворителю С-концевые участки альфа-субъединиц 3, 5 и 7 [338]. Тем не менее, очевидно, что слабое связывание и удаленность подобных контактов от входа в протеолитическую камеру значительно уменьшает их способность направлять MBP на протеасомное расщепление. Эти идеи согласуются с массивными эпизодами abortивного гидролиза субстратов, связанных с BEADs.

Ub-независимый протеасомальный гидролиз MBP, опосредуемый REG α , имеет много общего с опубликованными свидетельствами деградации SRC-3/AIB-1 [140] и ингибиторов

клеточного цикла [141] комплексами REG γ -20S. Во-первых, сам MBP может быть гидролизован комплексами REG γ -20S, хотя и со слегка пониженной скоростью. Во-вторых, удаление короткого фрагмента 156-161 из последовательности p21 полностью ингибирует его взаимодействие с REG γ . Особо интересен тот факт, что этот фрагмент [RLIFSK] довольно сильно схож с последовательностью BEAD – [GRASGKF], имея в своем составе 4 общих аминокислоты из 6. В-третьих, известно, что миелиновые белки транспортируются в ядро [339] и действуют там как регуляторные факторы, способствуя пролиферации олигодендроцитов [340], поэтому REG γ может контролировать подобную активность MBP, как и в случае циклинзависимых ингибиторов киназ.

Вовлечение REG α в процесс разрушения MBP может иметь важное физиологическое значение с точки зрения развития рассеянного склероза. В настоящем исследовании мы показали, что аутоиммунная нейродегенерация в центральной нервной системе тесно связана с Ub-независимым протеолизом MBP, опосредованным иммунопротеасомами. Протеасомы в такой форме могут генерировать значительно большее количество иммунодоминантных пептидов MBP, презентация которых на поверхности олигодендроцитов способствует атаке цитотоксических лимфоцитов. REG α / β представляют собой классические IFN γ -индуцируемые белки, непосредственно связанные с иммунопротеасомами [341] и активно участвующие в представлении антигена в условиях воспаления [342]. Накопленные здесь экспериментальные данные свидетельствуют о том, что иммунопротеасомы, экипированные REG α / β гептамерами, становятся смертоносными протеолитическими машинами, координирующими аутоиммунную атаку на миелиновые оболочки *ab intra*. Таким образом, наши данные косвенно подтверждают выводы о том, что иммунопротеасомы и конститутивные протеасомы в целом равны по своей способности взаимодействовать с убиквитинилированными белками [343]. Имеющиеся данные об ускорении расщепления белка иммунопротеасомами по сравнению с конститутивными протеасомами [344], также свидетельства ускоренного гидролиза основных белков иммунопротеасомой [345, 346], могут быть объяснены заменой 19S-регуляторной субчастицы REG α / β гептамерами.

Фундаментальная универсальность обнаруженных явлений подтверждается фактами того, что стабильный белок может быть превращен в Ub-независимый субстрат путем *in vitro* конъюгации с катионными химическими веществами. Интересно, что Veenukumar с соавторами недавно показали, что полиамины напрямую способствуют Ub-независимой деградаци ODC, катализируемой AZ [347]. На основании накопленных знаний мы полагаем, что этот эффект может быть тесно связан с обнаруженным феноменом заряд-опосредованного гидролиза белков протеасомой, поскольку химическая конъюгация BSA со спермином приводит к его деградаци

протеасомой без Ub. Таким образом, настоящее исследование претендует на открытие нового типа сигнала деградации белков протеасомой.

4.1.3 Изучение патофизиологической значимости расщепления миелина различными типами протеасом

Ускорение внутриклеточного протеолиза основного белка миелина иммунопротеасомой..

Хорошо известно, что в клетках млекопитающих под действием провоспалительных цитокинов, в первую очередь таких как $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$, происходит замещение конститутивных каталитических субъединиц на гомологичные иммуносубъединицы $\beta 1i/LMP2$, $\beta 2i/MECL1$ и $\beta 5i/LMP7$ [15]. С другой стороны, характер протекания как РС, так и ЕАЕ включает в себя массовый выброс $IFN\gamma$ внутри центральной нервной системы. Для изучения внутриклеточного гидролиза MBP иммунопротеасомой клетки HEK293, трансфицированные pBud4.1EF/thMBP (**Рис. 4.27А**), обрабатывали $IFN\gamma$ и подвергали трансфекции малых интерферирующих РНК (siRNA) к иммуносубъединицам протеасомы $\beta 1i$ и $\beta 5i$. По прошествии 24 часов содержание MBP в клеточных лизатах анализировали вестерн-блоттингом, используя моноклональные антитела к FLAG эпитопу (**Рис. 4.27Б**). Проведение предварительной трансфекции малых интерферирующих РНК (siRNA) к иммуносубъединицам протеасомы $\beta 1i$ и $\beta 5i$ в сравнении с контрольной siRNA не только понижало уровень экспрессии соответствующих иммуносубъединиц, но и ингибировало внутриклеточный протеолиз MBP.

Из проведенных экспериментов можно сделать вывод, что опосредованный протеасомой внутриклеточный протеолиз MBP значительно ускоряется при воздействии провоспалительного цитокина $IFN\gamma$. Подавление экспрессии иммуносубъединиц протеасомы малыми интерферирующими РНК ингибирует внутриклеточный протеолиз MBP. Полученные данные свидетельствует о возможной роли иммунопротеасомы в развитии нейродегенерации при аутоиммунных нарушениях в центральной нервной системе, а также способах направленного воздействия на иммунопротеасому с помощью малых интерферирующих РНК.

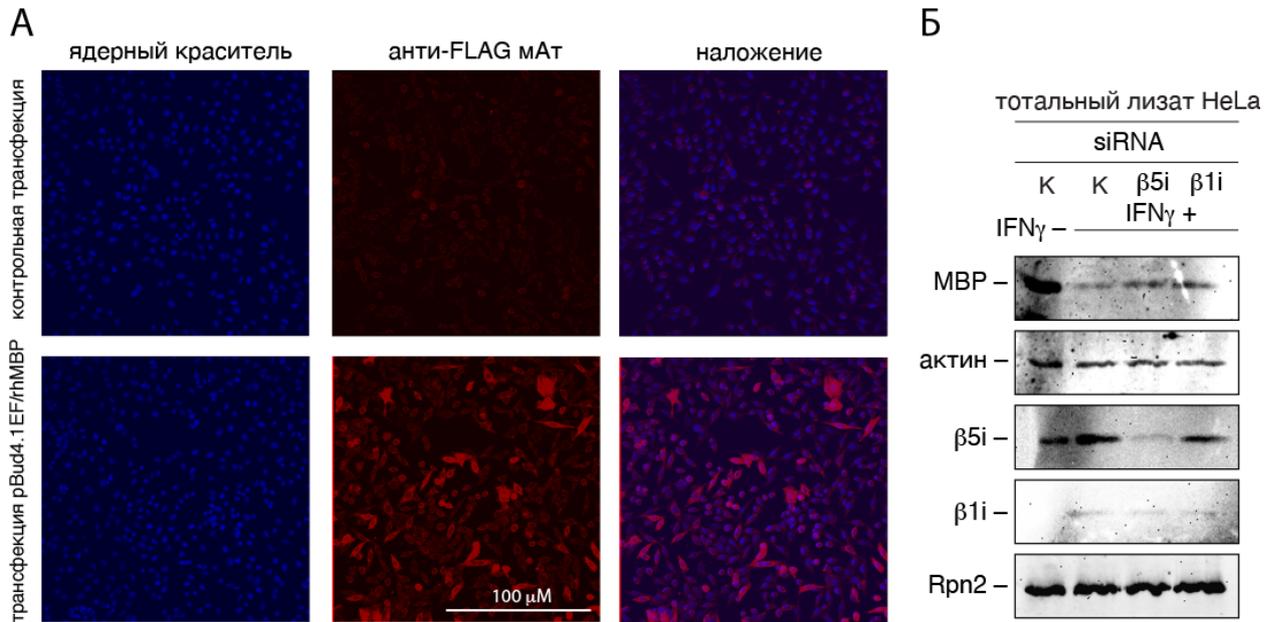


Рисунок 4.27 (А) Иммуноцитохимический анализ клеток линии HeLa, трансфицированных генетической конструкцией, кодирующей MBP, слитный с Flag эпитопом. Контрольная трансфекция – HA-с-Мус. **(Б)** Вестерн-блоттинг лизатов клеток линии HeLa, экспрессирующих рекомбинантный MBP, обработанных (IFN γ +) и необработанных (IFN γ -) интерфероном γ , а также клеток, в которых понижен уровень иммуносубъединиц $\beta 1i$ и $\beta 5i$ в результате воздействия малых интерферирующих РНК.

Определение субъединичного состава церебральных протеасом в норме и при протекании аутоиммунной нейродегенерации

Чтобы определить, накапливаются ли иммунопротеасомы в ЦНС при протекании ЕАЕ, мы окрашивали лизаты различных отделов головного мозга мышей линии BALB/c, неиммунизированных SJL и SJL мышей, развивающих ЕАЕ, на предмет наличия конститутивных и иммуносубъединиц. Вестерн-блот анализ показал, что экспрессия $\beta 1i$ и $\beta 5i$ была значительно повышена во всех отделах головного мозга мышей SJL с ЕАЕ по сравнению с интактными мышами SJL и BALB/c (**Рис. 4.28А**). Статистически значимое увеличение уровня $\beta 1i$ также наблюдалось в ряде отделов интактных мышей линии SJL с неповрежденным ГЭБ (**Рис. 4.28Б**). Интересно отметить, что иммунизация мышей линии BALB/c белком MBP приводила к повышенному уровню иммуносубъединиц протеасомы только в отделах головного мозга, обладающих повышенной проницаемостью ГЭБ (**Рис. 4.28В**). Таким образом, увеличение уровня иммунопротеасомы внутри ЦНС и за ГЭБ наблюдалось только у мышей линии SJL с ЕАЕ.

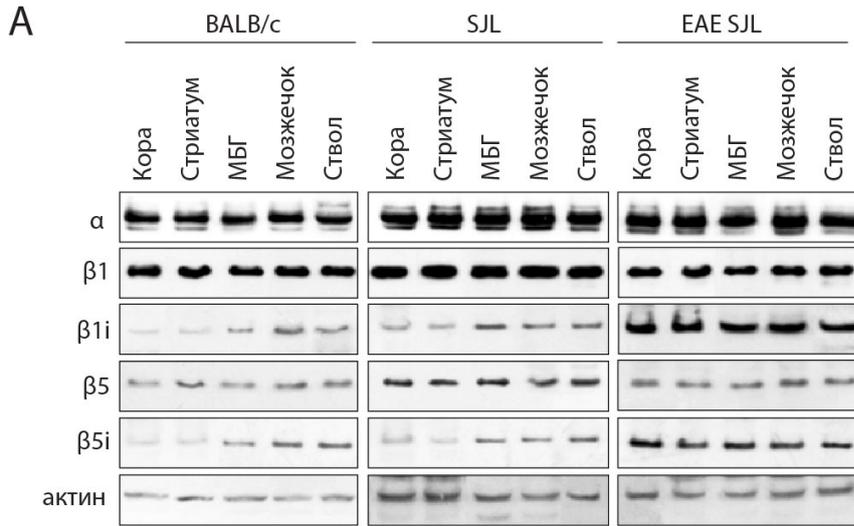
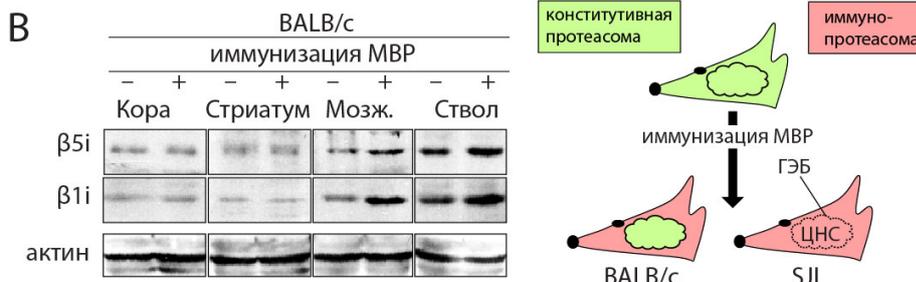
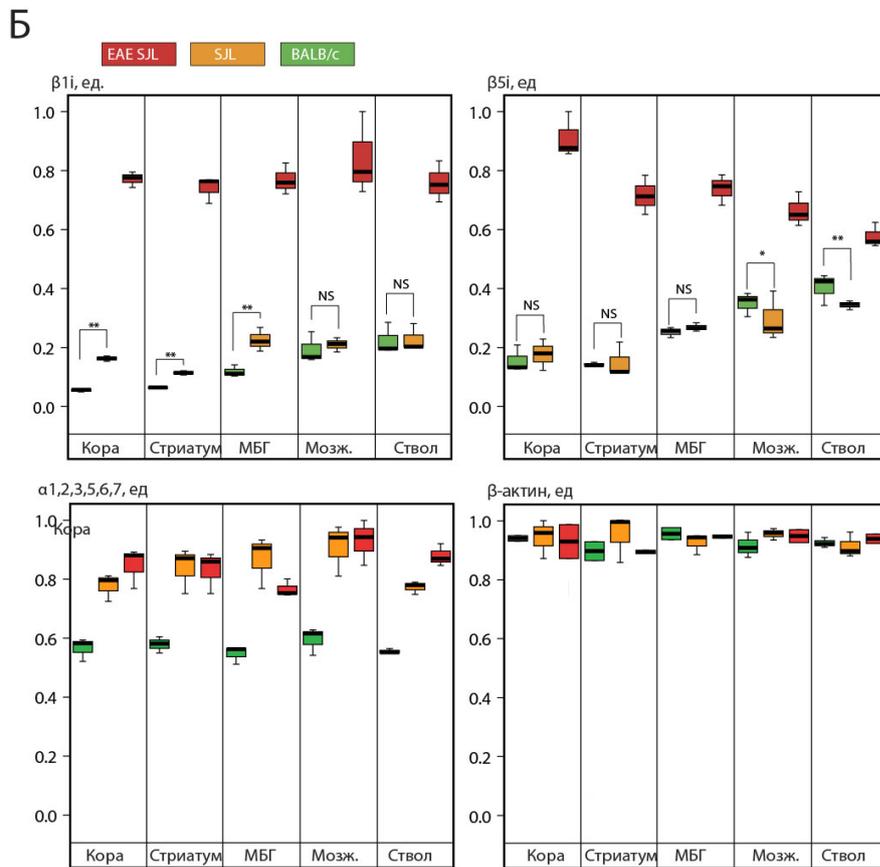


Рисунок 4.28 (А) Вестерн-блоттинг гомогенатов различных отделов головного мозга мышей на предмет наличия субъединиц конститутивной ($\beta 1/\beta 5$) или иммунной протеасомы ($\beta 1i/\beta 5i$). МБГ – медиобазальный гипоталамус. **(Б)** Денситометрический анализ количества субъединиц протеасомы и β -актина как контроля нанесения по результатам вестерн-блоттинга. ** - статистически значимое различие. **(В)** Вестерн-блоттинг гомогенатов различных отделов головного мозга мышей линии BALB/c, иммунизированных и не иммунизированных МВР на предмет наличия субъединиц иммунной протеасомы ($\beta 1i/\beta 5i$)



Следующей задачей было определение источника иммунопротеасомы в головном мозге мышей при протекании аутоиммунной демиелинизации. В частности, мы хотели определить, привносится ли иммунопротеасома нерезидентными клетками внутрь ЦНС или же она образуется непосредственно в церебральных клетках. По сравнению с неиммунизированными мышами линии SJL, мыши, развивающие EAE, содержали в головном мозге значительно большее количество $\beta 1i$ и меньшее нейрального маркера NeuN (**Рис. 4.29 2А и 2Б**). Поскольку содержание $\beta 1i$ по сравнению с $\beta 5i$ было значительно увеличено в головном мозге мышей с EAE, нами было проведено окрашивание срезов головного мозга мышей линии SJL с EAE на иммуносубъединицы $\beta 1i$ и $\beta 5i$. Полученные результаты свидетельствуют, что эти иммуносубъединицы не колокализуются, а значит находятся в разных клетках (**Рис. 4.29В**). Далее мы провели окрашивание срезов головного мозга мышей линии SJL с EAE антителами, распознающими MBP и CD3, маркеры олигодендроцитов и Т-клеток, соответственно (**Рис. 4.29Г**). Таким образом нами было показано, что $\beta 1i$ колокализуется с MBP, а значит присутствует в олигодендроцитах, в то время как $\beta 5i$ была ассоциирована с CD3-положительными клетками, которые представляют собой инфильтрирующие через ГЭБ лимфоциты.

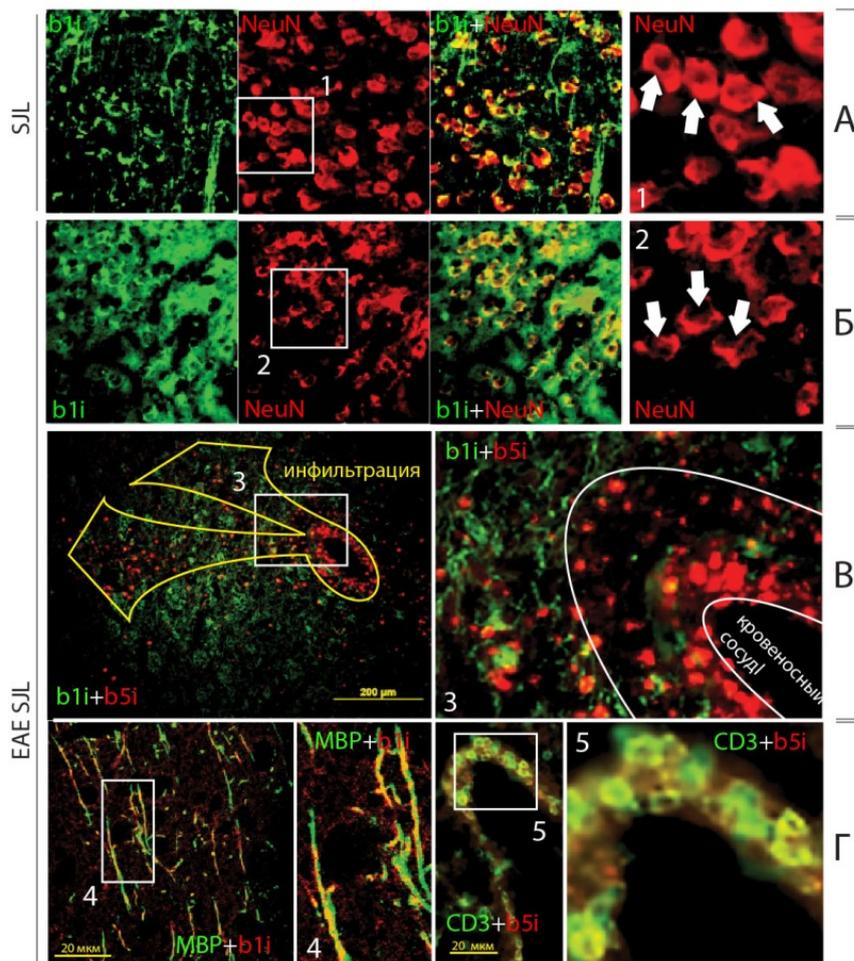


Рисунок 4.29. Иммуногистохимический анализ срезов головного мозга неиммунизированных мышей линии SJL (**А**) и мышей линии SJL, развивающих EAE (**Б–Г**).

Важно отметить, что в первичной культуре зрелых олигодендроцитов также наблюдалось увеличение количества β 1i при воздействии интерферона-гамма (**Рис.4.30**).

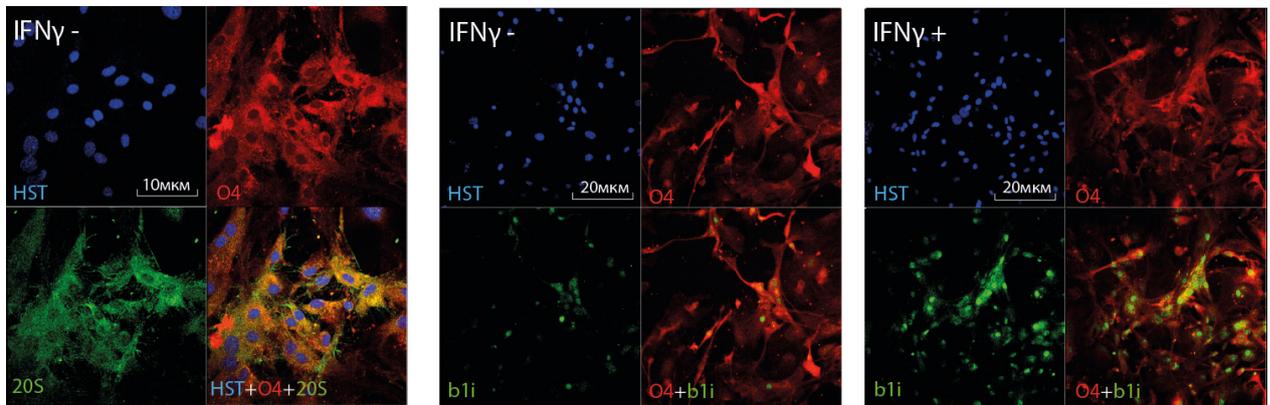


Рисунок 4.30 Иммуноцитохимический анализ культуры олигодендроцитов, обработанных и не обработанных интерфероном-гамма.

Изучение особенностей фрагментации MBP различными типами протеасом

Исходя из полученных данных, стало очевидным, что убиквитин-независимый протеолиз MBP протеасомами из ЦНС здоровых мышей и мышей с ЕАЕ может приводить к различным спектрам пептидных фрагментов. Чтобы проанализировать продукты гидролиза MBP протеасомой методом масс-спектрометрии, на первом этапе необходимо было детализировать посттрансляционные модификации MBP, выделенного из головного мозга коровы, который планировалось использовать в качестве субстрата для протеолиза. Методом масс-спектропии ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье с источником ионизации электроспрей (ESI-FTICR MS) было установлено, что MBP полностью ацетилирован и значительное количество белка монометилировано. Также MBP в пределах 10% от суммарного количества белка был диметилирован, фосфорилирован и окислен по остаткам метионина. Сайты модификаций были определены методом протеолитической фрагментации MBP и анализом полученных пептидов методом масс-спектрометрии с жидкостной хроматографией. Таким образом, основными посттрансляционными модификациями MBP являются ацетилирование N-конца, моно- и диметилирование остатков аргинина-106, фосфорилирование треонина-97, окисление метионина-19 и метионина-166 (**Рис. 4.31**).

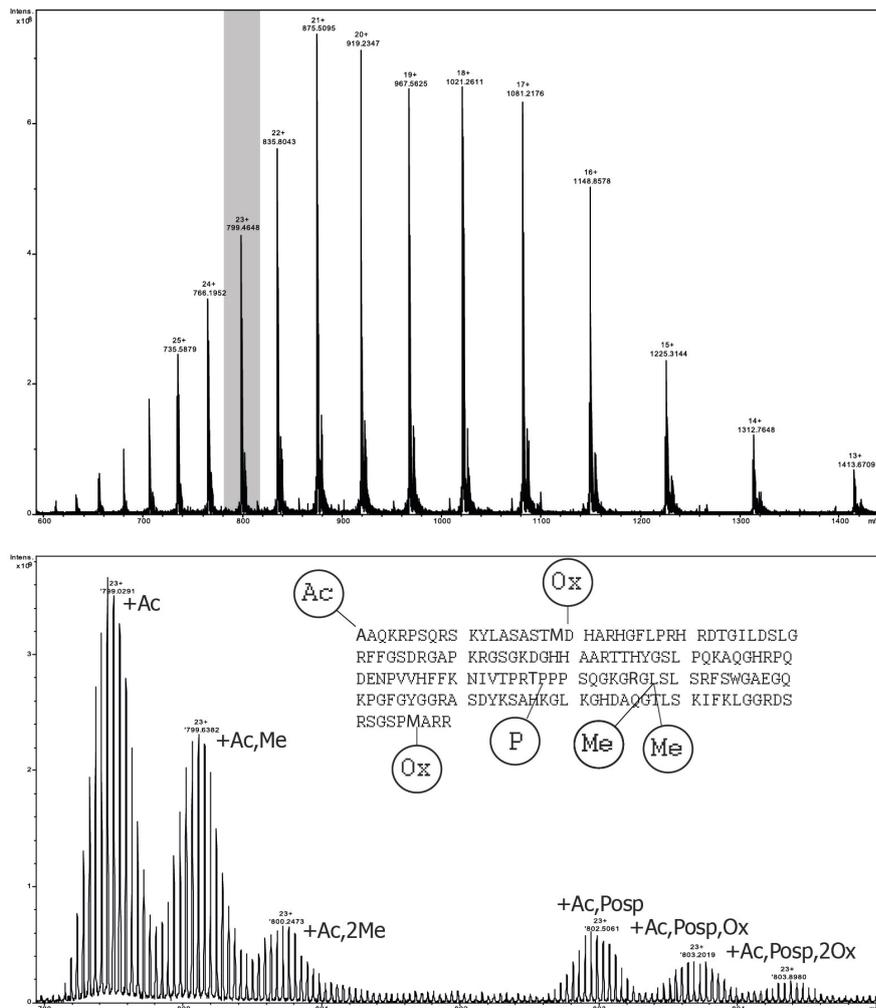


Рисунок 4.31 Масс-спектрограмма мультизарядных ионов высокоочищенного МВР (вверху), подробно показан пик с зарядом +23 (внизу) и аминокислотная последовательность МВР с отмеченными на ней идентифицированными посттрансляционными модификациями.

Процесс ферментативной деградации основного белка миелина может протекать по двум основным путям – с помощью протеасомы и протеаз. Чтобы выяснить, как отличается гидролиз МВР протеасомой в норме и патологии, мы провели *in vitro* гидролиз МВР протеасомами из головного мозга здоровых мышей и мышей, развивающих ЕАЕ. Для оценки качественного состава образующихся пептидов дополнительно нами был проведен гидролиз МВР рядом протеолитических ферментов, которые, как полагают, ассоциированы с развитием рассеянного склероза: матриксной металлопротеиназой 3, матриксной металлопротеиназой 9, μ -кальпаином и трипсином. Продукты гидролиза анализировали методом тандем-масс-спектрометрии. Паттерны гидролиза протеасомой из головного мозга мышей значительно отличались от паттернов гидролиза протеолитическими ферментами (**Рис. 4.32А**), а также от изученных ранее [61, 265] паттернов гидролиза каталитическими антителами. Под действием протеолитических ферментов в основном образовывались пептиды, относящиеся к фрагменту МВР₁₁₀₋₁₃₀, в то время как в гидролизатах протеасомой обнаруживались пептиды, относимые практически ко всей

аминокислотной последовательности MBP. Из всех протестированных протеолитических ферментов кальпаин наиболее близок к протеасоме по специфичности протеолиза MBP. Особо необходимо отметить, что спектры пептидов, образуемые под действием протеасомы из головного мозга здоровых и развивающих ЕАЕ мышей, заметно отличаются друг от друга. Пептиды, полученные под действием протеасомы из головного мозга развивающих ЕАЕ мышей, существенно перекрывались с основными Т-клеточными эпитопами MBP.

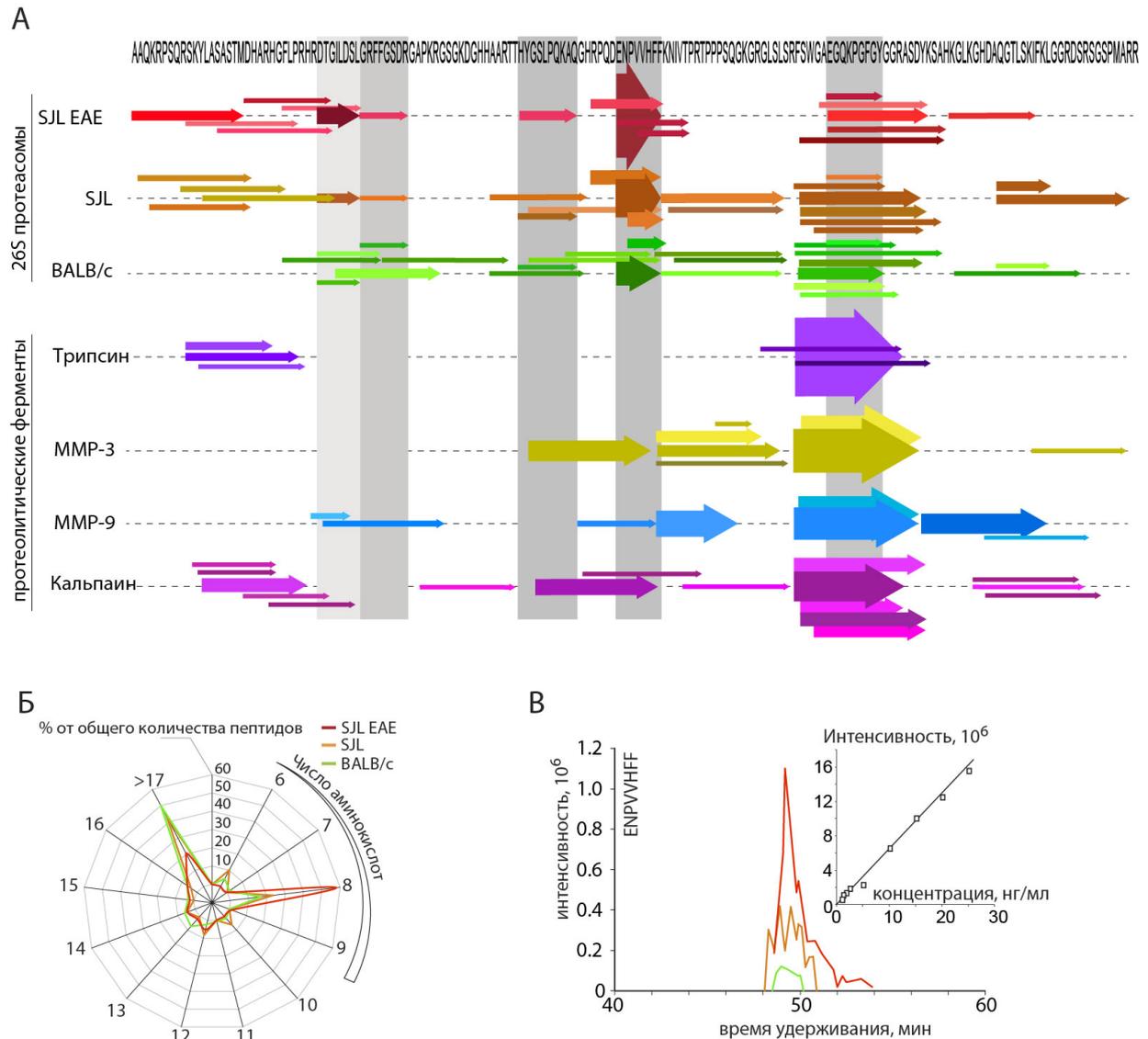


Рисунок 4.32 (А) Паттерны деградации MBP протеасомами из головного мозга мышей, а также рядом протеаз, ассоциированных с развитием аутоиммунных патологий ЦНС. Сверху представлена аминокислотная последовательность MBP, каждая стрелка соответствует пептидному фрагменту этой аминокислотной последовательности, детектируемому масс-спектрометрически. Толщина стрелок соответствует количеству того или иного пептида по результатам безметочного (label-free) анализа. **(Б)** Распределение по длинам пептидов MBP, полученных под действием протеасомы из головного мозга мышей BALB/c, SJL и EAE-SJL. **(В)** Безметочный анализ количества пептида ENPVVHFF (MBP₈₃₋₉₀) в различных протеасомных гидролизатах.

Анализ распределения образуемых фрагментов MBP по длине показывает, что максимальное количество пептидов длиной 8 аминокислотных остатков, оптимальной для презентации на MHC I, получается под действием протеасомы из головного мозга мышей,

развивающих ЕАЕ (**Рис. 4.32Б**). Безметочный анализ количества пептида MBP₈₃₋₉₀ [ENPVVHFF] в протеасомных гидролизатах показал, что под действием протеасомы из головного мозга мышей с ЕАЕ по сравнению со здоровыми мышами количество данного пептида возрастает в 10 раз (**Рис. 4.32В**). Проведенный безметочный анализ явно продемонстрировал необходимость строго количественного сравнения относительного содержания пептидов MBP в протеасомных гидролизатах. Для этого был разработан метод, основанный на применении воды, содержащей нуклид кислорода ^{18}O (**Рис. 4.33**). При каждом элементарном гидролитическом акте разрушения пептидной связи под действием протеасомы на С-конец образующегося пептида встраивается атом кислорода из молекулы воды. Протеолиз MBP протеасомой из головного мозга мышей линии BALB/с проводили в воде, содержащей ^{18}O , в то время как гидролиз протеасомой из мышей SJL проводили в обычной воде, содержащей ^{16}O . Таким образом, пептиды, полученные при гидролизе MBP соответствующими протеасомами, будут отличаться друг от друга на 2 единицы молекулярной массы, но обладать в точности одинаковым временем удерживания на обращенно-фазовом сорбенте и одинаковой эффективностью ионизации. Количество протеасомы, необходимой для гидролиза, выравняли исходя из ее активности по пептидному субстрату Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC.

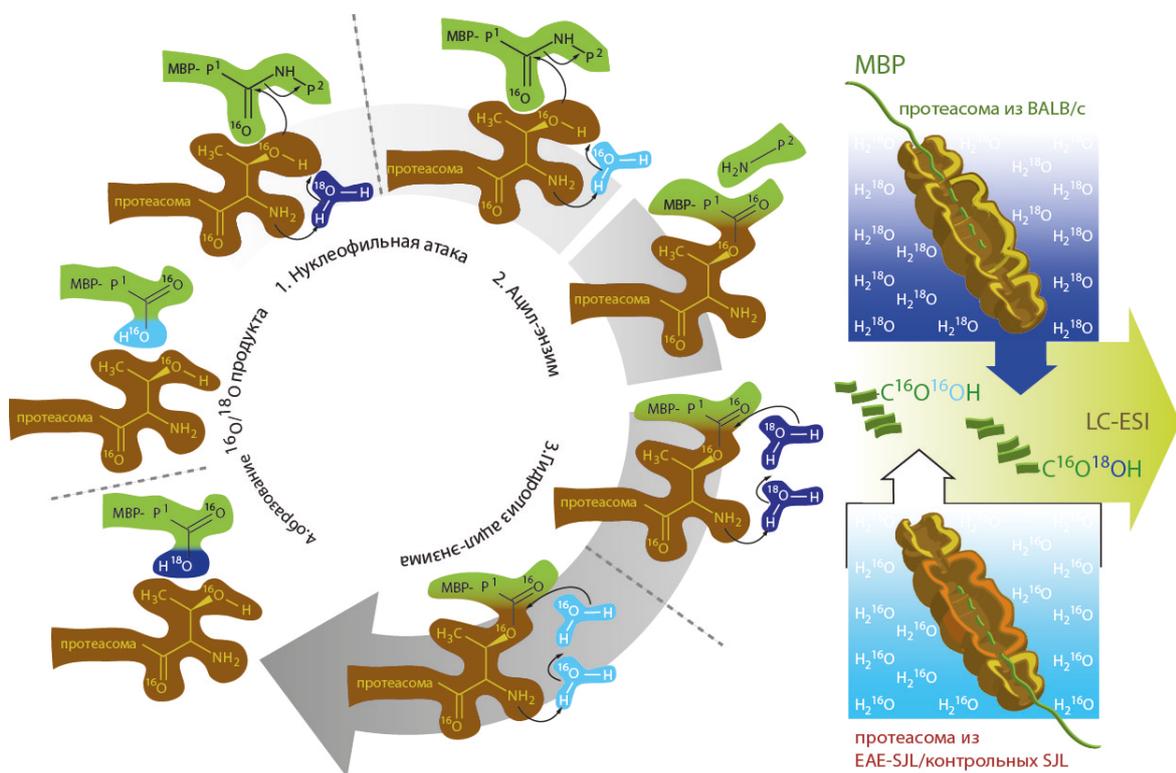


Рисунок 4.33 Схематичное изображение метода количественного анализа паттернов деградации MBP протеасомой с использованием воды, содержащей нуклид кислорода ^{18}O .

Для компенсации природного изотопного распределения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ гидролизаты МВР двумя типами протеасомы смешивали в нескольких разных молярных соотношениях. Это позволило осуществить количественный анализ образования более чем 250 фрагментов МВР под действием протеасом из мышей линий BALB/c и SJL с и без EAE (Рис. 4.34). Из этого количества 5 пептидов по структуре подходили для загрузки на МНС I. Количество двух из этих пептидов, DTGILDSL (МВР₃₃₋₄₀) и ENPVVHFF (МВР₈₃₋₉₀) увеличивалось в 10 раз при гидролизе МВР протеасомой из мозга EAE SJL в сравнении с гидролизом МВР протеасомой из мозга мышей линии BALB/c.

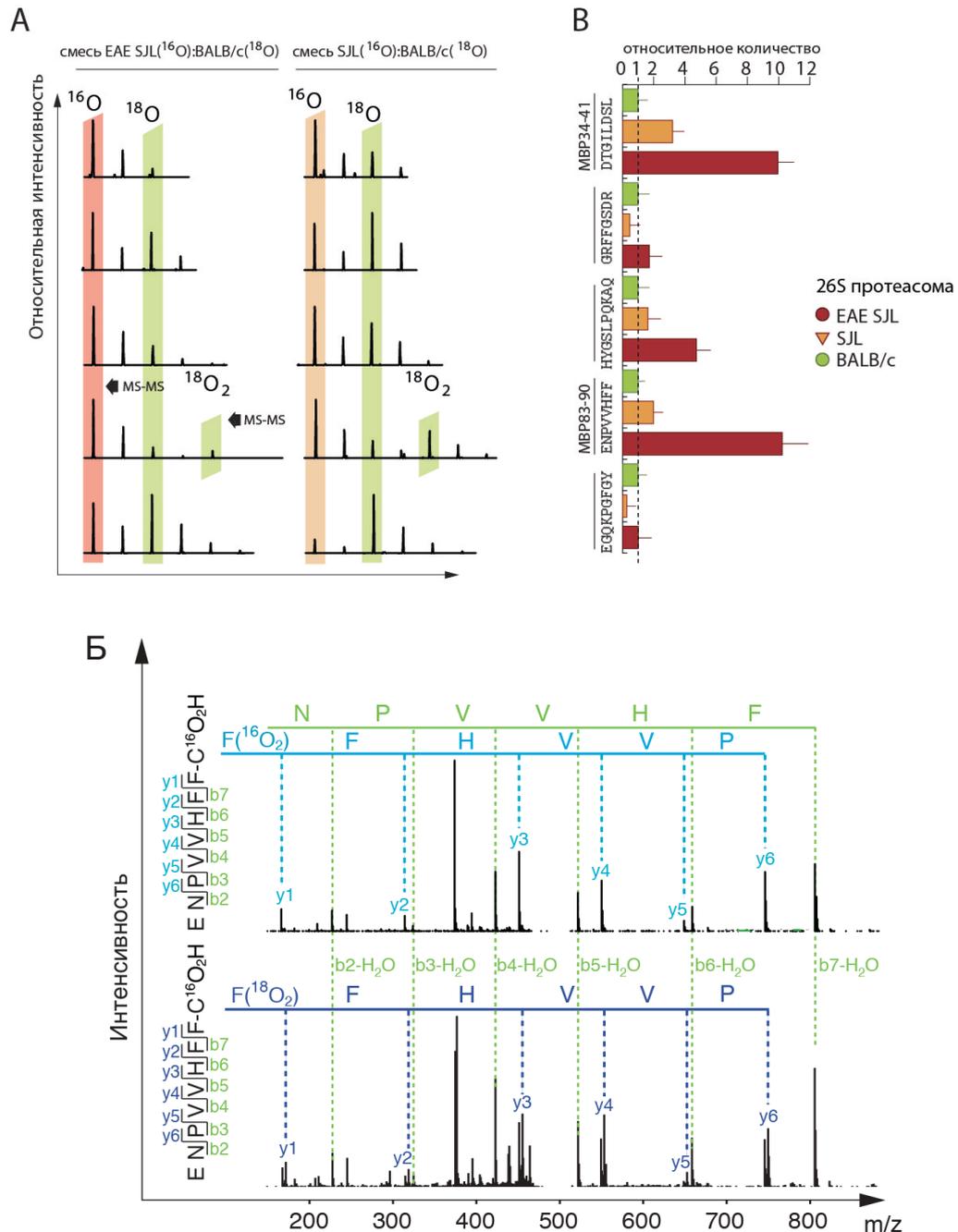


Рисунок 4.34 (А) Пример участка масс-спектра, полученного при анализе с использованием воды, содержащей нуклид кислорода ^{18}O . **(Б)** MS-MS спектр анализ пептидов ENPVVHFF, полученных под действием протеасомы в воде, содержащей ^{16}O и в воде, содержащей ^{18}O . **(В)** Количественная оценка некоторых пептидов МВР, образующихся под действием протеасом. Данные пептиды по длине подходят для загрузки на МНС I.

В отличие от других проанализированных пептидов, согласно результатам MS2 спектра, MBP₈₃₋₉₀ содержал на С-конце два атома ¹⁸O вместо одного. Предположительно, это результат двойной реакции гидролиза, которая становится возможной в результате повышенного сродства этого пептида к каталитической полости протеасомы.

Иммунопротеасомы с высоким содержанием субъединицы β1 маркируют олигодендроциты цитотоксическим клеткам для атаки

Пептид MBP₈₃₋₉₀ является частью энцефалитогенного фрагмента MBP, поэтому мы более детально изучили его образование при действии различных типов протеасомы на MBP. Для этого был синтезирован химически идентичный пептид с С-концевым фенилаланином, все атомы углерода и азота которого обладали массовыми числами 15 и 13, соответственно. Результаты количественного анализа с использованием подобного внутреннего стандарта полностью подтвердили ранее полученные данные. Скорость образования пептида MBP₈₃₋₉₀, рассчитанная исходя из известного количества внутреннего стандарта, заранее введенного в гидролизат MBP протеасомами, оказалась до 8 раз больше при гидролизе MBP протеасомой из мозга EAE SJL, чем при гидролизе протеасомой из мозга неиммунизированных мышей линии SJL и мышей линии BALB/c (**Рис. 4.35**). За 24 часа под действием протеасомы из головного мозга EAE-SJL образуется порядка 0.83 моль пептида ENPVVHFF на 1 моль изначального MBP.

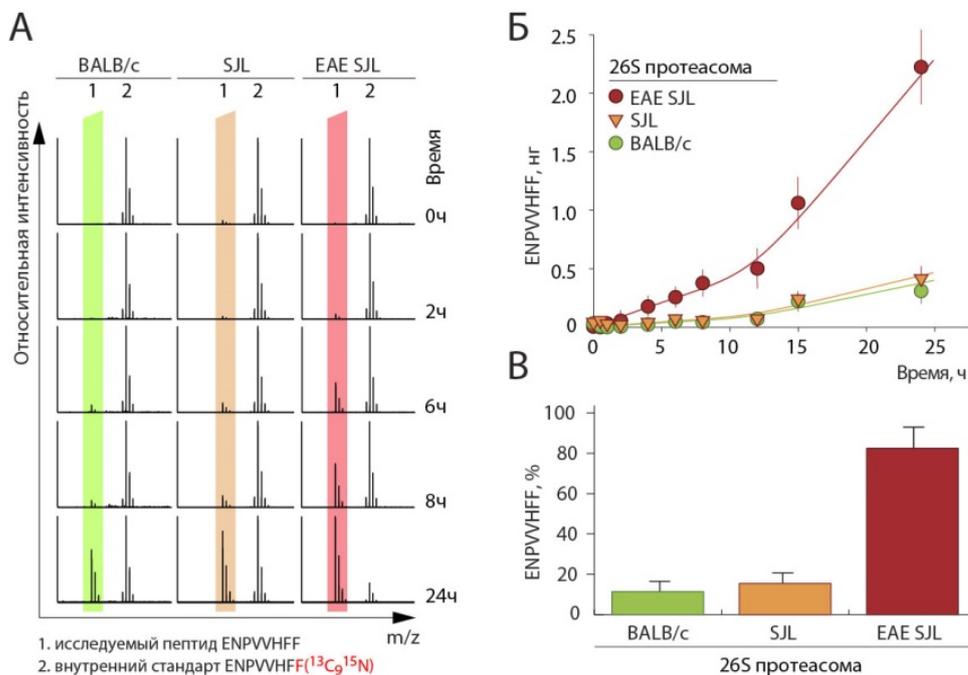


Рисунок 4.35 Определение скорости образования пептида ENPVVHFF с использованием синтетического изотопно-меченного аналога. Масс-спектр (**А**), зависимость количества образовавшегося пептида от времени протеолиза (**Б**) и количество ENPVVHFF, образовавшегося за 24 часа гидролиза MBP протеасомой из головного мозга мышей BALB/c, SJL и EAE SJL (в процентах от количества исходного MBP) (**В**).

Возможность презентации того или иного пептида на поверхности клетки в составе МНС I обусловлена структурой пептид-связывающей области молекулы МНС I. Из литературы известно [326], что пептид DENPVVHFF (MBP₈₂₋₉₀) способен презентироваться на МНС I мыши гаплотипа H-2^k. Однако, мыши линии SJL имеют гаплотип H-2^s, поэтому нельзя с уверенностью сказать, будет ли генерируемый иммунопротеасомой пептид MBP₈₃₋₉₀ презентироваться на МНС I и вносить свой вклад в развитие EAE у мышей линии SJL. Каждый тип молекулы МНС I взаимодействует с определенным набором пептидов, имеющих определенные аминокислотные остатки в так называемых «якорных сайтах», которые являются индивидуальной характеристикой каждого отдельно взятого МНС I. В терминах девятичленного пептида якорные сайты могут находиться в позициях P2-P9 или P5/6-P8. К нашему сожалению, отсутствуют точные литературные данные о том, какие именно аминокислотные остатки необходимы для связывания H-2^s. Известно только, что на H-2^s могут успешно презентироваться пептиды FNF⁺TAPFI, QTSYTSPTI и SNDDASVDFV [348]. Выравнивая аминокислотные последовательности этих пептидов (**Рис. 4.36А**), можно сделать предварительный вывод о том, что якорными сайтами для связывания с H-2^s являются позиции P5/6-P8. Для связывания с МНС I аминокислотные остатки валина, серина и треонина являются взаимозаменяемыми [349], поэтому с большой вероятностью пептид ENPVVHFF будет связываться с H-2^s.

Для экспериментального подтверждения данного предположения, нами были выделены мононуклеарные клетки из периферической крови мышей линии SJL, интересующего нас гаплотипа H-2^s, СЗН (H-2^k) – в качестве положительного контроля и BALB/c (H-2^d) в качестве отрицательного контроля, т.к. якорные сайты для H-2^d известны [350] и ENPVVHFF для связывания с H-2^d по структуре очевидно не подходит. Мононуклеарные клетки инкубировали с синтетическим пептидом ENPVVHFF в течение 5 часов, тщательно отмывали, лизировали и определяли содержание ENPVVHFF с методом количественной масс-спектрометрии с мониторингом множественных реакций (MRM) (**Рис. 4.36Б**). В результате анализа исследуемый пептид был обнаружен в образцах клеток с гаплотипами H-2^k и H-2^s, но не обнаружен в клетках с гаплотипом H-2^d. Методом MRM также было показано, что количество ENPVVHFF, образованного из эндогенного MBP, увеличивается в культуре олигодендроцитов при обработке интерфероном-гамма, но в данном случае применяемая методика не позволяет отличить пептид, находящийся в цитоплазме, от пептида, презентированного на МНС I.

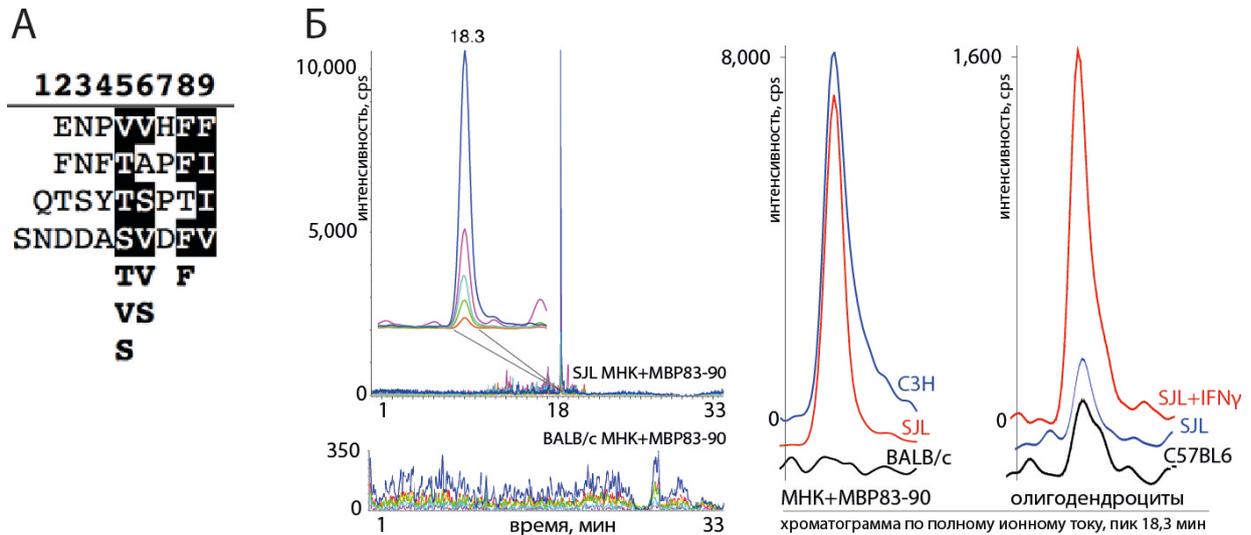


Рисунок 4.36 (А) Сравнение аминокислотных последовательностей пептидов, для которых показана презентация на МНС I гаплотипа H-2^S и изучаемого в данной работе пептида ENPVVHFF. **(Б)** Анализ связывания пептида ENPVVHFF с МНС I мыши методом MRM масс-спектрометрии. Хроматограммы по полному ионному току (слева) и пик, соответствующий данному пептиду (время удерживания 18,3 мин) для 5 MRM транзиций (справа).

На следующем этапе работы из мышей линии SJL методом активации *ex vivo* были получены цитотоксические Т-лимфоциты, специфичные к ENPVVHFF. В качестве контроля использовались цитотоксические Т-лимфоциты, специфичные к пептиду вируса энцефалита Тэйлера FNFTAPFI. Цитотоксические ENPVVHFF-реактивные Т-лимфоциты специфически лизировали олигодендроциты, полученные из мышей линии SJL, при этом этот процесс ингибировался анти-МНС I антителами и его эффективность значительно увеличивалась в случае олигодендроцитов, обработанных интерфероном-гамма (**Рис. 4.37**).

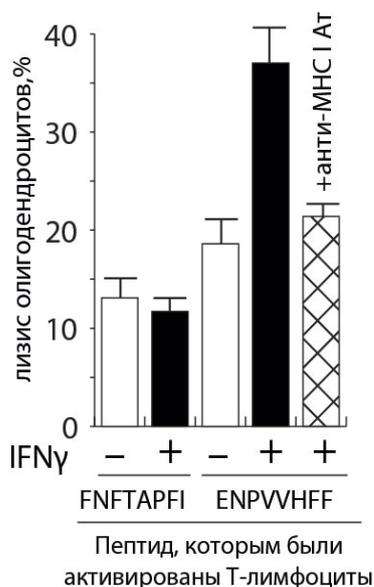


Рисунок 4.37 Лизис олигодендроцитов, обработанных (IFN γ +) и не обработанных (IFN γ -) интерфероном-гамма, цитотоксическими Т-лимфоцитами, специфичными к пептиду MBP₈₃₋₉₀ [ENPVVHFF] и контрольному пептиду [FNFTAPFI].

На основании полученных данных можно сделать вывод, что при развитии ЕАЕ меняется состав каталитических субъединиц протеасомы, находящейся в ЦНС, что приводит к изменению ее субстратной специфичности и паттернов деградации МВР. Замещение $\beta 1$ на $\beta 1i$ приводит к увеличению химотрипсин-подобной активности [351] и снижению каспазоподобной активности [352]. Благодаря увеличению химотрипсин-подобной активности протеасомы образуются пептиды с гидрофобным С-концом, наличие которого предпочтительно для связывания с МНС I [353], в то время как каспазо-подобная активность может приводить к разрушению некоторых Т-клеточных эпитопов [354]. В олигодендроцитах присутствует достаточно большое количество иммуносубъединицы $\beta 1i$, что создает условия для процессинга и презентации аутоантигенов, приводящей к активации специфичных к нейроантигенам Т-клеток и дальнейшему прогрессу аутоиммунной патологии. Недавние исследования показали, что наличие определенной мутации в гене, кодирующем $\beta 1i$ субъединицу иммунопротеасомы, влияет на процессинг МВР, а также снижает риск развития рассеянного склероза [355]. Этот факт, наряду с полученными в данной работе результатами, также свидетельствует о патогенной роли $\beta 1i$ субъединицы иммунопротеасомы в развитии аутоиммунных патологий ЦНС.

Значение убиквитин-независимого протеолиза МВР иммунопротеасомой в развитии аутоиммунной нейродегенерации

РС, аналогично ЕАЕ, характеризуется воспалением в ЦНС, что приводит к массивному высвобождению $IFN\gamma$ [356], который, в свою очередь, смещает баланс конститутивная протеасома-иммунопротеасома в пораженном головном мозге в сторону последней [355, 357]. Наши данные свидетельствуют о том, что резидентные церебральные протеасомы у мышей линии SJL с ЕАЕ подвергаются структурным изменениям, что приводит к различной протеолитической активности, которая объясняет разную картину деградации МВР. Замена $\beta 1$ на $\beta 1i$ приводит к усилению химотрипсиноподобной активности [351] и к уменьшению каспазоподобной активности [352]. Химотрипсиноподобная активность протеасомы благоприятствует образованию пептидов с гидрофобными С-концевыми остатками, которые облегчают связывание подобных пептидов с МНС класса I [353], в то время как каспазоподобная активность может приводить к разрушению эпитопов, узнаваемых ЦТЛ [354]. Тот факт, что $\beta 1i$ -субъединица в значимом количестве экспрессируется в олигодендроцитах, указывает на то, что процессинг и представление нейроантигенов может происходить внутри головного мозга. Это может приводить к активации периферических Т-клеток, которые распознают нейроантигены и тем самым вызывают аутоиммунную реакцию. Важно отметить, что наши данные в значительной степени согласуются с недавно обнародованными данными о протективном значении мутантной

субъединицы $\beta 1i$ в итальянской женской популяции, которая видоизменяет гидролиз МВР и снижает риск развития РС [355]. Хотя Frausto и его коллеги сообщили, что мыши линии C57/BL6 с нокаутом по $\beta 1i$ субъединице все еще развивают ЕАЕ [358], следует отметить, что функциональный анализ иммуносубъединиц протеасом с использованием нокаутных мышей в настоящий момент признан в целом разочаровывающим. Исследования последних двух десятилетий ясно показали, что потребность в иммунопротеасоме для элиминации возбудителя или аутоиммунного ответа заметно варьируется от модели к модели [359]. Отсутствие у мышей линии C57/BL6 гаплотипа МНС-I Н-2^k и индукция ЕАЕ с использованием MOG могут заметно уменьшить роль субъединицы $\beta 1i$ в развитии ЕАЕ и исключить представление энцефалитогенных пептидов МВР, даже если они могут быть образованы. Таким образом, развитие ЕАЕ у мышей $\beta 1i^{-/-}$ C57BL6 ни в коем случае не означает, что эта конкретная иммуносубъединица не играет никакой роли в развитии ЕАЕ в животных моделях, отличных от C57BL6.

В настоящем исследовании мы показали, что происхождение каталитических субъединиц иммунопротеасомы, наблюдаемых в ЦНС, различно. $\beta 1i$ имеет истинное церебральное происхождение, тогда как $\beta 5i$ импортируется лимфоцитами и, по-видимому, другими иммунными клетками, такими как макрофаги, через ГЭБ. Известно, что $\beta 5i$ в лимфоцитах стимулирует их выживание и контролирует их пролиферативную способность, поэтому присутствие $\beta 5i$ в инфильтрирующих лимфоцитах, вероятно, способствует повреждению нейронов, опосредованное Т-клетками [360]. Профессор Тонегава с коллегами показал 20-30% уменьшение количества CD8⁺ по сравнению с CD4⁺ Т-клетками в лимфоидных органах $\beta 1i^{-/-}$ мышей [361]. Как было показано позже, эти эффекты видимо являются результатом неполноценного развития [118]. Кажется маловероятным, что введение $\beta 1i$ -ингибитора, которое, очевидно, значительно менее эффективно по сравнению с нокаутом $\beta 1i$, может существенно изменить репертуар CD8⁺ Т-клеток, в особенности когда аутореактивные CD8⁺ Т-клеточные клоны уже предсуществуют. В этой связи терапия ЕАЕ с использованием $\beta 1i$ -специфического пептидил-эпоксикетона выглядит очень многообещающе, поскольку такое лечение затрагивает скорее олигодендроциты, нежели иммунные клетки. Следует отметить, что в ряде исследований сообщается, что $\beta 1i^{-/-}$ лимфоциты по сравнению с $\beta 2i^{-/-}$ или $\beta 5i^{-/-}$ фенотипом пролиферируют нормально, но все же могут иметь недостатки в выживании [362, 363]. Мы предполагаем, что терапевтическая эффективность $\beta 1i$ -ПЕК в основном связана с ингибированием $\beta 1i$ в резидентных клетках ЦНС, но по крайней мере частично может быть обусловлена систематическим подавлением иммунной системы.

В настоящей работе мы показали, что количество двух пептидов, МВР₈₃₋₉₀ и МВР₃₄₋₄₁, увеличилось в десять раз в гидролизатах МВР, продуцируемых церебральными протеасомами из мышей линии SJL с ЕАЕ по сравнению с протеасомой из мышей линии BALB/c. Примечательно, что адаптивно переносимые ЦТЛ, которые индуцируют ЕАЕ у мышей С3Н [326], проявляют выраженную специфичность к МВР₈₂₋₉₀. Оба этих пептида имеют гидрофобные С-концевые остатки и могут быть эффективно загружены непосредственно в пептид-связывающую щель молекул МНС класса I без дополнительного процессинга ERAAP/ERAP2 в эндоплазматическом ретикулуме. РС-ассоциированные HLA I человека В44, В35 и А2 представляют очень похожие МВР пептиды – МВР₈₁₋₈₉, МВР₈₄₋₉₃ и МВР₈₆₋₉₄, соответственно [364]. Ранее было показано, что МВР₃₄₋₄₄ и МВР₃₅₋₄₄ представлены на молекулах HLA класса I у пациентов с РС [365]. Важно отметить, что мышинные ЦТЛ, специфичные к МВР₈₃₋₉₀, успешно лизируют обработанные IFN γ зрелые олигодендроциты *ex vivo*, что подтверждает патофизиологическую значимость наших результатов.

Протеасомы, использованные для количественных исследований деградации МВР, были выровнены с точки зрения химотрипсиновой активности, которая должна в основном компенсировать недавно выявленную разницу в скорости гидролиза основных белков конститутивной и иммунопротеасомой [345]. Более того, мы показали, что большинство пептидов были одинаково представлены в гидролизатах МВР независимо от источника протеасом. Наконец, оба МВР-пептида (МВР₃₄₋₄₁ и МВР₈₃₋₉₀) имеют гидрофобные С-концевые аминокислотные остатки – лейцин и фенилаланин, соответственно. Таким образом, более реалистичное объяснение их повышенного количества, вытекающее из исследования Рауле с соавторами [345], представляет собой 8-кратное увеличение V_{max} активности по типу химотрипсина, обнаруженной у иммунопротеасомы. Наши наблюдения мы связываем с измененной специфичностью иммуносубъединиц протеасомы [343, 366] но не с недавно высказанной более высокой оборотистостью иммунопротеасомы [344]. Тем не менее, в настоящий момент никто не может исключить вероятность того, что иммунопротеасома гидролизует основные белки быстрее [345], особенно *in vivo*.

Принимая во внимание эти и другие доступные литературные данные, мы предлагаем следующую последовательность событий в качестве молекулярного механизма, объясняющего, каким образом иммунопротеасома участвует в патогенезе аутоиммунной демиелинизации (**Рис. 4.38**). Развитие воспалительной реакции в головном мозге, в частности выброс IFN γ , индуцирует экспрессию β 1i-субъединицы в олигодендроцитах, что приводит к эффективной продукции протеасомой пептидов МВР, распознаваемых CD8⁺ ЦТЛ. Кроме того, само воспаление в ЦНС снижает способность олигодендроцитов к активному сокращению популяции аутореактивных

CD8⁺ клеток, как недавно было показано на с соавторами [367]. Дальнейшее повышение количества иммунопротеасомы, обусловленное увеличением продукции IFN γ , может функционировать как элемент обратной-положительной связи, усугубляя прогрессирование заболевания. Эксперименты с дважды трансгенными мышами ODC-OVA показали, что без первоначальной атаки CD8⁺ ЦТЛ на олигодендроциты, которые экспрессируют OVA-антиген, клетки ODC-OVA остаются невидимыми для CD4⁺ Т-клеток. Кроме того, аутореактивные CD8⁺ Т-клетки могут спонтанно и в высшей степени эффективно поражать нейральные клетки без какой-либо кросс-презентации [368]. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что даже слегка увеличенный базальный уровень презентации иммунодоминантных пептидов на МНС класса I в головном мозге может инициировать прайминг аутореактивных CD8⁺ Т-клеток. Поэтому, согласно нашим данным, предрасположенность к аутоиммунной реакции у мышей линии SJL может быть объяснена, по меньшей мере частично, увеличением базального уровня экспрессии каталитических субъединиц протеасомы в ЦНС.

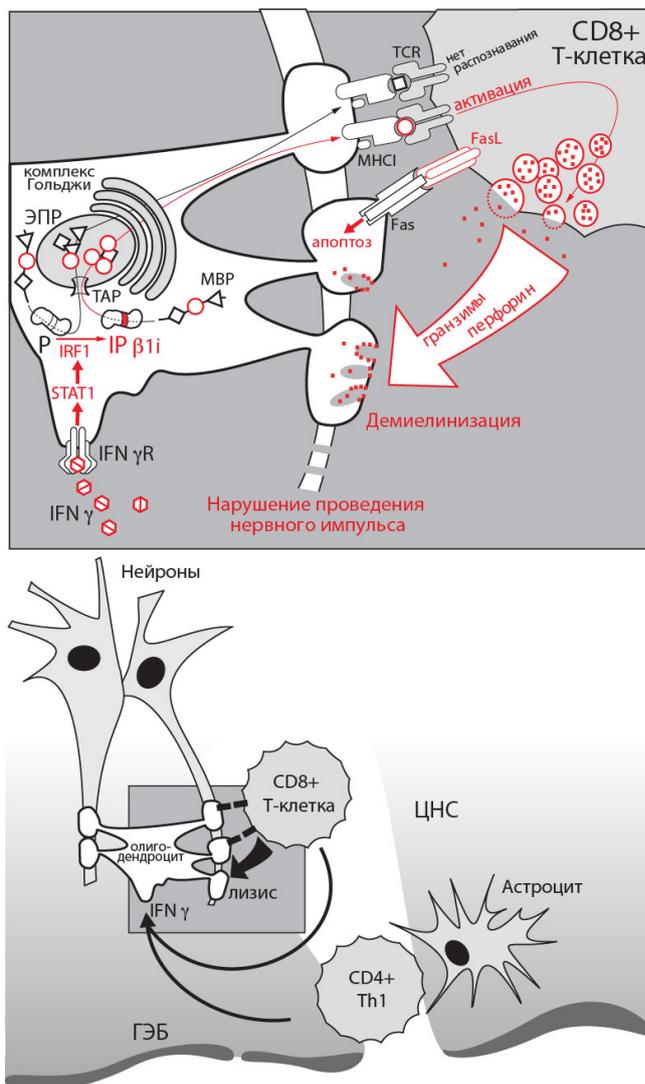


Рисунок 4.38 Молекулярный механизм вовлечения иммунопротеасомы в развитие аутоиммунной нейродегенерации.

Патофизиологическое значение полученных результатов заключается в том, что, будучи неконтролируемым системой убиквитинирования, протеолиз МВР иммунопротеасомой в условиях аутоиммунного состояния может быть краеугольным камнем, который приводит к массивному образованию пептидов, которые в составе МНС класса I маркируют олигодендроциты для атаки ЦТЛ. Следовательно, селективное ингибирование $\beta 1i$ субъединицы лекарственными препаратами может стать перспективным средством избирательного терапевтического вмешательства в РС.

4.2 НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

4.2.1 Создание модульных бифункциональных иммунотоксинов, способных к узконаправленной элиминации заранее predetermined популяций патологических лимфоцитов.

Сложность и неоднородность аутоиммунных аномалий, даже в рамках одного классифицированного заболевания, такого как рассеянный склероз, приводят к отсутствию эффективного лечения. Сложившаяся ситуация, вероятно, потребует дальнейшего развития терапии благодаря так называемой персонализированной медицине. Хотя известно, что CD4+ T-клетки играют первую скрипку в патогенезе РС, роль В-клеток не следует недооценивать. Терапевтическое вмешательство, направленное на патогенные аутореактивные В-клетки, может стать универсальным подходом для лечения различных аутоиммунных аномалий, включая РС.

Наработка и структурно-функциональный анализ рекомбинантных иммунотоксинов

Идеальными кандидатами в рамках данной стратегии для терапии раковых заболеваний принято считать иммунотоксины (ИТ) на основе конъюгатов антител, специфичных к поверхностному маркеру клеток-мишеней, и каталитических доменов токсинов различной природы. Для решения поставленной задачи – разработать белки-киллеры патологических В-клеток – вместо антитела возможно использование иммунодоминантных фрагментов антигенов, по отношению к которым В-клеточные рецепторы (БКР) аутореактивных лимфоцитов обладают высокой афинностью и избирательностью. В идеальном случае иммунотоксин среди всех клеток организма будет нацелен только на одну клетку-мишень или же клональное потомство этой клетки. На сегодняшний день разработано значительное количество различных иммунотоксинов для убийства раковых клеток, тем не менее, в мировой практике не существует единого мнения о том, какие цитотоксические белки лучше всего подходит для создания иммунотоксинов.

Поэтому первостепенной задачей данной работы было сравнение эффективности различных подходов по элиминации В-клеток для выбора наиболее оптимального цитотоксического агента. В результате анализа литературных данных в качестве цитотоксической составляющей иммунотоксинов были выбраны: РНКаза барназа, каталитические домены псевдомонадного токсина (ETA) и шига-подобного токсина *E. coli* (ШПТ), а также константный домен иммуноглобулина мыши и человека (Fc домен IgG), каждый из которых приводит к гибели клетки-мишени по различному механизму (Рис. 4.39).

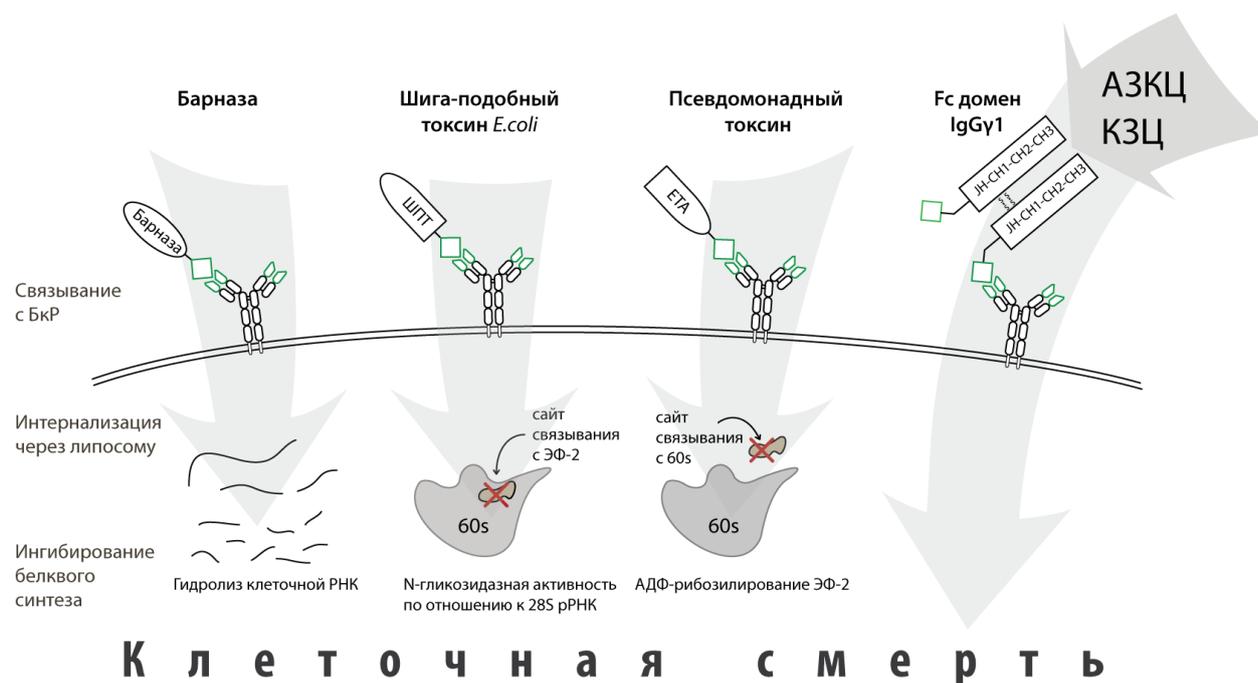


Рисунок 4.39 Схематическое изображение выбранных механизмов специфической элиминации аутореактивных В-клеток.

Для сравнения цитотоксичности выбранных токсинов и подтверждения работоспособности предложенной концепции нами были созданы рекомбинантные белки на их основе, слитные с сигнальной последовательностью – пептидом, содержащим тус эпитоп (SEQKLISEEDL). В свою очередь, в качестве модельной линии В-клеток была выбрана гибридома С-МУС, имеющая на своей поверхности БКР, специфичный к тус эпитопу. Сравнительный анализ эффективности цитотоксических агентов на модельной системе С-МУС позволил выбрать лучший вариант для дальнейшей элиминации природных антиген-специфичных В-клеток при ЕАЕ.

На первом этапе все очищенные рекомбинантные белки были протестированы на наличие тус эпитопа путем вестерн-блоттинга с моноклональным анти-тус антителом (Рис. 4.40).

А Окрашивание Кумасси

Б Гибридизация с анти-мыс и анти-Fc антителами

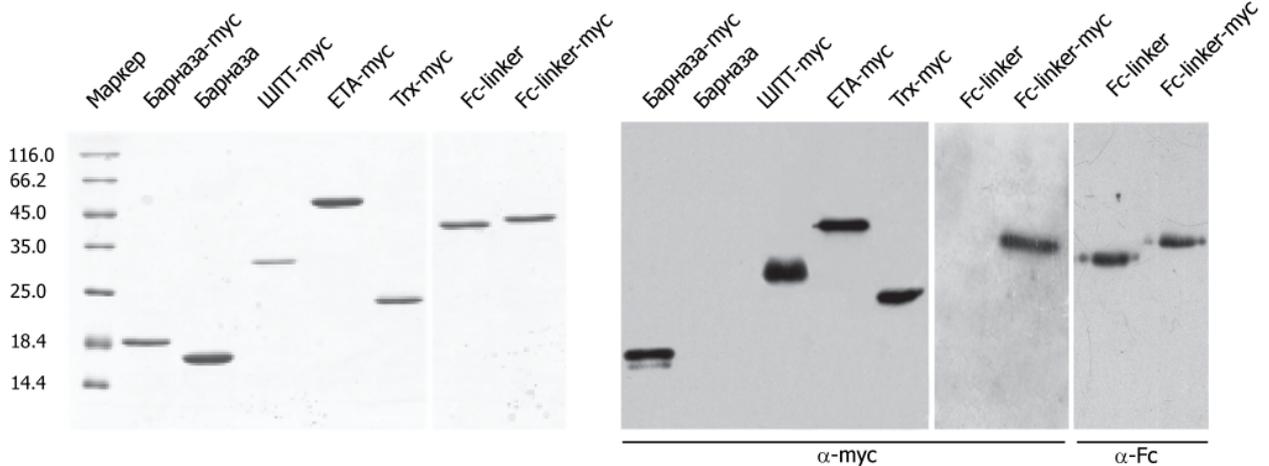


Рисунок 4.40 (А) Электрофоретический анализ степени гомогенности очищенных белков. **(Б)** Вестерн-блоттинг рекомбинантных белков с анти-мыс и анти-Fc антителами.

Для оценки функциональной активности выделенные рекомбинантные белки на основе РНКазы барназы инкубировали с РНК в отсутствие и с добавлением ингибитора РНКазы А. Образцы инкубировали 1 час при 37°C с 6 мкг дрожжевой РНК, после чего в пробы вносили этидиум бромид для визуализации концентрации остаточной РНК. Полученные пробы разносили в 96 луночную плашку и измеряли интенсивность флуоресценции раствора при длине волны 615 нм. Было показано, что барназа эффективно гидролизует дрожжевую РНК, при этом ингибитор РНКазы А не оказывает ощутимого влияния на ее ферментативную активность (**Рис. 4.41**).

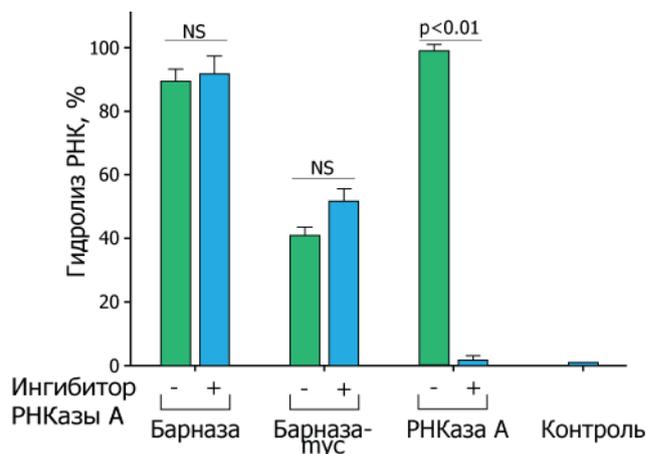


Рисунок 4.41. РНК-гидролизующая активность рекомбинантных ИТ барназы и барназы-мыс.

Наиболее показательным анализом функциональной эффективности созданных иммунотоксинов на основе барназы и РИБ является определение степени подавления трансляции *in vitro*. Для этого различные концентрации рекомбинантной барназы, псевдомонадного и шига-подобного токсинов добавляли к S30 экстракту клеток мышиноного асцита, содержащего экзогенную мРНК,

кодирующую люциферазу светлячка. Спустя 45 минут инкубации в растворы добавляли люциферин, а затем измеряли люциферазную активность (**Рис. 4.42**). Полученные данные наглядно демонстрируют эффективное ингибирование барназой и обоими рекомбинантными иммунотоксинами белкового синтеза *in vitro*, а также позволяют утверждать, что после интернализации в цитозоль созданные ИТ не будут подвергаться ингибированию внутриклеточными компонентами и тем самым не утратят своего цитотоксического потенциала.

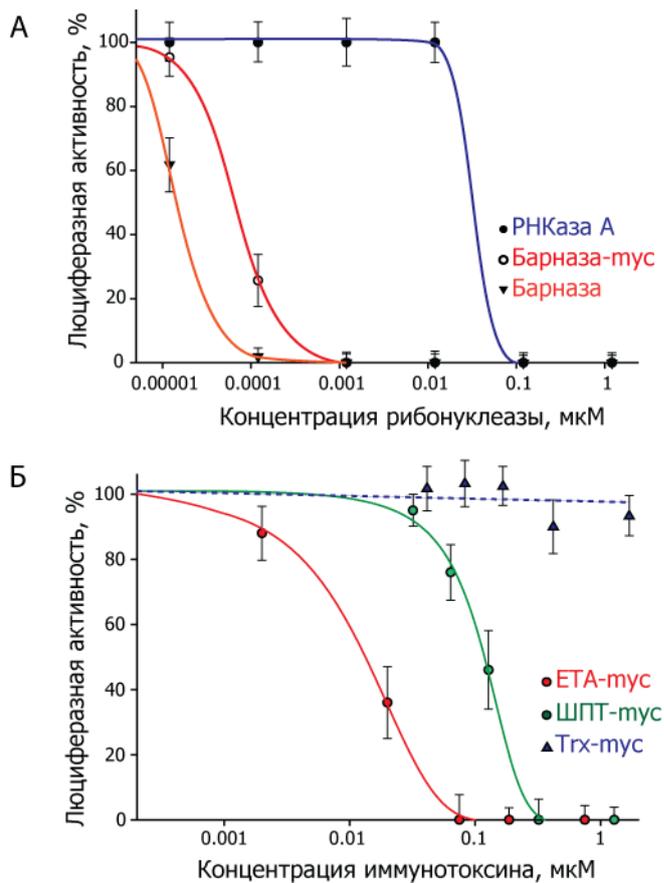


Рисунок 4.42 Влияние барназы, барназы-мус (**А**), псевдомонадного и шига-подобного токсинов (**Б**) на трансляцию люциферазы в клеточном экстракте.

Одним из возможных механизмов цитотоксического действия константного домена иммуноглобулина в составе молекулы Fc-linker-мус является комплемент-зависимая цитотоксичность антител. Для активации каскада системы комплемента несколько антител своим константным доменом должны связать C1q компонент системы комплемента. Для подтверждения функциональной активности рекомбинантных белков Fc-linker-мус и Fc-linker была определена степень их связывания с C1q компонентом системы комплемента в сравнении с полноразмерными антителами методом ИФА (**Рис. 4.43**). Приведенные данные наглядно демонстрируют, что, наряду с природными иммуноглобулинами (Fc доменом антитела, полученного обработкой поликлональных антител папаином, и полноразмерным антителом класса IgG1), созданные ИТ со сравнимой афинностью взаимодействуют с C1q.

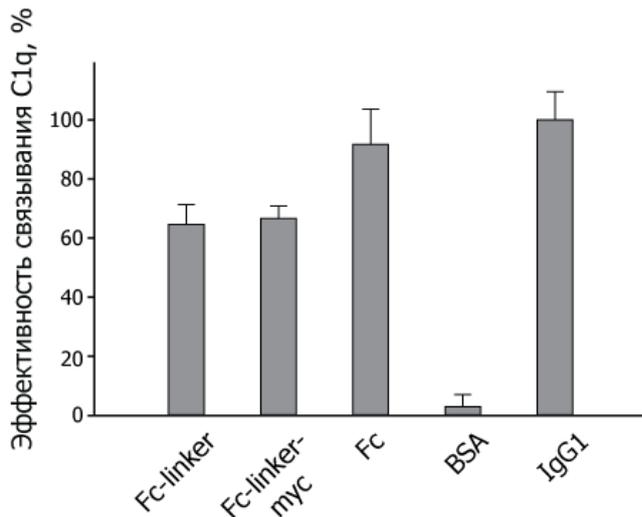


Рисунок 4.43 Связывание C1q компонента системы комплемента рекомбинантными белками Fc-linker и Fc-linker-мус по данным ИФА.

Исследование цитотоксических свойств иммунотоксинов *ex vivo*.

Для сравнения цитотоксического потенциала полученных ИТ выделенные рекомбинантные белки инкубировали с гибридной линией клеток С-МУС; в качестве отрицательного контроля использовали гибридную линию клеток 1В4F4, не несущую на своей поверхности анти-мус БкР. Инкубацию ИТ с клетками вели в 24х луночных планшетах в 1 мл культуральной среды в течение 72 часов при 37°C. К клеткам добавляли ИТ в разведениях от 0.1 до 2000 нМ для корректного определения значения LD₅₀. В случае инкубации клеток с рекомбинантными белками Fc-linker-мус и Fc-linker раствор в лунках содержал 1% сыворотки человека. Спустя 72 часа с помощью МТТ теста определяли количество живых клеток. Согласно полученным данным были построены кривые зависимости процента живых клеток в зависимости от концентрации ИТ (**Рис. 4.44**). В качестве отрицательного контроля для белков барназа-мус и Fc-linker-мус использовали барназу и Fc-linker, не содержащих мус эпитопа (**Рис. 4.44Б и 4.44Г**).

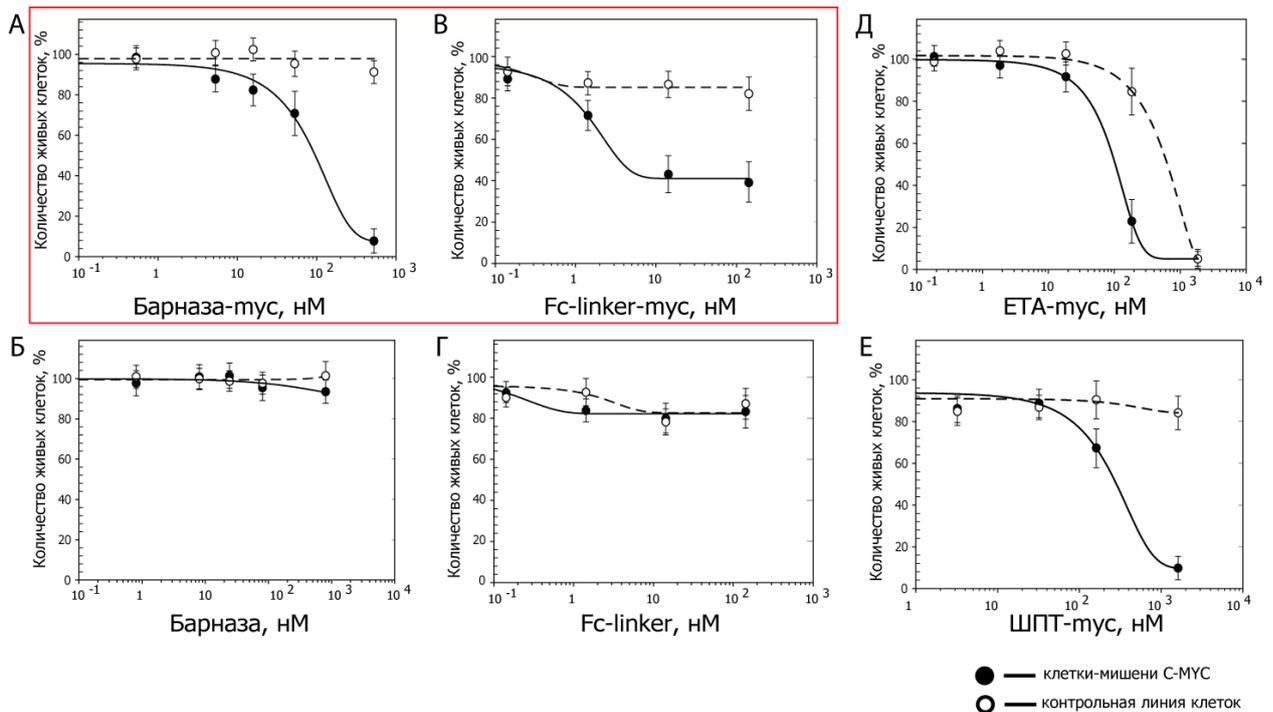


Рисунок 4.44 Зависимость процента выживших клеток С-МУС (сплошная линия) и 1В4F4 (пунктирная линия) от концентрации рекомбинантных иммунотоксинов; время инкубации 72 часа.

Анализ функциональной активности панели рекомбинантных ИТ, проведенный на модельных клетках С-МУС, продемонстрировал высокую степень их специфической цитотоксичности. На основании полученных результатов была определена LD_{50} рекомбинантных ИТ для клеток линии С-МУС (Табл. 5). Наиболее сильным цитотоксическим действием обладает рекомбинантный псевдомонадный токсин, однако данный ИТ продемонстрировал и наиболее высокую неспецифическую цитотоксичность. Шига-подобный токсин показал средние показатели специфичности и цитотоксичности на модельных клетках. Для дальнейшей работы нами были выбраны ИТ на основе барназы и Fc домена антитела, так как они показали наименьшую

Таблица 5. Значения LD_{50} действия полученных иммунотоксинов на модельную линию клеток С-МУС.

Рекомбинантный ИТ	наличие тус эпитопа	LD_{50} для клеток линии С-МУС
псевдомонадный токсин	+	0,05 мкМ
шига-подобный токсин <i>E.coli</i>	+	0,44 мкМ
барназа	—	> 10 мкМ
Fc домен IgG γ 1	+	~0.002 мкМ
	—	> 10 мкМ

степень неспецифического цитотоксического действия, и эффективно элиминировали клетки-мишени (Табл. 5).

Селективная элиминация В-клеток в культуре спленоцитов иммунотоксинами на основе барназы и константного домена иммуноглобулина

В дальнейшем нами был осуществлен ряд дополнительных экспериментов на нативных В-клетках для достоверного подтверждения разрабатываемой концепции. Для этого у мышей линии BALB/c стимулировали иммунный ответ к тус пептиду путем их иммунизации химически конъюгированным белком КЛН-тус. Через 3 недели после иммунизации из селезенки иммунизированных мышей была получена культура спленоцитов, содержащая популяцию В-клеток, специфичных к тус эпитопу. В качестве основных подходов для анализа эффективности действия иммунотоксинов применяли два метода: проточная цитофлуориметрия и анализ концентрации суммарных и тус-специфических антител.

Для подсчета процента тус-специфичных В-клеток выделенные спленоциты инкубировали с белком БСА-ФИТЦ-тус и анти-В220-АПС антителами (В220 – поверхностный маркер В-клеток), после чего клетки анализировали на проточном цитофлуориметре FACSDiva (BD). Нами было показано наличие В-клеток, специфических к тус эпитопу, в культуре спленоцитов, изолированных из иммунизированной мыши (Рис. 4.45 секция 1), в то время как в культуре клеток, изолированных из неиммунизированной мыши, данная популяция клеток отсутствовала (Рис. 4.45 секция 2). Для изучения цитотоксического действия созданных ИТ культуру спленоцитов инкубировали с барназой и константным доменом иммуноглобулина, слитными с тус эпитопом. Как видно из представленных данных, инкубация клеток с контрольными белками барназой (Рис. 4.45 секция 4) и тиоредоксином, слитным с тус эпитопом (Тгх-тус) (Рис. 4.45 секция 5), не приводит к статистически значимому подавлению целевой популяции. В то время как инкубация клеток с ИТ барназа-тус приводит к значительному, приблизительно трехкратному, уменьшению популяции целевых клеток (Рис. 4.45 секция 3).

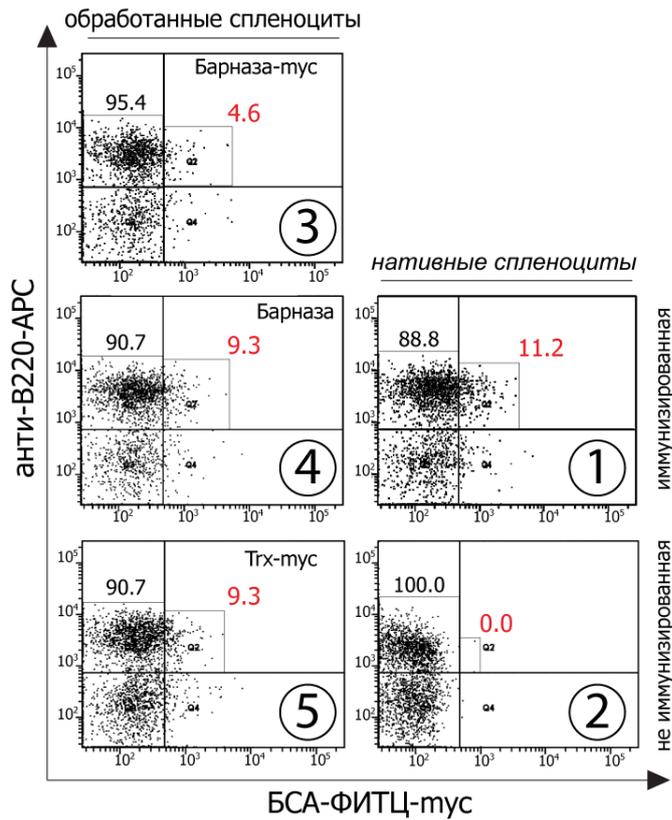


Рисунок 4.45 Анализ подавления популяции В-клеток, специфичных к мус эпитопу, в культуре спленоцитов после инкубации с рекомбинантными белками барназа-мус (3), барназа (4) и Тгх-мус (5), по сравнению с контрольной культурой (1) и интактными спленоцитами из неиммунизированной мыши (2).

Для изучения цитотоксического действия Fc-linker-мус на мус-специфические В-клетки данный ИТ был аналогичным образом добавлен в культуру спленоцитов, изолированных из мыши линии BALB/c, иммунизированной конъюгатом KLH-мус. В качестве отрицательного контроля цитотоксического действия мы использовали белок Fc-linker. Инкубацию спленоцитов с Fc-linker-мус и Fc-linker производили в течение 72 часов, ежедневно отбирая образец клеточной среды. Далее в отобранных образцах методом ИФА был определена тотальная концентрация иммуноглобулинов, а также концентрация специфических анти-мус антител (**Рис. 4.46**).

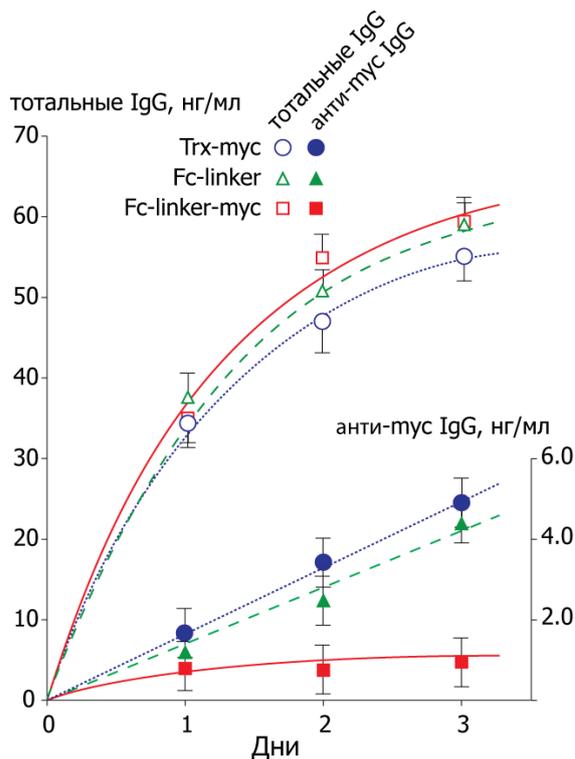


Рисунок 4.46 Снижение титра анти-мус антител в культуре спленоцитов при инкубации с ИТ Fc-linker-мус (квадраты) по сравнению с контрольными белками Fc-linker (треугольники) и Trx-мус (круги). Тотальный уровень иммуноглобулинов в культуре оставался неизменным во всех образцах.

Как видно из рисунка 4.46, при инкубации изолированных спленоцитов с ИТ Fc-мус в сравнении с контролями происходит значительное снижение продукции мус-специфичных антител, в то время как общая концентрация IgG остается неизменной. Данный факт однозначно свидетельствует о способности белка Fc-мус селективно подавлять экспрессию мус-специфичных антител.

Элиминация иммунотоксинами миелин-реактивных В-клеток *in vivo*

Заключительной стадией изучения терапевтического потенциала созданных ИТ являлось проведение селективной элиминации аутореактивных МВР-специфичных В-клеток *in vivo* в мышах линии SJL с индуцированным ЕАЕ. В результате тестирования панели созданных ИТ на предыдущих этапах наиболее перспективными оказались ИТ на основе барназы и константного домена иммуноглобулина. Для финального теста из двух озвученных кандидатов нами был выбран константный домен иммуноглобулина. Основное преимущество Fc при проведении экспериментов *in vivo* состоит в меньшей иммуногенности и в значительной молекулярной массе, превышающей 60 кДа, что позволяет этому белку долгое время не отфильтровываться в почечных гломерулах [369].

Для формирования популяции аутореактивных В-клеток, специфичных к МВР, ЕАЕ был индуцирован у мышей линии SJL. Для этого животным производили двукратные подкожные инъекции гомогената спинного мозга мыши в эмульсии ПАФ, дополнительно для усиления развития ЕАЕ в те же дни животным внутривенно вводили раствор Pertussis toxin. В качестве

отрицательного контроля была использована группа интактных мышей без заболевания (группа – Контроль).

Мышей с индуцированным ЕАЕ разделили на 5 экспериментальных групп по 10 голов в каждой: (1) без терапии; (2) животным однократно вводили 200 мкг Сорахоне (группа - Сорахоне); (3) животным в каждой группе дважды внутривенно вводили рFm (константный фрагмент иммуноглобулина, группа - рFm), (4) рFm-7 (константный фрагмент иммуноглобулина, слитный с фрагментом MBP QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQG, группа – рFm7) или (5) рFm-11 (константный фрагмент иммуноглобулина, слитный с фрагментом MBP RASDYKSAHKGFKGVDAQGTLSKIFKL, группа – рFm-11) (Табл. 6).

Таблица 6. Экспериментальные группы.

Группа	N =	ЕАЕ	Иньекции	Количество инъекций	День инъекции	мкг/гол
Контроль	5	–	–	–	–	–
Без терапии	10	+	–	–	–	–
Сорахоне	10	+	Сорахоне	1	1	200 мкг
рFm	10	+	рFm	2	5 и 10	50 мкг
рFm-7	10	+	рFm-7	2	5 и 10	50 мкг
рFm-11	10	+	рFm-11	2	5 и 10	50 мкг

На седьмой день с начала индукции ЕАЕ и до окончания эксперимента во всех группах производили оценку развития симптомов ЕАЕ по 5 бальной шкале. На 14-15 день после индукции заболевания у мышей во всех группах начинали развиваться симптомы ЕАЕ, на 17-19 дни заболевание достигало пика обострения. На 23 день после начала эксперимента из каждой экспериментальной группы были отобраны мыши SJL с одинаковой клинической картиной развития ЕАЕ (Рис. 4.47А). Культуры спленоцитов, полученные из этих мышей, анализировали на наличие В-клеток, специфичных к иммунодоминантному и С-концевому фрагментам MBP. Для этого клетки инкубировали с пептидами MBP₈₁₋₁₀₄ (7) и MBP₁₄₆₋₁₇₀ (12), конъюгированными с биотином. Для визуализации В-клеток использовали конъюгат анти-B220 антител с флуорофором APC (eBioscience), в свою очередь биотинилированные пептиды MBP, связанные с поверхностными БкР, детектировали добавлением конъюгата стрептавидина с флуорофором Pacific Blue. Образцы анализировали методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSDiva (BD), результаты представлены на (Рис. 4.47Б).

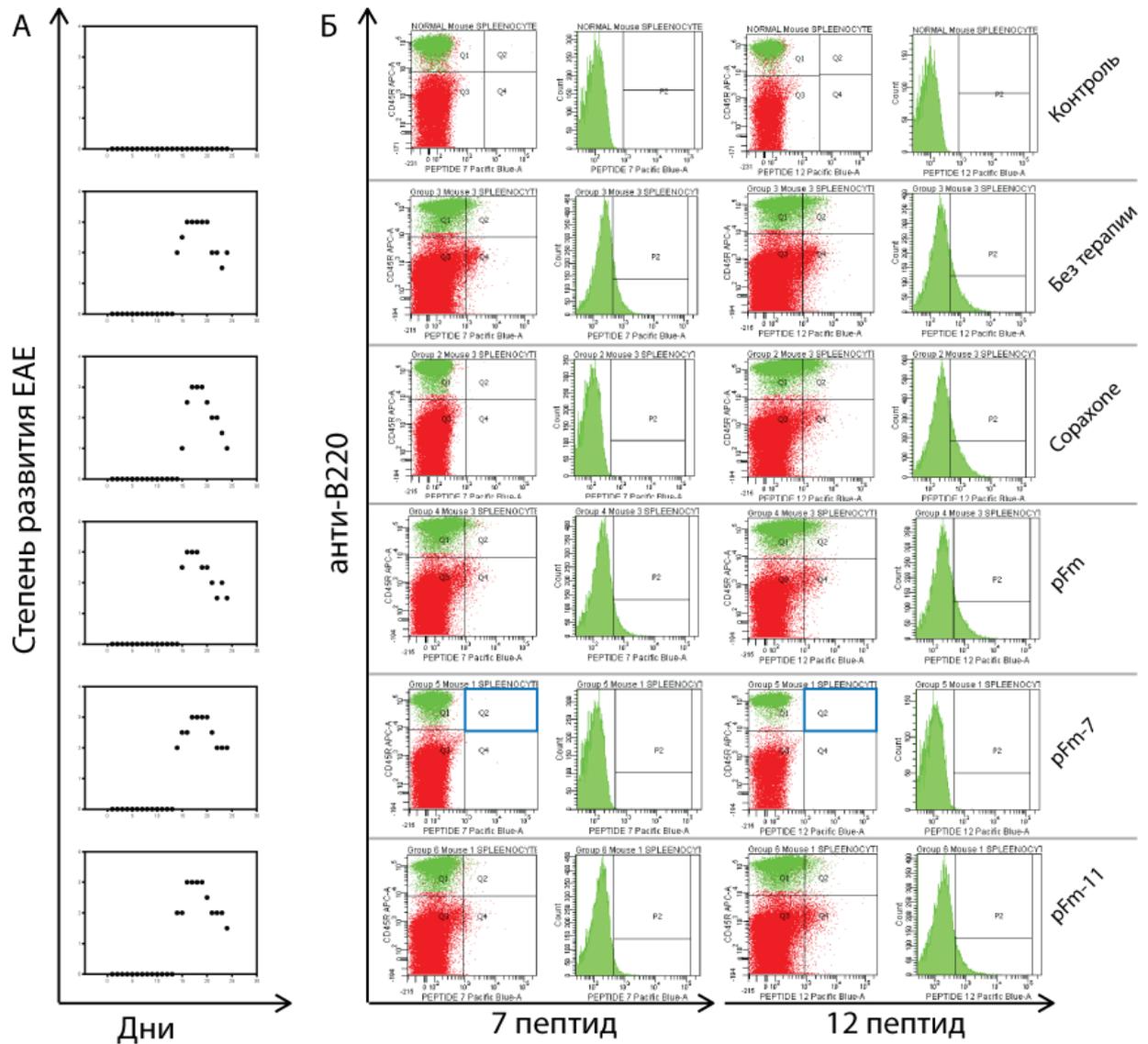


Рисунок 4.47 Степень развития ЕАЕ у мышей линии SJL, отобранных из каждой экспериментальной группы (А). Анализ изолированных спленоцитов на наличие В-клеток, специфичных к 7 и 12 фрагментам МВР, методом проточной цитофлуориметрии (Б).

Как видно из рисунка 4.47Б у мыши из группы “контроль” отсутствовала популяция В-клеток, специфичных к МВР, в то время как в культуре спленоцитов, полученной у животного из группы “без терапии”, существует значительная популяция В-клеток, специфичных к обоим пептидам МВР. При однократном введении препарата Сораксоне, в культуре клеток оставалась популяция В-клеток, имеющих на своей поверхности БкР, специфичный только к 12 фрагменту МВР. Данное наблюдение в очередной раз подтверждает, что терапевтическое действие Сораксоне направленно на популяцию В-клеток, специфичных к иммунодоминантному эпитопу МВР (7 пептиду). Как и ожидалось, внутривенные инъекции контрольного белка rFm, не содержащего пептидов МВР, а также контрольного белка rFm-11 не привело к подавлению целевой популяции В-клеток. В свою очередь введение rFm-7 приводило к полной элиминации В-клеток, специфичных не только к 7 фрагменту, который присутствует в составе ИТ rFm-7, но

и к 12 фрагменту. Таким образом, после терапии ИТ рFm-7, пул В-клеток, специфичных к МВР, в культуре спленоцитов из леченой мыши совпадал с профилем здорового неиммунизированного животного. Полученные результаты позволяют предположить, что ИТ рFm-7 наряду с селективной элиминацией В-клеток, специфичных к иммунодоминантному фрагменту МВР (7), также подавляет формирование В-клеток, специфичных к 12 фрагменту МВР.

Перспектива использования иммунотоксинов для селективной элиминации аутореактивных В-клеток

Аутореактивные В-клетки являются одним из ключевых игроков во многих аутоиммунных патологиях. Эти агрессивные патогенные клетки способны вызывать критическое повреждение тканей и органов. Имеются свидетельства успешной элиминации патогенных В-клеток с применением различных ИТ, таких как MOG-Fc, MOG-ETA и МВР-ETA [370-372]. В настоящем исследовании нам удалось провести сравнительное исследование панели ИТ, основанных на различных механизмах действия. В общем эти белки состоят из двух частей: эффекторного домена (токсина, фрагмента антитела, РНКазы) и лиганда направленной доставки.

Направляющий мотив ИТ может избирательно взаимодействовать с патогенными В-клетками через их БКР и вызывать гибель клеток путем действия слитного токсина. Барназа и рибосом-инактивирующие токсины ингибируют синтез белка посредством гидролиза клеточной РНК [373, 374] и ингибирования компонентов эукариотического трансляционного аппарата, соответственно [375, 376]. А-субъединица шига-подобного токсина состоит из двух частей: цитотоксического домена А1 и связывающего домена А2. При интернализации токсина связь между А1 и А2 расщепляется фурином, высвобождая цитотоксический домен А1 (27 кДа), который впоследствии выходит из ранней эндосомы [377]. В настоящем исследовании все искусственные элементы, включая линкер, с-тус эпитоп и кластеры, слитны с доменом А2. Таким образом, после эндоцитоза и фурин-зависимого расщепления полностью природный домен А1 способен функционировать независимо в соответствии с заранее predetermined биологической программой убийства клетки-мишени. Аналогично, нуклеотидная последовательность ETA-с-тус кодирует транслокационный домен II токсина, слитый с с-тус-последовательностью, и далее высвобожденный в цитозоль цитотоксический домен III вызывает гибель целевых клеток [376]. Таким образом, созданные химерные бактериальные иммунотоксины обладают природной способностью мигрировать из эндосомы в цитозоль, где они способны проявить свою цитотоксическую активность. Барназа не обладает подобной способностью. Однако ранее сообщалось, что барназа самостоятельно высвобождается в цитозоль из эндосомы [373].

Нами было показано, что, в отличие от ферментативной активности РНКазы А, ингибиторы, присутствующие в эукариотических клеточных экстрактах, не влияют на деградацию РНК, опосредованную барназой. Наши данные согласуются с ранее полученными результатами [373], свидетельствующими, что иммунотоксины на основе барназы после интернализации не подвержены ингибированию эндогенными эукариотическими ингибиторами РНКаз. В случае иммунотоксинов, содержащих Fc-домен, элиминация патогенных В-клеток происходит путем антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC⁸⁵), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC⁸⁶), а также потенциально путем образования активных форм кислорода [378].

В настоящем исследовании нами был проведен сравнительный анализ специфической и неспецифической токсичности различных «боеголовок». Иммунотоксин ЕТА-с-мус проявил высокий цитотоксический эффект как в случае клеток-мишеней, так и для контрольных клеточных линий. Иммунотоксин на основе шига-подобного токсина продемонстрировал промежуточную цитотоксичность и специфичность по сравнению с другими иммунотоксинами. Наиболее обнадеживающие результаты были получены для иммунотоксинов на основе барназы и Fc, которые проявили наилучшее соотношение цитотоксичности и специфичности, составившее приблизительно 900 и 5000 единиц, соответственно. Нами было показано, что подобные иммунотоксины способны специфически элиминировать В-клетки и уменьшать продукцию соответствующих антител в культуре спленоцитов, изолированных из мышей, иммунизированных KLH-с-мус.

Резюмируя, можно утверждать, что иммунотоксины на основе SLT и ЕТА обладают значительной побочной токсичностью, в то же время барназа и константный фрагмент иммуноглобулина человека лишены этих недостатков. Fc обладает дополнительными преимуществами благодаря высокой стабильности в кровотоке и минимальному потенциальному иммунному ответу. Введение этого рекомбинантного иммунотоксина в SJL/J мышей с индуцированным ЕАЕ приводило к полному устранению популяции миелин-реактивных В-клеток. Подобные результаты позволяют сделать вывод о том, что валидированная концепция может быть успешно реализована при разработке лекарств для целенаправленной терапии рассеянного склероза и других аутоиммунных нарушений.

⁸⁵ от англ. Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity

⁸⁶ от англ. Complement-dependent cytotoxicity

4.2.2 Разработка подходов к индукции иммунотолерантности при рассеянном склерозе инкапсулированными фрагментами аутоантигенов.

Введение иммунодоминантных пептидов MBP, инкапсулированных в маннозилированные липосомы, значительно снижает тяжесть протекания EAE у крыс линии DA

На основе имеющихся данных мы выбрали три пептида MBP₄₆₋₆₂ (p1), MBP₁₂₄₋₁₃₉ (p2) и MBP₁₄₇₋₁₇₀ (p3) (рис. 1B) для оценки их терапевтического потенциала. Для проведения процедуры инкапсуляции липосомы получали из яичного фосфатидилхолина с добавлением одного молярного процента ManDOG (18) (mSUV⁸⁷) или без него (SUV). Получение липосом (**Рис. 4.48А**) включало следующие стадии: (i-ii) испарение органического растворителя из смеси липидов, приводящее к образованию нерегулярных липидных слоев; (iii) первую стадию регидратации, при которой образуются многослойные липосомные везикулы (MLV⁸⁸); (iv) гомогенизация высоким давлением для получения «пустых» SUV; (V) сублимационная сушка липосом в присутствии пептидов MBP, которые на этой стадии расположены между коллапсированными липосомными везикулами; и (vi) вторую стадию регидратации, приводящую к инкапсуляции пептидов в SUV диаметром около 60-100 нм, содержащие остатки маннозы на их поверхности.

Для получения количественных данных, демонстрирующих интернализацию липосомных препаратов, мы выделили периферические дендритные клетки из крови крыс и далее инкубировали их с маннозилированными и неманнозилированными липосомами в различных концентрациях, нагруженных с-тус-пептидом (**Рис. 4.48Б**). Результаты эксперимента свидетельствуют, что дендритные клетки поглощают маннозилированные липосомы значительно более эффективно нежели неманнозилированные. Далее мы протестировали наличие усиления терапевтического действия при инкапсуляции MBP-пептидов в липосомы и добавлении маннозилированного компонента к липидной композиции. С этой целью DA-крысам с EAE, индуцированным иммунизацией MBP₆₂₋₈₄, подкожно вводили пептид p1 как таковой или инкапсулированный в маннозилированные или неманнозилированные липосомы (**Рис. 4.48В**). Непосредственно сам пептид не проявлял обнаружимого терапевтического эффекта, тогда как тот же пептид, инкапсулированный в липосомы значительно ингибировал развитие EAE. Более того, маннозилированные липосомы, нагруженные p1, были, очевидно, более эффективными, чем аналогичные по заполнению неманнозилированные липосомы.

⁸⁷ от англ. small unilamellar vesicles

⁸⁸ от англ. multilamellar vesicles

А

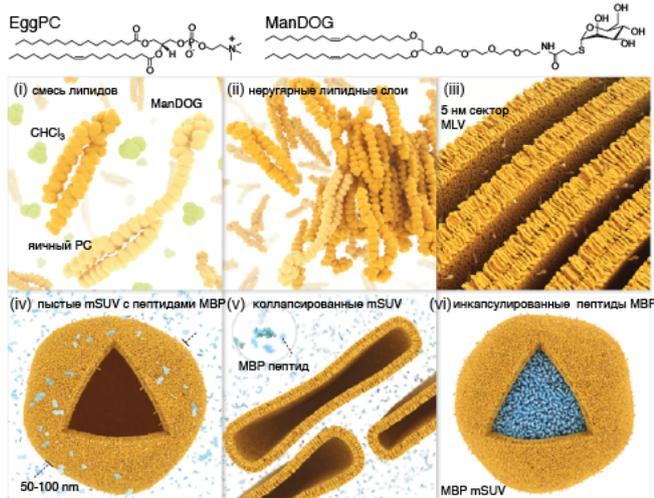
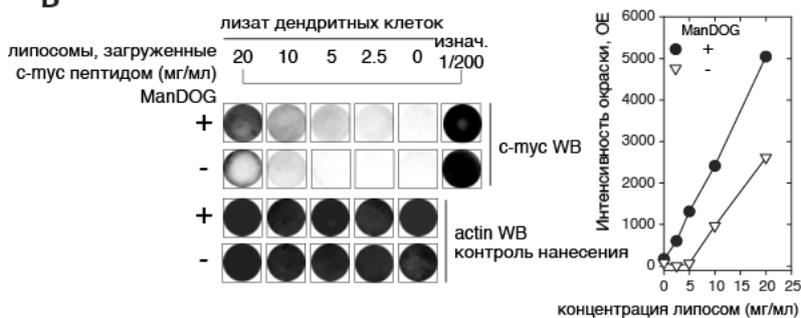
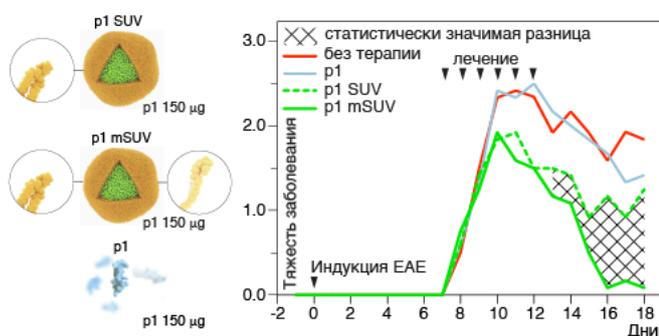


Рисунок 4.48 (А) Химические формулы липидов Egg PC и MannDOG, использованных для создания липосом. Ниже представлен процесс получения липосомных наноконтейнеров. **(Б)** Сравнение эффективности интернализации полипептида, содержащего тус эпитоп, в составе липосом с MannDOG и без. Гибридизация клеточного лизата дендритных клеток с антителами к тус эпитопу и актину. Справа представлен денситометрический анализ количества интернализированного тус пептида. **(В)** Профили развития ЕАЕ у крыс линии DA при различных видах терапии.

Б



В



Для анализа действия каждого из трех пептидов MBP и их смеси, мы подготовили четыре липосомных препарата, в которых эти три пептида по отдельности и их эквимоллярная смесь были инкапсулированы в липосомы, несущие остатки маннозы на их поверхности (Рис. 4.49А). Полученные липосомы имели диаметр приблизительно 85 нм, имели слегка отрицательный заряд (от -7,5 до -10,5 мВ) и содержали в инкапсулированном виде более 90% исходного количества пептида. Для тестирования этих mSUV в терминах их терапевтической эффективности, полученные композиции подкожно вводили крысам DA с индуцированным ЕАЕ (Рис. 4.49Б). Терапия была начата на 7-й день после индукции ЕАЕ, то есть во время первых клинических

проявлений заболевания. Каждая крыса получила шесть ежедневных инъекций тестируемых варинатов mSUV. По окончании эксперимента для каждой группы были рассчитаны средняя тяжесть EAE, а также средняя кумулятивная и максимальная тяжесть протекания EAE (Рис. 4.49В). Препараты спинного мозга, окрашенные гематоксилин-эозином, были получены для оценки степеней глиоза и демиелинизации (Рис. 4.49Г). Нами было обнаружено, что группа p1 mSUV значительно отличается от группы плацебо (mSUV) как по максимальным, так и по кумулятивным показателям тяжести заболевания, в то время как подобная разница не наблюдалась для группы p2 mSUV или p3 mSUV (Рис. 4.49В). С другой стороны, средние профили оценки тяжести заболевания (Рис. 4.49Б, правая панель) и оценки степени демиелинизации (Рис. 4.49Г) наглядно демонстрируют, что окончательное восстановление в группах p2 mSUV и p3 mSUV было заметно лучше, чем в группе p1 mSUV. Важно отметить, что препарат p123 mSUV значительно снизил тяжесть протекания EAE, уменьшив как общий профиль, так и в итоге обеспечив полное восстановление (Рис. 4.49Б, центральная панель), таким образом сочетая лечебные свойства отдельных пептидов. Группа p123 mSUV значительно отличалась от группы плацебо по средней максимальной тяжести болезни (Рис. 4.49В, центральная панель) и имела самый низкий средний показатель совокупной тяжести заболевания (14, IQR = 5,25) среди всех тестовых групп (Рис. 4.49В, левая панель). При расчете параметра, характеризующего величину дельты между экспериментальными группами и плацебо (Рис. 4.49В, правая панель), группы расположились в следующем порядке $p1 \ll p2 \text{ mSUV} \approx p3 \text{ mSUV} < p1 \text{ mSUV} \approx \text{Сораконе} < p123 \text{ mSUV}$; В последней группе значение этого параметра было самым высоким (20,3 ед. MDS×день). Глатирамера ацетат, который использовался в качестве положительного контроля, был аналогичен формуляции p123 mSUV в терминах профиля подавления EAE (Рис. 4.49Б, центральная панель) и средней максимальной тяжести развития EAE (Рис. 4.49В, центральная панель). Как и ожидалось, введение пептида p1 без липосом не обладало значимым терапевтическим эффектом (Рис. 4.49Б, правая панель, 4.49В и 4.49Г).

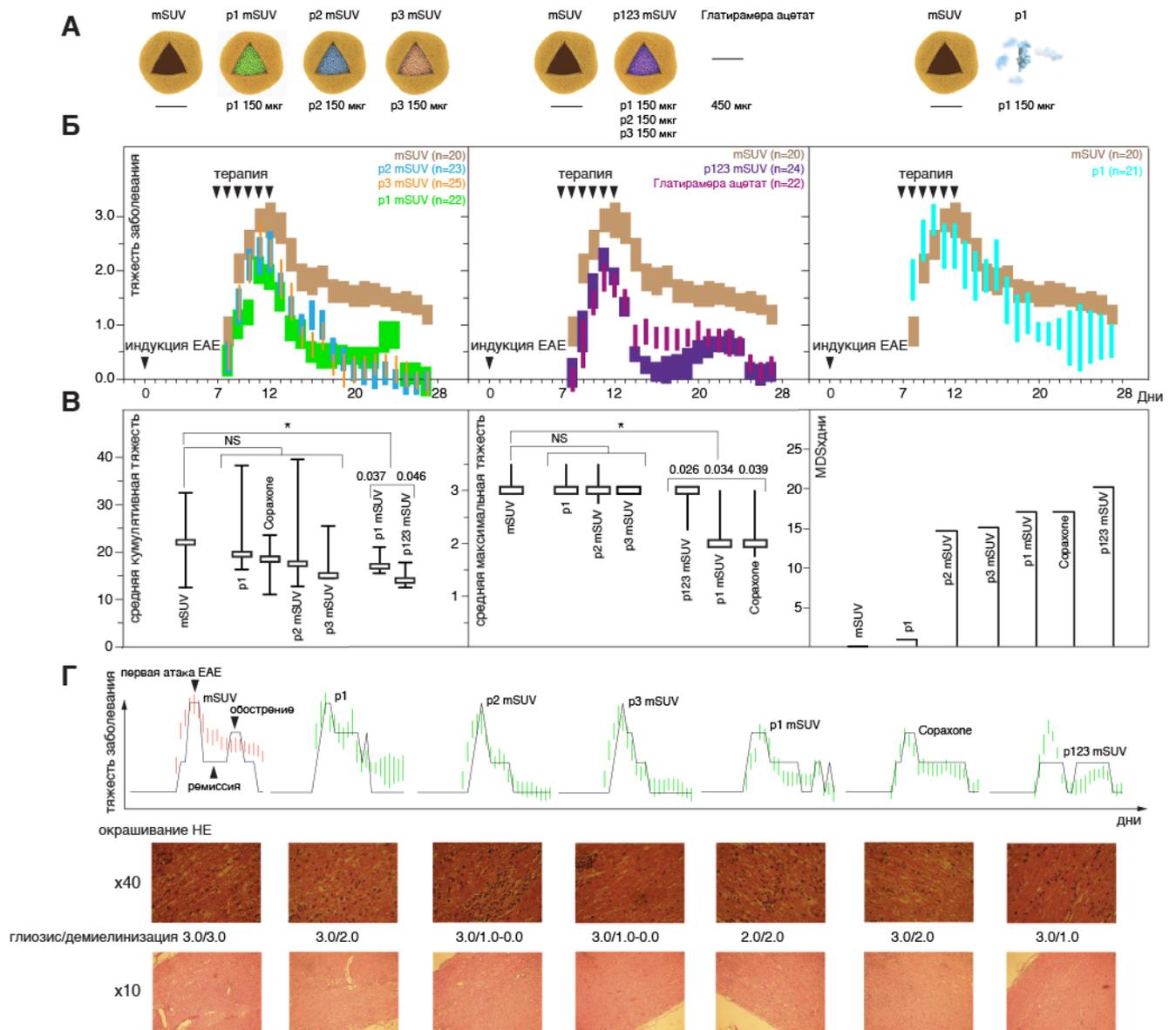


Рисунок 4.49 Терапия экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита в крысах линии DA иммунодоминантными пептидами MBP, инкапсулированными в липосомы. **(А)** Схематическое изображение вводимых композиций с указанием состава и количества инкапсулированных пептидов. **(Б)** Экспериментальные группы животных оценивали по усредненной степени развития симптомов заболевания. **(В)** Сравнительный анализ средней кумулятивной и средней максимальной степени развития EAE у DA крыс в различных экспериментальных группах (В, левая и средняя панель, соответственно). Сопоставление интегральной терапевтической эффективности (произведение тяжести развития заболевания на дни) пептидов MBP в составе липосом по сравнению с контролем (В, левая панель). **(Г)** Из каждой экспериментальной группы было выбрано животное с профилем развития EAE (сплошная линия), наиболее приближенным к среднему профилю по всей группе (продольные зеленые и красные линии). Ниже представлен гистологический анализ повреждений в ЦНС у соответствующих крыс линии DA с индуцированным EAE в различных экспериментальных группах.

Инкапсулированные иммунодоминантные пептиды MBP подавляют развитие EAE путем подавления Th1-цитокинов и продукции BDNF в ЦНС

Чтобы прояснить иммунологический статус животных, подвергшихся терапии, мы проанализировали уровень сывороточных аутоантител и провели окрашивание цитокинов в ЦНС (Рис. 4.50). Значительное снижение концентрации аутоантител к полноразмерному MBP по

сравнению с контрольной группой наблюдалось только у крыс, получавших p1 mSUV, p123 mSUV и Сорахоне (Рис. 4.50А, левая панель). Титр антител к иммунодоминантным фрагментам MBP 81-103 и 146-170 также был снижен в этих группах (Рис. 4.50А, центральная и правая панели). Важно отметить, что пептид MBP₈₁₋₁₀₃ не входил в состав ни одной из композиций липосом, тем не менее концентрация аутоантител, специфичных к этому фрагменту, снизилась в той же степени, как и анти-MBP антитела.

Окрашивание Th1-цитокинов в спинном мозге крыс, получавших композиции p1 mSUV, p123 mSUV и глатирамера ацетат, показало, что продукция IL-2 и IFN γ была в значительной степени подавлена во всех трех группах (Рис. 4.50Б), что указывает на противовоспалительный эффект исследуемых композиций. Как следует из результатов проведенных тестов, степень демиелинизации в ЦНС у крыс из этих групп также снижалась. Подавление нейродегенерации коррелировало с усиленным выбросом нейротропного фактора мозга (BDNF⁸⁹), что отчетливо наблюдалось при окраске срезов спинного мозга крыс из различных экспериментальных групп (Рис. 4.50Б).

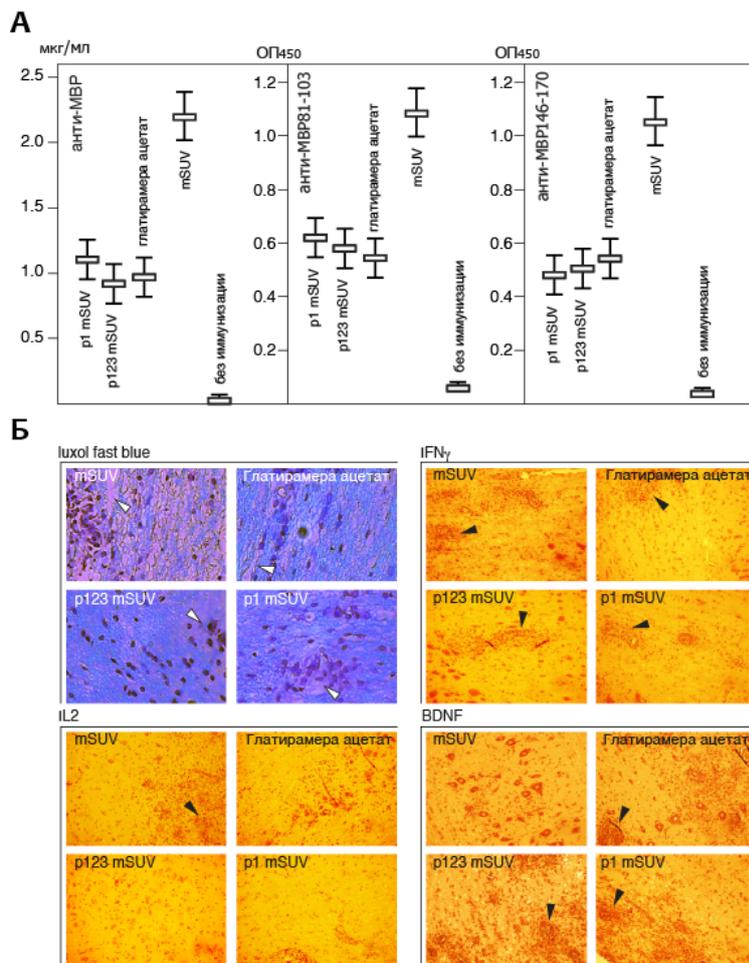


Рисунок 4.50 (А) Сравнение титра сывороточных аутоантител к полноразмерному MBP и его иммунодоминантным фрагментам MBP₈₁₋₁₀₃ и MBP₁₄₆₋₁₇₀ у крыс линии DA с EAE, подвергнутых терапии, в сравнении животными из контрольной группы с EAE без лечения и интактными животными. **(Б)** Гистологические срезы спинного мозга крыс линии DA из групп mSUV, Сорахоне, p1 mSUV и p123 mSUV. Для выявления повреждений миелиновой оболочки аксонов использовали краситель luxol fast blue. Гибридизация срезов с антителами, специфичными к IFN γ , IL-2 и BDNF, для определения цитокинового статуса ЦНС.

⁸⁹ от англ. brain-derived neurotrophic factor

Липосомированные пептиды MBP (Хетус) в качестве универсального способа индукции иммунотолерантности при аутоиммунной нейродегенерации

ЕАЕ может быть индуцирован у разных видов животных путем иммунизации миелиновыми антигенами. Тем не менее, ряд терапевтических средств, протестированных на животных с индуцированным ЕАЕ, не показали какого-либо положительного эффекта и даже вызывали обострение у пациентов с РС [379]. Подобные случаи могут быть частично объяснены тем фактом, что В-клеточный ответ может значительно варьироваться от одной модели ЕАЕ к другой, а также сильно видоизменяться от применяемого протокола иммунизации. Именно поэтому на начальной стадии мы провели тщательную оценку различных моделей ЕАЕ в терминах аутоантительного ответа, дабы валидировать их «иммунологическую значимость» и выбрать соответствующие биомаркеры для последующего анализа терапевтического ответа на применяемую терапию. Следует отметить, что профилирование антител из ЦСЖ пациентов с РС подтвердило наличие аутоантител против шести пептидов MBP: 124-143, 146-170, 154-170, 10-29, 41-59 и 80-99 [178]. Это соответствует нашим данным, поскольку пять из шести этих фрагментов MBP перекрываются с обнаруженными нами.

Ранее было установлено, что инкапсулированные миелиновые аутоантигены эффективны для лечения ЕАЕ у крыс Льюиса [380, 381]. С другой стороны, введение маннозилированного APL M-PLP139-151 привело к индукции специфической иммунологической толерантности к ЕАЕ у мышей линии SJL [382]. Мы предположили, что сочетание этих подходов может привести к повышению эффективности терапии. Основным преимуществом комбинированного подхода является то, что иммунодоминантные пептиды содержатся в нативной форме внутри липосомы, в то время как их целенаправленная доставка в АПК осуществляется за счет поверхностно экспонированных остатков маннозы. Известно, что АПК несут на своей поверхности большее количество маннозных рецепторов, что облегчает эндоцитоз маннозилированных липосомных частиц в цитозоль [383]. Эффективность представления антигена в маннозилированной форме по сравнению с нативной формой может быть до 10 000 раз выше [383, 384]. Результаты нашего исследования подтверждают, что присутствие остатков маннозы на поверхности липосомных носителей имеет решающее значение для их поглощения дендритными клетками и терапевтической эффективности: неманнозилированные липосомы оказались значительно менее эффективными в терапии ЕАЕ, чем маннозилированные липосомы, нагруженные одним и тем же пептидом p1.

Следует подчеркнуть, что липидный состав липосом может иметь решающее значение для их терапевтического эффекта. Так, Cavaletti с соавторами [385] недавно продемонстрировали способность катионных, но не анионных липосом проникать за ГЭБ у животных с ЕАЕ.

Результаты других исследований показывают, что введение катионных липосом без маннозы может значительно усилить антительный ответ [253], таким образом подобной композиции следует избегать при попытке выработать иммунологическую толерантность. Безусловно, выбор заряда липидной компоненты также во многом зависит от инкапсулированного агента, как в случае катионных липосом, широко используемых для доставки отрицательно заряженной ДНК [386].

Нами было показано, что p1 mSUV был наиболее эффективным в снижении общей тяжести ЕАЕ, главным образом во время первой атаки, тогда как p2 mSUV и p3 mSUV эффективно предотвращали развитие стадии вторичного обострения. Чтобы объединить действия этих пептидов, мы использовали их смесь, инкапсулированных в маннозилированные липосомы. Действительно, комбинированная композиция p123 mSUV обладала наиболее мощным терапевтическим эффектом по сравнению с глатирамером ацетата или липосомами, нагруженными одиночными пептидами. Крысы, получавшие p123 mSUV, почти полностью излечивались от ЕАЕ в течение недели после первых клинических проявлений заболевания, тогда как нелеченные животные оставались тяжело инвалидизированными. Средний показатель интегральной заболеваемости в этой тестовой группе уменьшился на 40% по сравнению с таковой в группе плацебо. Важно отметить, что инъекции разработанных липосомных композиций производились только после первых клинических признаков ЕАЕ, что полностью имитирует режим применения препаратов против РС в клинической практике.

Оценка экспрессии маркеров поверхностной активации РВМС, обработанных пептидами МВР, входящих в состав Хемус

Для изучения влияния пептидов МВР из композиции p123 mSUV (далее употребляемая как Хемус) на экспрессию маркеров поверхностной активации, РВМС⁹⁰, изолированные из пациентов с РС и здоровых доноров (ЗД), инкубировали с отдельными пептидами GH17 (МВР₄₆₋₆₂), GK16 (МВР₁₂₄₋₁₃₉) и QR24 (МВР₁₄₇₋₁₇₀) и далее окрашивали на человеческий лейкоцитарный антиген (HLA-DR), CD4, CD8, CD25 и CD80 (Рис. 4.51). Экспрессия поверхностных молекул HLA-DR и CD123 в ответ на пептиды МВР резко различалась между ЗД и пациентами с РС (Рис. 4.51А). Количество HLA-DR-положительных клеток в РВМС из ЗД изменилось с 2,1% (PBS) до 1,5%, 2,3% и 4,6% при инкубации с GH17, GK16 и QR24, соответственно. Воздействие пептидов МВР на РВМС из пациентов с РС приводило к значительному увеличению пропорции HLA-DR-положительных клеток, оцениваемое как 13,6%, 23,8% и 41,1% при инкубации с GH17, GK16 и

⁹⁰ от англ. peripheral blood mononuclear cell

QR24, соответственно. Количество CD123-положительных клеток в PBMC из ЗД и пациентов с РС при инкубации с QR24 увеличилось до 4% и 24% соответственно (Рис. 4.51Б).

Изучение экспрессии CD80 – костимуляторного сигнала, необходимого для активации и выживания Т-клеток, – на PBMC в ответ на пептиды МВР показало, что GK16 и QR24 увеличивают экспрессию CD80 на клетках как из пациентов с РС, так и из ЗД (Рис. 4.51В). Подобно HLA-DR, PBMCs из пациентов с РС ответили на добавление пептидов более выразительно по сравнению с ЗД: процент CD80-положительных клеток увеличился с ~ 1% до 4,8-8,1% в РС и 2,4-3,9% в ЗД в случае воздействия GK16 и QR24, соответственно.

Затем мы измерили отношение CD4/CD8 в PBMC, обработанных пептидами МВР. Пептиды QR24 и GK16 увеличили это отношение до 1,5-2,0, тогда как GH17 индуцировал изменения отношения CD4/CD8 до значений менее 1,0 в PBMC из пациентов с РС (Рис. 4.51Г). Изменения в отношении CD4/CD8 в популяции PBMC из ЗД в ответ на добавление пептида были расценены как статистически незначимые. Затем мы изучили влияние пептидов МВР на CD25-положительную популяцию в PBMC. Инкубация PBMC с GK16 и GH17 не изменяла уровень CD25-положительных клеток, тогда как пептид QR24 увеличивал количество CD25 + клеток по сравнению с контрольной инкубацией с PBS (Рис. 4.51Д).

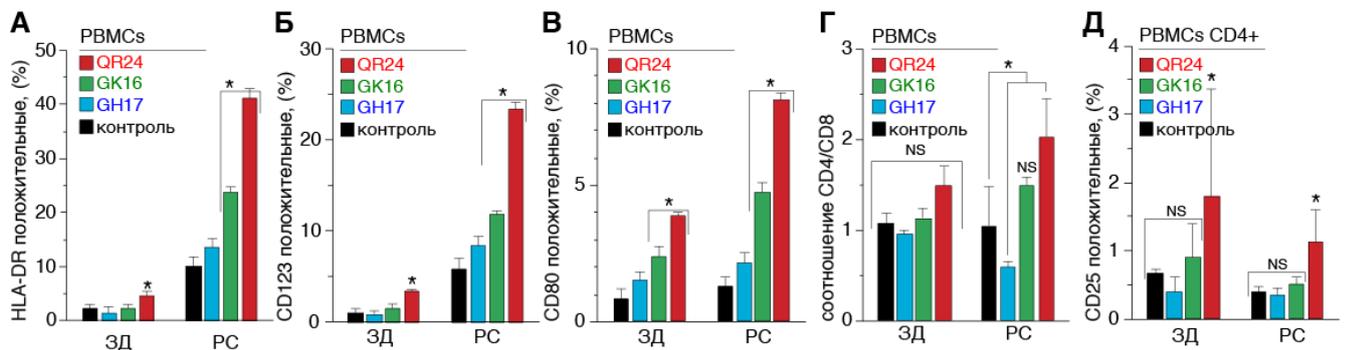


Рисунок 4.51 Определение экспрессии поверхностных маркеров PBMC при инкубации с различными пептидами, входящими в состав Хемус

Анализ выброса цитокинов мононуклеарными клетками человека, обработанных пептидами – компонентами Хемус

Фенотипы Т-хелперов Th1 и Th2 в значимой степени активируются при РС [387, 388]. Чтобы выяснить, могут ли пептиды МВР сдвинуть баланс по отношению к Th1 или Th2, мы измерили цитокины, высвобождаемые PBMC, иолированных из пациентов с РС и ЗД. Супернатанты из культивируемых клеток, обработанных пептидами МВР, собирали в различные моменты времени, далее уровни IL-6, IL-8, IL-10, IFN- α , IFN- γ и TNF измеряли с помощью ELISA (Рис. 4.52). Базовый уровень IFN- α в культуре PBMC у пациентов с РС был выше по сравнению с таковым в культуре PBMC из ЗД. Концентрация IFN- α в ответ на все МВР-пептиды увеличивалась примерно в 2 раза через 6-12 часов в культуре PBMC из пациентов с РС и ЗД.

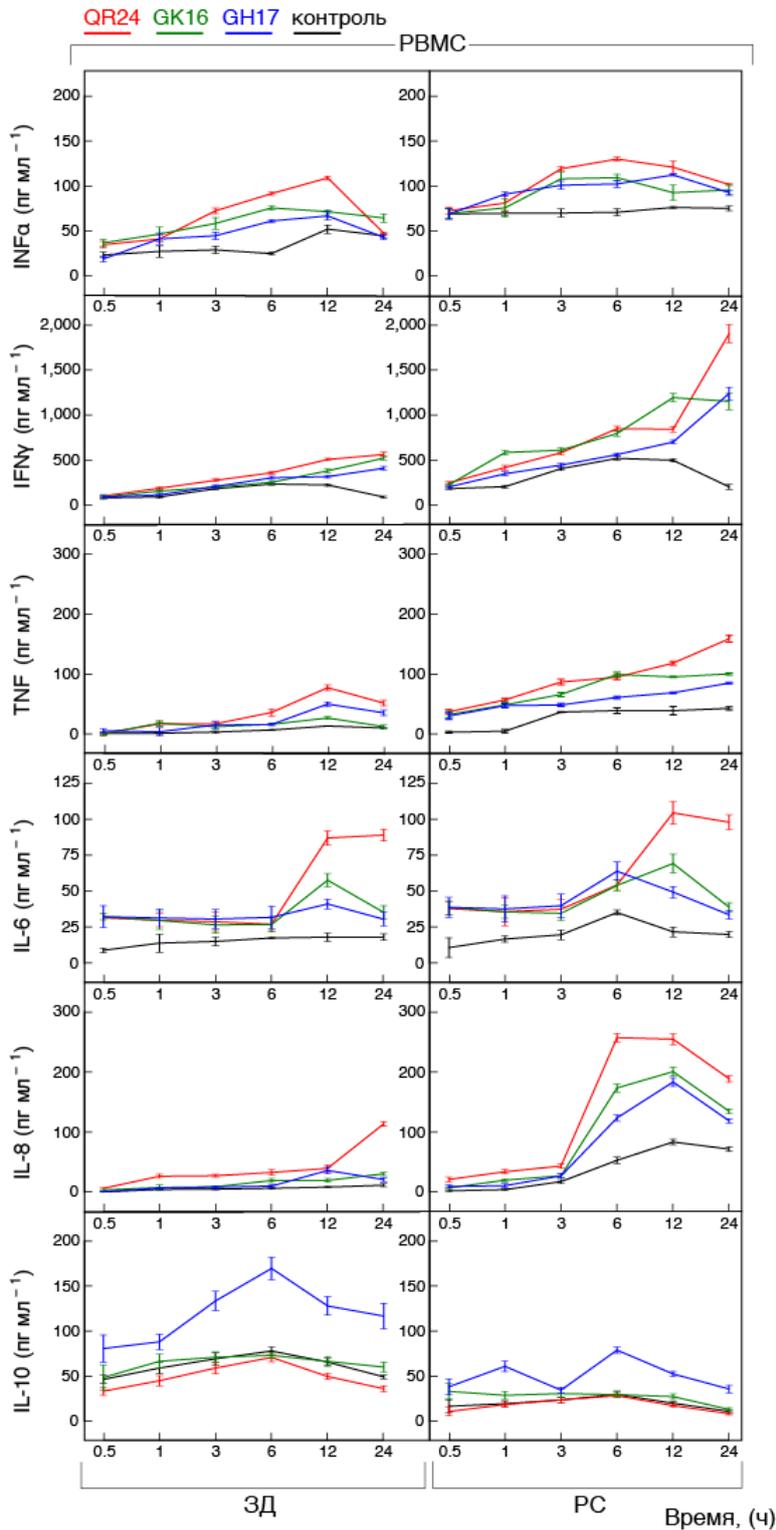


Рисунок 4.52 Анализ экспрессии цитокинов при инкубации РВМС с различными пептидами, входящими в состав Хетус.

Значительное увеличение концентрации IFN-γ наблюдалось только после 24 часов стимуляции РВМС любым из трех МВР-пептидов, при этом результирующий уровень IFNγ был в 2-4 раза выше в культуре РВМС из пациентов с РС. Аналогичным образом, уровень TNF после 24 часов инкубации с МВР-пептидами в культуре РВМС из пациентов с РС был в 2-3 раза выше по сравнению с ЗД. Статистически значимое 5-кратное увеличение концентрации IL-6 было обнаружено в культуре РВМС, обработанных QR24, независимо от происхождения клеток.

Уровень IL-8 был увеличен в культуре РВМС от пациентов с РС, обработанных любым из пептидов МВР, тогда как только пептид QR24 увеличивал уровень IL-8 в культуре РВМС из НД. Интересно отметить, что из трех пептидов МВР только GH17 увеличивал продукцию IL-10 в культуре РВМС независимо от их происхождения, при этом уровень IL-10 в обработанных GH17 РВМС из ЗД был в 2 раза выше, чем из пациентов с РС.

Анализ экспрессии маркеров поверхностной активации и выделения цитокинов рDCs, подверженных воздействию Хемус-содержащих пептидов МВР

Плазмоцитоидные дендритные клетки (pDC⁹¹) представляют собой незначительную популяцию лейкоцитов, играющие ключевую роль в регуляции иммунологической толерантности [389]. В этой связи роль рDC в патогенезе аутоиммунных заболеваний в настоящее время тщательно изучается [390]. Для выяснения влияния пептидов МВР, содержащихся в вакцине Хемус, на рDC, мы анализировали экспрессию поверхностных маркеров активации, а также продукцию цитокинов в ответ на инкубацию с GH17, GK16 и QR24. рDC, обработанные каждым из трех пептидов, значительно увеличивали экспрессию HLA-DR, CD80 и CD123 (Рис. 4.53). Примечательно, что было отмечено 5-10-кратное различие в увеличении экспрессии поверхностных маркеров между клетками, иолированными из пациентов с РС и ЗД, в то время как пептид QR24 вызывал наиболее выраженное влияние на рDC.

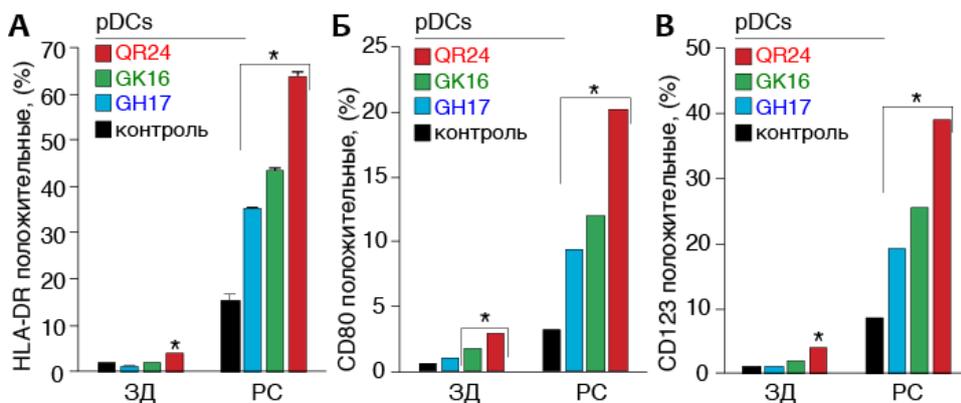


Рисунок 4.53
Определение экспрессии поверхностных маркеров рDC при инкубации с различными пептидами, входящими в состав Хемус.

Профиль продукции цитокинов популяцией рDCs, подвергнутой воздействию пептидов МВР, в общем аналогичен тому, который ранее наблюдался в случае РВМС (Рис. 4.54). Инкубация с любым из пептидов МВР вызывала ранний выброс (происходящий менее чем за 30 минут) IFN-α культурой рDCs из ЗД, концентрация которого через 6 часов постепенно снижалась. Напротив, только пептид QR24 активировал продукцию IFN-α в рDCs из пациентов с РС, в то время как уровни цитокинов оставались в целом неизменными в случае инкубации с GK16 и GH17.

⁹¹ от англ. peripheral dendritic cells

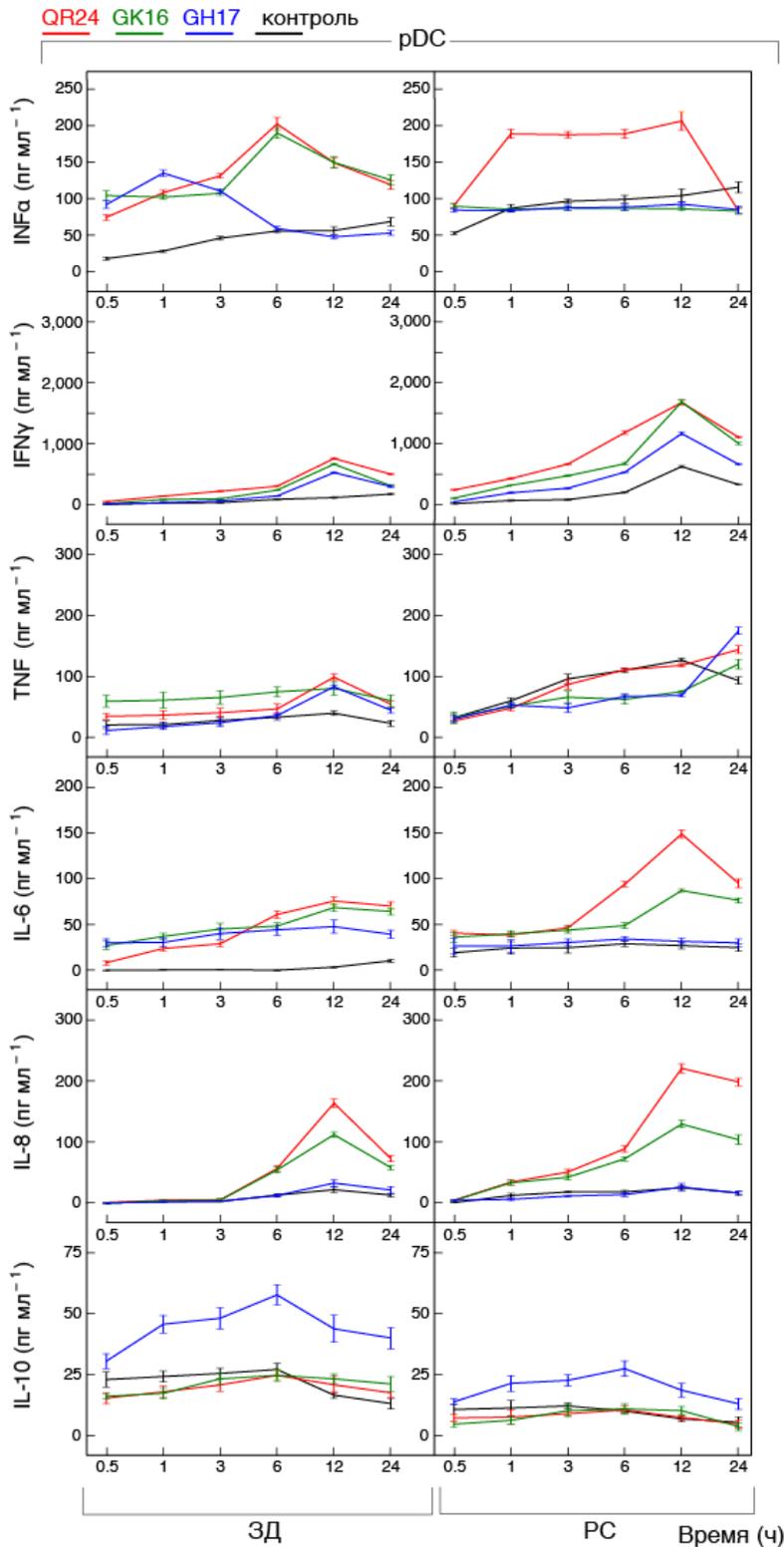


Рисунок 4.54 Анализ экспрессии цитокинов при инкубации pDC с различными пептидами, входящими в состав Хемус.

Уровень IFN- γ после 12 часов инкубации с каждым из трех пептидов МВР увеличился в 2-3 раза в культуре pDC как из пациентов с РС, так и ЗД. Не было статистически значимого различия в концентрации TNF в культуре pDCs из пациентов с РС, обработанной пептидами МВР, тогда как 2-3 кратное увеличение уровня TNF наблюдалось в культуре pDCs из ЗД, обработанной любым из МВР-пептидов. Уровень IL-6 был увеличен в культуре pDCs из ЗД в ответ на инкубацию с любым из МВР-пептидов, в то время как после 12 часов инкубации только GK16 и QR24

приводили к увеличению концентрации IL-6 в культуре pDC из пациентов с РС в 3-6 раз. Концентрация IL-8 в культуре pDC из ЗД и пациентов с РС возрастала в 10-20 раз при инкубации клеток с GK16 и QR24, но не в случае добавления GH17. Напротив, концентрация IL-10 увеличивалась в культуре pDC, подвергнутых воздействию GH17, тогда как ни QR24, ни GK16 значимо не влияли на уровень этого цитокина.

Предполагаемый клеточный механизм индукции иммунотолерантности инкапсулированными миелиновыми антигенами

Патогенез аутоиммунных расстройств обусловлен главным образом потерей толерантности к собственным антигенам [391], поэтому её восстановление может предотвратить или даже обратить вспять аутоиммунную патологию. Это утверждение может быть в полной мере применено и к патогенезу РС, так как введение МВР и его производных повышает устойчивость животных к ЕАЕ [392]. В соответствии с этими рассуждениями симптомы ЕАЕ могут быть значительно ослаблены путем введения регуляторных Т-клеток [393]. Настоящее исследование имело целью оценить влияние пептидов МВР, содержащихся в вакцине Хемус, на активацию РВМС и pDC, изолированных от здоровых доноров и пациентов с РС.

Эффект пептида GH17 (МВР₄₆₋₆₂) явно отличался от эффекта оставшихся двух пептидов QR24 (МВР₁₄₇₋₁₇₀) и GK16 (МВР₁₂₄₋₁₃₉), так как он значительно меньшей степени активировал клетки. Анализ соотношения лимфоцитов CD4/CD8 показал, что пептиды QR24 и GK16 сдвигают этот баланс по отношению к CD4-клеткам, тогда как пептид GH17 обращает его в сторону увеличения CD8. Кроме того, пептид GH17 был более эффективным в терминах активации экспрессии противовоспалительного цитокина IL-10. Напротив, пептиды QR24 и GK16 активировали экспрессию провоспалительных цитокинов, тогда как эффект этих пептидов на высвобождение IL-10 отсутствовал. Поэтому, подобно глатирамер ацетату [189, 394], пептид GH17, по-видимому, смещает баланс Th1/Th2 в сторону Th2, тогда как пептиды QR24 и GK16, напротив, смещают этот баланс в сторону Th1.

Интересно, что, как было ранее показано в данной работе, изученные пептиды МВР отличались и своей способностью ингибировать ЕАЕ. Так, пептиды QR24 и GK16 были эффективны, главным образом, в предотвращении второй волны обострения ЕАЕ, тогда как пептид GH17 снижал тяжесть аутоиммунной нейродегенерации во время первой атаки. Мы предлагаем, что различные эффекты пептидов МВР на начало и прогрессию ЕАЕ могут быть непосредственно связаны с различиями в их способности активировать РВМС/pDC и индуцировать продукцию цитокинов. Пептид GH17 ограниченно влиял на активацию лейкоцитов и обладал уникальной способностью индуцировать выброс противовоспалительного цитокина IL-10, что может в значительной степени подавлять первый пик ЕАЕ. Два других

пептида, QR24 и GK16, которые уменьшали рецидив ЕАЕ, показали более выраженную картину активации РВМС/pDC и индукции провоспалительных цитокинов.

Другое важное наблюдение состоит в том, что пептид QR24 способен стимулировать пролиферацию Т-регуляторных клеток, которые важны для поддержания иммунной толерантности [395] и, следовательно, могут подавлять рецидив заболевания. Интересно, что повышение процента CD25-положительных клеток было более выраженным в РВМС из здоровых доноров в сравнении с клетками, изолированными из пациентов с РС, что указывает на возможное ухудшение их регуляторной функции у пациентов с РС. Следует отметить, что выброс IL-6, индуцируемый QR24, на практике должен ингибировать пролиферацию Т-регуляторных клеток [396] и значительно ухудшать функцию самих Tregs [397]. С другой стороны, IL-6 и IL-8 могут привлекать Tregs, как это показано в случае новообразований [398]. Дальнейшие исследования должны прояснить подобный дуалистический эффект пептида QR24.

Наши данные впервые описывают влияние пептидов МВР из состава Хемус на активацию pDC, а также выброс цитокинов этими клетками. pDC представляют собой незначительную популяцию циркулирующих лейкоцитов [399], продуцирующих значительные количества IFN- α [400]. Их основная функция – обеспечение первой линии защиты от вирусов и микроорганизмов [401]. Недавние исследования показали, что pDC играют центральную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка [402], а в последнее время и РС [403]. Мы показали, что pDCs из пациентов с РС более активно реагируют на добавление пептидов МВР по сравнению с таковыми из здоровых доноров, что указывает на наличие подобных встреч в их иммунологическом прошлом. Важно отметить, что ограниченная способность pDCs из пациентов с РС в отличие от pDCs из здоровых доноров вырабатывать IL-10 в ответ на инкубацию с пептидом GH17 может свидетельствовать об их неполной функциональности в терминах индукции иммунологической толерантности. Резюмируя, можно высказать предположение, что индивидуальные пептидные компоненты Хемус действуют двунаправленно, поэтому синергетический эффект этой композиции, по-видимому, состоит в тонкой перенастройке иммунной системы, а не примитивным неспецифическим подавлением иммунных клеток или Th1/Th2 сдвигом.

4.2.3 Клинические испытания препарата нового поколения Хемус

Проведение испытательной фазы IIa клинических исследований в режиме нарастающей дозировки

В период с апреля 2013 года по июль 2014 года 20 пациентов с RR-MS и SP-MS были привлечены к участию в клиническом исследовании, которое проходило в четырех медицинских

центрах на территории Российской Федерации. Описание пациентов с РС перечислены в **таблице 7**. Критерии включения и исключения, а также количество пациентов в исследовании приведены на рисунке **4.55**. Из 20 пациентов 16 (80%) имели RR-MS и четыре (20%) имели SP-MS с рецидивами. На начальном этапе у трех (15%) пациентов была умеренная инвалидность по шкале EDSS (3,0), а у 17 (85%) была средняя инвалидность (3,5-5,5). Девятнадцать пациентов получили все шесть еженедельных доз препарата Хемус (всего 2,675 мг по действующему веществу) (Рис. **4.55А**). Один пациент, получивший все шесть доз Хемус, прекратил участие в исследовании на 6-й неделе по его собственному решению. Еще один пациент получил только первую дозу препарата (50 мкг) и решил отказаться от продолжения терапии по собственному желанию.

Таблица 7. Описание пациентов с РС, вовлеченных и исследование

Показатель	Значение
N	20
Возраст (лет) ^a	37.6 ± 9.9 (24-53)
Пол ^b	9-11 (45%)
Вес (кг) ^a	69.7±15.8 (44-105.5)
Клинические признаки РС (лет) ^a	10.4±6.8 (0.9-25.8)
Диагностированный РС (лет) ^a	5.0±3.7 (0.6-13.3)
EDSS	4.0 (3.0-5.5)
Тип течения RR	16 (80.0%)
Тип течения SP	4 (20.0%)
Число обострений (1 год)	2.0 (1-3)
Число обострений (2 года)	3.0 (1-6)

^aсреднее ± ст. отклонение (диапазон)

^bжен. – муж. (жен. %)

Поскольку ни один пациент не выявил эффекта DLT⁹² во время лечения, максимальная передельная дозировка (MTD⁹³) не была достигнута, что дает оценку MTD > 900 мкг в неделю. Восемь пациентов (40%) имели 16 инцидентов, связанных с отмеченными побочными явлениями (АЕ⁹⁴), причем 11 случаев у 5 (25%) пациентов были классифицированы как очевидно имеющие связь с инъекциями Хемус. Во время исследования не наблюдалось ни одного серьезного побочного явления (SAE⁹⁵) и смертельных исходов. 13/16 происшествий у шести (30%) пациентов были классифицированы как 1 категория; 3/16, у двух (10%) пациентов, были классифицированы как 2 категория. Ни одно АЕ не соответствовало критериям опасности побочных явлений ICH Еб. Все АЕ, связанные с введением препарата, были 1 категории, за исключением единичного

⁹² от англ. dose-limiting toxicity

⁹³ от англ. maximal tolerated dose

⁹⁴ от англ. adverse event

⁹⁵ от англ. serious adverse event

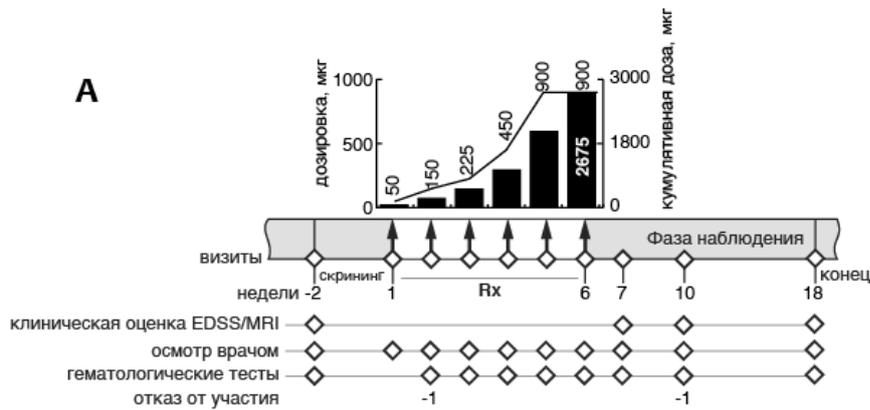
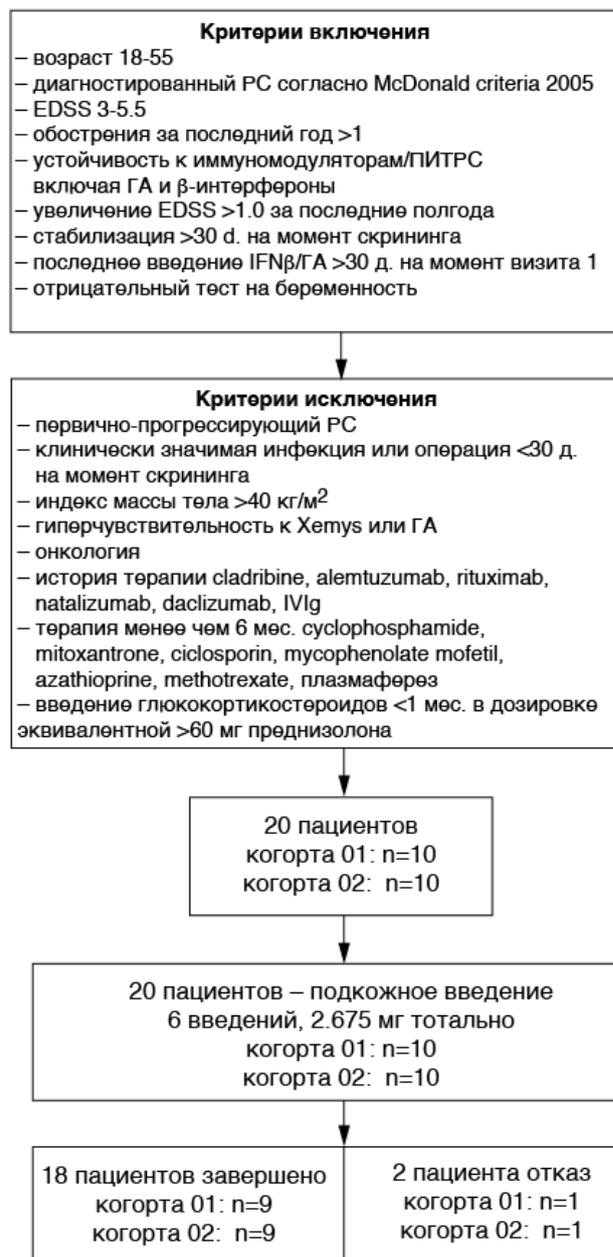


Рисунок 4.55 (А) Схема проведения клинических испытаний. **(Б)** Критерии включения и исключения в экспериментальную группу.

Б



эпизода диареи, которая была отнесена ко 2 категории. Все АЕ разрешались самостоятельно без дополнительного лечения и не требовали прерывания или отмены исследуемого препарата.

Наиболее распространенным АЕ была локальная реакция в месте инъекции, которая наблюдалась в 8 случаях у четырех (20%) пациентов. Большинство реакций на месте инъекции происходили при введении субмаксимальных (0,45 мг) и максимальных (0,9 мг) доз Хемус. Все эпизоды разрешились в течение 24 часов без специфического лечения. Риниты встречались дважды у двух пациентов (10%), общая слабость была зафиксирована дважды у одного (5%) пациента. Другие АЕ были зафиксированы в единичном экземпляре. Хемус не повлиял на лабораторные тесты и жизненно важные показатели, такие как температура тела, частота сердечных сокращений, частота дыхания и артериальное давление, результаты визуального осмотра и параметры ЭКГ. Резюмируя, исследованные дозировки Хемус признаны безопасными и хорошо переносимыми.

Таблица 8. Бляшки демиелинизации у пациентов по данным МРТ по неделям

Визит	Режим МРТ	N	Количество бляшек по данным МРТ				
			среднее ^a	медиана	мин-макс	Q 25%	Q 75%
Изначальное	T1	19	0.3±0.6	0.0	0-2	0.0	0.0
	T2		45.2±20.0	44.0	18-97	23.0	60.0
	FLAIR		46.9±20.4	44.0	21-96	24.0	62.0
Неделя 7	T1	18	1.3±1.9	1.0	0-6	0.0	2.0
	T2		47.7±21.7	47.0	18-101	25.0	62.0
	FLAIR		49.2±22.1	47.0	23-100	25.0	67.0
Неделя 10	T1	19	1.3±2.0	0.0	0-6	0.0	2.0
	T2		47.5±22.0	44.0	18-104	28.0	60.0
	FLAIR		48.5±21.6	44.0	23-103	28.0	62.0
Неделя 18	T1	18	1.3±2.8	0.0	0-11	0.0	1.0
	T2		48.2±22.2	45.0	19-105	31.0	60.0
	FLAIR		49.6±22.0	46.0	24-104	31.0	62.0

^aсреднее ± ст. отклон.

МРТ-сканирование было проведено для всех пациентов на стартовом этапе (неделя -2) и после лечения на 7, 10 и 18 неделях, используя режимы T1 (с контрастом), T2 и FLAIR⁹⁶ (Табл. 8 и рис. 4.56А).

⁹⁶ от англ. fluid attenuation inversion recovery

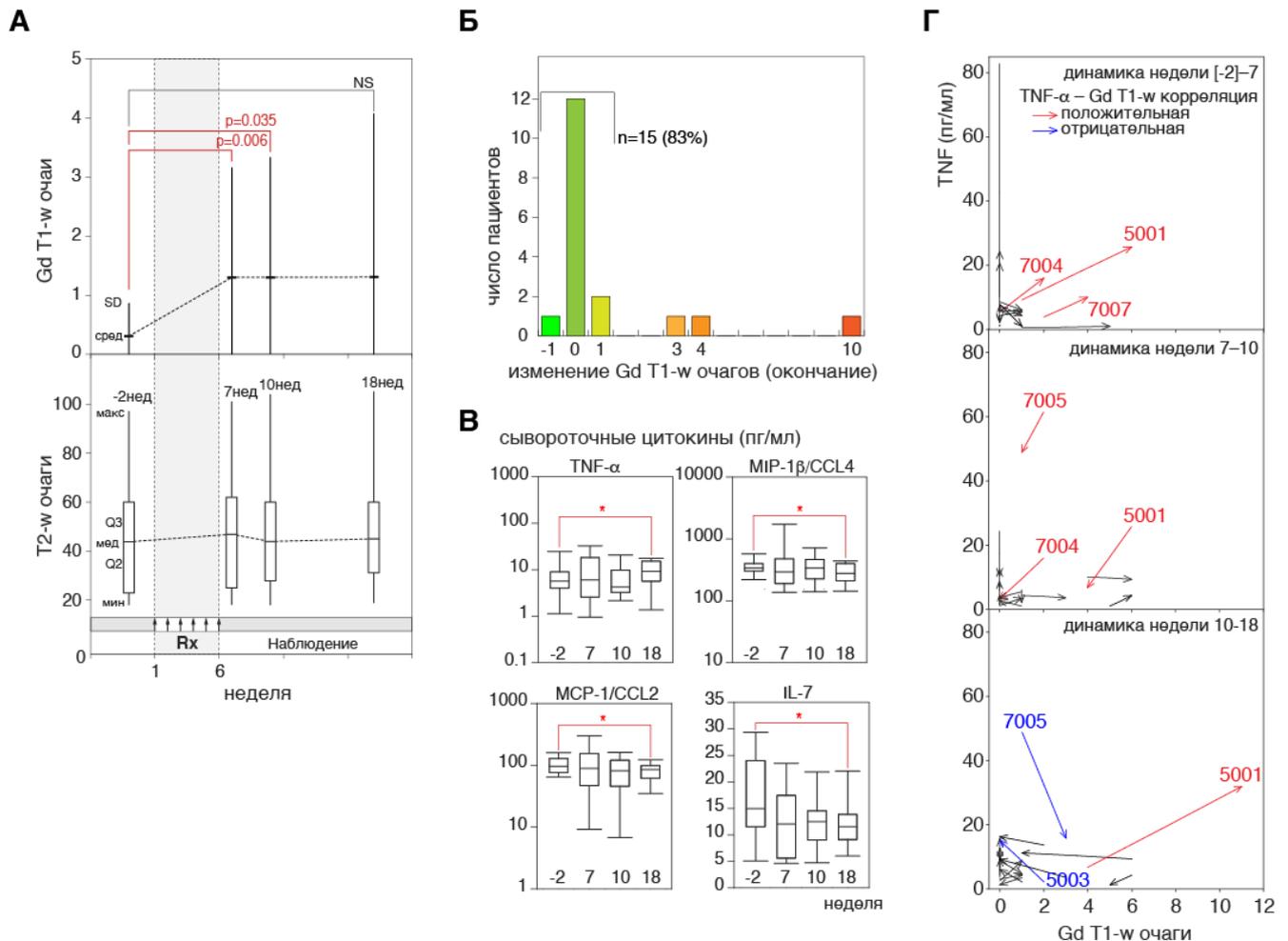


Рисунок 4.56 (А) Бляшки демиелинизации у пациентов по данным МРТ в режиме T1 и T2 по неделям. **(Б)** Изменение количества активных бляшек на момент окончания исследования. **(В)** Уровень сывороточных цитокинов по неделям. **(Г)** Индивидуальная динамика изменения концентрации сывороточного TNF в зависимости от количества активных бляшек демиелинизации.

На исходном этапе у 16 (84%) пациентов не было накапливающих гадолиний бляшек. Однако, к 7-й неделе активные бляшки были обнаружены у 10 (56%) пациентов и, на момент окончания исследования, – у 8 (33,7%) пациентов были активные поражения ЦНС. Несмотря на тенденцию к увеличению числа накапливающих гадолиний бляшек, пациент-специфический анализ результатов МРТ на момент окончания исследования (Рис. 4.56Б) свидетельствует о том, что у 83% пациентов было от 0 до 1 новых поражений, причем только у 3 пациентов (17%) число активных бляшек увеличилось более чем на одну. Чтобы оценить достоверность изменения количества поражений по результатам МРТ по сравнению с исходным уровнем, данные были обработаны с применением дисперсионного анализа ANOVA⁹⁷ (Табл. 9).

⁹⁷ от англ. ANalysis Of VAriance

Таблица 9. Количество бляшек, накапливающих гадолиний, в режиме T1 по визитам, обработанных с применением ANOVA

Неделя	^a среднее	95% дов. интервал	Парные сравнения			F	P
			^{ab} разница средних	P	95% дов. интервал		
исходное	2.0±0.2	(1.5; 2.4)				3.015	0.038
неделя 7	2.8±0.2	(2.4; 3.3)	-0.9±0.3	0.006	(-1.50; -0.27)		
неделя 10	2.6±0.2	(2.2; 3.0)	-0.7±0.3	0.035	(-1.25; -0.05)		
неделя 18	2.4±0.2	(2.0; 2.9)	-0.5±0.3	0.115	(-1.11; 0.12)		

^a ± стандартная ошибка

^b разница средних значений между изначальным уровнем и неделями 7, 10 и 18

Все наборы данных были распределены неравномерно. По сравнению с исходным уровнем увеличение числа накапливающих гадолиний бляшек было статистически значимым на 7 и 10 неделях (F = 3,015, P = 0,038), но не на 18 неделе (P > 0,05). Наконец, у 16 из 19 (85%) пациентов отсутствовали рецидивы, а параметр EDSS увеличился у 21% и уменьшился у 10% пациентов. История болезни, клинические показатели и результаты МРТ отдельных пациентов приведены в **таблице 10.**

Таблица 10. История болезни пациентов, данные МРТ и другие клинические показатели.

ID	Тип течения	Течение РС, лет	Обострения за последний год	Предшеств. терапия ^a	Количество новых Gd+ бляшек	Количество новых T2 бляшек	Изм. EDSS	Обострения во время лечения
7001	RRMS	7.8	3	INFβ	0	0	0	НЕТ
7002	RRMS	9.9	2	INFβ	0	0	-0.5	НЕТ
7004	RRMS	3.9	2	INFβ	1	2	-1	НЕТ
7005	RRMS	1.5	2	INFβ	3	2	0	НЕТ
7006	RRMS	1.5	1	INFβ	0	2	0.5	ДА
7007	RRMS	6.5	2	GA	-1	10	1	ДА
7008	SPMS	0.6	1	INFβ	0	0	0	НЕТ ^b
5001	RRMS	6.0	1	INFβ	10	0	0	НЕТ
5002	SPMS	9.9	2	INFβ	0	0	0	НЕТ
5003	SPMS	4.3	1	INFβ	0	0	0	НЕТ
4001	RRMS	1.4	1	GA	0	13	0	НЕТ
4002	SPMS	9.4	2	INFβ	0	9	0	НЕТ
4003	RRMS	2.9	1	INFβ	0	0	0	НЕТ
4004	RRMS	4.7	1	INFβ	0	2	0	НЕТ
4005	RRMS	7.2	3	INFβ	0	1	0	НЕТ
4006	RRMS	0.7	2	INFβ	0	1	0.5	НЕТ
4007	RRMS	2.6	2	INFβ	0	0	0	НЕТ
2001	RRMS	13.3	2	GA	1	1	0.5	НЕТ
2002	RRMS	3.2	3	GA/INFβ	4	8	0	ДА

^aGA – глатирамера ацетат

^b последний визит – день 64, данные по визиту на 120 день отсутствуют

Дополнительно нами были проанализированы концентрации 17 сывороточных цитокинов и хемокинов у пациентов, получавших Хетус (Рис. 4.56В). По сравнению с исходным уровнем на

момент окончания исследования концентрации MCP-1, MIP-1 и IL-7 были ниже, а TNF - значительно выше (неделя 18).

Анализ уровня цитокинов у больных РС в ответ на введение Хемус

Для анализа иммунологических последствий применения Хемус нами были проанализированы уровни 17 сывороточных цитокинов и хемокинов на изначальном уровне (неделя -2) и в точках последующих наблюдений (7, 10 и 18 недель) (Табл. 11).

Таблица 11. Уровни сывороточных цитокинов и хемокинов (пг/мл) на момент начала терапии и в период наблюдения

Цитокин/ хемокин	-2 неделя		7 неделя		10 неделя		18 неделя	
	медиана	IQR	медиана	IQR	медиана	IQR	медиана	IQR
TNF-α	5.7	4.2 – 8.7	6.1	2.6 – 15.9	4.2	3.4 – 9.3	9.2	6.6 – 14.5
IFN-γ	155	107–226	155	58 – 332	100	33 – 203	171	91 – 360
CCL4	337	311 – 378	293	208 – 429	337	229 – 441	278	216 – 394
CCL2	97	78 – 123	90	57 – 142	82	49.3 – 111	86	64 – 98
G-CSF	9.5	5.7 – 23.2	10.2	7.2 – 14.6	9.0	5.6 – 18.6	12	8 – 32
IL-1β	2.5	2.4 – 4.0	3.6	2.9-6.4	2.9	2.3 – 3.2	3.2	3.1 – 3.7
IL-2	1.4	0.4 – 22.4	0.4	0.4 – 1.6	0.7	0.4 – 10.7	0.5	0.4 – 10
IL-4	1.6	1.2 – 3.7	1.5	1.3 – 2.8	1.6	1.0 – 2.2	1.6	1.3 – 2.6
IL-5	5.6	3.6 – 7.8	4.7	3.2 – 9.3	4.9	3.0 – 7.2	6.4	3.4 – 9.2
IL-6	8.6	5.6 – 14.3	9.6	3.4 – 14.8	8.7	5.1 – 16.6	8.5	5.7 – 13.3
IL-7	15	12 – 23	12.1	5.8 – 17.2	12.5	9.4 – 13.6	11.5	9.2 – 13.6
IL-8	25	16 – 39	23	17 – 146	19	16 – 35	20	16 – 30
IL-10	14	7 – 25	12.4	6.3 – 15.2	9.5	6.3 – 16.8	12	7 – 19
IL-12	23	17 – 67	18	13 – 28	17	11 – 60	32	16 – 57
IL-13	4.4	2.7 – 6.8	3.2	2.7 – 7.0	3.7	2.9 – 4.8	4.9	3.6 – 6.0
IL-17	9.3	4.6 – 19.7	10.4	3.6 – 18.8	11.3	4.6 – 17.1	11	3.9 – 14.1
GM-CSF	Ниже предела обнаружения							

Как и ожидалось, по сравнению с здоровыми индивидами у пациентов с РС на исходном уровне был выявлен повышенный уровень провоспалительных цитокинов и хемокинов IFN- γ , IL-2, IL-8, IL-17, CCL2 и CCL4, тогда как уровень противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10 и IL-13 не были значительно изменен. Эти данные частично коррелируют с ранее опубликованными работами [72], которые демонстрируют повышенный уровень IL-12, IFN- γ , IL-17 и CCL4 в ЦСЖ пациентов с РС. Интересно, что уровень CCL2, как было ранее показано, уменьшался в ЦСЖ во время протекания РС. В настоящем исследовании на момент завершения исследования в сыворотке крови наблюдалось статистически значимое снижение уровней MCP-1/CCL2, MIP-1/CCL4, IL-7 и IL-2 (Рис. 4.57). Важно отметить, что средний уровень всех эффекторных молекул, за исключением IL-7, был вне межквартильного диапазона, который соответствовал здоровым субъектам, что указывает на то, что они были значительно повышены у пациентов с РС. Наши данные согласуются с рядом исследований, в которых сообщается, что уровни CCL2 [404] и

CCL4 [405, 406] повышаются при протекании РС. Эти хемокины рекрутируют моноциты, Т-клетки памяти и дендритные клетки в места воспаления через ГЭБ внутрь паренхимы ЦНС [407]. Cheng и соавторы выявили факт, что лечение IFN β приводит к снижению уровней CCL2 и CCL4 в ЦНС мышей C57BL/6, развивающих EAE [408]. Роль CCL2 в протекании РС имеет особо нетривиальную роль, так как уровень этого цитокина повышен только в крови и уменьшен в ЦСЖ, что, вероятно, связано с действием CCR2-положительных мигрирующих клеток при их переходе через ГЭБ [409].

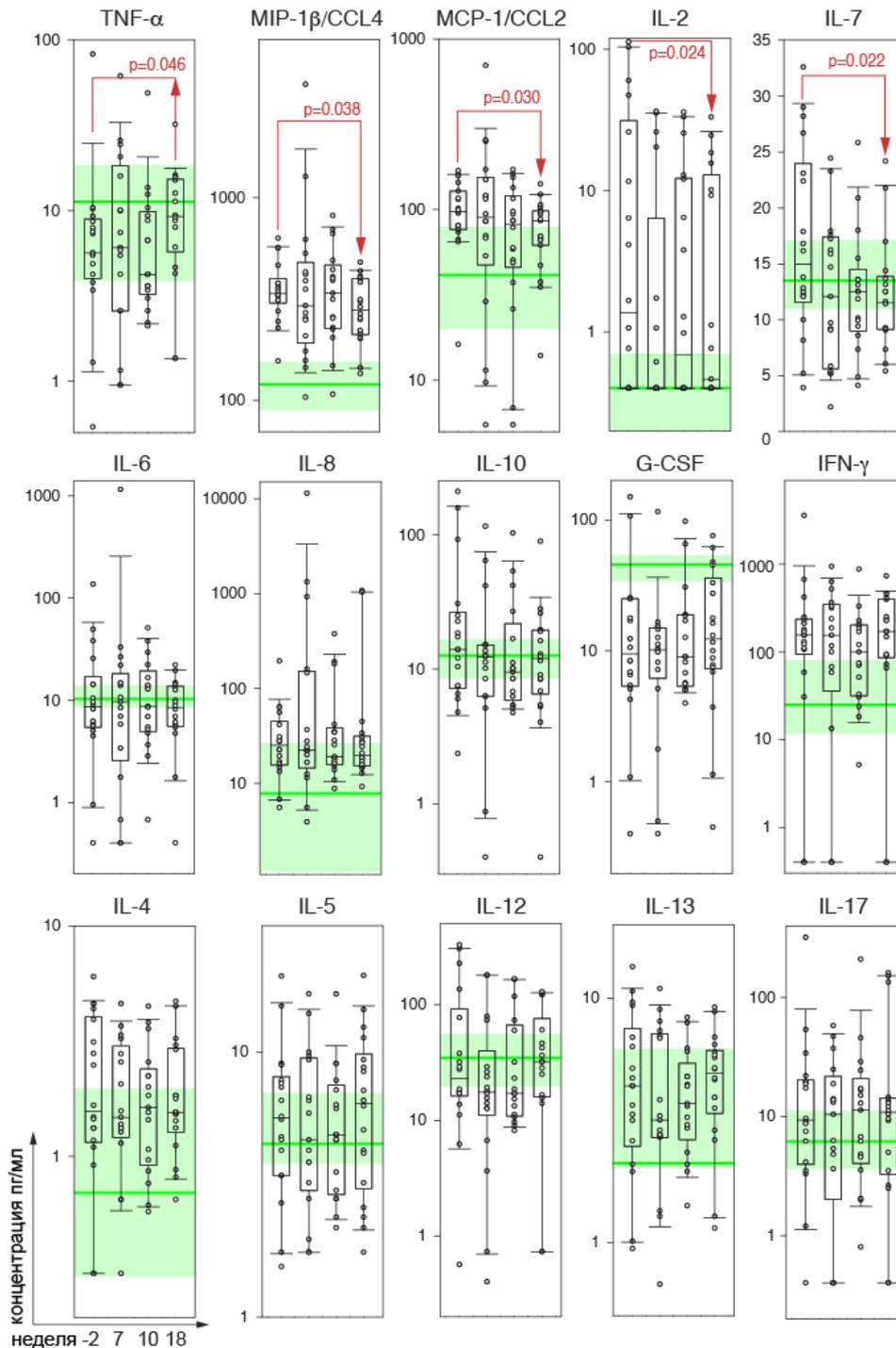


Рисунок 4.57 Изменение уровня сывороточных цитокинов у пациентов, получавших Хемус, по неделям.

Ранее в рамках настоящей работы мы показали, что лечение крыс DA инкапсулированными пептидами MBR приводило к снижению количества провоспалительного цитокина IL-2 в ЦНС. В соответствии с этими наблюдениями уровни IL-2 были снижены в сыворотке крови пациентов с РС после лечения Xemys. Следует отметить, что для 40% пациентов (7/18) концентрации IL-2 находились ниже предела обнаружения (0,4 пг/мл) во всех точках наблюдения, тогда как для остальных пациентов, за исключением одного, после введения Xemys повышенные уровни IL-2 возвращались к уровню, характерном для здоровых индивидов.

IL-7 представляет собой цитокин, который важен для развития В- и Т-клеток [410]. Этот цитокин образует гетеродимер с фактором роста гепатоцитов (HGF) [411]. Lee с соавторами показали, что повышенный уровень IL-7 в сыворотке крови является отличительной чертой Th1-опосредованной формы РС, таким образом блокада IL-7 и соответствующего IL-7R α -сигналинга может иметь терапевтический потенциал при лечении РС [412]. Резюмируя, наблюдаемое снижение концентрации IL-7 при введении Xemys может иметь терапевтическое значение.

Наши данные свидетельствуют, что уровни TNF в сыворотке крови повышаются после введения Xemys. Это статистически значимое изменение может иметь важное физиологическое значение. Интересно, что TNF считается мощным медиатором воспаления при РС [85]. Следует отметить, что в ЦСЖ, но не в сыворотке крови пациентов с РС, уровни TNF значительно выше и коррелируют с тяжестью и прогрессией заболевания [92]. Однако, было высказано предположение, что TNF является также и противовоспалительным цитокином при аутоиммунной демиелинизации [86, 87], а экспрессия генов, связанных с TNF, снижается при прогрессии РС [77]. Клинические исследования применением ингибиторов TNF выявили повышенную частоту рецидивов РС [88, 89, 413]. Дополнительное доказательство того, что TNF положительно влияет на супрессию РС, могут заключаться в том, что более короткий рецептор TNFR1 с двумя нуклеотидными заменами «А» вместо двух «G» увеличивает вероятность развития РС на 12%, имитируя действие TNF-блокирующих препаратов [90, 91].

Концентрация сывороточных цитокинов IL-8, IL-6 и IL-10 снижалась до уровня здоровых субъектов (Рис. 4.57). Это наблюдение является многообещающим, поскольку в предыдущих исследованиях сообщалось, что повышенные уровни этих цитокинов были связаны с прогрессией РС. Анализ экспрессии генов в РВМС показал, что IL-8 достоверно сверхэкспрессируется у пациентов с РС и другими аутоиммунными заболеваниями [82]. Более того, уровни IL-8 повышены в ЦСЖ пациентов с РС [83]. Корреляционный анализ между профилем цитокинов и прогрессией заболевания [84] показал, что уровни и интервалы IL-6 повышаются у пациентов с РС, при этом это коррелирует с тяжестью заболевания [84]. Наши данные свидетельствуют, что медианное значение уровня IL-6 не изменилось, тем не менее после

завершения исследования все повышенные значения снизились до нормального уровня, характерного для здоровых субъектов. Необходимо отметить, что недавно опубликованные данные сообщают о противовоспалительной активности IL-6, защищающей мышей от аутоиммунного заболевания, с помощью классической сигнальной IL-1-зависимой индукции IL-6 [414]. Уровень IL-10 был слегка повышен у пациентов с РС, какой-либо корреляции с тяжестью заболевания отмечено не было [84]. Уровни других цитокинов достоверно не изменялись, тогда как уровень GM-CSF находился ниже предела обнаружения.

Баланс между Th1 и Th2 цитокинами очень важен, поскольку они могут функционально перекрестно ингибировать действие друг друга. РС считается Th1-опосредованным заболеванием, однако ряд исследований ставит под сомнение подобную догму [98, 99, 415]. Клетки Th1 и связанные с ними пути активации напрямую связаны с образованием IFN γ и, в меньшей степени, с IL-12, IL-2 и TNF. Th2-клетки в значительной степени зависят от наличия IL-4, IL-5 и IL-10. Поэтому мы определили отношение Th1/Th2 цитокинов между IFN γ , TNF и IL-12 в сравнении с IL-4, IL-5, IL-6 и IL-10 (Рис. 4.58).

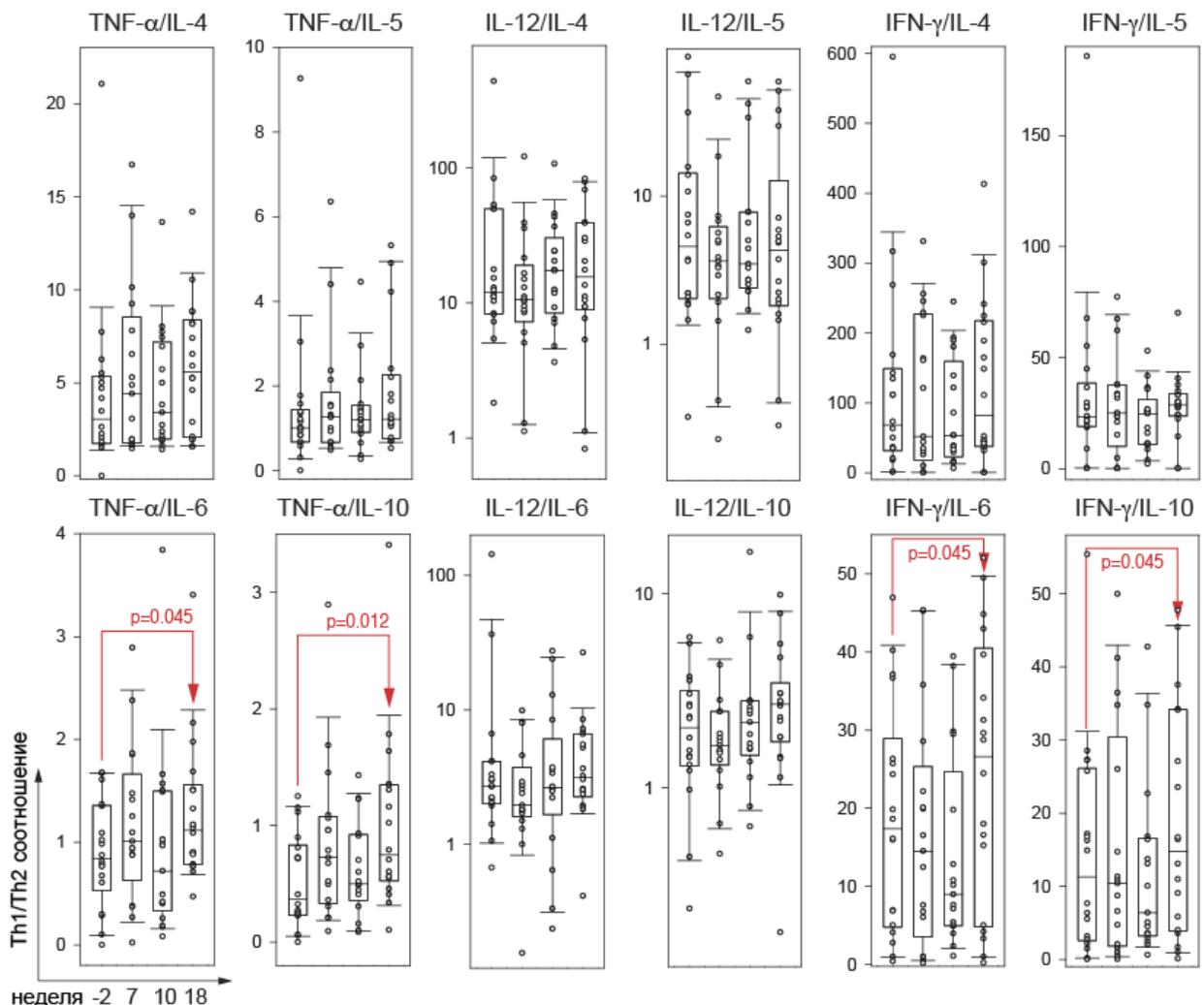


Рисунок 4.58 Изменение баланса Th1/Th2 у пациентов, получавших Хетымус, по неделям.

Интересно, что введение Xemys сдвинуло отношение Th1/Th2 в сторону Th1. Наблюдаемый сдвиг может быть обусловлен снижением Th2 цитокинов IL-6 и IL-10 и повышенной продукцией TNF, нежели системным повышением Th1-цитокинов.

Перспектива использования липосомальных композиций в терапии РС

Настоящее исследование показало, что подкожное введение препарата Xemys безопасно и хорошо переносится пациентами с РС, с ранее некупируемой прогрессией, резистентной к введению глатирамера ацетата или бета-интерферонов. Побочные явления, связанные с введением Xemys, имели легкую степень и имели место в основном после введения субмаксимальных и максимальных доз Xemys. Эти явления разрешались самостоятельно, не требовали сопутствующего лечения и не вызывали системных нарушений. В совокупности эти данные свидетельствуют, что еженедельное введение Xemys имеет высокий профиль безопасности.

Важно отметить, что через 12 недель после окончания введения Xemys семь пациентов (37%) показали отсутствие свидетельств активности заболевания (NEDA⁹⁸), а 16 (85%) не имели ни одного рецидива. Уровни EDSS и количество T2-взвешенных бляшек, а также число новых поражений на МРТ, накапливающих гадолиний, по сравнению с исходным уровнем статистически не изменялись на момент окончания исследования. Тем не менее, нами было зафиксировано статистически значимое увеличение числа бляшек, накапливающих гадолиний, по прошествии 7 и 10 недель терапии. Здесь необходимо подчеркнуть, что все без исключения пациенты, включенные в это исследование, имели в анамнезе более одного рецидива в течение предыдущего года и прогрессирующий индекс EDSS, и в то же время пребывали в стабильном состоянии как минимум в течение 30 дней до скрининга. Таким образом, количество бляшек, накапливающих гадолиний, возможно, имело естественную тенденцию к увеличению в ходе исследования. Отсутствие группы плацебо, одобренное регулятором в лице Министерства здравоохранения РФ, не позволяло проводить сравнительный мониторинг прогрессии заболевания, в том числе количества гадолиний-позитивных поражений, в отсутствие терапевтического вмешательства. Наконец, статистически значимое увеличение числа накапливающих гадолиний бляшек было выявлено только у небольшой группы пациентов, у которых наблюдался рецидив заболевания. Таким образом, вполне возможно появление этих повреждений не было напрямую связано с лечением, хотя эта возможность не может быть исключена полностью.

⁹⁸ от англ. no evident disease activity

Наши предварительные данные также свидетельствуют о том, что профиль цитокинов в сыворотке крови леченых пациентов не претерпевал значительных изменений. Концентрации MCP-1, MIP-1 и IL-7 были ниже после лечения в сравнении с исходным уровнем. Таким образом, можно предположить, что введение Xemus определенным образом ограничивает траффик моноцитов. Как уже упоминалось, имеются свидетельства положительного эффекта классического провоспалительного цитокина TNF на протекание аутоиммунной нейродегенерации [86]. В данном случае необходимо отметить, что несмотря на отсутствие четкой связи между изменением количества накапливающихся гадолиний поражений и динамикой уровня сывороточного TNF, между ними наблюдалась определенная положительная корреляция, что свидетельствует об обратном (Рис. 4.45Г).

Использование коротких антигенных пептидов, ограниченных несколькими десятками аминокислот в длину, в теории должно быть безопасным. Тем не менее, в некоторых случаях введение аутоантигенов может вызвать анафилаксию [215, 216], а также сильную реакцию гиперчувствительности, вызванную кросс-линкингом FcRI-связанных молекул IgE на поверхности тучных клеток [416, 417]. В настоящее время очевидно, что метод введения аутоантигена является краеугольным камнем подобной терапии. Риск развития анафилаксии является наибольшим в случае внутривенных инъекций, так как антиген сразу доступен для системного кровообращения. Существенно более низкая частота анафилаксии может быть достигнута путем подкожных инъекций, тогда как введение через слизистые оболочки считается наиболее безопасным [418]. Последовательное нарастание дозы вводимого антигена, аналогичное способу доставки аллергенов для лечения аллергий, может быть еще одной возможностью предотвратить побочные эффекты [419]. Наконец, использование новых маршрутов доставки, включая микрокапсулирование в наночастицы, осуществленное в настоящей работе, может значительно повысить безопасность и эффективность специфической иммунотерапии [420].

4.2.4 Изучение низкомолекулярных ингибиторов иммунопротеасомы в качестве средства для терапии аутоиммунной нейродегенерации

Изучение кинетических параметров ингибирования иммунопротеасомы ингибиторами различных классов

В настоящей работе нами были проанализированы 3 ингибитора протеасомы: PS-341, воздействующий на все каталитические субъединицы конститутивной и иммунопротеасомы; MG-132, ингибирующий преимущественно химотрипсин-подобную активность конститутивной протеасомы и иммунопротеасомы, и β 1-специфический пептидилэпоксикетон, необратимо связывающий остаток треонина в активном центре данной субъединицы. Чтобы определить

количественные параметры ингибирования, было проанализировано влияние этих ингибиторов на активность протеасомы по флуорогенному субстрату Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (**Рис. 4.59**). Рассчитанные параметры ингибирования для PS-341 и MG-132 (**Табл. 12**) соответствовали ранее опубликованным данным [421, 422]. Константа ассоциации $k_{obs}/[I]$ в случае $\beta 5i$ -специфического пептидилэпоксикетона составила около $240 \text{ M}^{-1}\text{сек}^{-1}$. PS-341 и MG-132 одинаково воздействовали на протеасому, изолированную из головного мозга как здоровых, так и развивающих ЕАЕ мышей. В случае $\beta 1i$ -специфического пептидилэпоксикетона, как и следовало ожидать, эффективность ингибирования напрямую зависела от количества конститутивных и иммуносубъединиц протеасомы. Данный ингибитор наиболее эффективно подавлял активность протеасомы из головного мозга мышей линии SJL с ЕАЕ, при этом он практически не воздействовал на протеасому из головного мозга мышей линии BALB/c (**Рис. 4.60А**). Все три протестированных ингибитора существенно замедляли гидролиз MBP 26S протеасомой *in vitro* (**Рис. 4.60Б**).

Таблица 12. Ингибирование химотрипсин-подобной активности протеасомы, изолированной из головного мозга мышей.

26S протеасома из головного мозга	PS-341 [†] K_i , нМ	MG-132 [†] K_i , нМ	$\beta 1i$ -PEK $k_{obs}/[I]$, $\text{M}^{-1}\text{с}^{-1}$
BALB/c	7±2	28±8	не определена
Контрольные SJL	10±3	35±8	230±60
ЕАЕ SJL	6±2	26±4	250±40

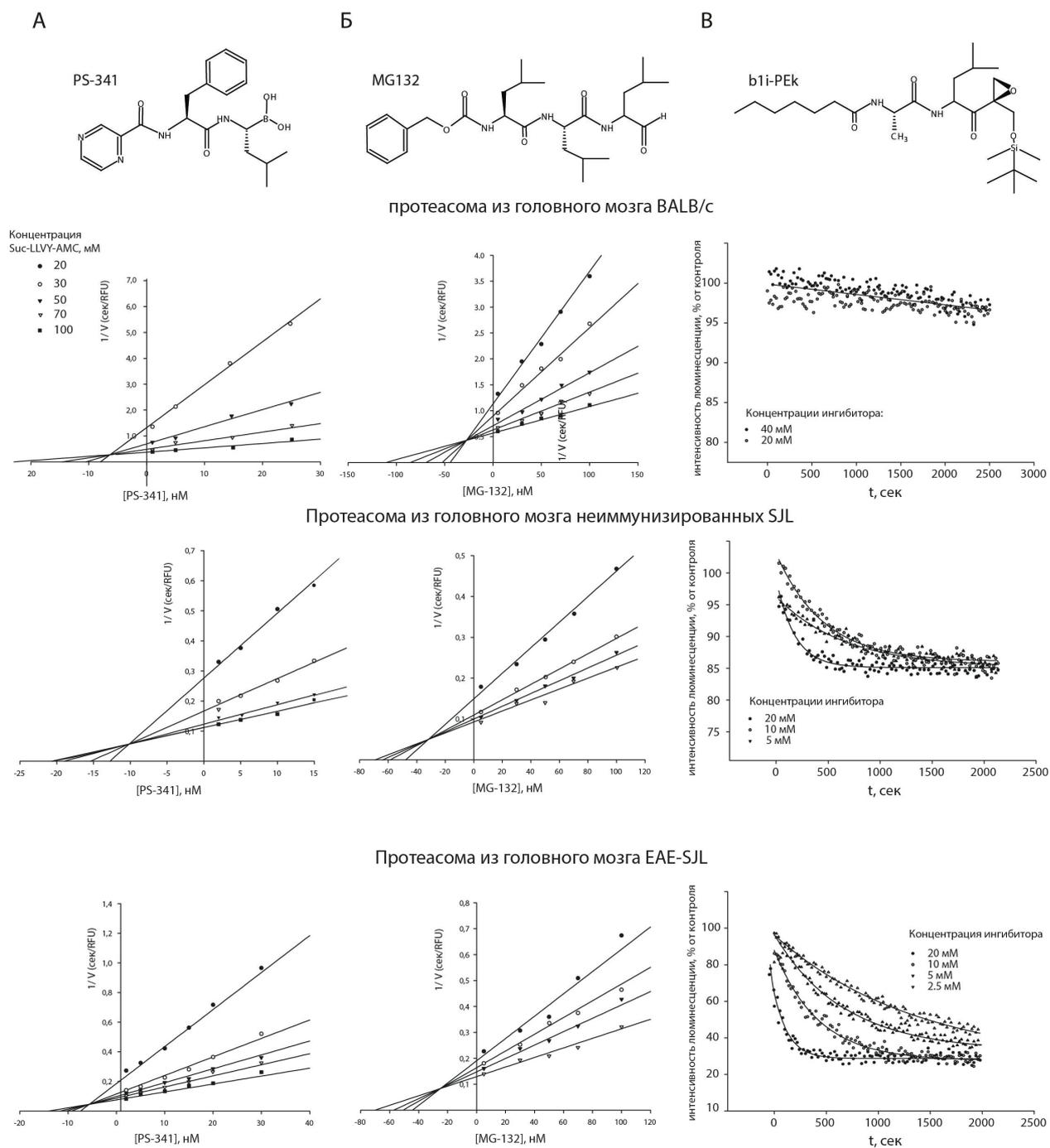


Рисунок 4.59 Определение констант ингибирования для PS-341 (**А**), MG-132 (**Б**) и β 1i-специфического пептидилэпоксикетона (**В**) на основании экспериментальных данных. В случае необратимо связывающегося ковалентного ингибитора β 1i-специфического пептидилэпоксикетона на рисунке представлена постепенно снижающаяся интенсивность люминесценции после добавления ингибитора, пропорциональная скорости гидролиза пептидного субстрата. Линии на рисунках (**В**) были получены аппроксимацией экспериментальных данных нелинейным методом наименьших квадратов.

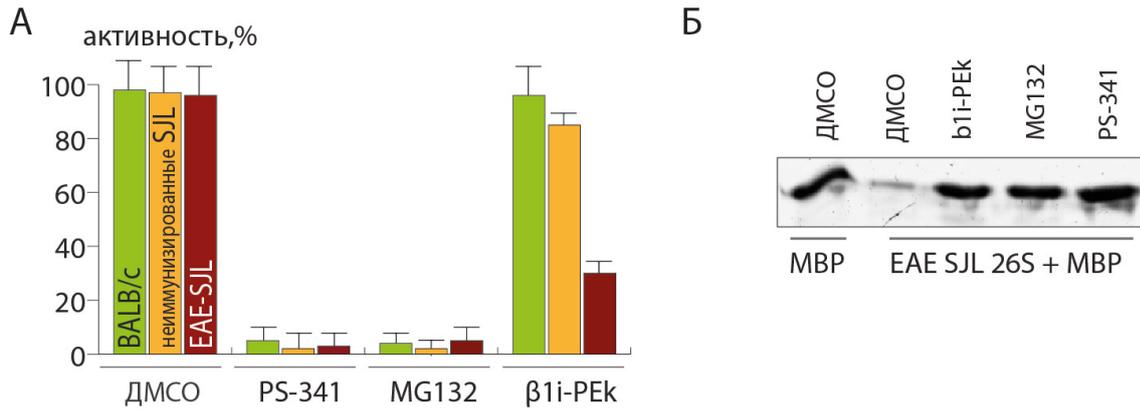


Рисунок 4.60 (А) Химотрипсин-подобная активность протеасомы (в процентах от активности протеасомы, не обработанной ингибиторами) при воздействии 1% ДМСО (контроль), 1 мкМ PS-341, 1 мкМ MG-132 и 1 мкМ β 1i-специфического пептидилэпоксикетона **(Б)** Воздействие ингибиторов протеасомы на гидролиз MBP *in vitro* 26S протеасомой, изолированной из головного мозга мышей линии SJL, развивающих EAE.

Терапия экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита β 1i-специфическим пептидилэпоксикетоном

На заключительном этапе нами была протестирована способность ингибиторов PS-341 и β 1i-специфического пептидилэпоксикетона подавлять развитие EAE у мышей линии SJL. Мышей с индуцированным EAE разделили на группы согласно **таблице 13**. Указанные препараты вводили внутривенно в хвостовую вену 2 раза в неделю с первого по 21й день после иммунизации. Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что β 1i-специфический пептидилэпоксикетон снижает тяжесть протекания заболевания эффективнее, чем PS-341 в той же дозировке (0.5 мг/кг) (**Рис. 4.61**).

Таблица 13. Терапия EAE ингибиторами протеасомы у мышей линии SJL.

Группа	Количество мышей	Ингибитор	Доза, мг/кг	Объем инъекции, мкл	Включая ДМСО, мкл	Введение*	Иммунизация
1	10	PS-341	0.5	250	10	+	+
2	10	β 1i-PEK	0.5	250	10	+	+
3	10	–	–	250	10	+	+
4	5	–	–	250	10	+	–
5	5	–	–	–	0	–	+
6	5	–	–	–	0	–	–

*2 раза в неделю с дня 0 до дня 21 после иммунизации

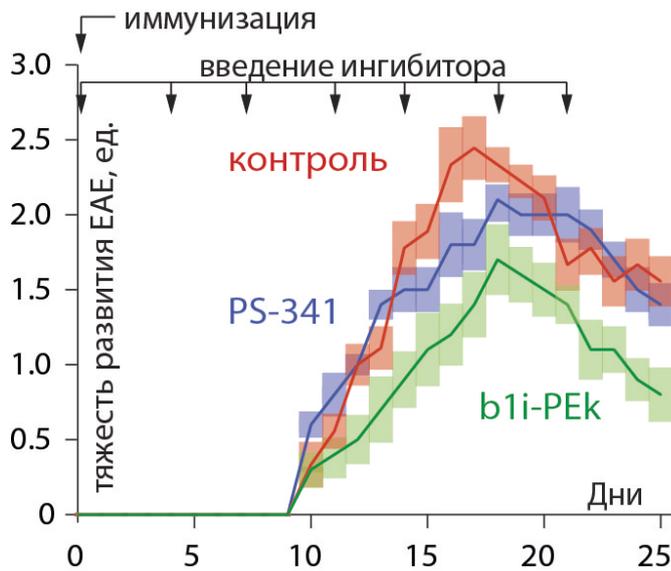


Рисунок 4.61 Развитие EAE у мышей линии SJL без терапии и при введении ингибиторов PS-341 и $\beta 1i$ -специфического пептидилэпоксикетона в дозе 0,5 мг/кг 2 раза в неделю в течение 21 дня после иммунизации.

Как уже упоминалось ранее, в настоящее время ингибиторы протеасомы активно исследуются в качестве потенциальных терапевтических средств для лечения широкого круга аутоиммунных заболеваний. В работе [143] показано, что ингибитор PR-957, специфичный к каталитической имуносубъединице $\beta 5i$, снижает тяжесть EAE у мышей линии C57BL/6, иммунизированных MOG₃₅₋₅₅ или PLP₁₃₉₋₁₅₁, а также предотвращает возникновение обострений. В этом случае терапевтический эффект обусловлен воздействием ингибитора на клетки иммунной системы, благодаря высокому содержанию в них имуносубъединицы $\beta 5i$. Преимущественная локализация $\beta 5i$ в инфильтрирующих лимфоцитах также была подтверждена и в данной работе. Предполагаемый механизм действия PR-957 заключается в подавлении миграции активированных лимфоцитов, в особенности CD4⁺ Т-хелперов, и активированных миелоидных клеток в ЦНС экспериментальных животных, а также ингибировании дифференцировки CD4⁺ Т-клеток в Th1 и Th17, увеличении количества Treg и снижении продукции ряда цитокинов. Очевидно, что подобное протективное действие сопровождается целым набором системных осложнений вследствие неспецифического угнетения функций иммунной системы в целом. Проведенные нами эксперименты наглядно демонстрируют, что при развитии EAE олигодендроциты содержат протеасому с имуносубъединицей $\beta 1i$. Данное наблюдение позволяет предположить, что терапевтическое действие $\beta 1i$ -специфического ингибитора на развитие EAE основано на ингибировании продукции антигенных пептидов в олигодендроцитах, что препятствует их узнаванию цитотоксическими Т-лимфоцитами, нежели на подавлении функций Т-лимфоцитов как таковых. Резюмируя, можно предположить, что применение $\beta 1i$ -специфического ингибитора для терапии аутоиммунной нейродегенерации будет более предпочтительным как с точки зрения эффективности, так и с позиции минимизации побочных явлений.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – это системное аутоиммунное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы человека, характеризующееся множественными повреждениями белого вещества. Среди главных аутоантигенов при РС выделяют несколько белков миелиновой оболочки, в том числе основной белок миелина (МВР), в значительных количествах присутствующий в мембране олигодендроцитов. В процессе метаболизма внутриклеточный протеолиз МВР может происходить под действием различных протеаз, а также мультикаталитического протеиназного комплекса – протеасомы. Абсолютное большинство белков разрушаются 26S протеасомой по убиквитин-зависимому пути. В рамках настоящей работы нами было установлено, что МВР принадлежит к крайне малочисленной группе белков, способных подвергаться протеолизу 26S протеасомой в отсутствие молекул убиквитина.

Поиск структурных элементов, необходимых для убиквитин-независимого гидролиза МВР протеасомой, выявил в составе МВР множественные «композиционные дегроны», инвариантные их линейной последовательности. На основе полученных данных можно утверждать, что механизм убиквитин-независимого гидролиза МВР протеасомой включает в себя заряд опосредованное взаимодействие множественных положительно заряженных дегронов МВР с отрицательно заряженными мотивами субъединиц протеасомы с последующей транслокацией в протеолитическую камеру коровой 20S субчастицы. Нами получены данные, указывающие на незначительную роль 19S регуляторного комплекса в убиквитин-независимом гидролизе МВР. Показано, что гидролиз МВР протеасомой АТФ-независим и ускоряется в присутствии регуляторных элементов типа REG альфа и гамма. Путем широкомасштабного транскриптомного анализа зафиксирован повышенный уровень регуляторной субчастицы REG альфа в первичной глиальной культуре при воздействии воспалительного стимула.

Протеасома является главным протеолитическим комплексом, генерирующим пептиды, презентруемые на поверхности клетки в контексте комплексов гистосовместимости I класса. Отсутствие контроля за гидролизом МВР со стороны системы убиквитинилирования означает, что качественный и количественный спектр пептидов МВР, презентруемых на поверхности олигодендроцитов, практически полностью определяется каталитическими субъединицами протеасомы. Нами было установлено, что при развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ) – животной модели рассеянного склероза – в головном мозге иммунизированных животных конститутивная протеасома в значительной степени замещается иммунопротеасомой, при этом иммуносубъединица $\beta 1i$ локализуется преимущественно в олигодендроцитах. Показано, что увеличенное содержание иммунопротеасомы в головном мозге мышей с ЕАЕ приводит к образованию повышенного количества ряда патогенных

пептидов MBP, включая пептид ENPVVHFF, являющийся частью энцефалитогенного региона MBP. Активированные CD8⁺ Т-клетки, специфичные к данному пептиду, эффективно лизировали олигодендроциты, обработанные интерфероном-гамма. Специфический ингибитор иммуносубъединицы $\beta 1i$ селективно воздействовал на иммунопротеасому *in vitro*, а также эффективно подавлял развитие EAE *in vivo* у экспериментальных животных. Полученные факты указывают на возможную связь между убиквитин-независимой протеолитической активностью иммунопротеасомы в отношении основного белка миелина и развитием рассеянного склероза, а также на перспективность специфических ингибиторов иммунопротеасомы как потенциальных лекарственных средств (Рис. 5.1).

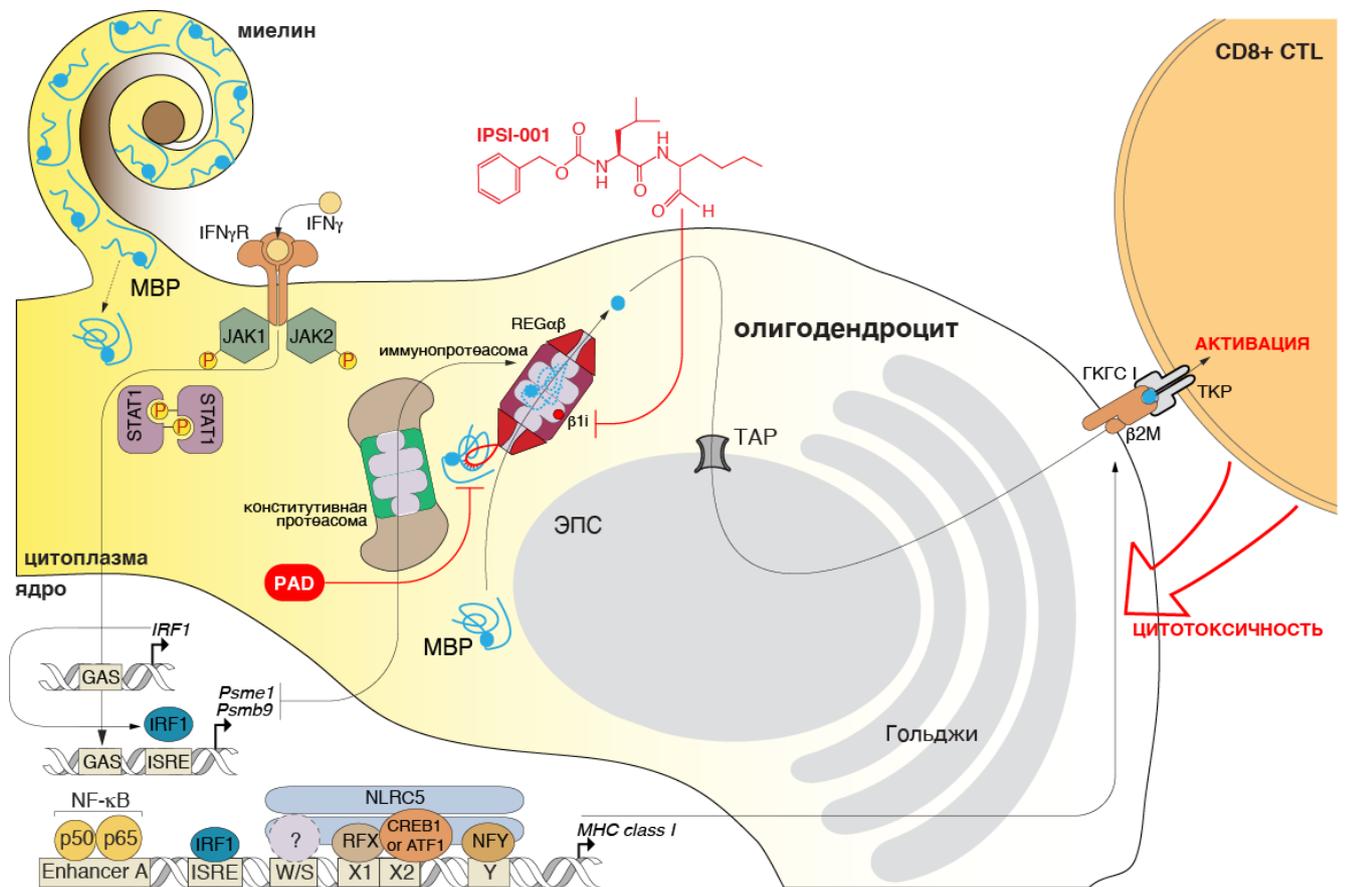


Рисунок 5.1 Роль иммунопротеасомы в развитии аутоиммунной нейродегенерации, а также перспективные способы её направленной терапии

Анализ репертуаров миелин-реактивных антител может выявить особенности механизма индукции и прогрессии РС. Основным препятствием является то, что структура и происхождение таких антител по-прежнему в значительной степени неизвестны. Секвенирование одиночных В-клеток, обнаруженных в ЦСЖ, может частично решить этот вопрос [269, 271, 285, 423], тем не менее охват, который достигается этим подходом, очевидно, недостаточен для каких-либо далеко идущих выводов. В данной работе с целью расширения

репертуара анализируемых аутоантител была создана фаг-дисплейная библиотека одноцепочечных антител на основе лимфоцитов, изолированных из крови пациентов с РС. Антитела, изначально отобранные на способность связывать МВР, оказались высокомолекулярны антителам против вирусного белка LMP1 вируса Эпштейн-Барр. Для одного такого антитела способность к взаимодействию с белками МВР и LMP1 была показана *in vitro*, что указывает на наличие природной кросс-реактивности. Основным выводом из этих экспериментов является то, что антитела против LMP1, образующиеся во время инфекции вирусом Эпштейн-Барр, могут в дальнейшем, связываясь с МВР, выступать в качестве воспалительного триггера (Рис 5.2). Высказанная гипотеза молекулярной мимикрии подтверждается рядом исследований, которые показывают корреляцию между развитием РС и наличием EBV в ЦНС [424]. Проведенное нами широкомасштабное секвенирование библиотек антител, отобранных на миелиновые и вирусные антигены, позволило выявить зародышевые линии, наиболее характерные для кросс-реактивных аутоантител.

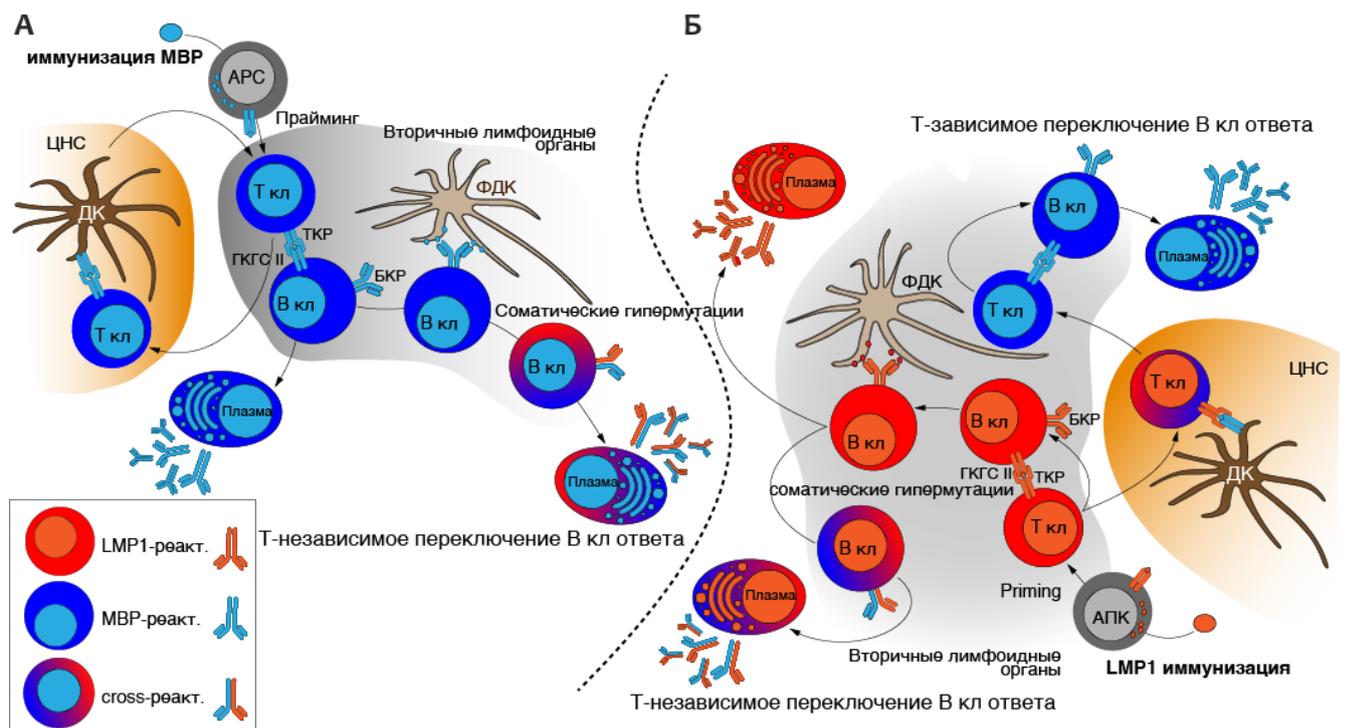


Рисунок 5.2 Концепция молекулярно-иммунобиологической платформы, объединяющей определение лигандов БКР с использованием рациональных и комбинаторных эпитопных библиотек и методов высокопроизводительного скрининга с дальнейшим созданием на их основе иммунотоксинов для селективной элиминации аутореактивных В-клеток

Идентификация лигандов аутореактивных БКР может быть полезна для селективной элиминации соответствующих В-клеток, поскольку БКР является уникальным рецептором, который отличает клонально гомогенную популяцию В-клеток от любой другой клетки в организме. Специфические лиганды БКР могут быть с успехом отобраны из пептидных

библиотек [269, 423]. Недавно разработанный метод фаговой иммунопреципитации (PhIP-Seq) можно рассматривать как перспективный инструмент для анализа целых пулов аутоантител с целью выявить связывающие мотивы [425, 426]. Известные пептиды – лиганды БКР – могут быть использованы для конструирования терапевтических иммунотоксинов [427]. Направляющий мотив бимодальных иммунотоксинов может избирательно взаимодействовать с патогенными В-клетками посредством их БКР и далее индуцировать их гибель посредством слитного токсина. Чтобы выявить наиболее эффективный способ подавления аутореактивных клеток, в данной работе нами был протестирован целый ряд бактериальных токсинов, а также константный фрагмент антитела человека класса G. Результаты свидетельствуют, что РНКазы барназа и константный фрагмент антитела человека класса G являются наиболее перспективными «боеголовками» создаваемых иммунотоксинов.

В настоящей работе была показана принципиальная возможность выборочного удаления аутореактивных В-клеток с применением константного фрагмента антитела, слитного с иммунодоминантной последовательностью МВР₈₂₋₁₀₅. Наши результаты свидетельствуют, что подобный ИТ наряду с селективным истощением В-клеток, специфичных к МВР₈₁₋₁₀₃, также ингибирует образование В-клеток, специфичных к фрагменту МВР₁₄₆₋₁₇₀. Для специфической элиминации МОG-реактивных В-клеток нами были разработаны ИТ на основе каталитических и транслокационных субъединиц дифтерийного токсина (DT), слитного с иммунодоминантной последовательностью МОG. Изучение фармакокинетических параметров внутривенного введения DT-МОG продемонстрировало, что фармакокинетика и неспецифическая токсичность DT-МОG превышали аналогичные параметры denileukin diftitox (ONTAK) – IL-2-DT, который одобрен FDA для лечения лейкемии и Т-клеточных лимфом [428].

В данном исследовании нами апробированы подходы к индукции иммунологической толерантности путем введения антигенных детерминант МВР в составе маннозилированных однослойных липосом. Результаты этого исследования показывают, что фрагменты МВР, инкапсулированные в маннозилированные липосомы, эффективно подавляют развитие ЕАЕ у крыс DA, снижая тяжесть первой атаки и существенно облегчая восстановление после стадии обострения. При введении препарата наблюдалось снижение Th1 цитокинов, индукция экспрессии BDNF в ЦНС и ингибирование продукции анти-МВР антител. Детализация механизма действия созданного препарата свидетельствует о его двухстадийности. На первом этапе интернализация фрагментов МВР дендритными клетками приводит к выбросу противовоспалительного цитокина IL-10 и Th2-поляризации, в то время как на втором этапе происходит «перезагрузка» иммунной системы благодаря образованию популяции регуляторных Т-клеток (Рис 5.3).

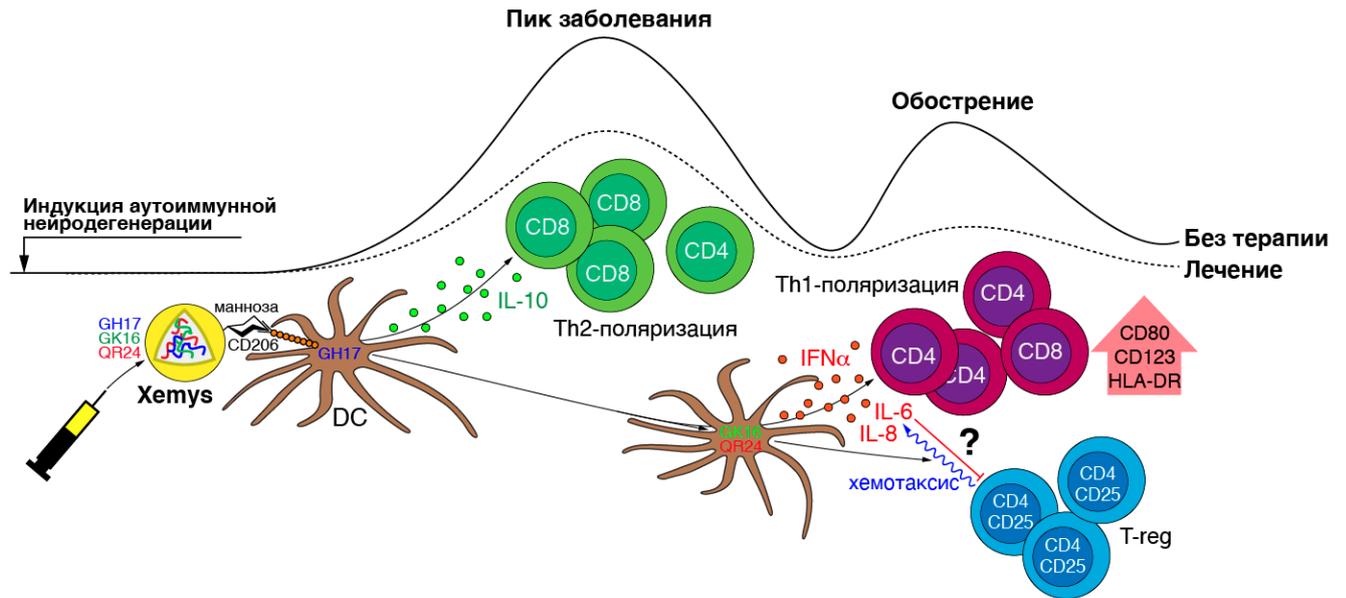


Рисунок 5.3 Молекулярный механизм действия препарата Xemys

Успешно завершённые клинические испытания второй стадии препарата Xemys, созданного на основе данных разработок, показали, что его введение является безопасным и хорошо переносится больными. Во время клинических испытаний не зафиксировано существенной разницы во вторичных целевых параметрах эффективности терапии, за исключением уровня ряда сывороточных цитокинов и хемокинов. В данном случае необходимо отметить, что клиническая эффективность стандартного иммуномодулирующего лечения РС имеет тенденцию проявляться в период от 3 до 6 месяцев [79]. Таким образом, проведенное исследование априори имело ограниченный потенциал в терминах обнаружения любых клинических эффектов лечения, в том числе по данным МРТ. Имеющиеся данные о профиле цитокинов свидетельствуют, что введение Xemys пациентам с РС приводит к нормализации уровней цитокинов до значений, характерных для условно здоровых индивидов. Нами наблюдалось статистически значимое снижение уровней MCP-1/CCL2, MIP-1 β /CCL4, IL-7 и IL-2 на момент завершения исследования. Таким образом, имеющиеся результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего тестирования Xemys в качестве препарата нового поколения, изменяющего течение РС.

Накопленные в настоящей работе знания можно суммировать как платформу, объединяющую определение лигандов БКР с использованием рациональных и комбинаторных эпитопных библиотек и методов высокопроизводительного скрининга с дальнейшим созданием на их основе иммунотоксинов для селективной элиминации аутореактивных В-клеток (Рис. 5.4). Подобная платформа показала свою эффективность и позволила в рамках данной работы проделать путь от простейших экспериментов *in vitro* до успешно проводимых клинических испытаний. В будущем описанная платформа может стать основой для исследования

аутоантигенных эпитопов, которые в составе бимодальных токсинов имеют шанс стать высокоточными боеприпасами в борьбе с аутоиммунными нарушениями.

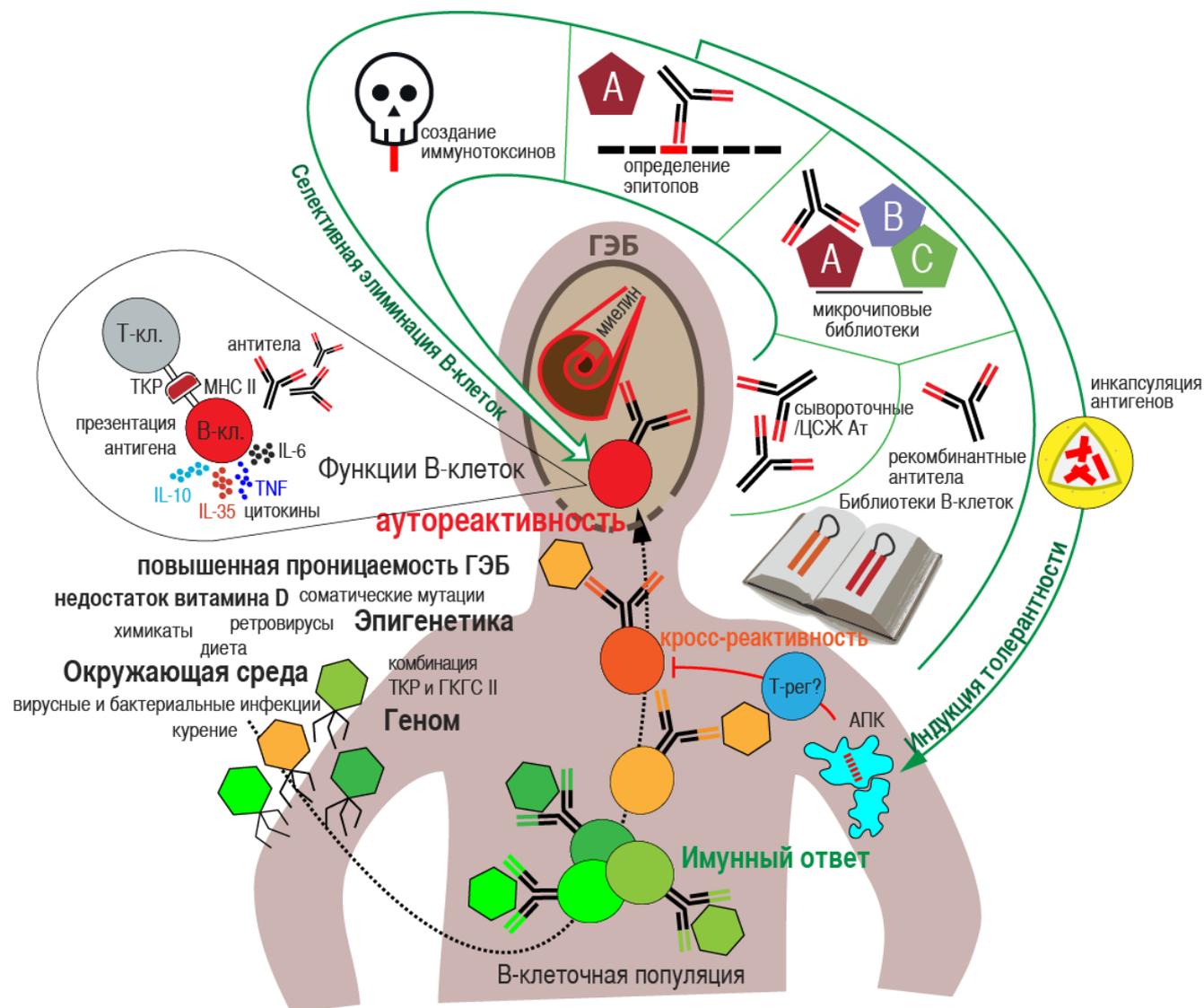


Рисунок 5.4 Концепция молекулярно-иммунобиологической платформы, объединяющей определение лигандов БКР с использованием рациональных и комбинаторных эпитопных библиотек и методов высокопроизводительного скрининга с дальнейшим созданием на их основе иммунотоксинов для селективной элиминации аутореактивных В-клеток

6. ВЫВОДЫ

1. На структурном уровне изучен репертуар аутореактивных иммуноглобулинов к ряду нейтральных аутоантигенов в сыворотке крови пациентов с рассеянным склерозом, а также модельных животных.
2. Экспериментально подтверждена гипотеза молекулярной мимикрии как одного из вариантов возникновения рассеянного склероза.
3. Впервые продемонстрирован факт убиквитин-независимости внутриклеточной деградации физиологически значимого аутоантигена протеасомой, показана непосредственная связь данного факта с развитием аутоиммунной нейродегенерации.
4. Детализирован молекулярный механизм убиквитин-независимой деградации основного белка миелина протеасомой. Высказана гипотеза об универсальности данного механизма, обуславливающего прямой захват основных полипептидных субстратов регуляторными комплексами протеасомы.
5. Созданы модульные бифункциональные иммунотоксины, позволяющие проводить узконаправленную элиминацию заранее predetermined популяций патологических лимфоцитов.
6. Разработаны подходы к индукции толерантности инкапсулированными фрагментами аутоантигенов. Предложенный на их основе препарат Хемус успешно прошел I и II фазы клинических испытаний с имеющимся одобренным синопсисом на фазу III.
7. Продемонстрирована потенциальная возможность блокады каталитических субъединиц иммунопротеасомы в качестве средства для терапии аутоиммунной нейродегенерации.

7. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heterogeneity of autoimmune diseases: pathophysiologic insights from genetics and implications for new therapies / J. H. Cho and M. Feldman // *Nat Med.* – 2015. – Vol. 21, no. 7. – P. 730-738.
2. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology / N. Koch-Henriksen and P. S. Sorensen // *Lancet Neurol.* – 2010. – Vol. 9, no. 5. – P. 520-532.
3. Multiple sclerosis / J. H. Noseworthy, C. Lucchinetti, M. Rodriguez, et al. // *N Engl J Med.* – 2000. – Vol. 343, no. 13. – P. 938-952.
4. Histologie de la sclérose en plaques [French] / J. M. Charcot // *Gazette des Hopitaux.* – 1868. – Vol. 41, no. – P. 554-555.
5. Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys / T. M. Rivers, D. H. Sprunt and G. P. Berry // *J Exp Med.* – 1933. – Vol. 58, no. 1. – P. 39-53.
6. Immunology of multiple sclerosis * / M. Sospedra and R. Martin // *Annu Rev Immunol.* – 2005. – Vol. 23, no. – P. 683-747.
7. A new scale for evaluating disability in multiple sclerosis / J. F. Kurtzke // *Neurology.* – 1955. – Vol. 5, no. 8. – P. 580-583.
8. И. А. З. Е.И.Гусев, А.Н.Бойко (2004). Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. Москва, Миклош.
9. Multiple sclerosis etiology: beyond genes and environment / R. Mechelli, V. Annibaldi, G. Ristori, et al. // *Expert Rev Clin Immunol.* – 2010. – Vol. 6, no. 3. – P. 481-490.
10. Blood-brain barrier changes and cell invasion differ between therapeutic immune clearance of neurotrophic virus and CNS autoimmunity / M. J. Fabis, T. W. Phares, R. B. Kean, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – Vol. 105, no. 40. – P. 15511-15516.
11. Regulation of lymphocyte traffic by adhesion molecules / M. Fabbri, E. Bianchi, L. Fumagalli, et al. // *Inflamm Res.* – 1999. – Vol. 48, no. 5. – P. 239-246.
12. Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions / A. Maeda and R. A. Sobel // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 1996. – Vol. 55, no. 3. – P. 300-309.
13. Functional activation of myelin-specific T cells by virus-induced molecular mimicry / J. K. Olson, T. N. Eagar and S. D. Miller // *J Immunol.* – 2002. – Vol. 169, no. 5. – P. 2719-2726.
14. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein / K. W. Wucherpfennig and J. L. Strominger // *Cell.* – 1995. – Vol. 80, no. 5. – P. 695-705.
15. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis / H. L. Lang, H. Jacobsen, S. Ikemizu, et al. // *Nat Immunol.* – 2002. – Vol. 3, no. 10. – P. 940-943.

16. Molecular mimicry in multiple sclerosis / H. Wekerle and R. Hohlfeld // *N Engl J Med.* – 2003. – Vol. 349, no. 2. – P. 185-186.
17. Structural basis for the binding of an immunodominant peptide from myelin basic protein in different registers by two HLA-DR2 proteins / Y. Li, H. Li, R. Martin, et al. // *J Mol Biol.* – 2000. – Vol. 304, no. 2. – P. 177-188.
18. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis / M. Marta, A. Andersson, M. Isaksson, et al. // *Eur J Immunol.* – 2008. – Vol. 38, no. 2. – P. 565-575.
19. Cryoelectron microscopy of protein-lipid complexes of human myelin basic protein charge isomers differing in degree of citrullination / D. R. Beniac, D. D. Wood, N. Palaniyar, et al. // *J Struct Biol.* – 2000. – Vol. 129, no. 1. – P. 80-95.
20. Основной белок миелина. Строение, свойства, функции, роль в диагностике демиелинизирующих заболеваний. / В. П. Чехонин, О. И. Гурина, Т. Б. Дмитриева, et al. // *Вопросы медицинской химии.* – 2000. – Vol. 6, no. – P. 10-27.
21. Endogenous presentation of self myelin epitopes by CNS-resident APCs in Theiler's virus-infected mice / Y. Katz-Levy, K. L. Neville, A. M. Girvin, et al. // *J Clin Invest.* – 1999. – Vol. 104, no. 5. – P. 599-610.
22. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis / K. Ota, M. Matsui, E. L. Milford, et al. // *Nature.* – 1990. – Vol. 346, no. 6280. – P. 183-187.
23. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis / R. Martin and H. F. McFarland // *Crit Rev Clin Lab Sci.* – 1995. – Vol. 32, no. 2. – P. 121-182.
24. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction / H. Babbe, A. Roers, A. Waisman, et al. // *J Exp Med.* – 2000. – Vol. 192, no. 3. – P. 393-404.
25. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes / C. B. Pettinelli and D. E. McFarlin // *J Immunol.* – 1981. – Vol. 127, no. 4. – P. 1420-1423.
26. W. Paul (2003). *Fundamental immunology.* Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins .
27. Immunology of multiple sclerosis / M. Sospedra and R. Martin // *Annu Rev Immunol.* – 2005. – Vol. 23, no. – P. 683-747.
28. Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis / J. R. Oksenberg, M. A. Panzara, A. B. Begovich, et al. // *Nature.* – 1993. – Vol. 362, no. 6415. – P. 68-70.
29. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay / M. P. Crawford, S. X. Yan, S. B. Ortega, et al. // *Blood.* – 2004. – Vol. 103, no. 11. – P. 4222-4231.

30. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis / J. Booss, M. M. Esiri, W. W. Tourtellotte, et al. // *J Neurol Sci.* – 1983. – Vol. 62, no. 1-3. – P. 219-232.
31. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions / R. Hoftberger, F. Aboul-Enein, W. Brueck, et al. // *Brain Pathol.* – 2004. – Vol. 14, no. 1. – P. 43-50.
32. Collateral bystander damage by myelin-directed CD8+ T cells causes axonal loss / B. Sobottka, M. D. Harrer, U. Ziegler, et al. // *Am J Pathol.* – 2009. – Vol. 175, no. 3. – P. 1160-1166.
33. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis / A. L. Zozulya and H. Wiendl // *Nat Clin Pract Neurol.* – 2008. – Vol. 4, no. 7. – P. 384-398.
34. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice / S. Hori, M. Haury, A. Coutinho, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – Vol. 99, no. 12. – P. 8213-8218.
35. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells / X. Zhang, D. N. Koldzic, L. Izikson, et al. // *Int Immunol.* – 2004. – Vol. 16, no. 2. – P. 249-256.
36. Functional identification of pathogenic autoantibody responses in patients with multiple sclerosis / C. Elliott, M. Lindner, A. Arthur, et al. // *Brain.* – 2012. – Vol. 135, no. Pt 6. – P. 1819-1833.
37. Untapped targets in multiple sclerosis / E. Meinl // *J Neurol Sci.* – 2011. – Vol. 311 Suppl 1, no. – P. S12-15.
38. A rapid ELISA-based serum assay for myelin basic protein in multiple sclerosis / A. J. Chamczuk, M. Ursell, P. O'Connor, et al. // *J Immunol Methods.* – 2002. – Vol. 262, no. 1-2. – P. 21-27.
39. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study / M. Reindl, C. Linnington, U. Brehm, et al. // *Brain.* – 1999. – Vol. 122 (Pt 11), no. – P. 2047-2056.
40. Quantified CSF antibody reactivity against myelin in multiple sclerosis / X. Sun, M. Bakhti, D. Fitzner, et al. // *Ann Clin Transl Neurol.* – 2015. – Vol. 2, no. 12. – P. 1116-1123.
41. Antigen microarrays identify CNS-produced autoantibodies in RRMS / F. J. Quintana, M. F. Farez, G. Izquierdo, et al. // *Neurology.* – 2012. – Vol. 78, no. 8. – P. 532-539.
42. MR imaging investigations in a non-human primate model of multiple sclerosis / C. P. Genain // *AJNR Am J Neuroradiol.* – 1999. – Vol. 20, no. 6. – P. 955-957.
43. A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody / C. Linnington, M. Webb and P. L. Woodhams // *J Neuroimmunol.* – 1984. – Vol. 6, no. 6. – P. 387-396.

44. B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice / T. Litzenburger, R. Fassler, J. Bauer, et al. // *J Exp Med.* – 1998. – Vol. 188, no. 1. – P. 169-180.
45. Tweaking the B lymphocyte compartment in autoimmune diseases / M. Zouali // *Nat Immunol.* – 2014. – Vol. 15, no. 3. – P. 209-212.
46. The B cell--old player, new position on the team / H. F. McFarland // *N Engl J Med.* – 2008. – Vol. 358, no. 7. – P. 664-665.
47. Control systems and decision making for antibody production / C. C. Goodnow, C. G. Vinuesa, K. L. Randall, et al. // *Nat Immunol.* – 2010. – Vol. 11, no. 8. – P. 681-688.
48. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens / R. Halverson, R. M. Torres and R. Pelanda // *Nat Immunol.* – 2004. – Vol. 5, no. 6. – P. 645-650.
49. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors / H. Wardemann, S. Yurasov, A. Schaefer, et al. // *Science.* – 2003. – Vol. 301, no. 5638. – P. 1374-1377.
50. Central B-cell tolerance: where selection begins / R. Pelanda and R. M. Torres // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2012. – Vol. 4, no. 4. – P. a007146.
51. Accumulation of clonally related B lymphocytes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients / M. Colombo, M. Dono, P. Gazzola, et al. // *J Immunol.* – 2000. – Vol. 164, no. 5. – P. 2782-2789.
52. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology / R. Magliozzi, O. Howell, A. Vora, et al. // *Brain.* – 2007. – Vol. 130, no. Pt 4. – P. 1089-1104.
53. B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions / S. E. Baranzini, M. C. Jeong, C. Butunoi, et al. // *J Immunol.* – 1999. – Vol. 163, no. 9. – P. 5133-5144.
54. The involvement of specific anti myelin basic protein antibody-forming cells in multiple sclerosis immunopathology / K. Gerritse, C. Deen, M. Fasbender, et al. // *J Neuroimmunol.* – 1994. – Vol. 49, no. 1-2. – P. 153-159.
55. Administration of myelin basic protein synthetic peptides to multiple sclerosis patients / K. G. Warren and I. Catz // *J Neurol Sci.* – 1995. – Vol. 133, no. 1-2. – P. 85-94.
56. The effect of intrathecal MBP synthetic peptides containing epitope P85 VVHFFKNIIVTP96 on free anti-MBP levels in acute relapsing multiple sclerosis / K. G. Warren and I. Catz // *J Neurol Sci.* – 1997. – Vol. 148, no. 1. – P. 67-78.
57. A structurally available encephalitogenic epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein specifically induces a diversified pathogenic autoimmune response / F. Bischof, A. Bins, M. Durr, et al. // *J Immunol.* – 2004. – Vol. 173, no. 1. – P. 600-606.
58. Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals / T. Derfuss, K. Parikh, S. Velhin, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – Vol. 106, no. 20. – P. 8302-8307.

59. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury / E. K. Mathey, T. Derfuss, M. K. Storch, et al. // *J Exp Med.* – 2007. – Vol. 204, no. 10. – P. 2363-2372.
60. Catalytic activity of autoantibodies toward myelin basic protein correlates with the scores on the multiple sclerosis expanded disability status scale / N. A. Ponomarenko, O. M. Durova, Vorobiev, II, et al. // *Immunol Lett.* – 2006. – Vol. 103, no. 1. – P. 45-50.
61. Autoantibodies to myelin basic protein catalyze site-specific degradation of their antigen / N. A. Ponomarenko, O. M. Durova, Vorobiev, II, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103, no. 2. – P. 281-286.
62. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event / T. Berger, P. Rubner, F. Schautzer, et al. // *N Engl J Med.* – 2003. – Vol. 349, no. 2. – P. 139-145.
63. Antimyelin antibodies in clinically isolated syndromes correlate with inflammation in MRI and CSF / J. Kuhle, R. L. Lindberg, A. Regeniter, et al. // *J Neurol.* – 2007. – Vol. 254, no. 2. – P. 160-168.
64. Anti-MOG and anti-MBP antibody subclasses in multiple sclerosis / R. Egg, M. Reindl, F. Deisenhammer, et al. // *Mult Scler.* – 2001. – Vol. 7, no. 5. – P. 285-289.
65. Formulas for the quantitation of intrathecal IgG production. Their validity in the presence of blood-brain barrier damage and their utility in multiple sclerosis / K. Blennow, P. Fredman, A. Wallin, et al. // *J Neurol Sci.* – 1994. – Vol. 121, no. 1. – P. 90-96.
66. Infectious causes of multiple sclerosis / D. H. Gilden // *Lancet Neurol.* – 2005. – Vol. 4, no. 3. – P. 195-202.
67. B cells in multiple sclerosis: connecting the dots / H. C. von Budingen, A. Bar-Or and S. S. Zamvil // *Curr Opin Immunol.* – 2011. – Vol. 23, no. 6. – P. 713-720.
68. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity / F. E. Lund and T. D. Randall // *Nat Rev Immunol.* – 2010. – Vol. 10, no. 4. – P. 236-247.
69. Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells / B. Pollinger, G. Krishnamoorthy, K. Berer, et al. // *J Exp Med.* – 2009. – Vol. 206, no. 6. – P. 1303-1316.
70. B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide / J. A. Lyons, M. San, M. P. Happ, et al. // *Eur J Immunol.* – 1999. – Vol. 29, no. 11. – P. 3432-3439.
71. Role of cytokines in neurological disorders / J. A. Aarli // *Curr Med Chem.* – 2003. – Vol. 10, no. 19. – P. 1931-1937.
72. CSF cytokines/chemokines as biomarkers in neuroinflammatory CNS disorders: A systematic review / K. Kothur, L. Wienholt, F. Brilot, et al. // *Cytokine.* – 2015. – Vol. no. – P.
73. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis / W. Cheng and G. Chen // *Mediators Inflamm.* – 2014. – Vol. 2014, no. – P. 659206.

74. Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis / D. Maimone, S. Gregory, B. G. Arnason, et al. // *J Neuroimmunol.* – 1991. – Vol. 32, no. 1. – P. 67-74.
75. Immune Parameters That Distinguish Multiple Sclerosis Patients from Patients with Other Neurological Disorders at Presentation / A. Mouzaki, M. Rodi, N. Dimisianos, et al. // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, no. 8. – P. e0135434.
76. EBV and vitamin D status in relapsing-remitting multiple sclerosis patients with a unique cytokine signature / A. Nejati, Z. Shoja, S. Shahmahmoodi, et al. // *Med Microbiol Immunol.* – 2015. – Vol. no. – P.
77. Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: unique gene expression of disease activity / A. Achiron, M. Gurevich, N. Friedman, et al. // *Ann Neurol.* – 2004. – Vol. 55, no. 3. – P. 410-417.
78. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group / D. W. Paty and D. K. Li // *Neurology.* – 1993. – Vol. 43, no. 4. – P. 662-667.
79. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group // *Lancet.* – 1998. – Vol. 352, no. 9139. – P. 1498-1504.
80. Michael R. Morgan, PharmD 2013, Harrison School of Pharmacy, Auburn University; Wesley T. Lindsey, PharmD, Associate Clinical Professor, Drug Information and Learning Resource Center, Harrison School of Pharmacy, Auburn University / A. L. Adams // – – Vol. no. – P.
81. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system / H. S. Panitch, R. L. Hirsch, J. Schindler, et al. // *Neurology.* – 1987. – Vol. 37, no. 7. – P. 1097-1102.
82. Common and specific signatures of gene expression and protein-protein interactions in autoimmune diseases / T. Tuller, S. Atar, E. Ruppin, et al. // *Genes Immun.* – 2013. – Vol. 14, no. 2. – P. 67-82.
83. Cerebrospinal fluid IL-12p40, CXCL13 and IL-8 as a combinatorial biomarker of active intrathecal inflammation / B. Bielekova, M. Komori, Q. Xu, et al. // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, no. 11. – P. e48370.
84. Cytokine profile in relapsingremitting multiple sclerosis patients and the association between progression and activity of the disease / A. P. Kallaur, S. R. Oliveira, A. N. Colado Simao, et al. // *Mol Med Rep.* – 2013. – Vol. 7, no. 3. – P. 1010-1020.
85. The cytokine storm in multiple sclerosis / H. Link // *Mult Scler.* – 1998. – Vol. 4, no. 1. – P. 12-15.
86. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination / J. Liu, M. W. Marino, G. Wong, et al. // *Nat Med.* – 1998. – Vol. 4, no. 1. – P. 78-83.

87. Demyelination occurring during anti-tumor necrosis factor alpha therapy for inflammatory arthritides / N. Mohan, E. T. Edwards, T. R. Cupps, et al. // *Arthritis Rheum.* – 2001. – Vol. 44, no. 12. – P. 2862-2869.
88. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group // *Neurology.* – 1999. – Vol. 53, no. 3. – P. 457-465.
89. Demyelinating neurological disease after treatment with tumor necrosis factor alpha-inhibiting agents in a rheumatological outpatient clinic: description of six cases / A. Theibich, L. Dreyer, M. Magyari, et al. // *Clin Rheumatol.* – 2013. – Vol. no. – P.
90. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci / P. L. De Jager, X. Jia, J. Wang, et al. // *Nat Genet.* – 2009. – Vol. 41, no. 7. – P. 776-782.
91. TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis / A. P. Gregory, C. A. Dendrou, K. E. Attfield, et al. // *Nature.* – 2012. – Vol. 488, no. 7412. – P. 508-511.
92. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis / M. K. Sharief and R. Hentges // *N Engl J Med.* – 1991. – Vol. 325, no. 7. – P. 467-472.
93. Cytokines as Biomarkers of Treatment Response to IFN beta in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis / N. Dimisianos, M. Rodi, D. Kalavrizioti, et al. // *Mult Scler Int.* – 2014. – Vol. 2014, no. – P. 436764.
94. Predictive value of early serum cytokine changes on long-term interferon beta-1a efficacy in multiple sclerosis / B. Petek-Balci, A. Coban, E. Shugaiv, et al. // *Int J Neurosci.* – 2015. – Vol. 125, no. 5. – P. 352-356.
95. Abnormal levels of interferon-gamma receptors in active multiple sclerosis are normalized by IFN-beta therapy: implications for control of apoptosis / J. Ahn, X. Feng, N. Patel, et al. // *Front Biosci.* – 2004. – Vol. 9, no. – P. 1547-1555.
96. Interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients decreases the number of circulating T cells producing interferon-gamma and interleukin-4 / R. Furlan, A. Bergami, R. Lang, et al. // *J Neuroimmunol.* – 2000. – Vol. 111, no. 1-2. – P. 86-92.
97. Effect of interferon-beta and atorvastatin on Th1/Th2 cytokines in multiple sclerosis / J. Sellner, I. Greeve, O. Findling, et al. // *Neurochem Int.* – 2008. – Vol. 53, no. 1-2. – P. 17-21.
98. Cytokine secretion of myelin basic protein reactive T cells in patients with multiple sclerosis / A. Windhagen, D. E. Anderson, A. Carrizosa, et al. // *J Neuroimmunol.* – 1998. – Vol. 91, no. 1-2. – P. 1-9.
99. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease / P. Kidd // *Altern Med Rev.* – 2003. – Vol. 8, no. 3. – P. 223-246.

100. Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1- reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells / O. Neuhaus, C. Farina, A. Yassouridis, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – Vol. 97, no. 13. – P. 7452-7457.
101. TH1/TH2 Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with Glatiramer acetate or Natalizumab / C. Oreja-Guevara, J. Ramos-Cejudo, L. S. Aroeira, et al. // *BMC Neurol.* – 2012. – Vol. 12, no. – P. 95.
102. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides / M. T. Heemels and H. Ploegh // *Annu Rev Biochem.* – 1995. – Vol. 64, no. – P. 463-491.
103. Survival of the fitters / H. G. Rammensee // *Nature.* – 2002. – Vol. 419, no. 6906. – P. 443-445.
104. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent / M. K. Tewari, G. Sinnathamby, D. Rajagopal, et al. // *Nat Immunol.* – 2005. – Vol. 6, no. 3. – P. 287-294.
105. Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain / G. Lizee, G. Basha, J. Tiong, et al. // *Nat Immunol.* – 2003. – Vol. 4, no. 11. – P. 1065-1073.
106. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo / E. S. Trombetta and I. Mellman // *Annu Rev Immunol.* – 2005. – Vol. 23, no. – P. 975-1028.
107. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation / J. Neefjes, M. L. Jongsma, P. Paul, et al. // *Nat Rev Immunol.* – 2011. – Vol. 11, no. 12. – P. 823-836.
108. A recyclable assay to analyze the NH(2)-terminal trimming of antigenic peptide precursors / L. Burri, C. Servis, L. Chapatte, et al. // *Protein Expr Purif.* – 2002. – Vol. 26, no. 1. – P. 19-27.
109. An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope / U. Seifert, C. Maranon, A. Shmueli, et al. // *Nat Immunol.* – 2003. – Vol. 4, no. 4. – P. 375-379.
110. Beyond the proteasome: trimming, degradation and generation of MHC class I ligands by auxiliary proteases / L. Saveanu, D. Fruci and P. van Endert // *Mol Immunol.* – 2002. – Vol. 39, no. 3-4. – P. 203-215.
111. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum / T. Serwold, F. Gonzalez, J. Kim, et al. // *Nature.* – 2002. – Vol. 419, no. 6906. – P. 480-483.
112. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing / B. Strehl, U. Seifert, E. Kruger, et al. // *Immunol Rev.* – 2005. – Vol. 207, no. – P. 19-30.
113. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides / T. Saric, S. C. Chang, A. Hattori, et al. // *Nat Immunol.* – 2002. – Vol. 3, no. 12. – P. 1169-1176.
114. The unravelling of the ubiquitin system / A. Ciechanover // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2015. – Vol. 16, no. 5. – P. 322-324.

115. Molecular mechanisms of proteasome assembly / S. Murata, H. Yashiroda and K. Tanaka // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2009. – Vol. 10, no. 2. – P. 104-115.
116. Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target / A. F. Kisselev, W. A. van der Linden and H. S. Overkleeft // *Chem Biol.* – 2012. – Vol. 19, no. 1. – P. 99-115.
117. Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation / J. Chapiro, S. Claverol, F. Piette, et al. // *J Immunol.* – 2006. – Vol. 176, no. 2. – P. 1053-1061.
118. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens / W. Chen, C. C. Norbury, Y. Cho, et al. // *J Exp Med.* – 2001. – Vol. 193, no. 11. – P. 1319-1326.
119. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses / E. J. Sijts and P. M. Kloetzel // *Cell Mol Life Sci.* – 2011. – Vol. 68, no. 9. – P. 1491-1502.
120. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity / B. C. Braun, M. Glickman, R. Kraft, et al. // *Nat Cell Biol.* – 1999. – Vol. 1, no. 4. – P. 221-226.
121. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle / G. C. Lander, E. Estrin, M. E. Matyskiela, et al. // *Nature.* – 2012. – Vol. 482, no. 7384. – P. 186-191.
122. Multiple chaperone-assisted formation of mammalian 20S proteasomes / S. Murata // *IUBMB Life.* – 2006. – Vol. 58, no. 5-6. – P. 344-348.
123. Conformational switching of the 26S proteasome enables substrate degradation / M. E. Matyskiela, G. C. Lander and A. Martin // *Nat Struct Mol Biol.* – 2013. – Vol. 20, no. 7. – P. 781-788.
124. The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites / A. F. Kisselev, M. Garcia-Calvo, H. S. Overkleeft, et al. // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol. 278, no. 38. – P. 35869-35877.
125. Nature of pharmacophore influences active site specificity of proteasome inhibitors / M. Screen, M. Britton, S. L. Downey, et al. // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol. 285, no. 51. – P. 40125-40134.
126. Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome / F. Parlati, S. J. Lee, M. Aujay, et al. // *Blood.* – 2009. – Vol. 114, no. 16. – P. 3439-3447.
127. Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin in cultured cells / L. R. Dick, A. A. Cruikshank, A. T. Destree, et al. // *J Biol Chem.* – 1997. – Vol. 272, no. 1. – P. 182-188.
128. LMP2-specific inhibitors: chemical genetic tools for proteasome biology / Y. K. Ho, P. Bargagna-Mohan, M. Wehenkel, et al. // *Chem Biol.* – 2007. – Vol. 14, no. 4. – P. 419-430.
129. Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors / D. J. Kuhn, S. A. Hunsucker, Q. Chen, et al. // *Blood.* – 2009. – Vol. 113, no. 19. – P. 4667-4676.

130. Lack of proteasome active site allostery as revealed by subunit-specific inhibitors / J. Myung, K. B. Kim, K. Lindsten, et al. // *Mol Cell*. – 2001. – Vol. 7, no. 2. – P. 411-420.
131. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis / T. Muchamuel, M. Basler, M. A. Aujay, et al. // *Nat Med*. – 2009. – Vol. 15, no. 7. – P. 781-787.
132. Inhibitors of the immunoproteasome: current status and future directions / Z. Miller, L. Ao, K. B. Kim, et al. // *Curr Pharm Des*. – 2013. – Vol. 19, no. 22. – P. 4140-4151.
133. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction / M. H. Glickman and A. Ciechanover // *Physiol Rev*. – 2002. – Vol. 82, no. 2. – P. 373-428.
134. Modification by single ubiquitin moieties rather than polyubiquitination is sufficient for proteasomal processing of the p105 NF-kappaB precursor / Y. Kravtsova-Ivantsiv, S. Cohen and A. Ciechanover // *Mol Cell*. – 2009. – Vol. 33, no. 4. – P. 496-504.
135. The size of the proteasomal substrate determines whether its degradation will be mediated by mono- or polyubiquitylation / N. Shabek, Y. Herman-Bachinsky, S. Buchsbaum, et al. // *Mol Cell*. – 2012. – Vol. 48, no. 1. – P. 87-97.
136. MDM2 promotes p21waf1/cip1 proteasomal turnover independently of ubiquitylation / Y. Jin, H. Lee, S. X. Zeng, et al. // *EMBO J*. – 2003. – Vol. 22, no. 23. – P. 6365-6377.
137. Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination / R. J. Sheaff, J. D. Singer, J. Swanger, et al. // *Mol Cell*. – 2000. – Vol. 5, no. 2. – P. 403-410.
138. Proteasomal degradation of RPN4 via two distinct mechanisms, ubiquitin-dependent and -independent / D. Ju and Y. Xie // *J Biol Chem*. – 2004. – Vol. 279, no. 23. – P. 23851-23854.
139. Structural determinants for the intracellular degradation of human thymidylate synthase / A. M. Forsthoefel, M. M. Pena, Y. Y. Xing, et al. // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43, no. 7. – P. 1972-1979.
140. The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REGgamma proteasome / X. Li, D. M. Lonard, S. Y. Jung, et al. // *Cell*. – 2006. – Vol. 124, no. 2. – P. 381-392.
141. Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome / X. Chen, L. F. Barton, Y. Chi, et al. // *Mol Cell*. – 2007. – Vol. 26, no. 6. – P. 843-852.
142. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination / Y. Murakami, S. Matsufuji, T. Kameji, et al. // *Nature*. – 1992. – Vol. 360, no. 6404. – P. 597-599.
143. Inhibition of the immunoproteasome ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis / M. Basler, S. Mundt, T. Muchamuel, et al. // *EMBO Mol Med*. – 2014. – Vol. 6, no. 2. – P. 226-238.
144. Dual inhibition of proteasomal and lysosomal proteolysis ameliorates autoimmune central nervous system inflammation / N. Fissolo, M. Kraus, M. Reich, et al. // *Eur J Immunol*. – 2008. – Vol. 38, no. 9. – P. 2401-2411.

145. Treatment of established relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with the proteasome inhibitor PS-519 / C. L. Vanderlugt, S. M. Rahbe, P. J. Elliott, et al. // *J Autoimmun.* – 2000. – Vol. 14, no. 3. – P. 205-211.
146. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis / B. A. t Hart, B. Gran and R. Weissert // *Trends Mol Med.* – 2011. – Vol. 17, no. 3. – P. 119-125.
147. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells / I. Mendel, N. Kerlero de Rosbo and A. Ben-Nun // *Eur J Immunol.* – 1995. – Vol. 25, no. 7. – P. 1951-1959.
148. Rat and human myelin oligodendrocyte glycoproteins induce experimental autoimmune encephalomyelitis by different mechanisms in C57BL/6 mice / A. R. Oliver, G. M. Lyon and N. H. Ruddle // *J Immunol.* – 2003. – Vol. 171, no. 1. – P. 462-468.
149. Experimental autoimmune encephalomyelitis / P. Rao and B. M. Segal // *Methods Mol Biol.* – 2012. – Vol. 900, no. – P. 363-380.
150. Relapsing murine experimental allergic encephalomyelitis induced by myelin basic protein / R. B. Fritz, C. H. Chou and D. E. McFarlin // *J Immunol.* – 1983. – Vol. 130, no. 3. – P. 1024-1026.
151. Characterization of the antigen specificity and TCR repertoire, and TCR-based DNA vaccine therapy in myelin basic protein-induced autoimmune encephalomyelitis in DA rats / A. Miyakoshi, W. K. Yoon, Y. Jee, et al. // *J Immunol.* – 2003. – Vol. 170, no. 12. – P. 6371-6378.
152. Induction of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats with purified synthetic peptides: delineation of antigenic determinants for encephalitogenicity, in vitro activation of cellular transfer, and proliferation of lymphocytes / M. D. Mannie, P. Y. Paterson, D. C. U'Prichard, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1985. – Vol. 82, no. 16. – P. 5515-5519.
153. The immune response against myelin basic protein in two strains of rat with different genetic capacity to develop experimental allergic encephalomyelitis / D. E. McFarlin, S. C. Hsu, S. B. Slemenda, et al. // *J Exp Med.* – 1975. – Vol. 141, no. 1. – P. 72-81.
154. Protracted, relapsing and demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats immunized with syngeneic spinal cord and incomplete Freund's adjuvant / J. C. Lorentzen, S. Issazadeh, M. Storch, et al. // *J Neuroimmunol.* – 1995. – Vol. 63, no. 2. – P. 193-205.
155. MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats / R. Weissert, E. Wallstrom, M. K. Storch, et al. // *J Clin Invest.* – 1998. – Vol. 102, no. 6. – P. 1265-1273.
156. T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis / S. S. Zamvil, D. J. Mitchell, A. C. Moore, et al. // *Nature.* – 1986. – Vol. 324, no. 6094. – P. 258-260.
157. Induction of experimental allergic encephalomyelitis by myelin proteolipid-protein-specific T cell clones and synthetic peptides / V. K. Kuchroo, R. A. Sobel, T. Yamamura, et al. // *Pathobiology.* – 1991. – Vol. 59, no. 5. – P. 305-312.

158. Induction of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in Biozzi mice / D. Baker, J. K. O'Neill, S. E. Gschmeissner, et al. // *J Neuroimmunol.* – 1990. – Vol. 28, no. 3. – P. 261-270.
159. Genetic susceptibility or resistance to autoimmune encephalomyelitis in MHC congenic mice is associated with differential production of pro- and anti-inflammatory cytokines / R. Maron, W. W. Hancock, A. Slavin, et al. // *Int Immunol.* – 1999. – Vol. 11, no. 9. – P. 1573-1580.
160. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis / J. K. Olson, J. L. Croxford, M. A. Calenoff, et al. // *J Clin Invest.* – 2001. – Vol. 108, no. 2. – P. 311-318.
161. Relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the SJL/J mouse / A. M. Brown and D. E. McFarlin // *Lab Invest.* – 1981. – Vol. 45, no. 3. – P. 278-284.
162. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity / J. Goverman, A. Woods, L. Larson, et al. // *Cell.* – 1993. – Vol. 72, no. 4. – P. 551-560.
163. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis / E. Bettelli, M. Pagany, H. L. Weiner, et al. // *J Exp Med.* – 2003. – Vol. 197, no. 9. – P. 1073-1081.
164. Multiple sclerosis—a quiet revolution / R. M. Ransohoff, D. A. Hafler and C. F. Lucchinetti // *Nat Rev Neurol.* – 2015. – Vol. 11, no. 3. – P. 134-142.
165. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group / K. P. Johnson, B. R. Brooks, J. A. Cohen, et al. // *Neurology.* – 1995. – Vol. 45, no. 7. – P. 1268-1276.
166. Multiple sclerosis: trial of a synthetic polypeptide / M. B. Bornstein, A. I. Miller, D. Teitelbaum, et al. // *Ann Neurol.* – 1982. – Vol. 11, no. 3. – P. 317-319.
167. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis / C. H. Polman, P. W. O'Connor, E. Havrdova, et al. // *N Engl J Med.* – 2006. – Vol. 354, no. 9. – P. 899-910.
168. Daclizumab high-yield process in relapsing-remitting multiple sclerosis (SELECT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial / R. Gold, G. Giovannoni, K. Selmaj, et al. // *Lancet.* – 2013. – Vol. 381, no. 9884. – P. 2167-2175.
169. Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial / J. A. Cohen, A. J. Coles, D. L. Arnold, et al. // *Lancet.* – 2012. – Vol. 380, no. 9856. – P. 1819-1828.
170. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis / L. Kappos, E. W. Radue, P. O'Connor, et al. // *N Engl J Med.* – 2010. – Vol. 362, no. 5. – P. 387-401.
171. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial / C. Confavreux, P. O'Connor, G. Comi, et al. // *Lancet Neurol.* – 2014. – Vol. 13, no. 3. – P. 247-256.

172. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis / R. Gold, L. Kappos, D. L. Arnold, et al. // *N Engl J Med.* – 2012. – Vol. 367, no. 12. – P. 1098-1107.
173. Monoclonal Antibodies in Preclinical EAE Models of Multiple Sclerosis: A Systematic Review / K. Schmitz, G. Geisslinger and I. Tegeder // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Vol. 18, no. 9. – P.
174. Emerging immunopharmacological targets in multiple sclerosis / M. Farjam, G. X. Zhang, B. Ciric, et al. // *J Neurol Sci.* – 2015. – Vol. 358, no. 1-2. – P. 22-30.
175. Prophylactic inoculation against hay fever / L. Noon // *Lancet.* – 1911. – Vol. i, no. – P. 1572–1573.
176. T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis / J. M. Critchfield, M. K. Racke, J. C. Zuniga-Pflucker, et al. // *Science.* – 1994. – Vol. 263, no. 5150. – P. 1139-1143.
177. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets / R. Hohlfeld, K. Dornmair, E. Meinl, et al. // *Lancet Neurol.* – 2015. – Vol. no. – P.
178. Phase 2 trial of a DNA vaccine encoding myelin basic protein for multiple sclerosis / H. Garren, W. H. Robinson, E. Krasulova, et al. // *Ann Neurol.* – 2008. – Vol. 63, no. 5. – P. 611-620.
179. Design and synthesis of a cyclic double mutant peptide (cyclo(87-99)[A91,A96]MBP87-99) induces altered responses in mice after conjugation to mannan: implications in the immunotherapy of multiple sclerosis / M. Katsara, G. Deraos, T. Tselios, et al. // *J Med Chem.* – 2009. – Vol. 52, no. 1. – P. 214-218.
180. A double mutation of MBP(83-99) peptide induces IL-4 responses and antagonizes IFN-gamma responses / M. Katsara, E. Yuriev, P. A. Ramsland, et al. // *J Neuroimmunol.* – 2008. – Vol. 200, no. 1-2. – P. 77-89.
181. Antibody responses following induction of antigen-specific tolerance with antigen-coupled cells / P. Peschl, M. Reindl, K. Schanda, et al. // *Mult Scler.* – 2015. – Vol. 21, no. 5. – P. 651-655.
182. Antigen-specific tolerance by autologous myelin peptide-coupled cells: a phase 1 trial in multiple sclerosis / A. Lutterotti, S. Yousef, A. Sputtek, et al. // *Sci Transl Med.* – 2013. – Vol. 5, no. 188. – P. 188ra175.
183. Autoantigen-pulsed dendritic cells constitute a beneficial cytokine and growth factor network in ameliorating experimental allergic encephalomyelitis / X. Liu, C. Ciumas, Y. M. Huang, et al. // *Mult Scler.* – 2005. – Vol. 11, no. 4. – P. 381-389.
184. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by COP1--relevance to multiple sclerosis / R. Arnon, D. Teitelbaum and M. Sela // *Isr J Med Sci.* – 1989. – Vol. 25, no. 12. – P. 686-689.
185. Binding of copolymer 1 and myelin basic protein leads to clustering of class II MHC molecules on antigen-presenting cells / M. Fridkis-Hareli, D. Teitelbaum, I. Pecht, et al. // *Int Immunol.* – 1997. – Vol. 9, no. 7. – P. 925-934.

186. Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis / P. W. Duda, M. C. Schmied, S. L. Cook, et al. // *J Clin Invest.* – 2000. – Vol. 105, no. 7. – P. 967-976.
187. Specific Th2 cells accumulate in the central nervous system of mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis by copolymer 1 / R. Aharoni, D. Teitelbaum, O. Leitner, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – Vol. 97, no. 21. – P. 11472-11477.
188. Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3 / J. Hong, N. Li, X. Zhang, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – Vol. 102, no. 18. – P. 6449-6454.
189. Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ / R. Aharoni, B. Kayhan, R. Eilam, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2003. – Vol. 100, no. 24. – P. 14157-14162.
190. Promiscuous binding of synthetic copolymer 1 to purified HLA-DR molecules / M. Fridkis-Hareli and J. L. Strominger // *J Immunol.* – 1998. – Vol. 160, no. 9. – P. 4386-4397.
191. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action / C. Farina, M. S. Weber, E. Meinl, et al. // *Lancet Neurol.* – 2005. – Vol. 4, no. 9. – P. 567-575.
192. Comparative efficacy of interferon beta versus glatiramer acetate for relapsing-remitting multiple sclerosis / L. La Mantia, C. Di Pietrantonj, M. Rovaris, et al. // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2015. – Vol. 86, no. 9. – P. 1016-1020.
193. Comparative effectiveness of glatiramer acetate and interferon beta formulations in relapsing-remitting multiple sclerosis / T. Kalincik, V. Jokubaitis, G. Izquierdo, et al. // *Mult Scler.* – 2015. – Vol. 21, no. 9. – P. 1159-1171.
194. Effectiveness and cost-effectiveness of interferon beta and glatiramer acetate in the UK Multiple Sclerosis Risk Sharing Scheme at 6 years: a clinical cohort study with natural history comparator / J. Palace, M. Duddy, T. Bregenzer, et al. // *Lancet Neurol.* – 2015. – Vol. 14, no. 5. – P. 497-505.
195. Therapy with glatiramer acetate for multiple sclerosis / L. Munari, R. Lovati and A. Boiko // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2004. – Vol. no. 1. – P. CD004678.
196. Continuous long-term immunomodulatory therapy in relapsing multiple sclerosis: results from the 15-year analysis of the US prospective open-label study of glatiramer acetate / C. Ford, A. D. Goodman, K. Johnson, et al. // *Mult Scler.* – 2010. – Vol. 16, no. 3. – P. 342-350.
197. A 2-year observational study of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis converting to glatiramer acetate from other disease-modifying therapies: the COPTIMIZE trial / T. Ziemssen, O. A. Bajenaru, A. Carra, et al. // *J Neurol.* – 2014. – Vol. 261, no. 11. – P. 2101-2111.
198. Effects of early treatment with glatiramer acetate in patients with clinically isolated syndrome / G. Comi, V. Martinelli, M. Rodegher, et al. // *Mult Scler.* – 2013. – Vol. 19, no. 8. – P. 1074-1083.

199. [Local fibrinolysis of hypertensive intracerebral hematomas] / A. S. Saribekian, E. V. Arzamastsev, R. Bibilashvili, et al. // *Zh Vopr Neurokhir Im NN Burdenko*. – 2008. – Vol. no. 3. – P. 14-19; discussion 19-20.
200. Synthetic peptides that inhibit binding of the myelin basic protein 85-99 epitope to multiple sclerosis-associated HLA-DR2 molecules and MBP-specific T-cell responses / M. Fridkis-Hareli, J. N. Stern, L. Fugger, et al. // *Hum Immunol*. – 2001. – Vol. 62, no. 8. – P. 753-763.
201. Novel synthetic amino acid copolymers that inhibit autoantigen-specific T cell responses and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis / M. Fridkis-Hareli, L. Santambrogio, J. N. Stern, et al. // *J Clin Invest*. – 2002. – Vol. 109, no. 12. – P. 1635-1643.
202. Modified amino acid copolymers suppress myelin basic protein 85-99-induced encephalomyelitis in humanized mice through different effects on T cells / Z. Illes, J. N. Stern, J. Reddy, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2004. – Vol. 101, no. 32. – P. 11749-11754.
203. Peptide 15-mers of defined sequence that substitute for random amino acid copolymers in amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis / J. N. Stern, Z. Illes, J. Reddy, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2005. – Vol. 102, no. 5. – P. 1620-1625.
204. Amino acid copolymer-specific IL-10-secreting regulatory T cells that ameliorate autoimmune diseases in mice / J. N. Stern, D. B. Keskin, H. Zhang, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2008. – Vol. 105, no. 13. – P. 5172-5176.
205. The role of dendritic cells in the generation of CD4(+) CD25(HI) Foxp3(+) T cells induced by amino acid copolymers / N. Kawamoto, H. Ohnishi, N. Kondo, et al. // *Int Immunol*. – 2013. – Vol. 25, no. 1. – P. 53-65.
206. Amino acid copolymers that alleviate experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo interact with heparan sulfates and glycoprotein 96 in APCs / P. A. Koenig, E. Spooner, N. Kawamoto, et al. // *J Immunol*. – 2013. – Vol. 191, no. 1. – P. 208-216.
207. Immunization with a synthetic T-cell receptor V-region peptide protects against experimental autoimmune encephalomyelitis / A. A. Vandenbark, G. Hashim and H. Offner // *Nature*. – 1989. – Vol. 341, no. 6242. – P. 541-544.
208. T cell receptor peptide therapy triggers autoregulation of experimental encephalomyelitis / H. Offner, G. A. Hashim and A. A. Vandenbark // *Science*. – 1991. – Vol. 251, no. 4992. – P. 430-432.
209. Vaccination against experimental allergic encephalomyelitis with T cell receptor peptides / M. D. Howell, S. T. Winters, T. Olee, et al. // *Science*. – 1989. – Vol. 246, no. 4930. – P. 668-670.
210. Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with clonotypic CDR3 peptides: CD4(+) Foxp3(+) T-regulatory cells suppress interleukin-2-dependent expansion of myelin basic protein-specific T cells / A. C. Buenafe, S. Andrew, M. Afentoulis, et al. // *Immunology*. – 2010. – Vol. 130, no. 1. – P. 114-124.
211. A CD4-CDR3 peptide analog inhibits both primary and secondary autoreactive CD4+ T cell responses in experimental allergic encephalomyelitis / J. C. Marini, B. A. Jameson, F. D. Lublin, et al. // *J Immunol*. – 1996. – Vol. 157, no. 8. – P. 3706-3715.

212. Effect of a cyclic heptapeptide based on the human CD4 domain 1 CC' loop region on murine experimental allergic encephalomyelitis: inhibition of both primary and secondary responses / A. E. Edling, S. Choksi, Z. Huang, et al. // *J Neuroimmunol.* – 2001. – Vol. 112, no. 1-2. – P. 115-128.
213. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using peptide mimics of CD28 / M. Srinivasan, I. E. Gienapp, S. S. Stuckman, et al. // *J Immunol.* – 2002. – Vol. 169, no. 4. – P. 2180-2188.
214. NBI-5788, an altered MBP83-99 peptide, induces a T-helper 2-like immune response in multiple sclerosis patients / P. D. Crowe, Y. Qin, P. J. Conlon, et al. // *Ann Neurol.* – 2000. – Vol. 48, no. 5. – P. 758-765.
215. Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. The Altered Peptide Ligand in Relapsing MS Study Group / L. Kappos, G. Comi, H. Panitch, et al. // *Nat Med.* – 2000. – Vol. 6, no. 10. – P. 1176-1182.
216. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand / B. Bielekova, B. Goodwin, N. Richert, et al. // *Nat Med.* – 2000. – Vol. 6, no. 10. – P. 1167-1175.
217. Microbial epitopes act as altered peptide ligands to prevent experimental autoimmune encephalomyelitis / P. J. Ruiz, H. Garren, D. L. Hirschberg, et al. // *J Exp Med.* – 1999. – Vol. 189, no. 8. – P. 1275-1284.
218. Nanoparticle-mediated codelivery of myelin antigen and a tolerogenic small molecule suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis / A. Yeste, M. Nadeau, E. J. Burns, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. – Vol. 109, no. 28. – P. 11270-11275.
219. Rational design and synthesis of altered peptide ligands based on human myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 epitope: inhibition of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in mice / T. Tselios, M. Aggelidakis, A. Tapeinou, et al. // *Molecules.* – 2014. – Vol. 19, no. 11. – P. 17968-17984.
220. An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune encephalomyelitis / L. B. Nicholson, J. M. Greer, R. A. Sobel, et al. // *Immunity.* – 1995. – Vol. 3, no. 4. – P. 397-405.
221. A T cell receptor antagonist peptide induces T cells that mediate bystander suppression and prevent autoimmune encephalomyelitis induced with multiple myelin antigens / L. B. Nicholson, A. Murtaza, B. P. Hafler, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – Vol. 94, no. 17. – P. 9279-9284.
222. IL-4, IL-10, IL-13, and TGF-beta from an altered peptide ligand-specific Th2 cell clone down-regulate adoptive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis / D. A. Young, L. D. Lowe, S. S. Booth, et al. // *J Immunol.* – 2000. – Vol. 164, no. 7. – P. 3563-3572.
223. A single TCR antagonist peptide inhibits experimental allergic encephalomyelitis mediated by a diverse T cell repertoire / V. K. Kuchroo, J. M. Greer, D. Kaul, et al. // *J Immunol.* – 1994. – Vol. 153, no. 7. – P. 3326-3336.

224. T cell receptor antagonist peptides are highly effective inhibitors of experimental allergic encephalomyelitis / A. Franco, S. Southwood, T. Arrhenius, et al. // *Eur J Immunol.* – 1994. – Vol. 24, no. 4. – P. 940-946.
225. A biodegradable nanoparticle platform for the induction of antigen-specific immune tolerance for treatment of autoimmune disease / Z. Hunter, D. P. McCarthy, W. T. Yap, et al. // *ACS Nano.* – 2014. – Vol. 8, no. 3. – P. 2148-2160.
226. Antigen-specific suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by a novel bifunctional peptide inhibitor / N. Kobayashi, H. Kobayashi, L. Gu, et al. // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2007. – Vol. 322, no. 2. – P. 879-886.
227. The functional network of ion channels in T lymphocytes / M. D. Cahalan and K. G. Chandy // *Immunol Rev.* – 2009. – Vol. 231, no. 1. – P. 59-87.
228. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases / C. Beeton, H. Wulff, N. E. Standifer, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103, no. 46. – P. 17414-17419.
229. Kv1.3 channel-blocking immunomodulatory peptides from parasitic worms: implications for autoimmune diseases / S. Chhabra, S. C. Chang, H. M. Nguyen, et al. // *FASEB J.* – 2014. – Vol. 28, no. 9. – P. 3952-3964.
230. Autoimmunity: The worm returns / J. V. Weinstock // *Nature.* – 2012. – Vol. 491, no. 7423. – P. 183-185.
231. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis / J. Correale and M. Farez // *Ann Neurol.* – 2007. – Vol. 61, no. 2. – P. 97-108.
232. A potent and Kv1.3-selective analogue of the scorpion toxin HsTX1 as a potential therapeutic for autoimmune diseases / M. H. Rashid, R. Huq, M. R. Tanner, et al. // *Sci Rep.* – 2014. – Vol. 4, no. – P. 4509.
233. B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic / F. Martin and A. C. Chan // *Annu Rev Immunol.* – 2006. – Vol. 24, no. – P. 467-496.
234. B cell depletion with anti-CD79 mAbs ameliorates autoimmune disease in MRL/lpr mice / Y. Li, F. Chen, M. Putt, et al. // *J Immunol.* – 2008. – Vol. 181, no. 5. – P. 2961-2972.
235. New approaches of B-cell-directed therapy: beyond rituximab / T. Dorner and G. R. Burmester // *Curr Opin Rheumatol.* – 2008. – Vol. 20, no. 3. – P. 263-268.
236. Rituximab in multiple sclerosis: A retrospective observational study on safety and efficacy / J. Salzer, R. Svenningsson, P. Alping, et al. // *Neurology.* – 2016. – Vol. 87, no. 20. – P. 2074-2081.
237. Safety and efficacy of ofatumumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2 study / P. S. Sorensen, S. Lisby, R. Grove, et al. // *Neurology.* – 2014. – Vol. 82, no. 7. – P. 573-581.
238. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial / L. Kappos, D. Li, P. A. Calabresi, et al. // *Lancet.* – 2011. – Vol. 378, no. 9805. – P. 1779-1787.

239. Natalizumab for multiple sclerosis / R. M. Ransohoff // *N Engl J Med.* – 2007. – Vol. 356, no. 25. – P. 2622-2629.
240. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression / T. Matsushita, K. Yanaba, J. D. Bouaziz, et al. // *J Clin Invest.* – 2008. – Vol. 118, no. 10. – P. 3420-3430.
241. Exacerbation of ulcerative colitis after rituximab salvage therapy / M. Goetz, R. Atreya, M. Ghalibafian, et al. // *Inflamm Bowel Dis.* – 2007. – Vol. 13, no. 11. – P. 1365-1368.
242. The development of anti-CD79 monoclonal antibodies for treatment of B-cell neoplastic disease / L. Zhang, R. R. French, H. T. Chan, et al. // *Ther Immunol.* – 1995. – Vol. 2, no. 4. – P. 191-202.
243. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity / I. S. Grewal and R. A. Flavell // *Annu Rev Immunol.* – 1998. – Vol. 16, no. – P. 111-135.
244. Novel opportunities for therapeutic targeting in systemic autoimmune diseases / M. Ouarzane and M. Zouali // *Methods Mol Biol.* – 2007. – Vol. 361, no. – P. 285-297.
245. Updates from B Cell Trials: Efficacy / S. B. Cohen // *J Rheumatol Suppl.* – 2006. – Vol. 77, no. – P. 12-17.
246. Mature myelin basic protein-expressing oligodendrocytes are insensitive to kainate toxicity / P. A. Rosenberg, W. Dai, X. D. Gan, et al. // *J Neurosci Res.* – 2003. – Vol. 71, no. 2. – P. 237-245.
247. MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes / A. Jurewicz, W. E. Biddison and J. P. Antel // *J Immunol.* – 1998. – Vol. 160, no. 6. – P. 3056-3059.
248. Isolation and generation of human dendritic cells / S. Nair, G. E. Archer and T. F. Tedder // *Curr Protoc Immunol.* – 2012. – Vol. Chapter 7, no. – P. Unit7 32.
249. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha / F. Sallusto and A. Lanzavecchia // *J Exp Med.* – 1994. – Vol. 179, no. 4. – P. 1109-1118.
250. Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice. I. Induction of EAE with mouse spinal cord homogenate and myelin basic protein / T. Yasuda, T. Tsumita, Y. Nagai, et al. // *Jpn J Exp Med.* – 1975. – Vol. 45, no. 5. – P. 423-427.
251. IMGT/HighV-QUEST: the IMGT(R) web portal for immunoglobulin (IG) or antibody and T cell receptor (TR) analysis from NGS high throughput and deep sequencing / E. Alamyar, V. Giudicelli, S. Li, et al. // *Immunome Res.* – 2012. – Vol. 8, no. 1. – P. 26.
252. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis / X. Brochet, M. P. Lefranc and V. Giudicelli // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – Vol. 36, no. Web Server issue. – P. W503-508.

253. Strategies for induction of catalytic antibodies toward HIV-1 glycoprotein gp120 in autoimmune prone mice / O. M. Durova, Vorobiev, II, I. V. Smirnov, et al. // *Mol Immunol.* – 2009. – Vol. 47, no. 1. – P. 87-95.
254. Hospitalization and mortality rates from peptic ulcer disease and GI bleeding in the 1990s: relationship to sales of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acid suppression medications / J. D. Lewis, W. B. Bilker, C. Brensinger, et al. // *Am J Gastroenterol.* – 2002. – Vol. 97, no. 10. – P. 2540-2549.
255. E. Harlow and D. Lane (1988). Antibodies : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
256. Множественность форм протеасомы и некоторые подходы к их разделению / Т. М. А. Е.Б.Абрамова, П.А.Ерохов, Н.П.Шарова. // *Известия РАН. Серия биологическая.* – 2004. – Vol. no. 2. – P. 150-156.
257. Preparation of HeLa cell nuclear and cytosolic S100 extracts for in vitro splicing / A. Mayeda and A. R. Krainer // *Methods Mol Biol.* – 1999. – Vol. 118, no. – P. 309-314.
258. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, no. 5259. – P. 680-685.
259. Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis / S. Elsasser, M. Schmidt and D. Finley // *Methods Enzymol.* – 2005. – Vol. 398, no. – P. 353-363.
260. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels / R. A. Reisfeld, U. J. Lewis and D. E. Williams // *Nature.* – 1962. – Vol. 195, no. – P. 281-283.
261. Inorganic supports coated with N-substituted polyacrylamides: application to biospecific chromatography of proteins / A. E. Ivanov, L. V. Kozlov, B. B. Shojbonov, et al. // *Biomed Chromatogr.* – 1991. – Vol. 5, no. 2. – P. 90-93.
262. Effect of chemical modifications of myelin basic protein on its interaction with lipid interfaces and cell fusion ability / C. G. Monferran, B. Maggio and F. A. Cumar // *Mol Cell Biochem.* – 1986. – Vol. 70, no. 2. – P. 131-139.
263. Deimination of myelin basic protein. 1. Effect of deimination of arginyl residues of myelin basic protein on its structure and susceptibility to digestion by cathepsin D / L. B. Pritzker, S. Joshi, J. J. Gowan, et al. // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39, no. 18. – P. 5374-5381.
264. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS) / J. F. Kurtzke // *Neurology.* – 1983. – Vol. 33, no. 11. – P. 1444-1452.
265. Recognition and degradation of myelin basic protein peptides by serum autoantibodies: novel biomarker for multiple sclerosis / A. A. Belogurov, Jr., I. N. Kurkova, A. Friboulet, et al. // *J Immunol.* – 2008. – Vol. 180, no. 2. – P. 1258-1267.
266. Myelin basic protein-reactive autoantibodies in the serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients are characterized by low-affinity interactions / K. C. O'Connor, T. Chitnis, D. E. Griffin, et al. // *J Neuroimmunol.* – 2003. – Vol. 136, no. 1-2. – P. 140-148.

267. Cationic antigens. Problems associated with measurement by ELISA / A. J. Pesce, R. Apple, N. Sawtell, et al. // *J Immunol Methods*. – 1986. – Vol. 87, no. 1. – P. 21-27.
268. Chemical and genetic wrappers for improved phage and RNA display / J. A. Lamboy, P. Y. Tam, L. S. Lee, et al. // *Chembiochem*. – 2008. – Vol. 9, no. 17. – P. 2846-2852.
269. Specificity of recombinant antibodies generated from multiple sclerosis cerebrospinal fluid probed with a random peptide library / X. Yu, D. H. Gilden, A. M. Ritchie, et al. // *J Neuroimmunol*. – 2006. – Vol. 172, no. 1-2. – P. 121-131.
270. B cells and antibodies in MS / M. Reindl, B. Kuenz and T. Berger // *Results Probl Cell Differ*. – 2010. – Vol. 51, no. – P. 99-113.
271. Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of MS patients produce myelin-specific antibodies / H. C. von Budingen, M. D. Harrer, S. Kuenzle, et al. // *Eur J Immunol*. – 2008. – Vol. 38, no. 7. – P. 2014-2023.
272. Modulation of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activity by intrabodies / C. Y. Fang, C. Y. Chiang, Y. R. Pan, et al. // *Intervirology*. – 2007. – Vol. 50, no. 4. – P. 254-263.
273. Viral pathophysiology of multiple sclerosis: A role for Epstein-Barr virus infection? / A. H. Maghzi, M. Marta, I. Bosca, et al. // *Pathophysiology*. – 2011. – Vol. 18, no. 1. – P. 13-20.
274. Epstein-barr virus: environmental trigger of multiple sclerosis? / J. D. Lunemann, T. Kamradt, R. Martin, et al. // *J Virol*. – 2007. – Vol. 81, no. 13. – P. 6777-6784.
275. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis / E. L. Thacker, F. Mirzaei and A. Ascherio // *Ann Neurol*. – 2006. – Vol. 59, no. 3. – P. 499-503.
276. A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis / S. Haahr, A. M. Plesner, B. F. Vestergaard, et al. // *Acta Neurol Scand*. – 2004. – Vol. 109, no. 4. – P. 270-275.
277. Cross-reactivity of autoreactive T cells with MBP and viral antigens in patients with MS / W. Cheng, Y. Ma, F. Gong, et al. // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2012. – Vol. 17, no. – P. 1648-1658.
278. Differential induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by myelin basic protein molecular mimics in mice humanized for HLA-DR2 and an MBP(85-99)-specific T cell receptor / M. T. Greene, A. M. Ercolini, M. DeGutes, et al. // *J Autoimmun*. – 2008. – Vol. 31, no. 4. – P. 399-407.
279. Identification of a second mimicry epitope from *Acanthamoeba castellanii* that induces CNS autoimmunity by generating cross-reactive T cells for MBP 89-101 in SJL mice / C. Massilamany, O. A. Asojo, A. Gangaplara, et al. // *Int Immunol*. – 2011. – Vol. 23, no. 12. – P. 729-739.
280. Complete haplotype sequence of the human immunoglobulin heavy-chain variable, diversity, and joining genes and characterization of allelic and copy-number variation / C. T. Watson, K. M. Steinberg, J. Huddleston, et al. // *Am J Hum Genet*. – 2013. – Vol. 92, no. 4. – P. 530-546.
281. Individual variation in the germline Ig gene repertoire inferred from variable region gene rearrangements / S. D. Boyd, B. A. Gaeta, K. J. Jackson, et al. // *J Immunol*. – 2010. – Vol. 184, no. 12. – P. 6986-6992.

282. Peptide reactivity between multiple sclerosis (MS) CSF IgG and recombinant antibodies generated from clonally expanded plasma cells in MS CSF / X. Yu, D. Gilden, L. Chambers, et al. // *J Neuroimmunol.* – 2010. – Vol. no. – P.
283. Antibodies to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and controls / B. G. Xiao, C. Linington and H. Link // *J Neuroimmunol.* – 1991. – Vol. 31, no. 2. – P. 91-96.
284. Axon reactive B cells clonally expanded in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis / Y. Zhang, R. R. Da, W. Guo, et al. // *J Clin Immunol.* – 2005. – Vol. 25, no. 3. – P. 254-264.
285. Antigen specificity of clonally expanded and receptor edited cerebrospinal fluid B cells from patients with relapsing remitting MS / D. Lambracht-Washington, K. C. O'Connor, E. M. Cameron, et al. // *J Neuroimmunol.* – 2007. – Vol. 186, no. 1-2. – P. 164-176.
286. No evidence for intrathecal IgG synthesis to Epstein Barr virus nuclear antigen-1 in multiple sclerosis / N. Jafari, G. P. van Nierop, G. M. Verjans, et al. // *J Clin Virol.* – 2010. – Vol. 49, no. 1. – P. 26-31.
287. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration / S. L. Hauser and J. R. Oksenberg // *Neuron.* – 2006. – Vol. 52, no. 1. – P. 61-76.
288. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection / A. Ascherio and K. L. Munger // *Ann Neurol.* – 2007. – Vol. 61, no. 4. – P. 288-299.
289. Increased tendency to spontaneous in-vitro lymphocyte transformation in clinically active multiple sclerosis / K. B. Fraser, M. Haire, J. H. Millar, et al. // *Lancet.* – 1979. – Vol. 2, no. 8145. – P. 175-176.
290. Epstein-Barr virus antibodies in multiple sclerosis / C. V. Sumaya, L. W. Myers and G. W. Ellison // *Arch Neurol.* – 1980. – Vol. 37, no. 2. – P. 94-96.
291. Epstein-Barr virus neutralizing and early antigen antibodies in multiple sclerosis / J. W. Lindsey, L. M. Hatfield and T. Vu // *Eur J Neurol.* – 2010. – Vol. 17, no. 10. – P. 1263-1269.
292. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis / L. I. Levin, K. L. Munger, E. J. O'Reilly, et al. // *Ann Neurol.* – 2010. – Vol. 67, no. 6. – P. 824-830.
293. Immunology of multiple sclerosis / M. P. Pender and J. M. Greer // *Curr Allergy Asthma Rep.* – 2007. – Vol. 7, no. 4. – P. 285-292.
294. Epstein-Barr virus antibodies in serum and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis, chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy and amyotrophic lateral sclerosis / V. Nociti, G. Frisullo, A. Marti, et al. // *J Neuroimmunol.* – 2010. – Vol. 225, no. 1-2. – P. 149-152.
295. Intrathecal immune responses to EBV in early MS / E. Jaquierey, S. Jilek, M. Schlupey, et al. // *Eur J Immunol.* – 2010. – Vol. 40, no. 3. – P. 878-887.
296. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain / B. Serafini, B. Rosicarelli, D. Franciotta, et al. // *J Exp Med.* – 2007. – Vol. 204, no. 12. – P. 2899-2912.

297. EBV in MS: guilty by association? / J. D. Lunemann and C. Munz // *Trends Immunol.* – 2009. – Vol. 30, no. 6. – P. 243-248.
298. Humoral immune response to EBV in multiple sclerosis is associated with disease activity on MRI / R. A. Farrell, D. Antony, G. R. Wall, et al. // *Neurology.* – 2009. – Vol. 73, no. 1. – P. 32-38.
299. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis / S. Cepok, D. Zhou, R. Srivastava, et al. // *J Clin Invest.* – 2005. – Vol. 115, no. 5. – P. 1352-1360.
300. Preventing and curing multiple sclerosis by controlling Epstein-Barr virus infection / M. P. Pender // *Autoimmun Rev.* – 2009. – Vol. 8, no. 7. – P. 563-568.
301. What role for genetics in the prediction of multiple sclerosis? / S. Sawcer, M. Ban, J. Wason, et al. // *Ann Neurol.* – 2010. – Vol. 67, no. 1. – P. 3-10.
302. Antibody responses to Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 (LMP1) and expression of LMP1 in juvenile Hodgkin's disease / P. Meij, M. B. Vervoort, E. Bloemena, et al. // *J Med Virol.* – 2002. – Vol. 68, no. 3. – P. 370-377.
303. Identification and prevalence of CD8(+) T-cell responses directed against Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 and latent membrane protein 2 / P. Meij, A. Leen, A. B. Rickinson, et al. // *Int J Cancer.* – 2002. – Vol. 99, no. 1. – P. 93-99.
304. Peripheral B cells latently infected with Epstein-Barr virus display molecular hallmarks of classical antigen-selected memory B cells / T. A. Souza, B. D. Stollar, J. L. Sullivan, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – Vol. 102, no. 50. – P. 18093-18098.
305. Restricted low-level human antibody responses against Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 1 in a subgroup of patients with EBV-associated diseases / P. Meij, M. B. Vervoort, J. Aarbiou, et al. // *J Infect Dis.* – 1999. – Vol. 179, no. 5. – P. 1108-1115.
306. Acyclovir treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. A randomized, placebo-controlled, double-blind study / J. Lycke, B. Svennerholm, E. Hjelmquist, et al. // *J Neurol.* – 1996. – Vol. 243, no. 3. – P. 214-224.
307. Cross-neutralization of influenza A viruses mediated by a single antibody loop / D. C. Ekiert, A. K. Kashyap, J. Steel, et al. // *Nature.* – 2012. – Vol. 489, no. 7417. – P. 526-532.
308. Multiple sclerosis: autoimmunity and viruses / M. F. Cusick, J. E. Libbey and R. S. Fujinami // *Curr Opin Rheumatol.* – 2013. – Vol. 25, no. 4. – P. 496-501.
309. Cross-reactivity between peptide mimics of the immunodominant myelin proteolipid protein epitope PLP139-151: comparison of peptide priming in CFA vs. viral delivery / A. M. Ercolini, J. Ludovic Croxford, M. Degutes, et al. // *J Neuroimmunol.* – 2007. – Vol. 186, no. 1-2. – P. 5-18.
310. Cross-reactivity of myelin basic protein-specific T cells with multiple microbial peptides: experimental autoimmune encephalomyelitis induction in TCR transgenic mice / J. L. Grogan, A. Kramer, A. Nogai, et al. // *J Immunol.* – 1999. – Vol. 163, no. 7. – P. 3764-3770.

311. Oligoclonal bands in multiple sclerosis reactive against two herpesviruses and association with magnetic resonance imaging findings / J. Virtanen, J. Wohler, K. Fenton, et al. // *Mult Scler.* – 2013. – Vol. no. – P.
312. B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis / H. C. von Budingen, T. C. Kuo, M. Sirota, et al. // *J Clin Invest.* – 2012. – Vol. 122, no. 12. – P. 4533-4543.
313. Deimination of human myelin basic protein by a peptidylarginine deiminase from bovine brain / J. W. Lamensa and M. A. Moscarello // *J Neurochem.* – 1993. – Vol. 61, no. 3. – P. 987-996.
314. Acute multiple sclerosis (Marburg type) is associated with developmentally immature myelin basic protein / D. D. Wood, J. M. Bilbao, P. O'Connors, et al. // *Ann Neurol.* – 1996. – Vol. 40, no. 1. – P. 18-24.
315. Thermodynamic analysis of the disorder-to-alpha-helical transition of 18.5-kDa myelin basic protein reveals an equilibrium intermediate representing the most compact conformation / K. A. Vassall, A. D. Jenkins, V. V. Bamm, et al. // *J Mol Biol.* – 2015. – Vol. 427, no. 10. – P. 1977-1992.
316. Is myelin basic protein crystallizable? / J. Sedzik and D. A. Kirschner // *Neurochem Res.* – 1992. – Vol. 17, no. 2. – P. 157-166.
317. Sequence of EMB-1, an mRNA accumulating specifically in embryos of carrot / T. U. Ulrich, E. S. Wurtele and B. J. Nikolau // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – Vol. 18, no. 9. – P. 2826.
318. Evolution of proteomes: fundamental signatures and global trends in amino acid compositions / F. Tekaia and E. Yeramian // *BMC Genomics.* – 2006. – Vol. 7, no. – P. 307.
319. Localization of the proteasomal ubiquitin receptors Rpn10 and Rpn13 by electron cryomicroscopy / E. Sakata, S. Bohn, O. Mihalache, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. – Vol. 109, no. 5. – P. 1479-1484.
320. Assembly pathway of the Mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones / T. Kaneko, J. Hamazaki, S. Iemura, et al. // *Cell.* – 2009. – Vol. 137, no. 5. – P. 914-925.
321. Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha) / J. R. Knowlton, S. C. Johnston, F. G. Whitby, et al. // *Nature.* – 1997. – Vol. 390, no. 6660. – P. 639-643.
322. Developmental regulation of myelin basic protein in dispersed cultures / E. Barbarese and S. E. Pfeiffer // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1981. – Vol. 78, no. 3. – P. 1953-1957.
323. Migrating oligodendrocyte progenitor cells swell prior to soma dislocation / P. Happel, K. Moller, N. K. Schwering, et al. // *Sci Rep.* – 2013. – Vol. 3, no. – P. 1806.
324. Myelin membrane assembly is driven by a phase transition of myelin basic proteins into a cohesive protein meshwork / S. Aggarwal, N. Snaidero, G. Pahler, et al. // *PLoS Biol.* – 2013. – Vol. 11, no. 6. – P. e1001577.
325. Increased levels of myelin basic protein transcripts in virus-induced demyelination / K. Kristensson, K. V. Holmes, C. S. Duchala, et al. // *Nature.* – 1986. – Vol. 322, no. 6079. – P. 544-547.

326. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis / E. S. Huseby, D. Liggitt, T. Brabb, et al. // *J Exp Med.* – 2001. – Vol. 194, no. 5. – P. 669-676.
327. Multiple sclerosis: an important role for post-translational modifications of myelin basic protein in pathogenesis / J. K. Kim, F. G. Mastronardi, D. D. Wood, et al. // *Mol Cell Proteomics.* – 2003. – Vol. 2, no. 7. – P. 453-462.
328. Differences in susceptibility of MBP charge isomers to digestion by stromelysin-1 (MMP-3) and release of an immunodominant epitope / C. A. D'Souza and M. A. Moscarello // *Neurochem Res.* – 2006. – Vol. 31, no. 8. – P. 1045-1054.
329. Peptidylarginine deiminase 2 (PAD2) overexpression in transgenic mice leads to myelin loss in the central nervous system / A. A. Musse, Z. Li, C. A. Ackerley, et al. // *Dis Model Mech.* – 2008. – Vol. 1, no. 4-5. – P. 229-240.
330. Thermodynamics of Ion Pair Formations Between Charged Poly(Amino Acid)s / V. Petrauskas, E. Maximowitsch and D. Matulis // *J Phys Chem B.* – 2015. – Vol. 119, no. 37. – P. 12164-12171.
331. Substrate selection by the proteasome during degradation of protein complexes / S. Prakash, T. Inobe, A. J. Hatch, et al. // *Nat Chem Biol.* – 2009. – Vol. 5, no. 1. – P. 29-36.
332. Defining the geometry of the two-component proteasome degron / T. Inobe, S. Fishbain, S. Prakash, et al. // *Nat Chem Biol.* – 2011. – Vol. 7, no. 3. – P. 161-167.
333. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal / J. S. Thrower, L. Hoffman, M. Rechsteiner, et al. // *EMBO J.* – 2000. – Vol. 19, no. 1. – P. 94-102.
334. Together, Rpn10 and Dsk2 can serve as a polyubiquitin chain-length sensor / D. Zhang, T. Chen, I. Ziv, et al. // *Mol Cell.* – 2009. – Vol. 36, no. 6. – P. 1018-1033.
335. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor / K. Husnjak, S. Elsasser, N. Zhang, et al. // *Nature.* – 2008. – Vol. 453, no. 7194. – P. 481-488.
336. Rpn1 provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome / Y. Shi, X. Chen, S. Elsasser, et al. // *Science.* – 2016. – Vol. 351, no. 6275. – P.
337. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome / M. H. Glickman, D. M. Rubin, V. A. Fried, et al. // *Mol Cell Biol.* – 1998. – Vol. 18, no. 6. – P. 3149-3162.
338. The inhibition mechanism of human 20S proteasomes enables next-generation inhibitor design / J. Schrader, F. Henneberg, R. A. Mata, et al. // *Science.* – 2016. – Vol. 353, no. 6299. – P. 594-598.
339. The active transport of myelin basic protein into the nucleus suggests a regulatory role in myelination / L. Pedraza, L. Fidler, S. M. Staugaitis, et al. // *Neuron.* – 1997. – Vol. 18, no. 4. – P. 579-589.
340. Nucleus-localized 21.5-kDa myelin basic protein promotes oligodendrocyte proliferation and enhances neurite outgrowth in coculture, unlike the plasma membrane-associated 18.5-kDa isoform / G. S. Smith, B. Samborska, S. P. Hawley, et al. // *J Neurosci Res.* – 2013. – Vol. 91, no. 3. – P. 349-362.

341. Deciphering preferential interactions within supramolecular protein complexes: the proteasome case / B. Fabre, T. Lambour, L. Garrigues, et al. // *Mol Syst Biol.* – 2015. – Vol. 11, no. 1. – P. 771.
342. A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation / M. Groettrup, A. Soza, M. Eggers, et al. // *Nature.* – 1996. – Vol. 381, no. 6578. – P. 166-168.
343. Immuno- and constitutive proteasomes do not differ in their abilities to degrade ubiquitinated proteins / J. A. Nathan, V. Spinnenhirn, G. Schmidtke, et al. // *Cell.* – 2013. – Vol. 152, no. 5. – P. 1184-1194.
344. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress / U. Seifert, L. P. Bialy, F. Ebstein, et al. // *Cell.* – 2010. – Vol. 142, no. 4. – P. 613-624.
345. Enhanced rate of degradation of basic proteins by 26S immunoproteasomes / M. Raule, F. Cerruti and P. Cascio // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – Vol. 1843, no. 9. – P. 1942-1947.
346. Immunoproteasome enhances intracellular proteolysis of myelin basic protein / E. S. Kuzina, E. L. Chernolovskaya, A. A. Kudriaeva, et al. // *Dokl Biochem Biophys.* – 2013. – Vol. 453, no. – P. 300-303.
347. Polyamines directly promote antizyme-mediated degradation of ornithine decarboxylase by the proteasome / R. Beenukumar, D. Goedderz, R. Palanimurugan, et al. // *Microbial Cell.* – 2015. – Vol. 2, no. 6. – P. 197-207.
348. The majority of infiltrating CD8+ T cells in the central nervous system of susceptible SJL/J mice infected with Theiler's virus are virus specific and fully functional / B. S. Kang, M. A. Lyman and B. S. Kim // *J Virol.* – 2002. – Vol. 76, no. 13. – P. 6577-6585.
349. Structural principles that govern the peptide-binding motifs of class I MHC molecules / C. Zhang, A. Anderson and C. DeLisi // *J Mol Biol.* – 1998. – Vol. 281, no. 5. – P. 929-947.
350. Structural studies of class I major histocompatibility complex proteins: insights into antigen presentation / A. C. Young, S. G. Nathenson and J. C. Sacchettini // *FASEB J.* – 1995. – Vol. 9, no. 1. – P. 26-36.
351. Altered properties of the branched chain amino acid-preferring activity contribute to increased cleavages after branched chain residues by the "immunoproteasome" / C. Cardozo and R. A. Kohanski // *J Biol Chem.* – 1998. – Vol. 273, no. 27. – P. 16764-16770.
352. Inactivation of a defined active site in the mouse 20S proteasome complex enhances major histocompatibility complex class I antigen presentation of a murine cytomegalovirus protein / G. Schmidtke, M. Eggers, T. Ruppert, et al. // *J Exp Med.* – 1998. – Vol. 187, no. 10. – P. 1641-1646.
353. Inhibitor-binding mode of homobelactosin C to proteasomes: new insights into class I MHC ligand generation / M. Groll, O. V. Larionov, R. Huber, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103, no. 12. – P. 4576-4579.
354. Why the structure but not the activity of the immunoproteasome subunit low molecular mass polypeptide 2 rescues antigen presentation / M. Basler, C. Lauer, J. Moebius, et al. // *J Immunol.* – 2012. – Vol. 189, no. 4. – P. 1868-1877.

355. Immunoproteasome LMP2 60HH variant alters MBP epitope generation and reduces the risk to develop multiple sclerosis in Italian female population / M. Mishto, E. Bellavista, C. Ligorio, et al. // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5, no. 2. – P. e9287.
356. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system / L. Steinman // *Cell*. – 1996. – Vol. 85, no. 3. – P. 299-302.
357. Changes in 20S subunit composition are largely responsible for altered proteasomal activities in experimental autoimmune encephalomyelitis / J. Zheng, A. Dasgupta and O. A. Bizzozero // *J Neurochem*. – 2012. – Vol. 121, no. 3. – P. 486-494.
358. Myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced experimental allergic encephalomyelitis and T cell responses are unaffected by immunoproteasome deficiency / R. F. Frausto, S. J. Crocker, B. Eam, et al. // *J Neuroimmunol*. – 2007. – Vol. 192, no. 1-2. – P. 124-133.
359. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? / M. Groettrup, C. J. Kirk and M. Basler // *Nat Rev Immunol*. – 2010. – Vol. 10, no. 1. – P. 73-78.
360. T cells lacking immunoproteasome subunits MECL-1 and LMP7 hyperproliferate in response to polyclonal mitogens / C. M. Caudill, K. Jayarapu, L. Elenich, et al. // *J Immunol*. – 2006. – Vol. 176, no. 7. – P. 4075-4082.
361. Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice / L. Van Kaer, P. G. Ashton-Rickardt, M. Eichelberger, et al. // *Immunity*. – 1994. – Vol. 1, no. 7. – P. 533-541.
362. Immunoproteasomes are essential for survival and expansion of T cells in virus-infected mice / J. Moebius, M. van den Broek, M. Groettrup, et al. // *Eur J Immunol*. – 2010. – Vol. 40, no. 12. – P. 3439-3449.
363. Unexpected role for the immunoproteasome subunit LMP2 in antiviral humoral and innate immune responses / S. E. Hensley, D. Zanker, B. P. Dolan, et al. // *J Immunol*. – 2010. – Vol. 184, no. 8. – P. 4115-4122.
364. Blood CD8+ T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals / L. Berthelot, D. A. Laplaud, S. Pettre, et al. // *Eur J Immunol*. – 2008. – Vol. 38, no. 7. – P. 1889-1899.
365. Naturally presented peptides on major histocompatibility complex I and II molecules eluted from central nervous system of multiple sclerosis patients / N. Fissolo, S. Haag, K. L. de Graaf, et al. // *Mol Cell Proteomics*. – 2009. – Vol. 8, no. 9. – P. 2090-2101.
366. Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules / B. Guillaume, J. Chapiro, V. Stroobant, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2010. – Vol. 107, no. 43. – P. 18599-18604.
367. Oligodendrocytes enforce immune tolerance of the uninfected brain by purging the peripheral repertoire of autoreactive CD8+ T cells / S. Y. Na, A. Hermann, M. Sanchez-Ruiz, et al. // *Immunity*. – 2012. – Vol. 37, no. 1. – P. 134-146.

368. Naive CD8 T-cells initiate spontaneous autoimmunity to a sequestered model antigen of the central nervous system / S. Y. Na, Y. Cao, C. Toben, et al. // *Brain*. – 2008. – Vol. 131, no. Pt 9. – P. 2353-2365.
369. An attempt to understand kidney's protein handling function by comparing plasma and urine proteomes / L. Jia, L. Zhang, C. Shao, et al. // *PLoS One*. – 2009. – Vol. 4, no. 4. – P. e5146.
370. Specific depletion of autoreactive B lymphocytes by a recombinant fusion protein in vitro and in vivo / M. Zocher, P. A. Baeuerle, T. Dreier, et al. // *Int Immunol*. – 2003. – Vol. 15, no. 7. – P. 789-796.
371. Depletion of autoreactive B-lymphocytes by a recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein-based immunotoxin / T. Nachreiner, F. Kampmeier, T. Thepen, et al. // *J Neuroimmunol*. – 2008. – Vol. 195, no. 1-2. – P. 28-35.
372. A novel antigen-toxin chimeric protein: myelin basic protein-pseudomonas exotoxin (MBP-PE 40) for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis / T. Brenner, I. Steinberger, D. Soffer, et al. // *Immunol Lett*. – 1999. – Vol. 68, no. 2-3. – P. 403-410.
373. Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells / E. Edelweiss, T. G. Balandin, J. L. Ivanova, et al. // *PLoS One*. – 2008. – Vol. 3, no. 6. – P. e2434.
374. Methods for studying the interaction of barnase with its inhibitor barstar / G. Schreiber // *Methods Mol Biol*. – 2001. – Vol. 160, no. – P. 213-226.
375. An evolved ribosome-inactivating protein targets and kills human melanoma cells in vitro and in vivo / M. C. Cheung, L. Revers, S. Perampalam, et al. // *Mol Cancer*. – 2010. – Vol. 9, no. – P. 28.
376. Immunotoxins for targeted cancer therapy / R. J. Kreitman // *AAPS J*. – 2006. – Vol. 8, no. 3. – P. E532-551.
377. Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging / N. Engedal, T. Skotland, M. L. Torgersen, et al. // *Microb Biotechnol*. – 2010. – Vol. 4, no. 1. – P. 32-46.
378. Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation / P. Wentworth, Jr., J. E. McDunn, A. D. Wentworth, et al. // *Science*. – 2002. – Vol. 298, no. 5601. – P. 2195-2199.
379. Therapeutic approaches in multiple sclerosis: lessons from failed and interrupted treatment trials / H. Wiendl and R. Hohlfeld // *BioDrugs*. – 2002. – Vol. 16, no. 3. – P. 183-200.
380. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by the encephalitogenic peptide, in solution or bound to liposomes / K. Avrilionis and J. M. Boggs // *J Neuroimmunol*. – 1991. – Vol. 35, no. 1-3. – P. 201-210.
381. Mannose receptor-targeted vaccines / T. Keler, V. Ramakrishna and M. W. Fanger // *Expert Opin Biol Ther*. – 2004. – Vol. 4, no. 12. – P. 1953-1962.
382. Mannosylated PLP(139-151) induces peptide-specific tolerance to experimental autoimmune encephalomyelitis / M. E. Luca, J. M. Kel, W. van Rijs, et al. // *J Neuroimmunol*. – 2005. – Vol. 160, no. 1-2. – P. 178-187.

383. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells / A. J. Engering, M. Cella, D. Fluitsma, et al. // *Eur J Immunol.* – 1997. – Vol. 27, no. 9. – P. 2417-2425.
384. Get into the groove! Targeting antigens to MHC class II / J. van Bergen, F. Ossendorp, R. Jordens, et al. // *Immunol Rev.* – 1999. – Vol. 172, no. – P. 87-96.
385. Cationic liposomes target sites of acute neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis / G. Cavaletti, A. Casseti, A. Canta, et al. // *Mol Pharm.* – 2009. – Vol. 6, no. 5. – P. 1363-1370.
386. Cytokine gene therapy in experimental allergic encephalomyelitis by injection of plasmid DNA-cationic liposome complex into the central nervous system / J. L. Croxford, K. Triantaphyllopoulos, O. L. Podhajcer, et al. // *J Immunol.* – 1998. – Vol. 160, no. 10. – P. 5181-5187.
387. Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? / M. A. Friese and L. Fugger // *Brain.* – 2005. – Vol. 128, no. Pt 8. – P. 1747-1763.
388. CD4 and CD8 lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid and peripheral blood from patients with multiple sclerosis, meningitis and normal controls / M. Vrethem, C. Dahle, C. Ekerfelt, et al. // *Acta Neurol Scand.* – 1998. – Vol. 97, no. 4. – P. 215-220.
389. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance / M. Swiecki and M. Colonna // *Immunol Rev.* – Vol. 234, no. 1. – P. 142-162.
390. Role of natural interferon-alpha producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in autoimmunity / L. Ronnblom, M. L. Eloranta and G. V. Alm // *Autoimmunity.* – 2003. – Vol. 36, no. 8. – P. 463-472.
391. Identifying the cells breaching self-tolerance in autoimmunity / R. A. Benson, A. Patakas, P. Conigliaro, et al. // *J Immunol.* – 2010. – Vol. 184, no. 11. – P. 6378-6385.
392. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by the oral administration of myelin basic protein / D. M. Bitar and C. C. Whitacre // *Cell Immunol.* – 1988. – Vol. 112, no. 2. – P. 364-370.
393. Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein / S. Brocke, K. Gijbels, M. Allegretta, et al. // *Nature.* – 1996. – Vol. 379, no. 6563. – P. 343-346.
394. Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis / R. Aharoni, D. Teitelbaum, M. Sela, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – Vol. 94, no. 20. – P. 10821-10826.
395. Glatiramer acetate reduces Th-17 inflammation and induces regulatory T-cells in the CNS of mice with relapsing-remitting or chronic EAE / R. Aharoni, R. Eilam, A. Stock, et al. // *J Neuroimmunol.* – 2010. – Vol. 225, no. 1-2. – P. 100-111.
396. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells / T. Korn, M. Mitsdoerffer, A. L. Croxford, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – Vol. 105, no. 47. – P. 18460-18465.

397. In active relapsing-remitting multiple sclerosis, effector T cell resistance to adaptive T(regs) involves IL-6-mediated signaling / A. Schneider, S. A. Long, K. Cerosaletti, et al. // *Sci Transl Med.* – 2013. – Vol. 5, no. 170. – P. 170ra115.
398. Enrichment of Foxp3+ CD4 regulatory T cells in migrated T cells to IL-6- and IL-8-expressing tumors through predominant induction of CXCR1 by IL-6 / S. Eikawa, Y. Ohue, K. Kitaoka, et al. // *J Immunol.* – 2010. – Vol. 185, no. 11. – P. 6734-6740.
399. Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: clarification on DC heterogeneity / P. Autissier, C. Soulas, T. H. Burdo, et al. // *J Immunol Methods.* – Vol. 360, no. 1-2. – P. 119-128.
400. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon / M. Cella, D. Jarrossay, F. Facchetti, et al. // *Nat Med.* – 1999. – Vol. 5, no. 8. – P. 919-923.
401. Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity / K. McKenna, A. S. Beignon and N. Bhardwaj // *J Virol.* – 2005. – Vol. 79, no. 1. – P. 17-27.
402. T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination / S. Zamvil, P. Nelson, J. Trotter, et al. // *Nature.* – 1985. – Vol. 317, no. 6035. – P. 355-358.
403. Plasmacytoid dendritic cells and immunotherapy in multiple sclerosis / F. von Glehn, L. M. Santos and K. E. Balashov // *Immunotherapy.* – Vol. 4, no. 10. – P. 1053-1061.
404. Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions / P. Van Der Voorn, J. Tekstra, R. H. Beelen, et al. // *Am J Pathol.* – 1999. – Vol. 154, no. 1. – P. 45-51.
405. Plasma biomarkers discriminate clinical forms of multiple sclerosis / M. Tejera-Alhambra, A. Casrouge, C. de Andres, et al. // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, no. 6. – P. e0128952.
406. Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis / T. Matsushita, T. Tateishi, N. Isobe, et al. // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, no. 4. – P. e61835.
407. Chemokine receptors: signposts to brain development and disease / P. B. Tran and R. J. Miller // *Nat Rev Neurosci.* – 2003. – Vol. 4, no. 6. – P. 444-455.
408. IFN-beta inhibits T cells accumulation in the central nervous system by reducing the expression and activity of chemokines in experimental autoimmune encephalomyelitis / W. Cheng, Q. Zhao, Y. Xi, et al. // *Mol Immunol.* – 2015. – Vol. 64, no. 1. – P. 152-162.
409. Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis / D. Mahad, M. K. Callahan, K. A. Williams, et al. // *Brain.* – 2006. – Vol. 129, no. Pt 1. – P. 212-223.
410. Recombinant interleukin 7, pre-B cell growth factor, has costimulatory activity on purified mature T cells / P. J. Morrissey, R. G. Goodwin, R. P. Nordan, et al. // *J Exp Med.* – 1989. – Vol. 169, no. 3. – P. 707-716.

411. Cutting edge: Identification of a hybrid cytokine consisting of IL-7 and the beta-chain of the hepatocyte growth factor/scatter factor / L. Lai and I. Goldschneider // *J Immunol.* – 2001. – Vol. 167, no. 7. – P. 3550-3554.
412. IL-7 promotes T(H)1 development and serum IL-7 predicts clinical response to interferon-beta in multiple sclerosis / L. F. Lee, R. Axtell, G. H. Tu, et al. // *Sci Transl Med.* – 2011. – Vol. 3, no. 93. – P. 93ra68.
413. Optic neuritis associated with adalimumab in the treatment of uveitis / S. Y. Li, A. D. Birnbaum and D. A. Goldstein // *Ocul Immunol Inflamm.* – 2010. – Vol. 18, no. 6. – P. 475-481.
414. Recombinant IL-6 treatment protects mice from organ specific autoimmune disease by IL-6 classical signalling-dependent IL-1ra induction / U. K. Samavedam, K. Kalies, J. Scheller, et al. // *J Autoimmun.* – 2013. – Vol. 40, no. – P. 74-85.
415. Elevated serum levels of IFN-gamma, IL-4 and TNF-alpha/unelevated serum levels of IL-10 in patients with demyelinating diseases during the acute stage / K. Hohnoki, A. Inoue and C. S. Koh // *J Neuroimmunol.* – 1998. – Vol. 87, no. 1-2. – P. 27-32.
416. Differential induction of IgE-mediated anaphylaxis after soluble vs. cell-bound tolerogenic peptide therapy of autoimmune encephalomyelitis / C. E. Smith, T. N. Eagar, J. L. Strominger, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – Vol. 102, no. 27. – P. 9595-9600.
417. An unexpected version of horror autotoxicus: anaphylactic shock to a self-peptide / R. Pedotti, D. Mitchell, J. Wedemeyer, et al. // *Nat Immunol.* – 2001. – Vol. 2, no. 3. – P. 216-222.
418. Antigen-specific tolerance strategies for the prevention and treatment of autoimmune disease / S. D. Miller, D. M. Turley and J. R. Podojil // *Nat Rev Immunol.* – 2007. – Vol. 7, no. 9. – P. 665-677.
419. Antigen-specific immunotherapy of autoimmune and allergic diseases / C. A. Sabatos-Peyton, J. Verhagen and D. C. Wraith // *Curr Opin Immunol.* – 2010. – Vol. 22, no. 5. – P. 609-615.
420. Therapeutic applications of nanomedicine in autoimmune diseases: from immunosuppression to tolerance induction / M. Gharagozloo, S. Majewski and M. Foldvari // *Nanomedicine.* – 2015. – Vol. 11, no. 4. – P. 1003-1018.
421. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules / K. L. Rock, C. Gramm, L. Rothstein, et al. // *Cell.* – 1994. – Vol. 78, no. 5. – P. 761-771.
422. Characterization of peptidyl boronic acid inhibitors of mammalian 20 S and 26 S proteasomes and their inhibition of proteasomes in cultured cells / R. C. Gardner, S. J. Assinder, G. Christie, et al. // *Biochem J.* – 2000. – Vol. 346 Pt 2, no. – P. 447-454.
423. Peptide reactivity between multiple sclerosis (MS) CSF IgG and recombinant antibodies generated from clonally expanded plasma cells in MS CSF / X. Yu, D. Gilden, L. Schambers, et al. // *J Neuroimmunol.* – 2011. – Vol. 233, no. 1-2. – P. 192-203.
424. Viruses and multiple sclerosis / G. P. Owens, D. Gilden, M. P. Burgoon, et al. // *Neuroscientist.* – 2011. – Vol. 17, no. 6. – P. 659-676.

425. Autoantigen discovery with a synthetic human peptidome / H. B. Larman, Z. Zhao, U. Laserson, et al. // *Nat Biotechnol.* – 2011. – Vol. 29, no. 6. – P. 535-541.
426. PhIP-Seq characterization of autoantibodies from patients with multiple sclerosis, type 1 diabetes and rheumatoid arthritis / H. B. Larman, U. Laserson, L. Querol, et al. // *J Autoimmun.* – 2013. – Vol. 43, no. – P. 1-9.
427. Therapeutic targets and recent advances in protein immunotoxins / J. Madhumathi and R. S. Verma // *Curr Opin Microbiol.* – 2012. – Vol. 15, no. 3. – P. 300-309.
428. Pivotal phase III trial of two dose levels of denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma / E. Olsen, M. Duvic, A. Frankel, et al. // *J Clin Oncol.* – 2001. – Vol. 19, no. 2. – P. 376-388.