

На правах рукописи

Мамедов Азад Энверович

Молекулярный механизм взаимодействия фрагментов основного белка  
миелина с главным комплексом гистосовместимости II класса человека

Специальность 03.01.03 - Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2020

Работа выполнена в лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

**Научный руководитель:**

**академик РАН, профессор, д.х.н. Габибов Александр Габибович**, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), заведующий лабораторией биокатализа ИБХ РАН.

**Официальные оппоненты:**

**чл.-корр. РАН, профессор, д.б.н. Лагарькова Мария Андреевна**, заведующая лабораторией клеточной биологии Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства.

**к.б.н. Ефимов Григорий Александрович**, заведующий лабораторией трансплантационной иммунологии «Национального медицинского исследовательского центра гематологии» Минздрава России.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Защита диссертации состоится 10.06.2020 г. в 10:00 на заседании Диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2020 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



д.ф.-м.н. В.А. Олейников

## АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

На сегодняшний день известно почти 100 заболеваний человека с аутоиммунной этиологией, и ожидается, что этот список будет расти в ближайшие десятилетия. Аутоиммунные заболевания представляют собой одну из самых серьезных глобальных угроз для здоровья человека в 21 веке и могут вскоре обойти проблему злокачественной трансформации. Заболеваемость различными аутоиммунными нарушениями варьирует во всем мире, но в совокупности поражает около 5% населения. Рассеянный склероз (РС) является одним из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний нейродегенеративного характера. По приблизительным оценкам, от 2 до 2,5 миллионов человек во всем мире страдают этим заболеванием. РС, как и другие аутоиммунные патологии, представляет собой серьезную клиническую проблему из-за хронического характера заболевания и связанных с этим затрат на поддерживающую терапию. Заболевание поражает молодых людей в пиковый период их трудовой деятельности и способности к репродуктивной функции. Неотъемлемой характеристикой аутоиммунитета является иммунологическая атака на собственные ткани. Триггерный механизм запуска иммунной системы для создания специфического ответа против аутоантигенов, в значительной степени до сих пор неизвестен. В патогенезе РС было продемонстрировано значение как экологических, так и генетических факторов, особенно генотипа HLA.

Исследования геномных ассоциаций выявили тот факт, что регион HLA класса II оказывает наиболее сильное генетическое влияние на риск развития РС. Вместе с тем механизм, обуславливающий связь конкретных типов HLA с развитием РС, остается непознанным. Поскольку аллели *HLA-DRB1* обладают различной структурной особенностью, обеспечивающей способность к презентации антигена в зависимости от их аминокислотной последовательности, ассоциация MHC II с РС была использована для подтверждения концепции о связи патогенеза заболевания с аутоиммунной реакцией против миелин-родственных антигенов в контексте аллеля *HLA-DRB1*. Однако молекулярные механизмы, с помощью которых полиморфизм последовательности MHC II влияет на предрасположенность к тому или иному аутоиммунному заболеванию, до сих пор не ясны. Тем более не понятны и механизмы протективности разных аллелей *HLA-DRB1*.

Изучение механизмов аутоиммунитета на сегодняшний день сконцентрировано на нарушениях в формировании тримолекулярного комплекса HLA-пептид-TCR, что, возможно, генерирует и активирует аутореактивные Т-клетки. Чтобы в будущем влиять на ход аутоиммунных заболеваний, необходимо сместить фокус также и на механизмы протективности. В связи с тем, что HLA является главным генетическим фактором РС, как

в случае и других аутоиммунных патологий, важно исследовать процесс связывания и презентации антигенов МНС и искать возможные механизмы протективности в этом процессе.

Распознавание пептида, участвующего в презентации комплексом МНС носит достаточно сложный характер. Весь процесс имеет достаточно четкие требования к структуре пептида для обеспечения нужной специфичности. Вместе с тем до сих пор не вполне ясными остаются процессы, влияющие на механизм загрузки и распознавание. Особую роль имеет кроссреактивность пептидов и связанная с этим возможность презентации пептидов из различных источников, в том числе вирусных и бактериальных. Включение этих процессов напрямую связано с развитием аутоиммунного процесса. Особенности узнавания пептидов и их презентации имеет непосредственное отношение к структуре генетических локусов МНС и именно это обеспечивает их специфичность. Раскрытие механизмов аутоиммунности имеет непосредственную связь со структурными характеристиками этих локусов и во многом определяет путь дальнейшего исследования данной проблемы. В связи с тем, что структурные особенности локусов имеют определенную этническую и географическую опосредованность, имеется достаточно много исследований, связывающих механизм распознавания пептидных фрагментов молекулами МНС с различными альтерациями. По всей видимости определение структурно-функциональных особенностей механизма распознавания даст ключ к пониманию механизма представления, а также даст обоснование патогенеза аутоиммунных заболеваний. Важной задачей является также выяснение деталей самого процесса узнавания и участия в этом процессе индивидуальных белков иммунного комплекса. Важны для понимания деталей процесса презентации и временные характеристики процесса. В связи с многофакторностью аутоиммунных заболеваний распознавание деталей процесса презентации в конечном итоге приведет исследователей к пониманию проблемы «прогрессоров» и «контроллеров», т.е. индивидов, которые по-разному отвечают на вызовы внешней среды и определяют по-разному развитие иммунопатологии благодаря генетическим особенностям своих МНС. Все вышесказанное обосновывает актуальность познания детальных механизмов презентации пептидных фрагментов аутоантигенов МНС, а также исследование особенностей их презентации различными генетическими вариантами этого комплекса.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ И ОСНОВНЫЕ ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель данной работы заключалась в исследовании процесса распознавания и презентации аутоантигенов МНС II человека при рассеянном склерозе и поиске возможного механизма протективности в контексте генетически протективного аллеля *HLA-DRB1*.

Для решения этого вопроса были поставлены следующие задачи:

1. Получение рекомбинантных белков и пептидов, участвующих в процессе распознавания и презентации аутоантигенов при рассеянном склерозе.
2. Идентификация миелиновых пептидов, способных связываться протективным *HLA-DRB1\*01:01*, и определение их эпитопов.
3. Исследование термодинамических и кинетических параметров процесса представления миелиновых аутоантигенов при рассеянном склерозе в сравнении с вирусными пептидами.
4. Изучение вопроса презентации миелинового пептида протективным *HLA-DRB1\*01:01* на поверхности дендритных клеток, а также активации Т-клеточного ответа.

## НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

Риск развития рассеянного склероза увеличивается у лиц, имеющих различные варианты *HLA* класса II, тогда как некоторые из них могут оказывать протективное действие. В настоящей работе совместно с профессором О.О. Фаворовой, доцентом О.Г. Кулаковой и Лабораторией медицинской геномики РНИМУ им. Н.И. Пирогова, а также профессором А.Н. Бойко и Московским центром рассеянного склероза было проанализировано распределение высокополиморфного локуса *HLA-DRB1* у более чем тысячи пациентов с ремиттирующим РС и здоровых индивидов русской национальности. Было установлено, что носительство аллелей *HLA-DRB1\*15* и *HLA-DRB1\*03* связано с риском развития РС, тогда как носительство *HLA-DRB1\*01* и *HLA-DRB1\*11* является протективным. Впервые был идентифицирован ранее неизвестный пептид MBP<sub>153-161</sub>, расположенный на С-конце основного белка миелина (MBP), одного из антигенов РС, а также энцефалитогенный пептид MBP<sub>90-98</sub>, которые связывались с рекомбинантным белком *HLA-DRB1\*01:01* со сродством, сравнимым с классическим антигенным пептидом 306–318 гемагглютинаина вируса гриппа (HA), что говорит о способности *HLA-DRB1\*01:01* презентировать вновь идентифицированные пептиды MBP<sub>153-161</sub> и MBP<sub>90-98</sub>. Измерения кинетических параметров

связывания пептидов МВР и НА с HLA-DRB1\*01:01, катализируемого HLA-DM, выявили значительно более низкую скорость обмена CLIP для пептидов МВР<sub>153-161</sub> и МВР<sub>90-98</sub> по сравнению с пептидом НА. Анализ связывания химерных пептидов МВР-НА продемонстрировал, что наблюдаемое различие между миелиновыми пептидами и НА обусловлено отсутствием якорных остатков в С-концевой части пептидов МВР, что приводит к умеренному позиционированию карманов P6/7 и P9 HLA-DRB1\*01:01 пептидами МВР<sub>153-161</sub> и МВР<sub>90-98</sub> в отличие от пептида НА. Это приводит к сбою докинга остатков в положениях P1 и P4, быстрой диссоциации пептидов и высвобождению пустого комплекса HLA-DM-HLA-DR. Причем, миелиновые пептиды не способны конкурировать с вирусным пептидом за связывание с протективным HLA-DRB1\*01:01. Кроме того, в данной работе было продемонстрировано, что в случае нормального индивидуума с гетерозиготным генотипом HLA-DRB1\*01:01/\*15:01 пептид МВР<sub>146-170</sub> не был обнаружен среди пептидов, связанных с HLA, экспонированными на поверхности дендритных клеток, а также этот пептид не активировал пролиферацию CD4 Т-клеток.

В результате настоящей работы можно предложить, что протективные свойства аллеля HLA-DRB1\*01 могут быть напрямую связаны со способностью HLA-DRB1\*01:01 кинетически различать антигенные экзогенные пептиды и эндогенные пептиды, фрагменты МВР. Полученные результаты обеспечивают новый вектор оптимизации пептидных лигандов с точки зрения кинетической дискриминации антигенов HLA класса II.

## **ПУБЛИКАЦИИ И АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ**

По теме диссертации опубликовано 3 статьи. Результаты диссертации были представлены на 3 международных и 1 российской конференциях.

## **СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ.**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, списка использованной литературы, который содержит 191 источник, и приложения. Диссертация изложена на 130 страницах и содержит 36 рисунков и 13 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Генетическая ассоциация вариантов гена HLA-DRB1 с рассеянным склерозом

Рассеянный склероз (РС) является полигенным заболеванием, прогностические критерии развития которого зависят от структуры комплексов гистосовместимости. В данной работе совместно с профессором О.О. Фаворовой, доцентом О.Г. Кулаковой и Лабораторией медицинской геномики РНИМУ им. Н.И. Пирогова, а также профессором А.Н. Бойко и Московским центром рассеянного склероза было проанализировано распределение аллелей гена HLA-DRB1, генетической детерминанты развития РС, у 565 пациентов с ремиттирующим РС и 471 здорового человека (русской этнической принадлежности), используя метод генотипирования низкого разрешения (двузначное). Коллективом указанных исследователей при нашем непосредственном участии были обнаружены существенные различия в частоте носительства нескольких групп аллелей HLA-DRB1 (далее «аллели») (**Таблица 1**). Как видно из таблицы, аллели HLA-DRB1\*03 и \*15 были существенно ассоциированы с высоким риском развития РС ( $p_{perm} = 0,0056$ , OR = 1,77 [CI: 1,27–2,49] и  $p_{perm} = 5,8 \times 10^{-14}$ , OR = 2,84 [CI: 2.17–3.72] соответственно). У этих аллелей значения отношения шансов (OR) были сильно выше 1 (1,77 у HLA-DRB1\*03 и 2,84 у HLA-DRB1\*15), что означает, что носители этих аллелей имеют высокую предрасположенность к развитию заболевания. Аллели HLA-DRB1\*01, \*09, \*11 и \*12 значительно преобладали в контрольной группе. Тем не менее, только аллели HLA-DRB1\*01 и \*11 были определены как протективные после коррекции для множественных сравнений ( $p_{perm} = 0,00062$ , OR = 0,55 [CI: 0,41–0,74] и  $p_{perm} = 0,0011$ , OR = 0,56 [CI: 0,42–0,76] соответственно), в то время как HLA-DRB1\*09 и \*12 просто оставались номинально значимыми. У аллелей HLA-DRB1\*01 и \*11 значения OR были ниже 1 (0,55 у HLA-DRB1\*01 и 0,56 у HLA-DRB1\*11), что означает, что носители этих аллелей имеют низкую предрасположенность к развитию заболевания, т.е. эти аллели обладают высокой протективностью в патологии РС. Тем самым, обобщая представленные данные, нами была обнаружена сильная ассоциация аллелей HLA-DRB1\*15 и \*03 с риском развития РС и значительный протективный эффект аллелей HLA-DRB1\*01 и \*11 у этнически русских индивидов. Ассоциация аллеля HLA-DRB1\*15 с РС была показана ранее в результате анализа ограниченной независимой когорты этнически русских. Для HLA-DRB1\*15, который широко известен как самый сильный генетический фактор риска РС, наблюдалось значение OR, равное 2,84, что аналогично результатам, полученным для большинства европейских и североамериканских популяций (среднее OR = 3,08). Что касается других аллелей, то они хуже изучены в плане прогностических факторов предрасположенности или протективности развития РС.

**Таблица 1.** Ассоциация носительства групп аллелей HLA-DRB1 с рассеянным склерозом.

Группа аллелей HLA-DRB1	Носители, n (%)		Значения $p_f$	Значения $p_{perm}$	OR [95% CI]
	Случаи РС (n=565)	Здоровые индивидуумы (n=471)			
<i>DRB1*01</i>	95 (16,8)	127 (26,9)	<b>5.16×10<sup>-5</sup></b>	<b>0.00062</b>	<b>0.55 (0.41-0.74)</b>
<i>DRB1*03</i>	118 (20,9)	61 (13,0)	<b>0.00047</b>	<b>0.0056</b>	<b>1.77 (1.27-2.49)</b>
<i>DRB1*04</i>	107 (18,9)	103 (22,3)	0.138	1.00	0.83 (0.61-1.13)
<i>DRB1*07</i>	111 (19,6)	116 (24,6)	0.032	0.38	0.75 (0.56-1.01)
<i>DRB1*08</i>	48 (8,5)	40 (8,5)	0.55	1.00	1.00 (0.65-1.55)
<i>DRB1*09</i>	4 (0,7)	14 (3,0)	0.0052	0.062	0.23 (0.077-0.71)
<i>DRB1*10</i>	11 (1,9)	11 (2,3)	0.83	1.00	0.83 (0.36-1.93)
<i>DRB1*11</i>	99 (17,5)	129 (27,4)	<b>9.35×10<sup>-5</sup></b>	<b>0.0011</b>	<b>0.56 (0.42-0.76)</b>
<i>DRB1*12</i>	21 (3,7)	36 (7,6)	0.0044	0.053	0.47 (0.27-0.81)
<i>DRB1*13</i>	141 (25,0)	102 (21,7)	0.12	1.00	1.20 (0.90-1.60)
<i>DRB1*14</i>	6 (1,1)	9 (1,9)	0.19	1.00	0.55 (0.19-1.56)
<i>DRB1*15</i>	264 (46,7)	111 (23,6)	<b>4.86×10<sup>-15</sup></b>	<b>5.8×10<sup>-14</sup></b>	<b>2.84 (2.17-3.72)</b>
<i>DRB1*16</i>	30 (5,3)	29 (6,2)	0.33	1.00	0.85 (0.50-1.45)

РС - рассеянный склероз; OR - отношение шансов; CI - конфиденциальный интервал.  $p$ -значения Фишера ( $p_f$ ),  $p$ -значения перестановки ( $p_{perm}$ ) и значения OR (95% CI) представлены в таблице. Значимые значения показаны жирным шрифтом. Красным цветом отмечены аллели с положительной ассоциацией с РС, зеленым цветом – с отрицательной ассоциацией с РС.

Хотя точные механизмы, с помощью которых продукты HLA, кодируемые различными аллелями *DRB1*, вносят вклад в восприимчивость к РС, до сих пор неизвестны, параметры аутоантигенного связывания с белками HLA могут быть ключевым компонентом, определяющим предрасполагающие или протективные эффекты аллельных вариантов HLA на развитие РС.

### **Отбор фрагментов MBP из библиотеки и определение эпитопов для HLA-DRB1\*01:01**

В результате статистического анализа русской популяции по гену HLA-*DRB1* были выявлены протективные аллели HLA-*DRB1\*01* и HLA-*DRB1\*11*, которые было бы интересно далее исследовать в вопросе поиска механизма протективности. В первую очередь необходимо понять, способен ли белок, продукт протективного аллеля, связывать один из антигенов РС, а именно основной белок миеллина, или механизм протективности и заключается в неспособности HLA-DR связывать и тем самым презентировать аутоантигены. Было бы важно провести сравнение протективной аллели с аллелью риска HLA-*DRB1\*15* в механизмах связывания антигенов.

В связи с вышесказанным из протективной группы аллелей HLA-*DRB1\*01* и группы аллелей риска HLA-*DRB1\*15* нами были выбраны аллели HLA-*DRB1\*01:01* и \*15:01,



соответственно, для дальнейших исследований механизма презентации. Аллель HLA-DRB1\*01:01 был выбран, как наиболее распространенный аллель среди группы HLA-DRB1\*01, а HLA-DRB1\*15:01, как наиболее изученный фактор риска в патологии РС. Для достижения поставленных целей в результате экспрессий стабильных клеточных линий культуры S2 *Drosophila melanogaster* нами были получены рекомбинантные HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*15:01 (с или без пептида CLIP), слитные с димером частей лейциновых мотивов факторов транскрипции c-fos и c-jun.

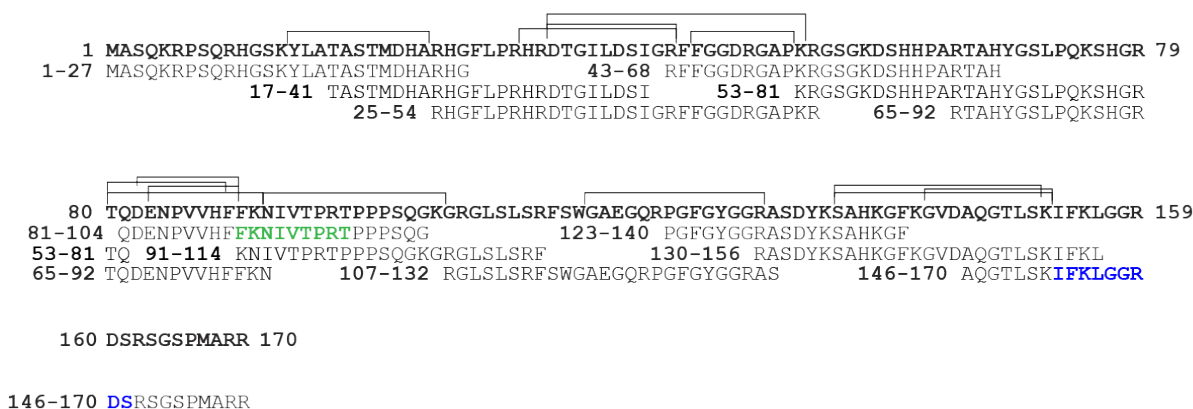
Процесс загрузки пептида на HLA-DR в клетке ускоряется в присутствии HLA-DM, поэтому для исследования кинетики данного процесса необходимо также и получение рекомбинантных молекул HLA-DM. С использованием клеток линии HEK293F был экспрессирован и далее очищен HLA-DM, слитный с димером константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина человека.

Необходимые для дальнейших исследований пептиды полученной ранее в нашей лаборатории библиотеки эпитопов MBP, а также вирусные, миелиновые с точечными заменами и химерные пептиды, слитные с тиоредоксином, были экспрессированы в клетках *E. coli* BL21 (DE3) и далее очищены.

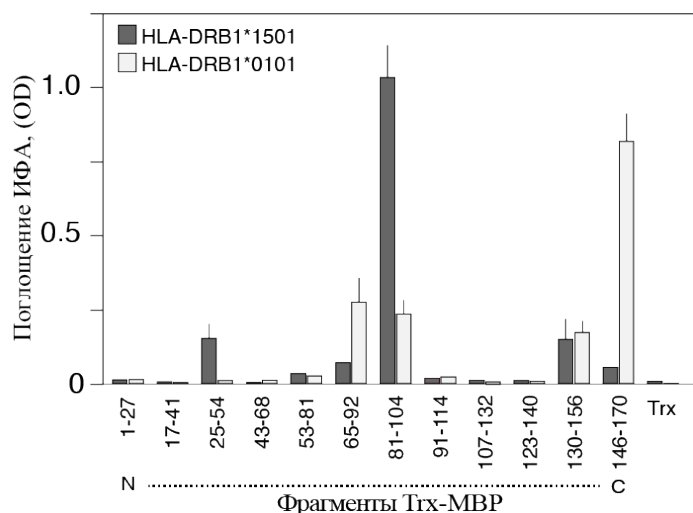
На следующем этапе было необходимо определить, может ли рекомбинантный HLA-DRB1\*01:01, связываться с фрагментами MBP, используя библиотеку эпитопов MBP (**Рисунок 1А**). Для этого методом ИФА проанализировали взаимодействие HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*15:01 с 12 перекрывающимися фрагментами MBP, слитными с тиоредоксином. Тиоредоксин без пептида (Тrx) был взят в качестве отрицательного контроля. Как видно из **Рисунка 1**, HLA-DRB1\*01:01 специфически связывал MBP<sub>146-170</sub> и менее эффективно связывал три других пептида MBP<sub>130-156</sub>, MBP<sub>81-104</sub> и MBP<sub>65-92</sub> (**Рисунок 1Б**), причем важно обратить внимание на то, что пары MBP<sub>81-104</sub>/MBP<sub>65-92</sub> и MBP<sub>130-156</sub>/MBP<sub>146-170</sub> перекрываются и скорее всего представляют два возможных эпитопа связывания 81-92 и 146-156. Однако в случае MBP<sub>130-156</sub>/MBP<sub>146-170</sub> эпитоп сдвинут в сторону MBP<sub>146-170</sub> по причине большего сигнала. Как и предполагалось, HLA-DRB1\*15:01 специфически распознавал энцефалитогенный пептид MBP<sub>81-104</sub> (**Рисунок 1Б**). Как было показано ранее, данный фрагмент MBP является классической аутоантигенной детерминантой при РС для HLA-DRB1\*15:01, вызывающей Т-клеточный иммунный ответ. Кроме того, еще два фрагмента, а именно MBP<sub>25-54</sub> и MBP<sub>130-156</sub>, были связаны HLA-DRB1\*15:01, однако со значительно меньшей эффективностью, чем MBP<sub>81-104</sub>. Полученные данные были также проверены методом ИФА с использованием химически синтезированных биотинилированных пептидов HA<sub>306-318</sub>, MBP<sub>81-104</sub>, MBP<sub>146-170</sub> и MBP<sub>17-41</sub> (**Рисунок 1В**). HLA-DRB1\*01:01 распознал свой классический лиганд, вирусный пептид

гемагглютинаина вируса гриппа HA<sub>306-318</sub>, взятый в качестве положительного контроля. Говоря о миелиновых пептидах, HLA-DRB1\*01:01 связал MBP<sub>81-104</sub> и MBP<sub>146-170</sub>, а HLA-DRB1\*15:01 - только MBP<sub>81-104</sub>, что совпало с полученными выше результатами в случае аналогичных пептидов, слитных с тиоредоксином. HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*15:01 не связывали нерелевантный пептид MBP<sub>17-41</sub>, взятый в качестве отрицательного контроля.

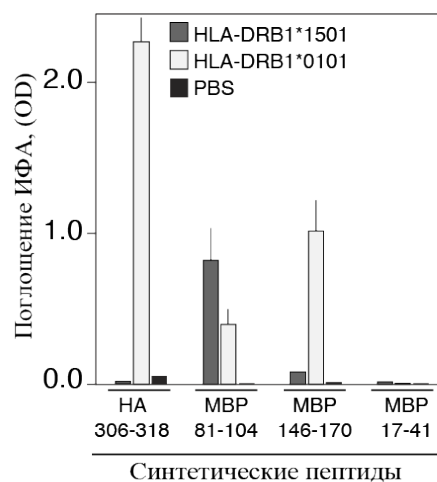
**А**



**Б**



**В**

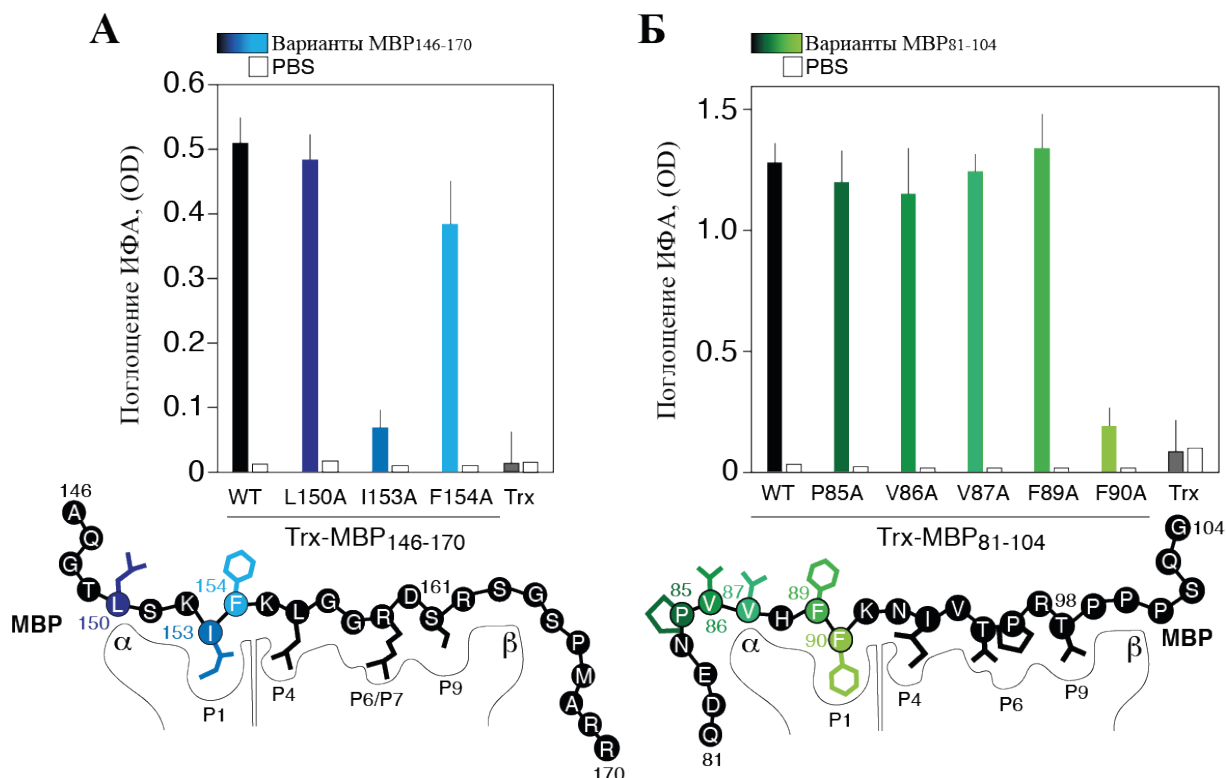


**Рисунок 1. Отбор фрагментов MBP из библиотеки для HLA-DRB1\*01:01. (А)** Аминокислотная последовательность MBP. Указаны перекрывающиеся пептиды библиотеки эпитопов. Два эпитопа HLA-DRB1\*01:01 отмечены зеленым и синим цветами. Квадратные скобки соответствуют последовательностям пептидов, ассоциированных с HLA, экспонированными на поверхности дендритных клеток, выделенных из крови нормального индивидуума с гетерозиготным генотипом HLA-DRB1\*01:01/\*15:01 согласно анализу LC-MS/MS. **(Б)** Анализ связывания HLA-DRB1\*15:01 (темно-серые столбцы) и HLA-DRB1\*01:01 (светло-серые столбцы) (150 нМ) с библиотекой эпитопов MBP (750 нМ), слитных с тиоредоксином. Тгх обозначает тиоредоксин. Стандартное отклонение отмечено. **(В)** Распознавание химически синтезированных пептидов, представляющих фрагменты MBP и пептида HA<sub>306-318</sub> (750 нМ), HLA-DRB1\*15:01 (темно-серые столбцы) и HLA-DRB1\*01:01 (светло-серые столбцы) (150 нМ). Черные столбцы представляют фоновый сигнал (PBS). Стандартное отклонение отмечено.

Как было продемонстрировано выше, протективный HLA-DRB1\*01:01 способен связывать фрагменты аутоантигена MBP, особенно С-концевой пептид. Было необходимо выяснить, презентует ли HLA-DRB1\*01:01 данный фрагмент на поверхности антиген-презентирующих клеток. Для этого были выделены дендритные клетки из крови нормального индивидуума с гетерозиготным генотипом HLA-DRB1\*01:01/\*15:01. Анализ LC-MS/MS пептидов, связанных с HLA, экспонированными на поверхности дендритных клеток, выявил три основных области MBP, что соответствовало MBP<sub>81-104</sub>, MBP<sub>25-54</sub> и MBP<sub>130-156</sub>, которые, как было показано выше, связывались HLA-DRB1\*15:01. В то же время нам не удалось обнаружить какие-либо пептиды, относящиеся к MBP<sub>146-170</sub>, связанные с HLA-DRB1\*01:01 (**Рисунок 1А**). Таким образом нами было показано, что HLA-DRB1\*01:01 не способен презентовать миелиновые аутоантигены или презентует их в недетектируемых количествах на поверхности антиген-презентирующих клеток в отличие от аллеля риска HLA-DRB1\*15:01, а также в комплексе с MBP<sub>146-170</sub> не активирует пролиферацию CD4-позитивных Т-клеток в результате анализа при помощи красителя CFSE и цитофлуориметрии. Полученные данные свидетельствуют в пользу выдвинутой нами выше концепции о протективном характере HLA-DRB1\*01:01.

Как следует из представленных данных, протективный аллель способен связывать фрагменты MBP, однако далее было важно определить точные эпитопы связывания, распознаваемые HLA-DRB1\*01:01, которые входят в состав MBP<sub>81-104</sub> и MBP<sub>146-170</sub>. Для этого был проведен аланиновый скрининг (замена гидрофобных и ароматических аминокислотных остатков на аланин) миелиновых пептидов с использованием слитных с тиоредоксином пептидов с точечными аминокислотными заменами, двигаясь с N-конца пептида для поиска положения P1: L150A, I153A и F154A для MBP<sub>146-170</sub>; P85A, V86A, V87A, F89A и F90A для MBP<sub>81-104</sub>. Данный анализ для пептида MBP<sub>146-170</sub> (**Рисунок 2А**) показал, что карман P1 в HLA-DRB1\*01:01, несущий MBP<sub>146-170</sub>, был занят изолейцином в положении 153 (по номенклатуре MBP<sub>1-170</sub> человека). Такой вывод был сделан, исходя из того, что в случае замены I153A наблюдалось падение сигнала ИФА, что говорит о том, что MBP<sub>146-170</sub> с такой мутацией не способен связываться с HLA-DRB1\*01:01. Следовательно, полярные остатки аргинина и серина в положениях 159 и 161 занимают остатки P6/P7 и P9 соответственно. Аланиновый скрининг пептида MBP<sub>81-104</sub>, слитного с тиоредоксином (**Рисунок 2Б**), продемонстрировал, что фенилаланин находится в положении 90 в качестве гидрофобного якоря в P1 в связи с падением сигнала ИФА в случае замены F90A. В свою очередь, это говорит о том, что карманы P6/P7 и P9 в HLA-DRB1\*01:01, связанном с MBP<sub>81-104</sub>, были заняты треонином, пролином и треонином в положениях 95, 96 и 98,

соответственно. Таким образом можно заключить, что эпитопы связывания MBP<sub>81-104</sub> и MBP<sub>146-170</sub> с HLA-DRB1\*0101 были определены, как 90-98 и 153-161 соответственно



**Рисунок 2. Определение эпитопов фрагментов MBP для HLA-DRB1\*01:01.** (А, Б) Связывание слитных с тиоредоксином пептидов MBP<sub>146-170</sub> (А) и MBP<sub>81-104</sub> (Б) и их вариантов (750 нМ) с точечными аминокислотными заменами на аланин с HLA-DRB1\*01:01 (150 нМ). Белые столбцы представляют фоновый сигнал. Стандартное отклонение отмечено. Точечные мутации обозначены разными тонами синего и зеленого цветов

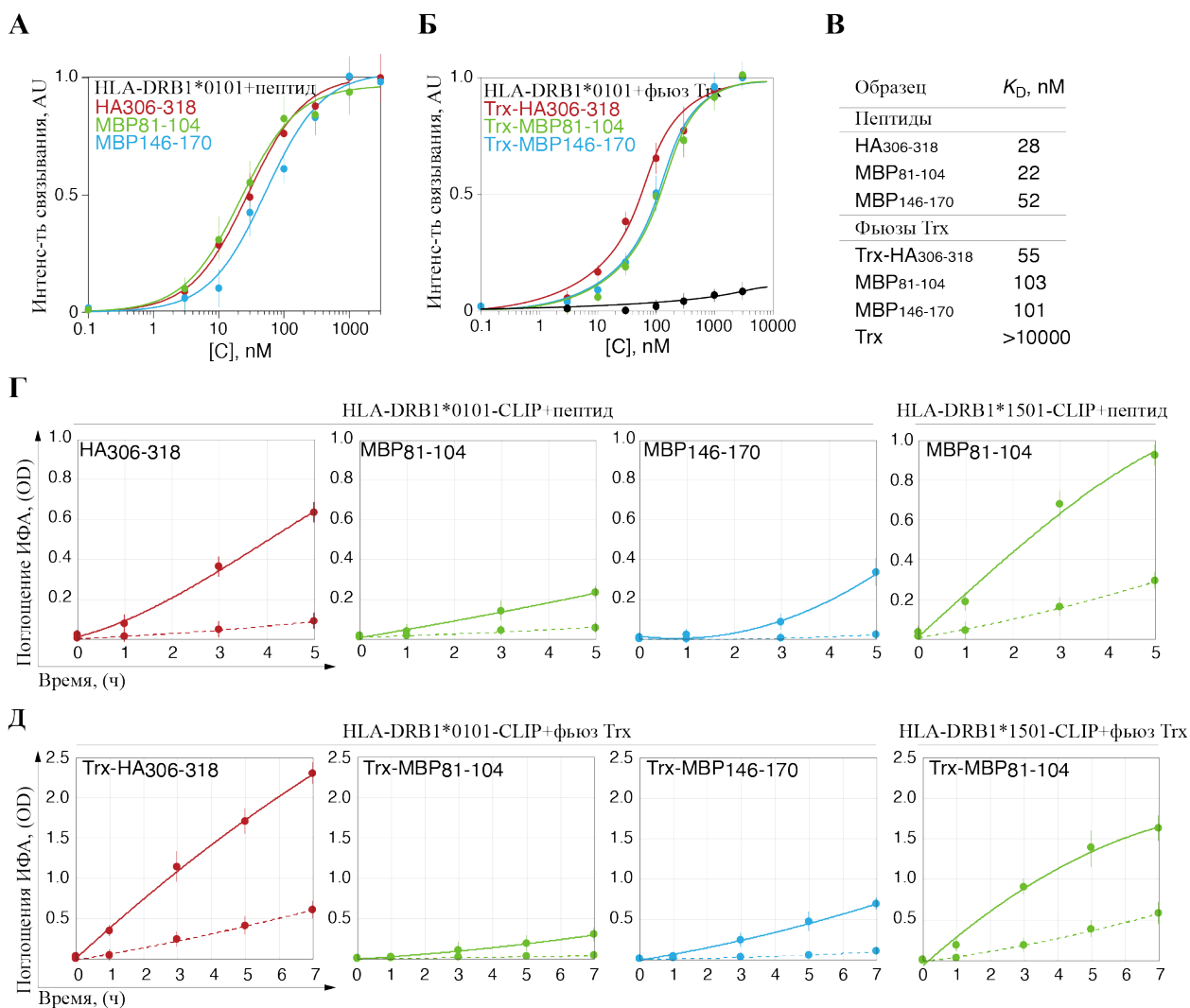
### Определение констант диссоциации и кинетики связывания HLA-DRB1\*01:01 с вирусным пептидом HA и фрагментами MBP

Константа диссоциации ( $K_D$ ) комплекса HLA-пептид может характеризовать силу, которая требуется для удаления полностью связанного пептида из борозды связывания HLA. Мы воспользовались методом DELFIA с целью определения  $K_D$  для комплексов HLA-DRB1\*01:01 с миелиновыми пептидами MBP<sub>81-104</sub> и MBP<sub>146-170</sub> и вирусным HA<sub>306-318</sub> в качестве положительной детерминанты. В данном эксперименте были использованы как химически синтезированные пептиды (Рисунок 3А), так и рекомбинантные, слитные с тиоредоксином (Trx) (Рисунок 3Б). Тиоредоксин без пептида был включен в исследование, как отрицательный контроль. Рассчитанные значения  $K_D$  показали, что HLA-DRB1\*01:01 связал все эпитопы с приблизительно одинаковой эффективностью (отличия составляли не более, чем в два раза) (Рисунок 3В). Эти данные свидетельствуют о том, что и вирусный, и

миелиновые пептиды обладают схожими термодинамическими параметрами по отношению к HLA-DRB1\*01:01.

Удаление CLIP и связывание антигенных пептидов на HLA класса II является динамическим процессом, который катализируется HLA-DM. Другими словами, данный процесс обладает кинетикой, параметры которой были определены с помощью метода ИФА (**Рисунки 3Г и 3Д**). В данном исследовании были измерены скорости связывания химически синтезированных пептидов (**Рисунок 3Г**) и их рекомбинантных аналогов, слитных с тиоредоксином (**Рисунок 3Д**), содержащих вирусный HA<sub>306-318</sub>, миелиновые MBP<sub>81-104</sub> и MBP<sub>146-170</sub>, с HLA-DRB1\*01:01, а также MBP<sub>81-104</sub> с HLA-DRB1\*15:01. Оба HLA-DR были предзагружены пептидом CLIP. Сравнивая скорости загрузки пептидов на HLA-DR в присутствии и без HLA-DM, наблюдалась значительная разница более, чем в 5 раз, что свидетельствует о специфичности связывания данных пептидов. Во время этого процесса, несмотря на сходную аффинность, вирусный пептид HA обменивал CLIP, предзагруженный на HLA-DRB1\*01:01, в 4 раза быстрее по сравнению с миелиновыми пептидами MBP<sub>81-104</sub> и MBP<sub>146-170</sub>, тогда как HLA-DRB1\*15:01 связывался с MBP<sub>81-104</sub> со скоростью (средняя  $6,3 \cdot 10^{-12}$  М/с), близкой и даже выше скорости взаимодействия HLA-DRB1\*01:01 и HA (средняя  $4 \cdot 10^{-12}$  М/с) (**Рисунок 3Г**). Изучение загрузки этих пептидов в составе белков, слитных с тиоредоксином, на HLA привело практически к идентичным результатам (**Рисунок 3Д**).

. Тем самым было показано, что наиболее распространенный аллельный вариант HLA-DRB1\*01:01 связывает С-концевой и энцефалитогенный пептидные фрагменты MBP со средством, сравнимым с таковым у экзогенных вирусных пептидов, как в случае HA, или даже у эндогенных пептидов с высокой аффинностью и медленной кинетикой диссоциации. Эти данные свидетельствуют о том, что молекулы HLA класса II, как в случае HLA-DRB1\*01:01, возможно, способны кинетически различать ауто- и экзогенные пептиды во время обмена CLIP, катализируемого HLA-DM. Важно отметить, что средство пептидов к белку HLA очень схоже, в то время как скорость их загрузки на HLA различается в несколько раз. Причем, стоит обратить внимание на то, что тот же аутоантигенный миелиновый пептид MBP<sub>81-104</sub> в случае аллели риска HLA-DRB1\*15:01 загружается быстрее всех изучаемых пептидов, что скорее всего и обуславливает фактор риска развития РС. В итоге данный анализ указывает на то, что кинетика связывания лигандов HLA может быть более существенной характеристикой в отличие от термодинамических свойств связывания и является более релевантной для объяснения физиологических процессов.



**Рисунок 3. Определение констант диссоциации и кинетики связывания HLA-DRB1\*01:01 с вирусным пептидом HA и фрагментами MBP.** Связывание химически синтезированных пептидов HA<sub>306-318</sub> (красная кривая), MBP<sub>81-104</sub> (зеленая кривая) и MBP<sub>146-170</sub> (синяя кривая) (А) и их аналогов, слитных с тиоредоксином (Б), в разных концентрациях (0,1 нМ - 3 мкМ) с HLA-DRB1\*01:01 (5 нМ), измеренное с помощью DELFIA с детекцией флуоресценции с разрешением по времени. AU обозначает относительные единицы, а Trx обозначает тиоредоксин. Константы диссоциации приведены в (В). Кинетика связывания химически синтезированных пептидов (Г) и их рекомбинантных аналогов, слитных с тиоредоксином (Д), содержащих HA<sub>306-318</sub> (красная кривая), MBP<sub>81-104</sub> (зеленая кривая) и MBP<sub>146-170</sub> (синяя кривая) (150 нМ), с предзагруженными CLIP HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*15:01 (150 нМ) в присутствии (сплошные кривые) или без (пунктирные кривые) HLA-DM (150 нМ).

### Влияние С-концевой части пептида на скорость загрузки на HLA-DR

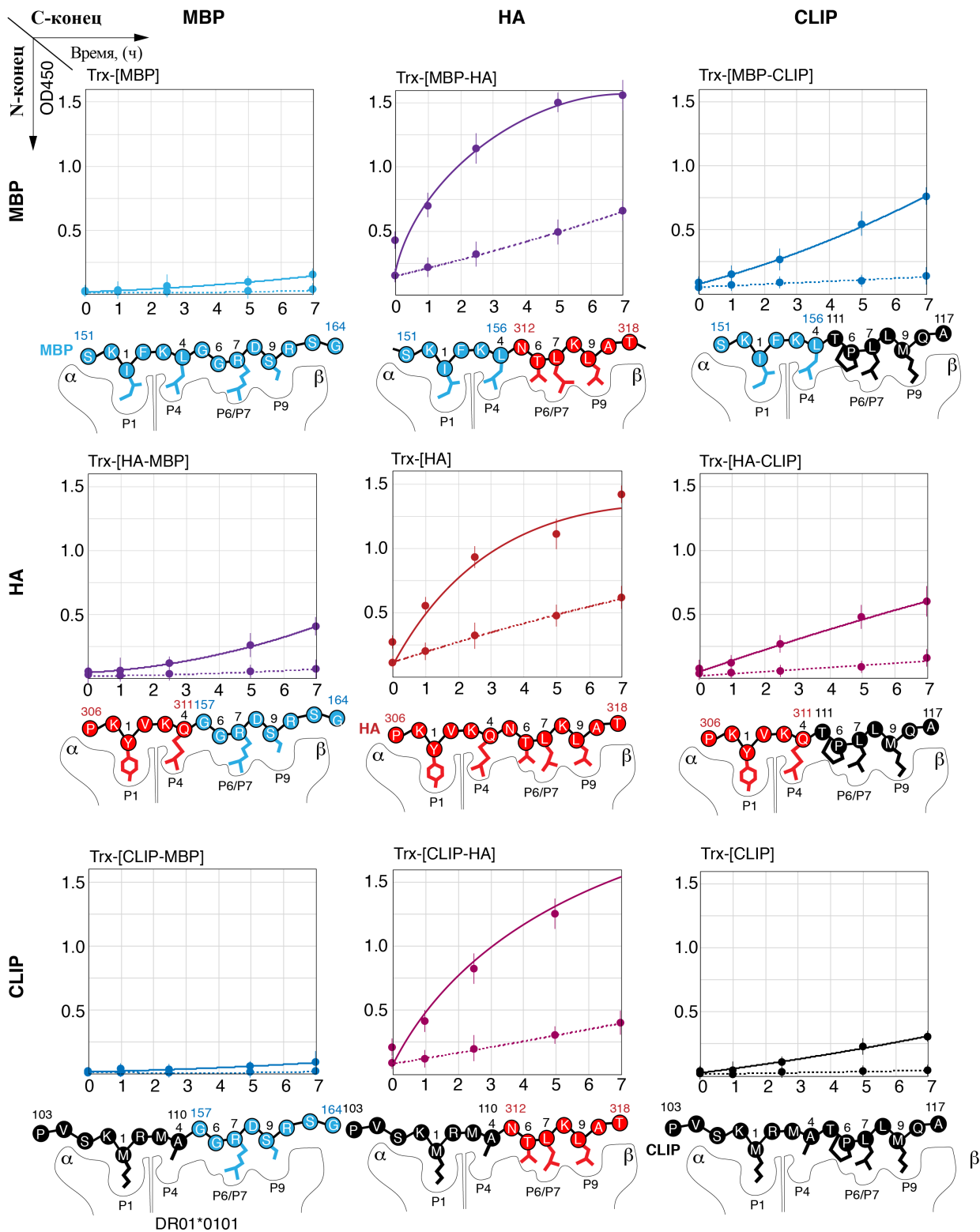
В предыдущем разделе была продемонстрирована кинетическая дискриминация HLA-DRB1\*01:01 миелиновых и вирусных пептидов. На следующем этапе исследования было необходимо выяснить причину медленной скорости загрузки миелиновых пептидов на HLA-DRB1\*01:01. Загрузка пептида на МНС II опосредована многоступенчатым механизмом, включающим высвобождение CLIP, чему способствует связывание HLA-DM

с HLA-DR. Кроме того, карманы P6-P9 заняты С-концевым «хвостом» пептида, что облегчает взаимодействие N-концевой «головы» пептида с карманами P1 и P4 с последующим высвобождением HLA-DM. Чтобы определить, какая из частей пептида, «голова» или «хвост», является определяющей в процессе загрузки, были созданы химерные пептиды, представляющие комбинации N- и С-концевых частей HA<sub>306-318</sub>, CLIP<sub>103-117</sub>, MBP<sub>151-164</sub> и MBP<sub>88-100</sub>, слитные с тиоредоксином (*Таблица 2*). Граница раздела «головы» и «хвоста» проходила между положениями P4 и P5.

*Таблица 2. Химерные пептиды.*

Пептид	Последовательность
HA	PKYVKQNTLKLAT
HA-MBP <sub>157-164</sub>	PKYVKQGGRDSRSG
HA-CLIP	PKYVKQTPLLMQA
MBP <sub>151-164</sub>	SKIFKLGGRDSRSG
MBP <sub>151-156</sub> -HA	SKIFKLNTLKLAT
MBP <sub>151-156</sub> -CLIP	SKIFKLTPLLMQA
CLIP	PVSKMRMATPLLMQA
CLIP-HA	PVSKMRMANTLKLAT
CLIP-MBP <sub>157-164</sub>	PVSKMRMAGGRDSRSG
MBP <sub>88-100</sub>	HFFKNIVTPRTPP
MBP <sub>88-93</sub> -HA	HFFKNINTLKLAT
HA-MBP <sub>94-100</sub>	PKYVKQVTPRTPP
pp65	MSIYVYALPLKMLNI
pp65-MBP <sub>91-97</sub>	MSIYVYKNIVTPR
MBP <sub>85-97</sub>	PVVHFFKNIVTPR

Для поставленной цели методом ИФА были измерены кинетические параметры обмена предзагруженного CLIP на химерные пептиды, несущие N- и С-концевые части HA<sub>306-318</sub>, CLIP<sub>103-117</sub> и MBP<sub>151-164</sub>, на HLA-DRB1\*01:01 с или без HLA-DM (*Рисунок 4*). Как видно из кинетических данных, химерные пептиды с С-концевой частью HA (Trx-[HA], Trx-[MBP<sub>151-156</sub>-HA] и Trx-[CLIP-HA]) загружались на HLA-DRB1\*01:01 с одинаковой скоростью независимо от N-концевой части. И наоборот, ни один из химерных пептидов с С-концевой частью пептида MBP<sub>151-164</sub> (Trx-[MBP<sub>151-164</sub>], Trx-[HA-MBP<sub>157-164</sub>], Trx-[CLIP-MBP<sub>157-164</sub>]) был способен эффективно связывать HLA-DRB1\*01:01. Причем, скорости различались более, чем в 5 раз. Подобно этим результатам, замена N-концевой части CLIP фрагментами HA или MBP<sub>151-164</sub> (Trx-[HA-CLIP] и Trx-[MBP<sub>151-156</sub>-CLIP]) оказала лишь умеренное влияние на связывание HLA-DRB1\*01:01. В случае другого миелиного пептида MBP<sub>88-100</sub> были получены данные, схожие с результатами для MBP<sub>151-164</sub>.

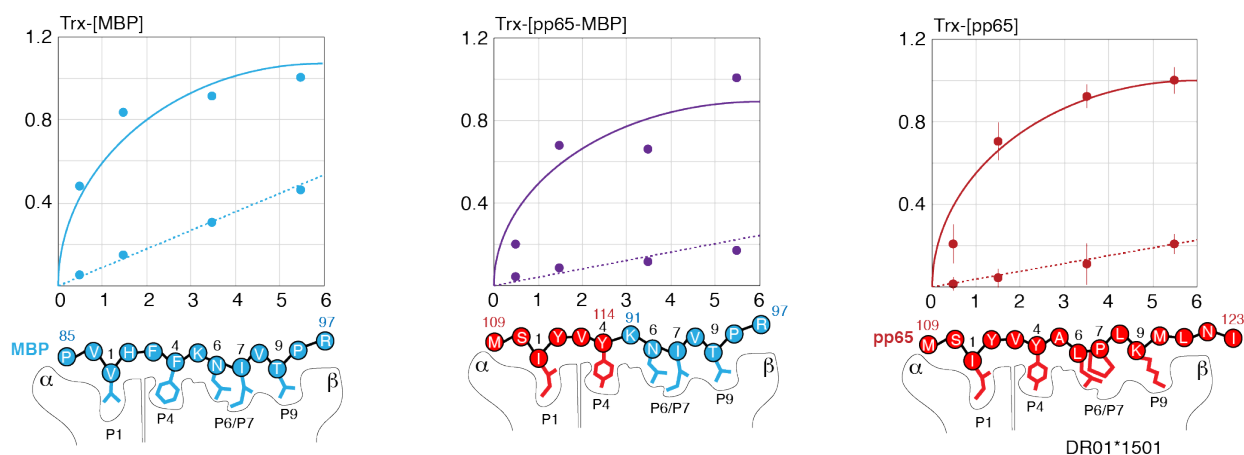


**Рисунок 4.** Кинетика связывания химерных пептидов (150 нМ), слитных с тиоредоксином, состоящих из N- и C-концевых частей HA<sub>306-318</sub> (красный), MBP<sub>151-164</sub> (синий) и CLIP (черный), с HLA-DRB1\*01:01 (150 нМ) в присутствии (сплошные линии) или в отсутствие (пунктирные линии) HLA-DM (150 нМ). Визуализация: стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена. Якорные остатки указаны.



Тем самым можно сделать вывод, что связывание химерных пептидов с HLA-DRB1\*01:01 свидетельствует о важности С-концевой части для эффективности взаимодействия с HLA-DRB1\*01:01 при одинаково высокоаффинных N-концевых частях пептида. В данных пептидах N-концевые части содержат основной якорь в кармане связывания P1: ароматические тирозин в положении 308 в случае HA и фенилаланин в положении 90 в случае MBP<sub>88-100</sub>, и гидрофобный изолейцин в положении 153 в случае MBP<sub>151-164</sub>. Однако можно предположить, что именно наличие пролина в положении 96 в С-концевой части пептидов MBP<sub>88-100</sub> и HA-MBP<sub>94-100</sub>, а также объемного остатка аргинина в положении 159 в С-концевой части пептидов MBP<sub>151-164</sub> и HA-MBP<sub>157-164</sub> изменило угол и положение пептидов в борозде связывания, соответственно, тем самым ухудшило взаимодействие пептидов с карманом связывания P6/7. В сравнении, у пептидов HA, MBP<sub>88-93</sub>-HA и MBP<sub>151-156</sub>-HA в положении 314 С-концевой части в кармане P6/7 находится гидрофобный остаток лейцина, благоприятствующий связыванию.

Для сравнения с аллелем риска HLA-DRB1\*15:01 также были получены кинетические кривые связывания HLA-DRB1\*15:01 с вирусным детерминантным пептидом pp65<sub>109-123</sub> структурного белка цитомегаловируса, миелиновым пептидом MBP<sub>85-97</sub> и созданным химерным пептидом pp65-MBP<sub>91-97</sub>, представляющий собой слитную конструкцию из N-концевой части pp65 и С-концевой части MBP<sub>85-97</sub> (**Рисунок 5**). Полученные данные показали, что все пептиды (Trx-[pp65], Trx-[pp65-MBP<sub>91-97</sub>] и Trx-[MBP<sub>85-97</sub>]) загружались на HLA-DRB1\*15:01 практически с одинаково высокой скоростью в присутствии HLA-DM.



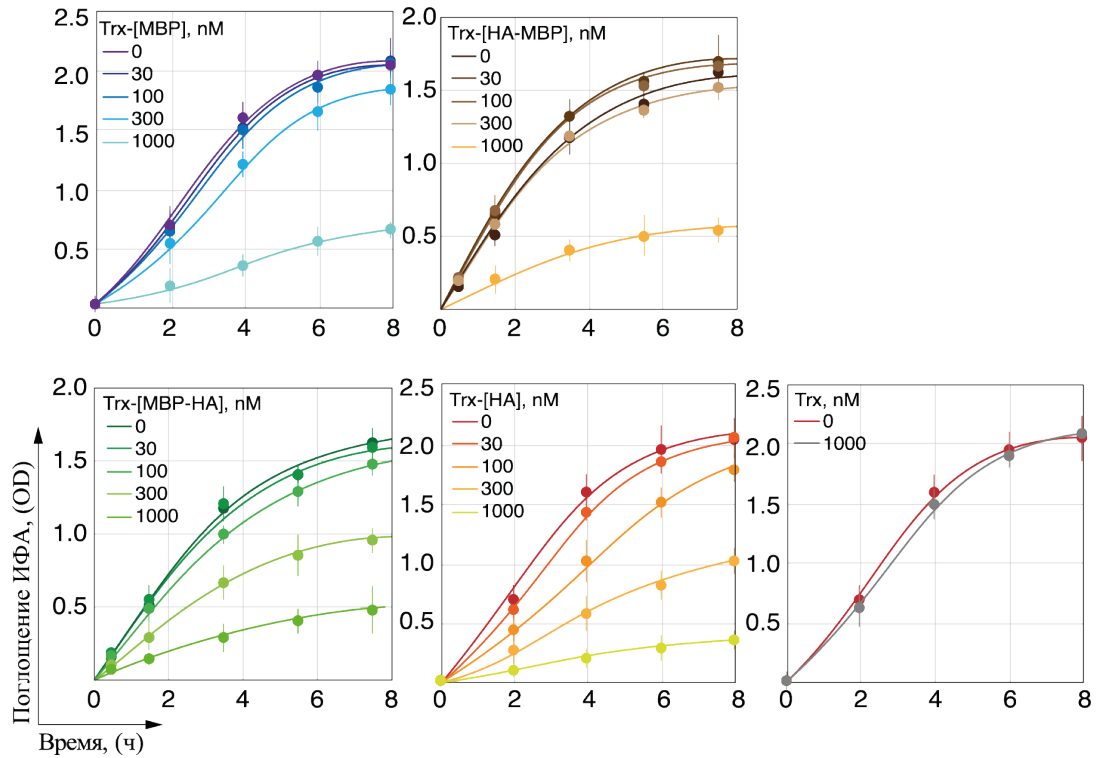
**Рисунок 5.** Кинетика связывания химерных пептидов (150 нМ), слитных с тиоредоксином, состоящих из N- и С-концевых частей pp65<sub>109-123</sub> (красный) и MBP<sub>85-97</sub> (синий) с HLA-DRB1\*15:01 (150 нМ) в присутствии (сплошные линии) или в отсутствие (пунктирные линии) HLA-DM (150 нМ). Измерено методом ИФА, визуализация: стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена. Якорные остатки указаны.

В отличие от HLA-DRB1\*01:01 у HLA-DRB1\*15:01 ключевым для связывания пептида является карман P4, куда идеально подходят ароматические аминокислотные остатки, а второстепенным является карман P1 с гидрофобными остатками в нем. Поэтому эффективность связывания вирусного, миелинового и химерного пептидов может быть объяснена наличием аминокислотных остатков, благоприятных для взаимодействия пептидов с пептид-связывающей бороздой HLA-DRB1\*15:01 и заполняющих важные для загрузки пептидов карманы P1 и P4: изолейцин 111 и тирозин 114 в случае pp65, валин 87 и фенилаланин 90 в случае MBP. Несмотря на то, что pp65 содержит в С-концевой части также пролин в кармане P6/7, он не уменьшает эффективность взаимодействия пептида с пептид-связывающей бороздой, так как в случае HLA-DRB1\*15:01 карманы P6/P7/P9 играют значительно меньшую роль, чем карман P4. Возможно, что для HLA-DRB1\*15:01 С-концевая часть пептида не имеет такого значения для связывания пептида, как для HLA-DRB1\*01:01. Разницу в скорости взаимодействия HA с HLA-DRB1\*01:01 и pp65 с HLA-DRB1\*15:01 примерно в 5 раз можно объяснить различиями в устройстве карманов и якорей между данными комплексами HLA-DR.

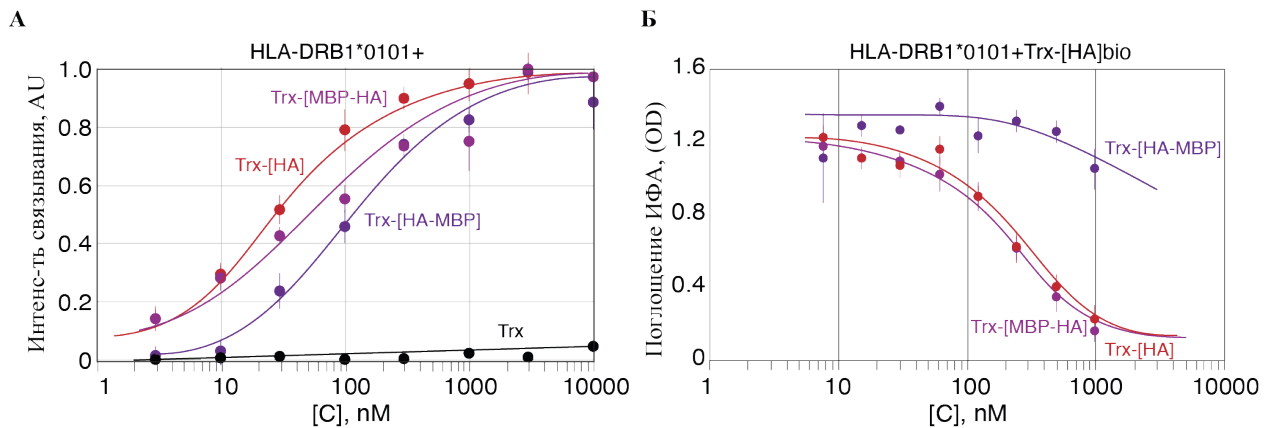
### **Конкуренция вирусных и миелиновых пептидов при загрузке на HLA-DR**

В связи с тем, что в поздних эндосомах антиген-презентирующих клеток образуются фрагменты не одного антигена, а целый набор пептидов различной природы, было необходимо понять, способны ли миелиновые пептиды с низкой скоростью загрузки на HLA-DRB1\*01:01 конкурировать с вирусными пептидами. Для этого были проведены эксперименты методом ИФА по изучению конкуренции за связывание с HLA-DRB1\*01:01 в присутствии HLA-DM.

В данных экспериментах сравнивались биотинилированные, слитные с тиоредоксином HA<sub>306-318</sub> (Trx-[HA]), MBP<sub>151-164</sub> (Trx-[MBP<sub>151-164</sub>]) или их химерные варианты MBP<sub>151-156</sub>-HA (Trx-[MBP<sub>151-156</sub>-HA]) и HA-MBP<sub>157-164</sub> (Trx-[HA-MBP<sub>157-164</sub>]) в возрастающих концентрациях 0, 30, 100, 300 и 1000 нМ в конкуренции с биотинилированным, слитным с тиоредоксином HA<sub>306-318</sub> (Trx-[HA]bio) (150 нМ) (**Рисунок 6**). Снижение сигнала ИФА показывает уменьшение количества связавшегося с HLA-DRB1\*0101 биотинилированного пептида HA, так как сигнал ИФА зависит от количества связавшегося биотинилированного пептида (проявка осуществлялась стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена).



**Рисунок 6.** Кинетика взаимодействия HLA-DRB1\*01:01 (150 нМ) и HLA-DM (150 нМ) с биотинилированным, слитным с тиоредоксином HA<sub>306-318</sub> (Trx-[HA]bio) (150 нМ) в присутствии увеличивающихся концентраций (0-1 мкМ) небитинилированных, слитных с тиоредоксином пептидов MBP<sub>151-164</sub> (Trx-[MBP]), HA<sub>306-311</sub>-MBP<sub>157-164</sub> (Trx-[HA-MBP]), MBP<sub>151-156</sub>-HA<sub>312-318</sub> (Trx-[MBP-HA]) и HA<sub>306-318</sub> (Trx-[HA]). Тиоредоксин (Trx) без пептида использовали в качестве отрицательного контроля. В моменты времени 8, 6, 4, 2 и 0 часов количество связанного Trx-[HA]bio определяли добавлением стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена.



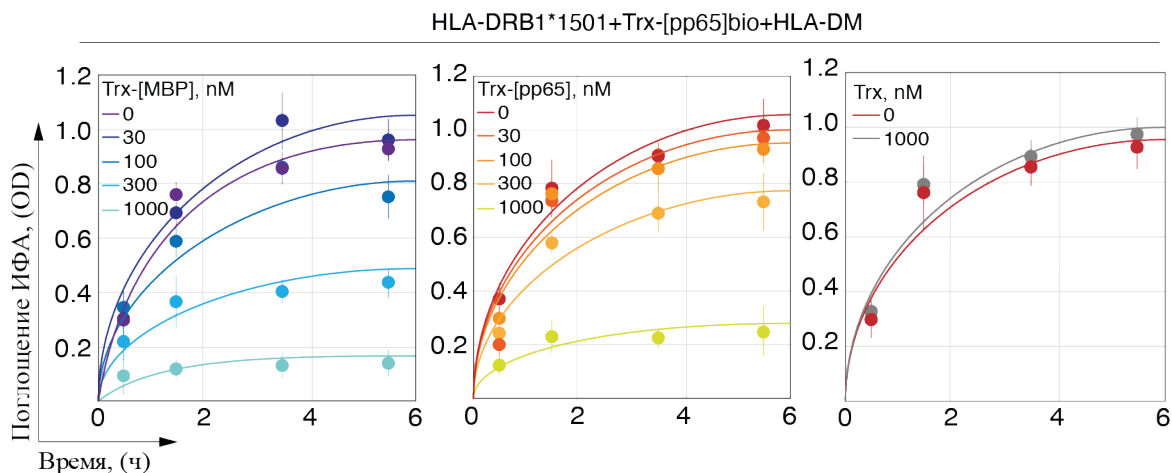
**Рисунок 7.** (А) DELFIA с определением флуоресценции с разрешением по времени взаимодействия слитных с тиоредоксином HA<sub>306-318</sub> и химерных пептидов, состоящих из N- и C-концевых частей HA<sub>306-318</sub> и MBP<sub>151-164</sub> (Trx-[MBP-HA] и Trx-[HA-MBP]), в разных концентрациях (3 нМ - 10 мкМ) с HLA-DRB1\*01:01 (5 нМ). (Б) ИФА взаимодействия HLA-DRB1\*01:01 (150 нМ) с биотинилированным, слитным с тиоредоксином HA<sub>306-318</sub> (Trx-[HA]bio) (150 нМ) в присутствии возрастающих концентраций (7,8 нМ - 1 мкМ) небитинилированных, слитных с тиоредоксином HA<sub>306-318</sub> (Trx-[HA]) и химерных пептидов, состоящих из N- и C-концевых частей HA<sub>306-318</sub> и MBP<sub>151-164</sub> (Trx-[MBP-HA] и Trx-[HA-MBP]). После 18 часов инкубации количество связанного Trx-[HA]bio определяли добавлением стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена.

Как видно из графиков, представленных на **Рисунках 6 и 7**, T<sub>гх</sub>-[MВР<sub>151-164</sub>] и T<sub>гх</sub>-[НА-MВР<sub>157-164</sub>] не смогли конкурировать с T<sub>гх</sub>-[НА]b<sub>ио</sub> до концентрации 1 мкМ, тогда как небитинилированные T<sub>гх</sub>-[НА] и T<sub>гх</sub>-[MВР<sub>151-156</sub>-НА] уменьшали связывание T<sub>гх</sub>-[НА]b<sub>ио</sub>, начиная с концентрации 100 нМ. В качестве отрицательного контроля тиоредоксин без пептида (T<sub>гх</sub>) в высокой концентрации 1 мкМ не конкурировал с T<sub>гх</sub>-[НА]b<sub>ио</sub>. Чтобы убедиться, что наблюдаемое различие было вызвано неподходящими остатками в положениях P6/P7 и P9 пептида MВР<sub>151-164</sub>, как было показано в случае кинетической дискриминации миелиновых и вирусных пептидов, была определена аффинность двух химерных пептидов T<sub>гх</sub>-[НА-MВР<sub>157-164</sub>] и T<sub>гх</sub>-[MВР<sub>151-156</sub>-НА] (**Рисунок 7А**) в сравнении с их способностью конкурировать с T<sub>гх</sub>-[НА]b<sub>ио</sub> за связывание HLA-DRB1\*01:01 (**Рисунок 7Б**). Наши данные свидетельствуют о том, что при сопоставимых термодинамических свойствах этих пептидов ингибирующая способность T<sub>гх</sub>-[НА-MВР<sub>157-164</sub>] минимум на порядок ниже, чем T<sub>гх</sub>-[НА] и T<sub>гх</sub>-[MВР<sub>151-156</sub>-НА]. В случае другого миелинового пептида MВР<sub>88-100</sub> были получены данные, схожие с результатами для MВР<sub>151-164</sub>.

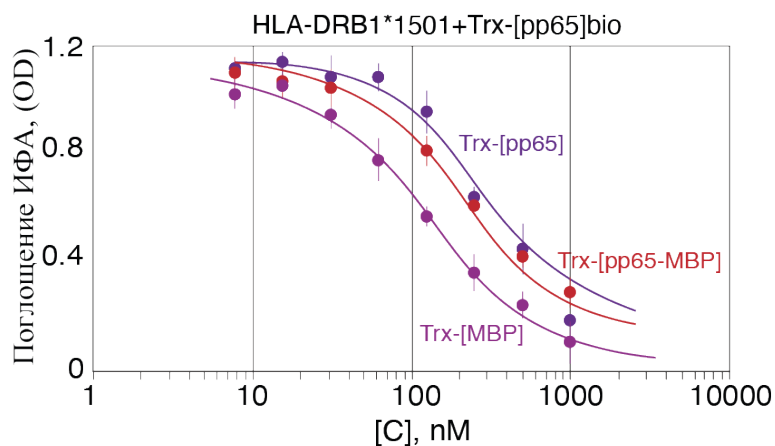
Кроме того, была проанализирована способность MВР<sub>85-97</sub> конкурировать с pp65<sub>109-123</sub> за связывание с HLA-DRB1\*15:01. Для этого HLA-DRB1\*15:01 инкубировали с HLA-DM и биотинилированным, слитным с тиоредоксином pp65<sub>109-123</sub> (T<sub>гх</sub>-[pp65]b<sub>ио</sub>) в присутствии возрастающих концентраций pp65<sub>109-123</sub> (T<sub>гх</sub>-[pp65]) или MВР<sub>85-97</sub> (T<sub>гх</sub>-[MВР<sub>85-97</sub>]) (**Рисунок 8**). Было показано, что T<sub>гх</sub>-[MВР<sub>85-97</sub>] способен конкурировать с T<sub>гх</sub>-[pp65]b<sub>ио</sub>, подобно небитинилированному T<sub>гх</sub>-[pp65], уменьшая связывание T<sub>гх</sub>-[pp65]b<sub>ио</sub>, начиная с концентрации 100 нМ. Термодинамическая ингибирующая способность T<sub>гх</sub>-[MВР<sub>85-97</sub>] сравнима с T<sub>гх</sub>-[pp65] и T<sub>гх</sub>-[pp65-MВР<sub>91-97</sub>] и даже больше (**Рисунок 9**), причем, IC<sub>50</sub> пептида MВР<sub>85-97</sub> в 3.3 раза меньше, чем у pp65, тем самым миелиновый пептид даже более конкурентоспособен вирусного.

Результаты данного и предыдущего разделов свидетельствуют о том, что связывание эпитопов MВР<sub>153-161</sub> и MВР<sub>88-100</sub> с HLA-DRB1\*01:01 неэффективно, особенно на первой стадии, поскольку карман P7 занят основным объемным остатком аргинина или структурно неблагоприятным пролином, соответственно, вместо высоко гидрофобного остатка лейцина. Следовательно, умеренное взаимодействие аминокислотных остатков миелиновых пептидов с карманами P6/7 и P9 в отличие от связывания пептида НА приводит к сбою процесса докинга даже высоко аффинных остатков в положениях P1 и P4, что в свою очередь приводит к диссоциации пептида и высвобождению пустого комплекса HLA-DM-HLA-DR (**Рисунок 10**). Тем самым, вирусный НА способен сильно конкурировать и вытеснять миелиновые пептиды из борозды HLA-DRB1\*01:01. В то время, как вирусный

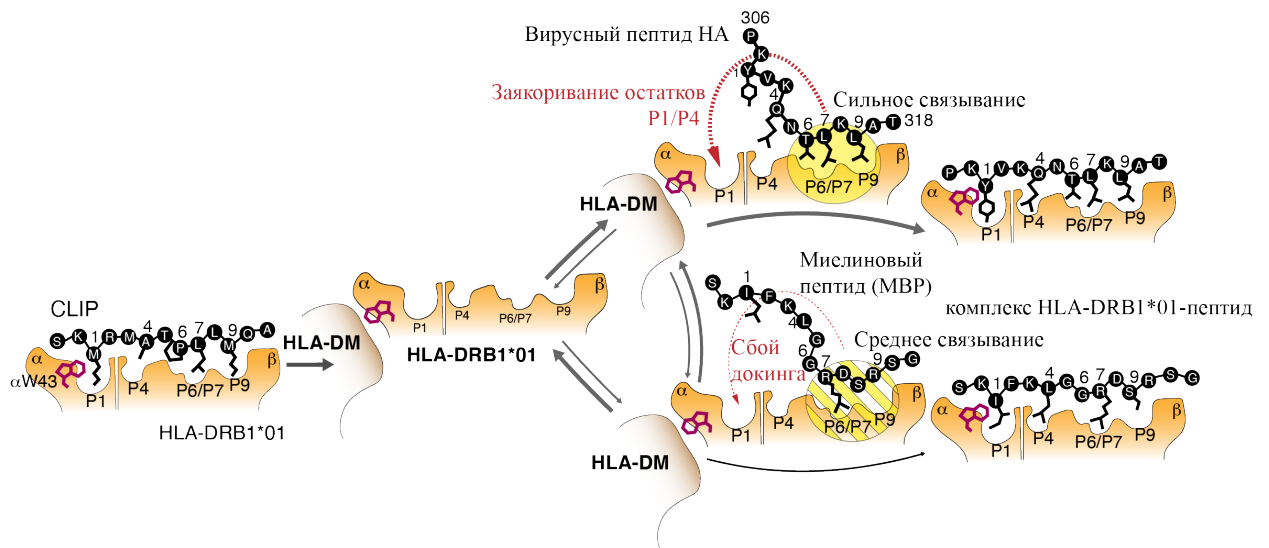
pp65 не способен конкурировать и заменять миелиновый пептид в комплексе с HLA-DRB1\*15:01, так как в определяющих средстве положения P1 и P4 находятся высокоаффинные аминокислотные остатки у обоих пептидов, а положения P6/P7/P9 не играют такой роли, как в случае HLA-DRB1\*01:01.



**Рисунок 8.** Кинетика взаимодействия HLA-DRB1\*15:01 (150 нМ) и HLA-DM (150 нМ) с биотинилированным, слитным с тиоредоксином pp65<sub>109-123</sub> (Trx-[pp65]bio) (150 нМ) в присутствии увеличивающихся концентраций (0-1 мкМ) небитинилированных, слитных с тиоредоксином пептидов MBP<sub>85-97</sub> (Trx-[MBP]) и pp65<sub>109-123</sub> (Trx-[pp65]). Тиоредоксин (Trx) без пептида использовали в качестве отрицательного контроля. В моменты времени 5,5, 3,5, 1,5, и 0,5 часа количество связанного Trx-[pp65]bio определяли добавлением стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена.



**Рисунок 9.** ИФА взаимодействия HLA-DRB1\*15:01 (150 нМ) с биотинилированным, слитным с тиоредоксином pp65<sub>109-123</sub> (Trx-[pp65]bio) (150 нМ) в присутствии возрастающих концентраций (7,8 нМ - 1 мкМ) небитинилированных, слитных с тиоредоксином MBP<sub>85-97</sub> (Trx-[MBP]), pp65<sub>109-114</sub>-MBP<sub>91-97</sub> (Trx-[pp65-MBP]) и pp65<sub>109-123</sub> (Trx-[pp65]). После 18 часов инкубации количество связанного Trx-[pp65]bio определяли добавлением стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена.



**Рисунок 10.** Молекулярный механизм кинетического отбора, опосредованного комплексом HLA-DM – HLA-DRB1\*01:01, который ограничивает загрузку аутоантигенных пептидов. Высвобождение CLIP сопровождается образованием комплекса HLA-DM – HLA-DRB1\*01:01, где триптофан 43 α-цепи HLA связывается HLA-DM. Миелиновые и экзогенные (вирусный HA в качестве репрезентативного примера) пептиды конкурируют друг с другом за связывание этого бимолекулярного комплекса с использованием остатков P6/P7 и P9. Умеренное связывание полярных остатков P6/P7 и P9 в миелиновых пептидах в отличие от гидрофобных якорей в пептиде HA не обеспечивает достаточно времени для остатков P1 и P4, чтобы атаковать соответствующий карман для полного докинга.

Если обратиться к физиологической составляющей изучаемых процессов, то важно отметить, что в профессиональных антиген-презентирующих клетках в лизосомальных компартментах присутствуют различные антигены, как собственные, так и чужеродные. Окончательная презентация антигенных пептидов Т-лимфоцитам с помощью МНС II может достигаться не сразу, а лишь после последовательного связывания различных пептидов, что приводит к презентации наиболее аффинного и быстро связывающегося пептида на поверхности антиген-презентирующих клеток. Поскольку время загрузки HLA класса II в позднюю эндосому ограничено несколькими часами, низкая скорость связывания пептидов становится более критичной, чем высокая аффинность их взаимодействий, что приводит к неспособности конкурировать с пептидами, имеющими быструю кинетику и даже более низкую аффинность. По этой причине пептид HA полностью блокирует загрузку миелиновых пептидов на протективный HLA-DRB1\*01:01 в эквимольной концентрации. Таким образом, маловероятно, что фрагменты миелина будут представлены в комплексе с HLA-DRB1\*01:01 на поверхности антиген-презентирующих клеток с достаточной плотностью, необходимой для активации Т-клеточного ответа. Тем более, что в предыдущем разделе не было детектировано достаточное количество С-концевого миелинового пептида среди пептидов, связанных с

HLA, экспонированными на поверхности дендритных клеток. По-видимому, протективные свойства аллеля HLA-DRB1\*01 могут быть напрямую связаны со способностью HLA-DRB1\*01:01 кинетически различать миелиновые и экзогенные пептиды. С другой стороны, продукт аллеля риска HLA-DRB1\*15:01 способен быстро презентировать фрагмент миелина даже в конкуренции с экзогенными пептидами, такими как вирусный pp65, что делает его фактором риска РС.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сумма полученных данных обеспечивает новый вектор оптимизации пептидных лигандов с точки зрения кинетической дискриминации антигенов HLA класса II. Как видно из **Рисунка 10**, кинетическая компонента презентации играет существенную роль в процессе активации иммунного ответа. Конкуренция фрагментов аутоантигенов и вирусных пептидов может иметь существенное значение в запуске аутоиммунного процесса. Дальнейшие исследования должны определить, может ли предполагаемый молекулярный механизм загрузки антигенного пептида на МНС II, предлагающий этап кинетической дискриминации, иметь более общее значение в вопросе защиты людей от аутоиммунных реакций наряду с центральной толерантностью, установленной во время отрицательного отбора пролифилирующих Т-клеток в тимусе.

## ВЫВОДЫ

1. Получены рекомбинантные белки и пептиды, участвующие в процессе распознавания и презентации аутоантигенов при рассеянном склерозе. В результате экспрессий стабильных клеточных линий культуры *S2 Drosophila melanogaster* были получены аллельные варианты главного комплекса гистосовместимости второго класса HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*15:01; с использованием клеток линии HEK293F был экспрессирован и далее очищен HLA-DM; пептиды библиотеки эпитопов MBP, а также вирусные, миелиновые с точечными заменами и химерные пептиды, слитные с тиоредоксином, были экспрессированы в клетках *E. coli* BL21 (DE3) и далее очищены. Выходы HLA-DR, HLA-DM и пептидов составили около 1 мг, 24 мг и 10 мг с литра среды, соответственно, с чистотой не менее 95%.
2. Идентифицированы миелиновые пептиды, способные связываться протективным HLA-DRB1\*01:01. В результате отбора фрагментов MBP из библиотеки эпитопов было показано, что HLA-DRB1\*01:01 специфически связывал С-концевой пептид MBP<sub>146-170</sub> и менее эффективно MBP<sub>130-156</sub>, MBP<sub>81-104</sub> и MBP<sub>65-92</sub>. HLA-DRB1\*15:01

специфически распознавал энцефалитогенный пептид MBP<sub>81-104</sub> и менее эффективно MBP<sub>25-54</sub> и MBP<sub>130-156</sub>. Были определены эпитопы связывания MBP<sub>81-104</sub> и MBP<sub>146-170</sub> с HLA-DRB1\*01:01: 90-98 и 153-161, соответственно.

3. Высказана гипотеза и получены экспериментальные данные о роли кинетического аспекта в процессе представления аутоантигенов при рассеянном склерозе. При сравнимых значениях  $K_D$  миелиновые пептиды MBP<sub>146-170</sub> и MBP<sub>88-100</sub> связывались с HLA-DRB1\*01:01 со скоростью, минимум в 4 раза меньшей по сравнению с вирусным пептидом HA, а также по сравнению с MBP<sub>85-97</sub> и вирусным pp65 в контексте HLA-DRB1\*15:01. Было продемонстрировано, что HLA-DRB1\*01:01 кинетически дискриминировал вирусный и миелиновые пептиды, причем ключевую роль в разнице в скорости связывания пептидов играет строение С-концевой части. Кроме того, было показано, что миелиновые пептиды не способны конкурировать с вирусным за связывание с протективным HLA-DRB1\*01:01, однако миелиновый пептид MBP<sub>85-97</sub> более конкурентоспособный вирусного пептида в связывании с HLA-DRB1\*15:01.
4. Весьма вероятно, что миелиновый пептид не презентуется протективным HLA-DRB1\*01:01 на поверхности дендритных клеток, что в свою очередь не активирует Т-клеточный ответ. В случае нормального индивидуума с гетерозиготным генотипом HLA-DRB1\*01:01/\*15:01 было продемонстрировано, что в результате анализа LC-MS/MS пептид MBP<sub>146-170</sub> не был обнаружен среди пептидов, связанных с HLA, экспонированными на поверхности дендритных клеток, а также не активировал пролиферацию CD4-позитивных Т-клеток в результате анализа при помощи красителя CFSE и цитофлуориметрии.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи:

1. Mamedov A.E., Ponomarenko N.A., Belogurov A.A. Jr, Gabibov A.G. Heterodimer HLA-DM Fused with Constant Fragment of the Heavy Chain of the Human Immunoglobulin Accelerates Influenza Hemagglutinin HA<sub>306-318</sub> Loading to HLA-DR1. Bull Exp Biol Med. 2016 May; 161(1):92-5. Epub 2016 Jun 6.
2. А.Э. Мамедов, М. Ю. Захарова, О. О. Фаворова, О. Г. Кулакова, А. Н. Бойко, В. Д. Кнорре, Н. А. Воробьева, Е. Н. Хурс, И. С. Киселев, Н. М. Баулина, академик РАН А. Г. Габиров, А. А. Белогуров. Скорость загрузки чужеродных и аутоантигенных детерминант на главный комплекс гистосовместимости второго класса опосредует



резистентность к развитию рассеянного склероза. Доклады академии наук, 2019, том 485, №2, с. 113 – 116.

3. Azad Mamedov, Nadezhda Vorobyeva, Ioanna Filimonova, Maria Zakharova, Ivan Kiselev, Vitalina Bashinskaya, Natalia Baulina, Alexey Boyko, Alexander Favorov, Olga Kulakova, Rustam Ziganshin, Ivan Smirnov, Alina Poroshina, Igor Shilovskiy, Musa Khaitov, Yuri Sykulev, Olga Favorova, Valentin Vlassov, Alexander Gabibov and Alexey Belogurov Jr. Protective Allele for Multiple Sclerosis HLA-*DRB1*\*01:01 Provides Kinetic Discrimination of Myelin and Exogenous Antigenic Peptides. *Front Immunol*, 10, 3088, 2020 Jan 17.

#### **Тезисы докладов на конференциях:**

1. A. Mamedov, N. Vorobyova, O. Favorova, A. Belogurov Jr. Molecular mechanisms of presentation of autoantigenic peptides on MHC class II, catalyzed by HLA-DM. 43<sup>rd</sup> Конгресс FEBS, 2018, Прага, Чехия.
2. Azad Mamedov, Nadezhda Vorobyeva, Ioanna Filimonova, Maria Zakharova, Ivan Kiselev, Vitalina Bashinskaya, Natalia Baulina, Alexey Boyko, Alexander Favorov, Olga Kulakova, Rustam Ziganshin, Ivan Smirnov, Yuri Sykulev, Olga Favorova, Alexander Gabibov, Alexey Belogurov Jr. Protective allele for multiple sclerosis HLA-*DRB1*\*01:01 provides kinetic discrimination of myelin and exogenous antigenic peptides. Симпозиум по программе «Фольксваген», 2019, Дрезден, Германия.
3. A. Mamedov, M. Zakharova, I. Kiselev, O. Kulakova, O. Favorova, A. Gabibov, A. Belogurov Jr. The MHC II allele HLA-*DRB1*\*01:01, known as a protective for multiple sclerosis, presents peptide fragments of myelin and exogenous antigenic peptides with different velocity and efficiency. 44<sup>th</sup> Конгресс FEBS, 2019, Краков, Польша.
4. Мамедов А.Э., Захарова М.Ю., Фаворова О.О., Кулакова О.Г., Бойко А.Н., Кнорре В.Д., Воробьева Н.А., Хурс Е.Н., Киселев И.С., Баулина Н.М., Габибов А.Г., Белогуров А.А. Особенности презентации миелиновых аутоантигенов на комплексах гистосовместимости второго класса, катализируемой HLA-DM. VI Съезд биохимиков России, 2019, Дагомыс-Сочи, Россия.