

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
академик РАН, профессор, д.х.н. Габибов А.Г.

Москва - 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
1. АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ.....	6
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
2.1. Структура МНС	11
2.2. Презентация антигена	16
2.3. Роль HLA-DM	22
2.4. Рассеянный склероз.....	27
2.4.1. Эпидемиология и нейропатология рассеянного склероза.....	27
2.4.2. Иммунология рассеянного склероза.....	31
2.4.3. Терапия рассеянного склероза	37
2.4.4. Аутоантигены рассеянного склероза.....	38
2.4.5. Отрицательная селекция Т-клеток в тимусе, как способ протективности против развития аутоиммунных заболеваний	40
2.5. Ассоциация аллелей гена HLA-DRB1 с рассеянным склерозом	43
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
3.1. Химические реактивы, буферные растворы и сопутствующие материалы.....	45
3.2. Методы работы с клетками бактерий.....	47
Получение электрокомпетентных клеток бактерий.....	47
Трансформация клеток E.coli методом электропорации	47
Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для клональной селекции	48
3.3. Методы работы с нуклеиновыми кислотами	48
Аmplификация фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции	48
Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции	49
Лигирование фрагментов ДНК	49
Выделение плазмидной ДНК	49
Электрофорез ДНК в агарозном геле	50
Электрофорез ДНК в полиакриламидном геле	50
Электроэлюция фрагментов ДНК из геля.....	51
Секвенирование плазмидной ДНК	51
3.4. Создание генетических конструкций	51
pMT-V5/His_DRA, pRmHa_DRB1_0101 и pRmHa_DRB1_1501 для экспрессии HLA-DRB1*01:01 и HLA-DRB1*15:01	51
pRmHa_DRB1_0101_CLIP и pRmHa_DRB1_1501_CLIP для экспрессии HLA-DRB1*01:01 и HLA-DRB1*15:01 с CLIP	52

pMT-V5/His_DRA_Fos_Avitag, pRmHa_DRB1_0101_Jun, pRmHa_DRB1_0101_CLIP_Jun, pRmHa_DRB1_1501_Jun и pRmHa_DRB1_1501_CLIP_Jun	53
HLA-DM	53
pGEM5zf_DMA в качестве промежуточной стадии для сборки α -цепи HLA-DM	53
pGEM5zf_DMB в качестве промежуточной стадии для сборки β -цепи HLA-DM	54
pFUSE_Fc_myc_Avitag, pFUSE_lh_Fc_myc_Avitag, pFUSE_Fc_FLAG и pFUSE_lh_Fc_FLAG в качестве системы экспрессии	54
pFUSE_DMA_Fc_myc_Avitag, pFUSE_DMA_N165D_Fc_myc_Avitag, pFUSE_DMB_Fc_FLAG и pFUSE_DMB_N92D_Fc_FLAG для экспрессии HLA-DM....	55
pFUSE_DMA_lh_Fc_myc_Avitag, pFUSE_DMA_N165D_lh_Fc_myc_Avitag, pFUSE_DMB_lh_Fc_FLAG и pFUSE_DMB_N92D_lh_Fc_FLAG для экспрессии HLA- DM с удлиненным hinge	56
pET32bCH_Per_Trx для экспрессии пептидов, слитных с тиоредоксином.....	56
3.5. Методы работы с эукариотическими клетками.....	58
Поддержание в культуре и разгон эукариотических клеток гибридомы L243	58
Поддержание в культуре и разгон эукариотических клеток насекомых <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i> линии S2	58
Поддержание в культуре и разгон эукариотических клеток линии HEK293F	59
Приготовление музея эукариотических клеток.....	59
Выведение линии эукариотических клеток из заморозки.....	59
Трансфекция и отбор стабильных клеточных линий эукариотических клеток насекомых <i>Drosophila melanogaster</i> линии S2	59
Трансфекция эукариотических клеток линии HEK293F	60
3.6. Хроматографические методы работы с белками.....	61
Выделение и очистка антител L243	61
Выделение и очистка HLA-DR.....	61
Выделение и очистка HLA-DM.....	62
Выделение и очистка пептидов, слитных с тиоредоксином	62
3.7. Аналитические методы работы с белками.....	64
Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле.	64
Окрашивание полиакриламидного геля	64
Иммуноблоттинг.....	64
Иммуноферментный анализ	65
Иммуноферментный анализ экспрессии вариантов HLA-DM.....	65
Иммуноферментный анализ связывания пептидов HLA-DR и определение константы диссоциации	66
Иммуноферментный анализ кинетики загрузки пептидов на HLA-DR.....	66
3.8. Методы работы с материалом пациентов с рассеянным склерозом и здоровых индивидов.....	67

Пациенты и контроли.....	67
Генотипирование и статистический анализ.....	68
Подготовка дендритных клеток человека и идентификация связавшихся пептидов.....	68
Анализ LC-MS/MS и анализ данных.....	69
Анализ пролиферации Т-клеток с помощью CFSE.....	69
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	71
4.1. Генетическая ассоциация вариантов гена HLA-DRB1 с рассеянным склерозом	71
4.2. Получение HLA-DR и HLA-DM и подбор условий кинетического анализа загрузки пептида на HLA-DR.....	77
4.3. Отбор фрагментов MBP из библиотеки и определение эпитопов для HLA-DRB1*01:01.....	86
4.4. Определение констант диссоциации и кинетики связывания HLA-DRB1*01:01 с вирусным пептидом HA и фрагментами MBP.....	90
4.5. Влияние С-концевой части пептида на скорость загрузки на HLA-DR.....	93
4.6. Конкуренция вирусных и миелиновых пептидов при загрузке на HLA-DR.....	99
4.7. Анализ активации Т-клеток при добавлении С-концевого миелинового пептида.	108
5. ВЫВОДЫ.....	112
6. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	114
7. ПРИЛОЖЕНИЕ.....	128

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПК – антиген-презентирующая клетка
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ДК – дендритная клетка
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА – иммунно-ферментный анализ
МК – моноклеарная клетка
НК – натуральный киллер
ПААГ – полиакриламидный гель
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РС – рассеянный склероз
ЦНС – центральная нервная система
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭПР – эндоплазматический ретикулум
CDR – участок, определяющий комплементарность
CFSE – карбоксифлуоресцеин сукцинимидил эфир
CI – доверительный интервал
CMV – цитомегаловирус
DMSO – диметилсульфоксид
EAE – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит
EBV – вирус Эпштейн-Барр
FBS – эмбриональная бычья сыворотка
Fc – кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина
FVD – краситель жизнеспособности клеток
GA – глатирамера ацетат
GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
HLA – лейкоцитарный антиген человека
IFN – интерферон
Ig – иммуноглобулин
IL – интерлейкин
IPTG - изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
LC – жидкостная хроматография
MBP – основной белок миелина
MHC – главный комплекс гистосовместимости
MOG – миелин-олигодендроцитарный гликопротеин
MS – масс-спектрометрия
OR – отношение шансов
PBS – фосфатно-солевой буфер
PE – фикоэритрин
PMSF – фенилметилсульфонил фторид
PPMS – первично-прогрессирующий РС
RRMS – ремиттирующий РС
SDS – додециосульфат натрия
SPMS – вторично-прогрессирующий РС
TCR – Т-клеточный рецептор
Th – Т-хелпер
TNF – фактор некроза опухоли
Tx – тиоредоксин

1. АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

На сегодняшний день известно почти 100 заболеваний человека с аутоиммунной этиологией, и ожидается, что этот список будет расти в ближайшие десятилетия (1). 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 (2). 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 (3). РС, как и другие аутоиммунные патологии, представляют 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 (4). 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 рассеянного склероза (5). 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 МНС 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 МНС II влияет на предрасположенность к тому или иному аутоиммунному заболеванию, до сих пор неясны. Тем более непонятны и механизмы протективности разных аллелей HLA-*DRB1*.

Структурное определение релевантных для заболевания комплексов пептид-HLA и HLA-пептид-TCR имеет важное значение для выяснения молекулярных механизмов, ответственных за развитие специфического защитного иммунитета против патогенов, а также за аутореактивность Т-клеток, которая способствует заболеванию. Предполагается, что взаимодействия HLA-пептид-TCR, которые лежат в основе дискриминации «своего» и

«чужого», руководствуются набором правил, которые нарушаются в иммунопатологии. Изучение более 50 различных структур комплекса HLA-пептид-TCR позволило предположить, что существуют определенные принципы, которые регулируют ограничение HLA и геометрию докинга TCR, но они не жесткие и изменчивы: вместо обычной центральной геометрии докинга TCR в заболевании участвует целый ряд молекулярных механизмов, которые влияют на взаимодействия HLA-пептид-TCR, представляющие особый интерес в контексте различных аутоиммунных заболеваний. Общей особенностью этих заболеваний является повреждение ткани, которое обуславливается аутореактивными Т-клетками, которые избегают как отрицательной селекции в тимусе, так и периферических механизмов толерантности. Тем не менее, еще предстоит определить, генерируются и активируются ли аутореактивные Т-клетки непосредственно с помощью механизмов, таких как атипичная ориентация связывания HLA-пептид-TCR, низкоаффинное связывание пептидов, которое способствует выходу из тимуса, опосредованная TCR стабилизация слабого взаимодействия пептид-HLA и представление пептидов в другом регистре связывания. Другие механизмы, которые могут генерировать и активировать аутореактивные Т-клетки, вероятно, обусловлены вариацией эпитопа, включая молекулярную мимикрию, посттрансляционную модификацию эпитопа, включение низкомолекулярных соединений и генерацию гибридных пептидов, а также процессы, которые регулируют экспрессию и стабильность HLA. Однако изучение механизмов аутоиммунитета на сегодняшний день сконцентрировано на нарушениях в формировании тримолекулярного комплекса, 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 патологий. 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.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Главный комплекс гистосовместимости (МНС; человеческий лейкоцитарный антиген (HLA)) представляет собой высокополиморфную область на шестой хромосоме человека с генами, кодирующими молекулы МНС, которые играют фундаментальную роль в иммунной системе и при аутоиммунных заболеваниях (**Рисунок 2.1**) (6). МНС впервые привлекли внимание в контексте исследований трансплантации тканей и органов, которые показали, что этот локус участвовал в принятии и отторжении трансплантата (гистосовместимость). Семейство генов МНС разделяют на три класса: МНС I, МНС II и МНС III (7).

МНС класса I (МНС I) экспрессируются в большинстве ядродержащих клеток, где они представляют в основном эндогенные пептиды на поверхности клетки эффекторным клеткам, таким как CD8 T-клетки (цитотоксические T-лимфоциты). Представленный пептидный репертуар может быть получен из экспрессируемых собственных белков или микробных белков в случае инфицированной клетки. Представление пептида, полученного из патогена, молекулой МНС класса I эффекторной клетке позволяет распознавать и убивать инфицированную клетку, тогда как представление собственного пептида индуцирует толерантность (8).

МНС класса II (изотипы человека HLA-DR, -DQ и -DP) (МНС II) представлены на специализированных антиген-презентирующих клетках (АПК), таких как макрофаги, дендритные клетки и В-клетки. При инфекции молекулы МНС II представляют экзогенные пептиды CD4 T-клеткам, полученным из внеклеточных патогенов. После распознавания патогенных пептидов CD4 T-клетки активируют и направляют другие иммунные клетки в место воспаления и, следовательно, играют решающую роль в инициации адекватного иммунного ответа. Недостаточная экспрессия молекул МНС класса II приводит к тяжелому иммунодефициту с дефектами как клеточного, так и гуморального иммунитета, вызывающими чрезвычайную уязвимость к инфекциям (9). Генетическая восприимчивость ко многим аутоиммунным заболеваниям, включая рассеянный склероз, диабет I типа и ревматоидный артрит, напрямую связана с локусом МНС II (10,11). Как молекулы МНС класса I, так и класса II демонстрируют обширные полиморфизмы последовательностей, особенно в пептид-связывающей области, позволяющей связываться различным типам пептидов (12).

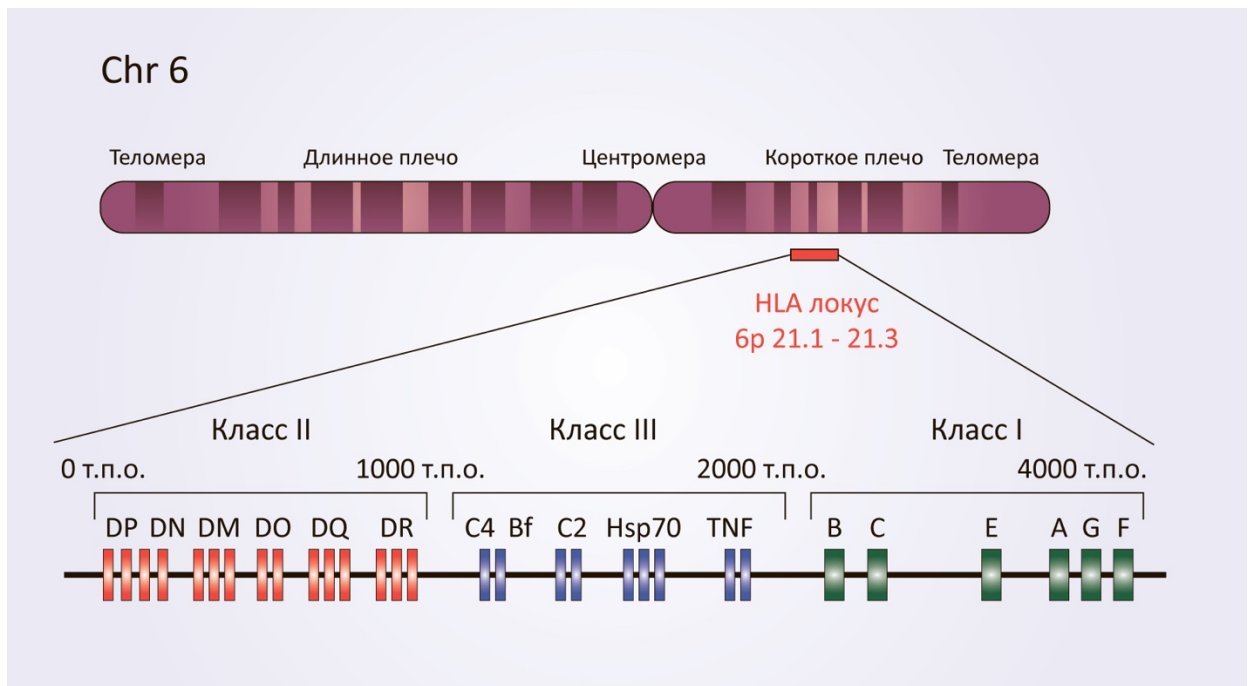


Рисунок 2.1. Схематическое изображение локуса HLA на шестой хромосоме человека. Область HLA расположена на коротком плече шестой хромосомы от бp21.1 до p21.3 и обозначена красной полосой. Показана протяженность генов класса II (красный), класса III (синий) и класса I (зеленый), которая простирается от центромерного до теломерного концов. Область класса II включает гены для α - и β -цепей молекул MHC класса II HLA-DR, -DP и -DQ. Кроме того, гены, кодирующие цепи $DM\alpha$ и $DM\beta$, и гены, кодирующие α и β -цепи молекулы DO ($DO\alpha$ и $DO\beta$, соответственно), также расположены в области MHC класса II (13).

Область MHC III, также называемая центральной MHC, поскольку она окружена центромерными генами MHC II и теломерными MHC I, является менее полиморфной и кодирует семейства белков, участвующих в различных аспектах врожденного иммунитета: белки системы комплемента (C2, C4 и фактор B), воспалительные цитокины (например, фактор некроза опухоли TNF) и белки теплового шока (например, Hsp70), а также некоторые белки, непосредственно не вовлеченные в иммунную систему (14).

2.1. Структура МНС

Молекулы МНС II представляют собой гетеродимеры, состоящие из α - и β -цепей, которые нековалентно связаны и имеют одинаковый размер примерно со 190 аминокислотными остатками в каждой. Обе цепи представляют собой трансмембранные белки типа I, которые однократно пронизывают мембрану и имеют C-концевой цитозольный и N-концевой внеклеточный домены. Внешняя часть каждой цепи содержит два домена - $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\beta 1$, $\beta 2$ соответственно (**Рисунок 2.2Б**). Мембранно-проксимальные домены ($\alpha 2$, $\beta 2$) демонстрируют структурное сходство с доменами иммуноглобулина, тогда как мембранно-дистальные домены ($\alpha 1$, $\beta 1$) плотно упаковываются вместе и образуют пептид-связывающую борозду. Эта открытая борозда, где пептид может связываться, состоит из «платформы», образованной антипараллельным бета-листом, состоящим из восьми β -слоев (четыре из домена $\alpha 1$ и четыре из домена $\beta 1$), и двух α -спиралей (по одной от каждого домена) по бокам борозды (**Рисунок 2.2Г**) (15).

Трехмерная структура молекулы МНС II внешне очень похожа на молекулу МНС I, хотя структура субъединиц различается, поскольку молекула МНС I состоит из α -цепи, разделенной на домены $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$, и $\beta 2$ -микроглобулина. Домены $\alpha 1$ и $\alpha 2$ образуют пептид-связывающую борозду, а $\alpha 3$ – структурный иммуноглобулин-подобный домен (**Рисунок 2.2А**). Основное структурное и функциональное различие между молекулами МНС I и II заключается в концах пептид-связывающей борозды (**Рисунки 2.2В, Г**). В молекуле МНС I концы пептида прочно связаны несколькими связями с кластерами консервативных аминокислотных остатков каждого конца борозды, и типичная длина пептида составляет 8-10 аминокислотных остатков. Для сравнения, пептиды, связанные с молекулой МНС II, выходят за пределы борозды и обычно имеют длину 13 аминокислот или более. Длина связанных пептидов не ограничена, и было показано, что частично развернутые белки связываются с молекулами МНС II через пептид-связывающую борозду (16). Однако вполне вероятно, что белки и более длинные пептиды процессируются протеазами до длины в 13-17 аминокислотных остатков.

Поскольку молекулы МНС должны представлять пептиды с различными последовательностями, возникающими из широкого спектра патогенов, их схемы связывания должны быть совершенно отличны от рецепторов, которые связывают только один специфический пептид. Таким образом, с одной стороны, связывающая борозда должна быть нацелена на общие пептидные признаки для размещения различных пептидов, а с другой стороны, должна создавать сильные и специфические взаимодействия, чтобы сформировать длительный индивидуальный комплекс. Следовательно, пептиды связаны в

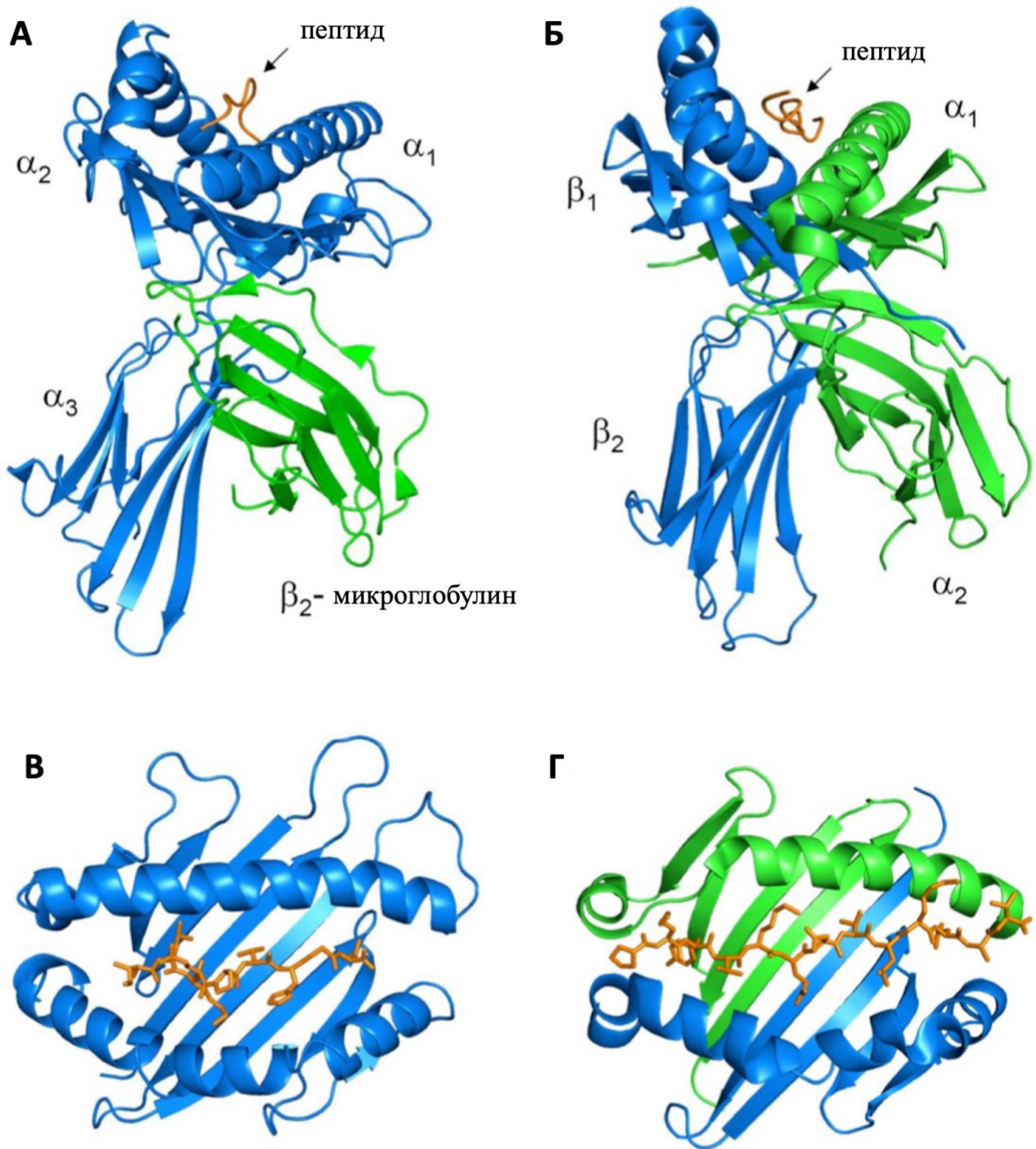


Рисунок 2.2. Сравнение белковых структур молекул МНС класса I и класса II. (А) Трехмерная структура молекулы МНС I с пептидом, состоящей из α -цепи (синий) и β_2 -микροглобулинового домена (зеленый). (Б) Трехмерная структура молекулы МНС II с пептидом, состоящей из α -цепи (зеленый) и β -цепи (синий). (А, Б) Отмечены разные домены белка. (В, Г) Пептид-связывающая борозда молекул МНС состоит из β -листа, образующего основание, и двух α -спиралей, фланкирующих пептид. Пептиды показаны от N-конца к C-концу. Пептид-связывающая борозда образована только α -цепью (синий) для молекулы МНС I (В) и α - (зеленый) и β -цепями (синий) для молекулы МНС II (Г). Пептид

выделен оранжевым цветом. Для отображения моделей молекул МНС I и МНС II были использованы структуры A2 (PDB: 3HLA) и DR1 (PDB: 1DLH), соответственно.

вытянутой ориентации, что обеспечивается двумя основными взаимодействиями между пептидом и молекулой МНС.

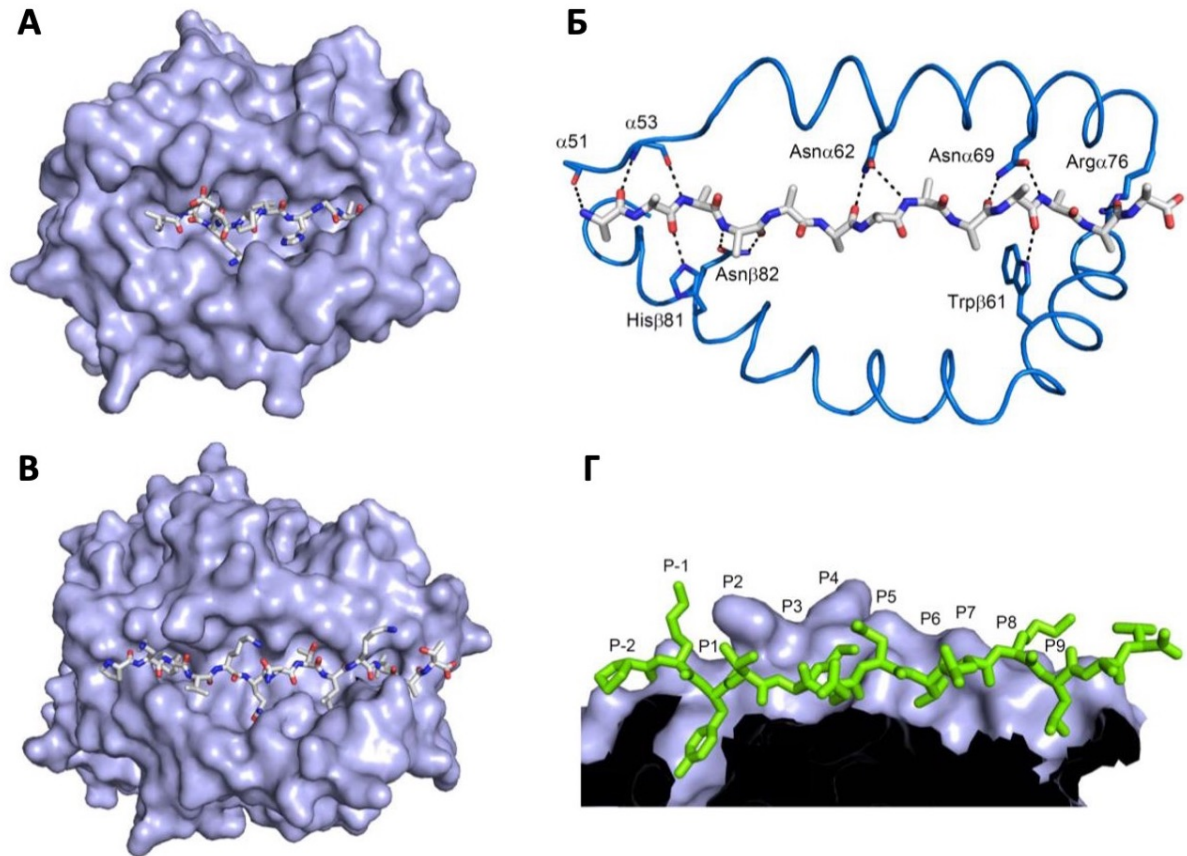


Рисунок 2.3. Сравнение пептид-связывающей борозды молекул МНС I и МНС II и основные взаимодействия пептида с МНС II. (А, В) Виды сверху пептид-связывающих борозд молекул МНС I (А) и МНС II (В). Пептид-связывающая борозда молекулы МНС I закрыта на обоих концах, тогда как в пептид-связывающей борозде молекулы МНС II пептидные концы выступают с обеих сторон. (Б, Г) Два основных взаимодействия между пептидом и молекулой МНС II представляют собой сеть консервативных водородных связей (Б) и ряд карманов, заполненных боковыми аминокислотными остатками пептида (Г). (Б) Вид сверху α -спиралей α - (вверху) и β -цепей (внизу) (синий) и пептида (серый) от N-конца к C-концу. (Г) Поперечное сечение пептид-связывающей борозды молекулы МНС II (синий) с пептидом (зеленый). Указаны положения пептида P(-2)-P9. Модели молекул МНС I и МНС II были получены с использованием структур A2 (PDB: 3HLA) и DR1 (PDB: 1DLH), соответственно.

Во-первых, набор консервативных водородных связей между аминокислотными остатками молекулы МНС и пептидной основной цепью фиксирует пептид вдоль борозды. В случае молекул МНС II консервативные аминокислоты доменов $\alpha 1$ (Phe51, Ser53, Asn62, Asn69 и Arg76) и $\beta 1$ (Trp61, His81 и Asn82) образуют 12 водородных связей с главной цепью пептида, шесть из которых расположены близко к N-концу, две – к средней части и четыре – к C-концу пептида (**Рисунок 2.3Б**). Вторым основным вкладом в связывание и выравнивание пептидов является сильное взаимодействие пептидных остатков с небольшими и глубокими карманами молекулы МНС (**Рисунки 2.3А, В**). Остатки пептидов входят в эти карманы и частично или полностью окружены аминокислотными остатками МНС. Остатки пептидов, находящиеся в глубоких карманах, особенно важны, так как они обеспечивают якорные положения для пептида вдоль борозды связывания. Для молекул МНС I и МНС II связывающие карманы расположены в фиксированных положениях борозды. Следовательно, для эффективного связывания пептиды должны содержать якорные остатки в соответствующих положениях. Для МНС II карманы связывания находятся в положениях P1, P4, P6 и P9 (**Рисунок 2.3Г**).

Поскольку аминокислоты, которые образуют связывающие карманы, очень полиморфны, размер полости может варьироваться между различными аллелями МНС. Эта дивергенция приводит к предпочтительному связыванию молекул МНС для разных пептидов. Напротив, остатки МНС, которые образуют сеть водородных связей между пептидом и молекулами МНС, являются высоко консервативными, и, поскольку они взаимодействуют с основной цепью, а не с боковыми цепями пептида, эти взаимодействия одинаковы для большинства пептидов.

Одним из первых полученных и разрешенных кристаллографически комплексов МНС II с пептидом стал HLA-DR1 с антигенным пептидом HA₃₀₆₋₃₁₈ гемагглютинаина вируса гриппа (**Рисунок 2.4**). Карман P1 является наиболее важным для связывания антигена, он наиболее крупный среди других карманов, что позволяет связывать ароматические аминокислотные остатки, например, тирозин в случае HA. Остальные карманы меньше P1 и менее гидрофобны, тем самым они определяют специфичность связывания различных пептидов с HLA-DR1, особенно карман P6, в котором связывается небольшой треонин в случае HA (17).

Пептид является неотъемлемой частью молекулы МНС, поскольку он стабилизирует структуру. В отсутствие связанного пептида или шаперонов молекулы МНС I и МНС II легко агрегируют. Это гарантирует, что только стабильные комплексы МНС-пептид транспортируются к поверхности клетки, и молекулы МНС представляют пептиды, которые были процессированы внутри клетки.

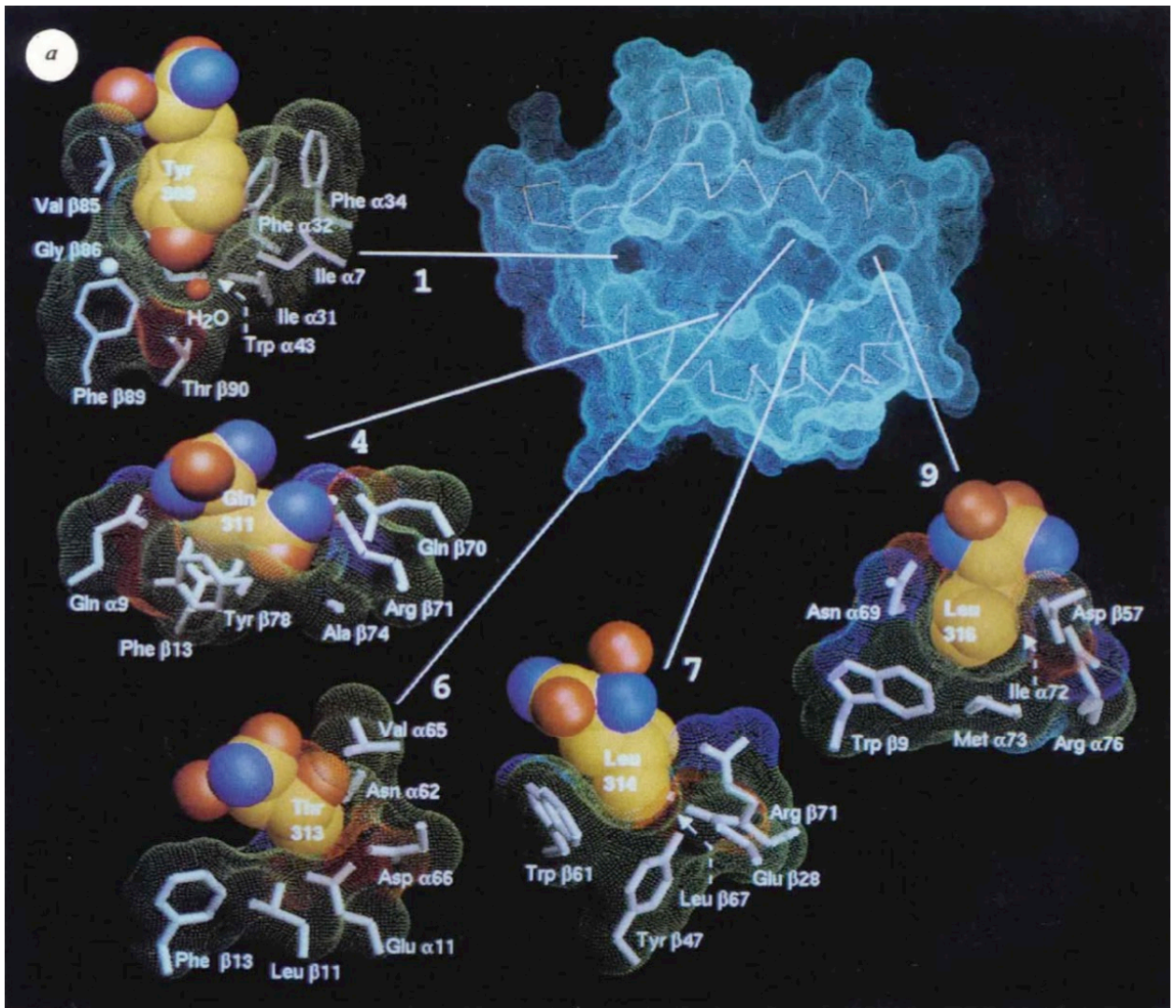


Рисунок 2.4. Карманы в пептид-связывающей борозде HLA-DR1. Вид сверху пептид-связывающей борозды HLA-DR1 (синий). Карманы, которые вмещают боковые цепи пептида HA, подробно показаны вокруг и пронумерованы в соответствии с их расстоянием вдоль пептида, начиная от первого кармана P1, в котором связывается остаток Tyr308: Gln311 в кармане P4, Thr313 в P6, Leu314 в P7, Leu316 в P9. Аминокислотные остатки каждого кармана HLA-DR1 также подробно показаны и отмечены. Атомы углерода отмечены желтым, атомы азота - синим, а атомы кислорода - красным (17).

2.2. Презентация антигена

Понимая теперь, как антигенный пептид связывается в борозде МНС II, перейдем к самому процессу презентации, состоящему из нескольких этапов.

Экспрессия МНС II регулируется на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Трансактиватор МНС II (СПТА) является одним из основных факторов такой регуляции. IFN γ стимулирует экспрессию СПТА, и АПК начинают экспрессировать в свою очередь МНС II. Как и другие гликопротеины клеточной поверхности, молекулы МНС класса I и класса II собираются в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР). Как показано на **Рисунке 2.5**, в отличие от МНС I, которые связывают эндогенные пептиды в ЭПР, молекулы МНС II должны защищать свою пептид-связывающую борозду до тех пор, пока они не достигнут позднего эндосомального компартмента, где они связывают экзогенные пептиды. Следовательно, α - и β -субъединицы, которые образуют молекулу МНС II, ассоциируются с третьей молекулой инвариантной цепи (Ii), которая частично связывается и перекрывает пептид-связывающую борозду (**Рисунок 2.5(4)**). В ЭПР инвариантные цепи сначала образуют тример, а затем три α/β -гетеродимера МНС II нековалентно связываются с каждой субъединицей (18) посредством шаперона калнексина (19). После сборки комплекс направляется через аппарат Гольджи в эндосомальный компартмент с низким рН через сигнальную последовательность в цитоплазматической области инвариантной цепи. Основным местом загрузки пептидов на МНС II является эндоцитарный компартмент, содержащий МНС II (МПС) (19). Во время транспорта и внутри поздних эндоцитарных и ранних лизосомальных структур инвариантная цепь постепенно процессирует за счет лизосомальных протеаз (20–22), таких как цистеиновые протеазы катепсины S и L (23–25). После первоначального укорочения С-конца инвариантной цепи дальнейшая деградация оставляет только короткие пептидные фрагменты, называемые CLIP (пептиды инвариантной цепи, ассоциированные с классом II), связанные с молекулами МНС II (**Рисунок 2.5(5)**). Поскольку CLIP связывается в пептид-связывающей борозде МНС II, он должен быть удален для того, чтобы другие антигенные пептиды связывались, а затем были представлены на поверхности клетки.

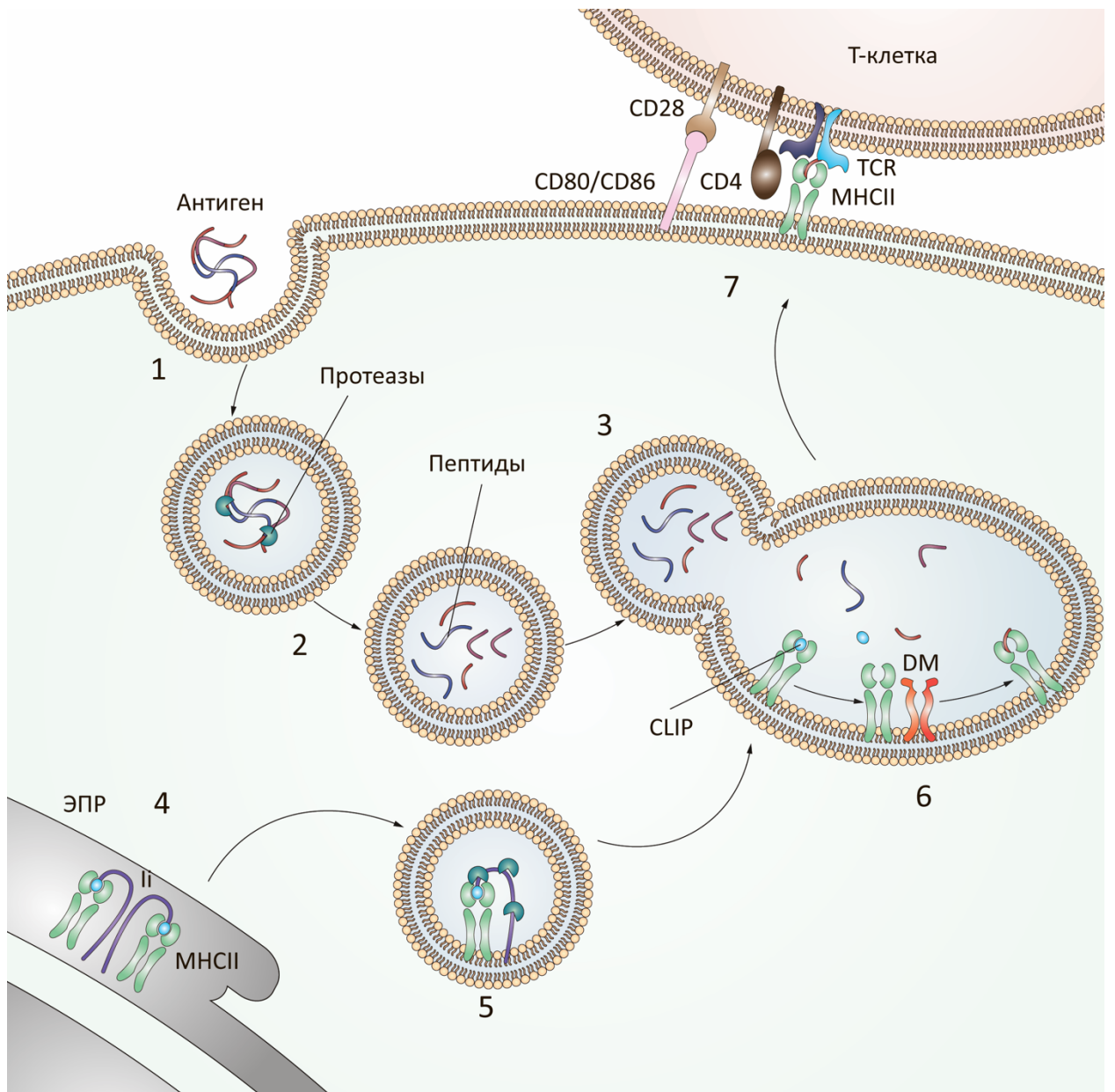


Рисунок 2.5. Схема процесса презентации антигена молекулами МНС II. (1) Антиген попадает во внутриклеточные везикулы. (2) Подкисление везикул активирует протеазы, которые гидролизуют антиген на пептидные фрагменты. (3) Везикулы, содержащие пептидные фрагменты, сливаются с везикулами, содержащими молекулы МНС II (зеленый). (4) Инвариантная цепь (Ii) (фиолетовый) связывается с вновь синтезированными молекулами МНС II, частично занимая пептид-связывающую борозду. (5) Инвариантная цепь протеолитически деградирует, в результате чего в борозде остается связанным пептид CLIP (голубой). (6) DM (желтый-красный) связывается с молекулами МНС II и катализирует пептидный обмен. (7) Молекулы МНС II, загруженные антигенным пептидом (малиновый), транспортируются на поверхность клетки, где они могут узнаваться рецептором CD4 Т-клеток TCR (голубой-синий). Молекула ко-рецептора CD4 (коричневый), присутствующая на Т-клетках, также связывается с молекулами МНС

II. Чтобы происходила активация Т-клеток, ко-стимулирующие молекулы CD80 или CD86 (розовый), экспрессируемые на антиген-презентирующей клетке, должны связываться с ко-стимулирующей молекулой CD28 (бежевый), экспрессируемой на Т-клетках (13).

Существуют различные пути поступления антигенов в антиген-презентирующие компартменты АПК: макропиноцитоз, рецептор-опосредованный эндоцитоз, фагоцитоз и аутофагия (**Рисунок 2.6**). Макропиноцитоз представляет собой неспецифическое поглощение растворимых агентов путем актин-зависимого механизма и появление макропиносом, которые далее сливаются с эндосомально-лизосомальными мультивезикулярными структурами, где происходит протеолиз захваченных белков и образование МНС II-пептидного комплекса (26). В основном, макропиноцитоз наблюдается у дендритных клеток. Эксперименты *in vitro* показали, что активация дендритных клеток приводит к временному сильному увеличению количества макропиносом, однако, их созревание с помощью липополисахаридов, например, ведет к снижению поглощения антигенов, то есть от поглощения антигенов они переходят к их презентации (27). Также АПК обладают несколькими типами поверхностных клеточных рецепторов, осуществляющих клатрин-опосредованный эндоцитоз (28). В основном данный механизм присущ В-клеткам, однако он также сохраняется у зрелых дендритных клеток, как основной способ поглощения антигенов (29). Поступление антигенов по механизму фагоцитоза присуще дендритным клеткам и макрофагам и характеризуется появлением фagosомы, впоследствии сливающейся с лизосомальными компартментами (30). В полученной гибридной фаголизосоме уже присутствует весь аппарат, служащий для презентации антигенов. Антигены при фагоцитозе также могут узнаваться различными типами рецепторов. Как правило, антигены принадлежат белкам патогенов и клеток, подвергшихся апоптозу (31). Наконец, приблизительно 20–30% пептидов, элюированных с МНС II в В-клетках и дендритных клетках человека, происходят из цитозольных или ядерных белков, что указывает на роль макроаутофагии в транспортировке цитозольных антигенов в антиген-процессорные компартменты (32). Аутофагосомы поглощают цитозольные макромолекулы и органеллы и могут сливаться с эндосомно-лизосомальными антиген-процессирующими компартментами с образованием аутофаголизосом (33).

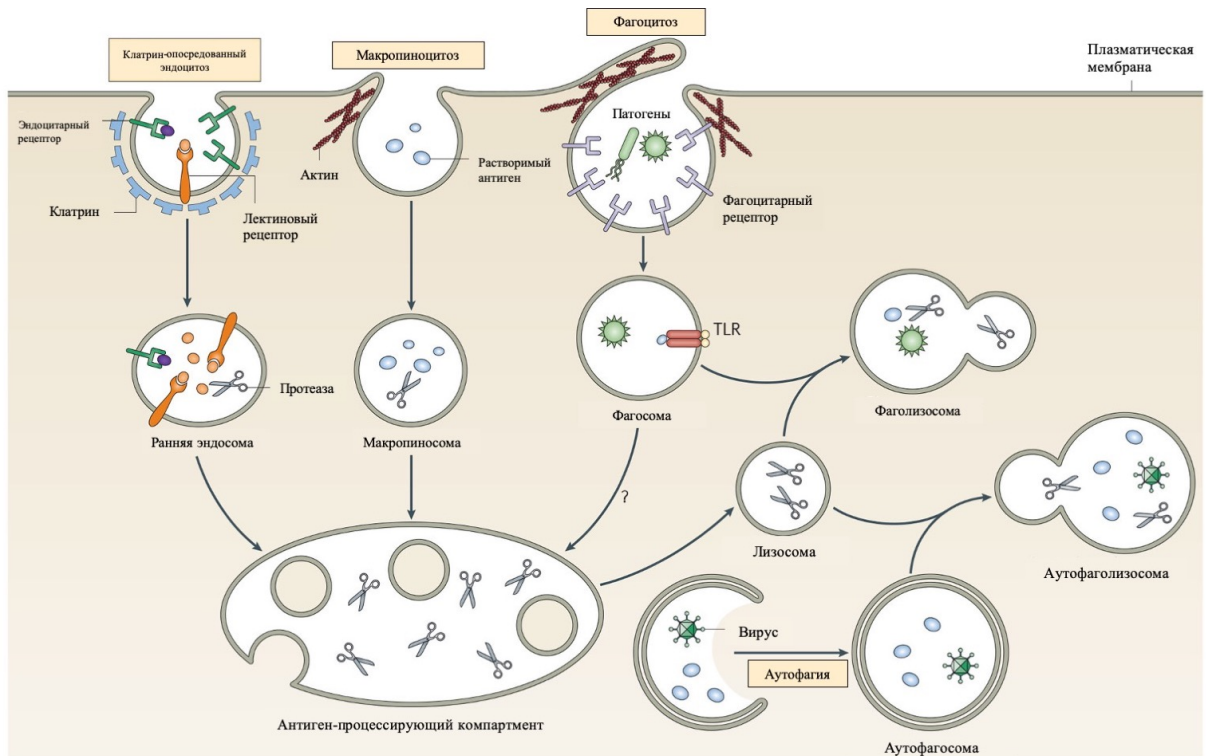


Рисунок 2.6. Пути антигенного эндоцитоза в антиген-презентирующих клетках. Антигены могут вступать в эндоцитарный путь антиген-презентирующих клеток (АПК) по нескольким механизмам. Рецептор-опосредованный эндоцитоз через клатриновые везикулы требует связывания антигена с одним из нескольких рецепторов на АПК, таких как лектиновые рецепторы, что приводит к их интернализации в ранние эндосомы. Макропиноцитоз является актин-зависимым процессом, который приводит к поглощению растворимых антигенов в клетку в виде макропиносом. В каждом из этих процессов интернализированные ранние эндосомы в конечном итоге сливаются с мультивезикулярными поздними эндосомно-лизосомальными антиген-процессирующими компартментами. Именно в этих компартментах происходит протеолиз антигена и образование комплекса пептид-МНС II. Фагоцитоз представляет собой эндоцитарный процесс, при котором опсонизированные частицы связываются с различными рецепторами и после актин-зависимой перестройки мембраны вокруг частицы попадают в клетку в виде полученных из мембраны фагосом. Фагосомы не особо богаты протеазами или МНС II и после индуцированного Toll-подобным рецептором (TLR) слияния с лизосомами или с поздними эндосомно-лизосомальными компартментами, содержащими МНС II, образуется фаголизосома, где уже формируются комплексы МНС II-пептид. Аутофагия - процесс, при котором мембраны (часто происходящие из ЭПР) окружают цитозольные антигены с образованием аутофагосомы. При слиянии аутофагосом с лизосомальными компартментами полученная аутофаголизосома формирует комплексы пептид-МНС II (адаптировано из (34)).

В неинфицированных клетках, подобно МНС I, молекулы МНС II связывают пептиды, полученные из собственных белков, часто происходящих из агрегированных и деградировавших МНС II и инвариантных цепей (35). В случае инфекции молекулы МНС II презентуют экзогенные пептиды, полученные в результате интернализации патогенов и фрагментов патогенных организмов или эукариотических паразитов, находящихся во внутриклеточных везикулах. Загруженные на МНС пептиды являются продуктами протеолитической деградации антигенов протеазами, которые активируются при низких значениях рН в поздних эндосомах и лизосомах. Среди этих протеаз - цистеиновые протеазы катепсины В, D, S и L, причем катепсины S и L являются наиболее преобладающими. Существуют также и другие протеазы, участвующие в процессинге антигена, и общий пептидный репертуар, по-видимому, отражает активность многих протеаз, которые присутствуют в эндосомном пути.

Образование стабильных комплексов между молекулами МНС II и пептидами имеет решающее значение для специфического иммунного ответа, поскольку эти комплексы могут присутствовать на поверхности клетки в течение нескольких дней (36). В течение этого времени потеря пептида из-за слабых взаимодействий и связывания локально доступных пептидов вне клетки пустыми молекулами МНС II может привести к неэффективной и неконтролируемой презентации пептида. Именно HLA-DM (DM), «неклассический» МНС II, также кодируемый в локусе МНС и регулируемый СРТА, подобно другим молекулам МНС II, выполняет задачу пептидного обмена и играет важную роль в процессе загрузки пептидов и образования стабильных комплексов МНС II-пептид (**Рисунок 2.5(6)**). В ранних эндосомах функции HLA-DM ингибируются другим «неклассическим» МНС II-подобным белком HLA-DO (37).

После образования стабильные комплексы МНС II-пептид транспортируются на поверхность клетки, где связанные пептиды представляются Т-клеточным рецепторам (TCR) на поверхности CD4 Т-клеток (38) (**Рисунок 2.5(7)**). В активированных дендритных клетках формируются тубулы, по которым МНС II-пептидный комплекс транспортируется в везикулах к плазматической мембране. При взаимодействии МНС II с Т-клеточным рецептором образуется иммунологический синапс, обеспечивающий плотный контакт между клетками и строго направленную передачу сигнала. Для точности передачи сигнала окружающее синапс пространство отграничивается полосой интегринов (LFA-1) и молекул ICAM-1. Поскольку распознавание антигенов Т-клетками ограничено по МНС, TCR должен распознавать пептид и молекулу МНС II специфически. Чтобы достичь полной активации наивной Т-клетки, активированная АПК также должна обеспечивать соответствующую ко-стимуляцию, обычно через экспрессию CD80 или CD86, которые

связываются с CD28, экспрессируемым на наивной Т-клетке. Стимуляция с помощью TCR без ко-стимуляции вызывает анергию Т-клеток, т.е. состояние, в котором Т-клетки становятся невосприимчивыми к стимуляции антигенами, даже в контексте ко-стимуляции. Кроме того, молекула ко-рецептора CD4, которая контактирует на поверхности Т-клеток с компонентами рецептора Т-клеток, связывается с проксимальным по отношению к мембране доменом молекул МНС II. Связывание Т-клеточного рецептора и ко-стимуляторных факторов приводит к рекрутированию других молекул и дальнейшей передаче сигналов в Т-клетке, что в конечном итоге приводит к активации ядерных факторов транскрипции, включающих экспрессию нового гена. Как только Т-хелперная клетка активируется, она участвует в активации и направлении других иммунных клеток и тем самым обеспечивает иммунный ответ.

2.3. Роль HLA-DM

Как уже упоминалось выше, HLA-DM (DM) играет решающую роль в загрузке пептидов молекулами MHC II и, следовательно, может модифицировать пептидный репертуар, представляемый T-клеткам. DM направляется в компартмент, содержащий MHC II, посредством направляющей последовательности в цитоплазматическом хвосте β -цепи (39). Но в отличие от других молекул MHC II, DM также несет цитоплазматический сигнал интернализации, который препятствует его стабильной экспрессии на клеточной поверхности (40). DM выполняет несколько функций во время загрузки пептида и обмена молекул MHC II. Во-первых, он катализирует высвобождение пептида CLIP, который занимает борозду связывания молекул MHC II после частичного протеолиза инвариантной цепи (41). Во время этого процесса DM также способствует связыванию других пептидов с молекулами MHC II, которые присутствуют в поздней эндосоме (42). Кроме того, DM стабилизирует пустые молекулы MHC II и препятствует их агрегации (43,44). Наконец, благодаря постоянному повторному связыванию с комплексом MHC II-пептид DM облегчает удаление связанных слабо пептидов и позволяет пептидам с более высокой аффинностью связываться, обеспечивая транспортировку преимущественно стабильных комплексов MHC II-пептид на клеточную поверхность (43). Эту функцию DM также называют «редактированием» пептидного репертуара.

DM является «неклассическим» MHC II, а именно не обладает полиморфностью и не способен связывать пептиды. Как и ожидалось из-за высокого общего сходства последовательностей (45,46), DM представляет собой гетеродимер с общей структурой складок и доменов, сходной с таковой у классических молекул MHC II (47). Основное различие по сравнению с молекулами HLA-DR заключается в пептид-связывающей борозде. α -Спирали доменов $\alpha 1$ и $\beta 1$ DM, которые формируют пептид-связывающую борозду в случае HLA-DR, находятся ближе друг к другу и образуют несколько контактов, которые препятствуют связыванию пептидов (**Рисунки 2.7А, В**). Интересно, что остатки, которые являются частью взаимодействий между α -спиралями доменов $\alpha 1$ и $\beta 1$, являются консервативными среди DM человека и гомологичных последовательностей мыши, кролика и быка. Однако остатки, которые направлены в сторону от этой области, являются переменными и показывают ограниченный полиморфизм (47). Это различается с классическими молекулами MHC II, которые проявляют обширный полиморфизм аминокислот, находящихся внутри пептид-связывающей борозды, что позволяет связывать различные пептиды.

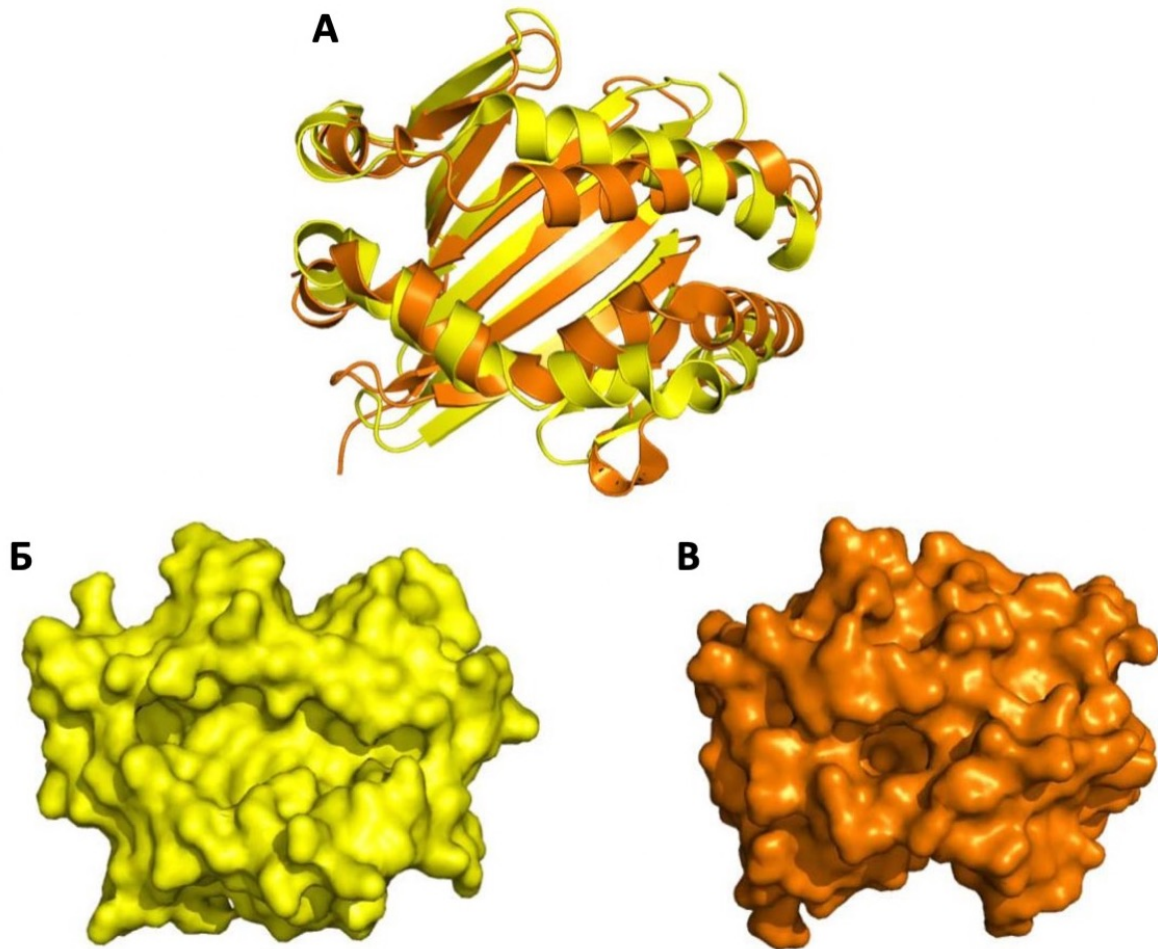


Рисунок 2.7. Сравнение белковых структур молекул HLA-DM и HLA-DR. (А) Наложение мембранно-дистальных доменов $\alpha 1/\beta 1$ молекул DM (оранжевый) и DR (желтый). (Б) Вид сверху пептид-связывающей борозды молекулы DR. (В) Вид сверху мембранно-дистальных доменов $\alpha 1/\beta 1$ молекулы DM, демонстрирующий глубокий карман в центре. Модели основаны на кристаллических структурах DM (PDB: 2BC4) и DR1 (PDB: 1DLH).

Некоторые аспекты механизма действия DM были изучены на примере рентген-структурного анализа HLA-DR1 и пептида HA (48) (**Рисунок 2.8**). Структура комплекса показывает, что пара DM-DR в основном взаимодействуют боковыми областями α -цепей обеих молекул за счет двух кластеров заряженных аминокислот (49,50). Образование комплекса DM-DR возможно тогда, когда N-концевая часть пептида не связана в борозде DR (**Рисунки 2.8Б, 2.9(2)**). Тем самым DM, выступая как фермент, образует комплекс с DR в переходном состоянии. В связи с освобождением борозды N-концевой частью пептида карман P1 остается пустым. DR α F51 закрывает P1, тем самым стабилизируя его, а фенилаланины DR α F24, DR α F32, DR α F48 и DR β F89 в свою очередь стабилизируют DR α F51 (**Рисунки 2.8Г, 2.9(3)**).

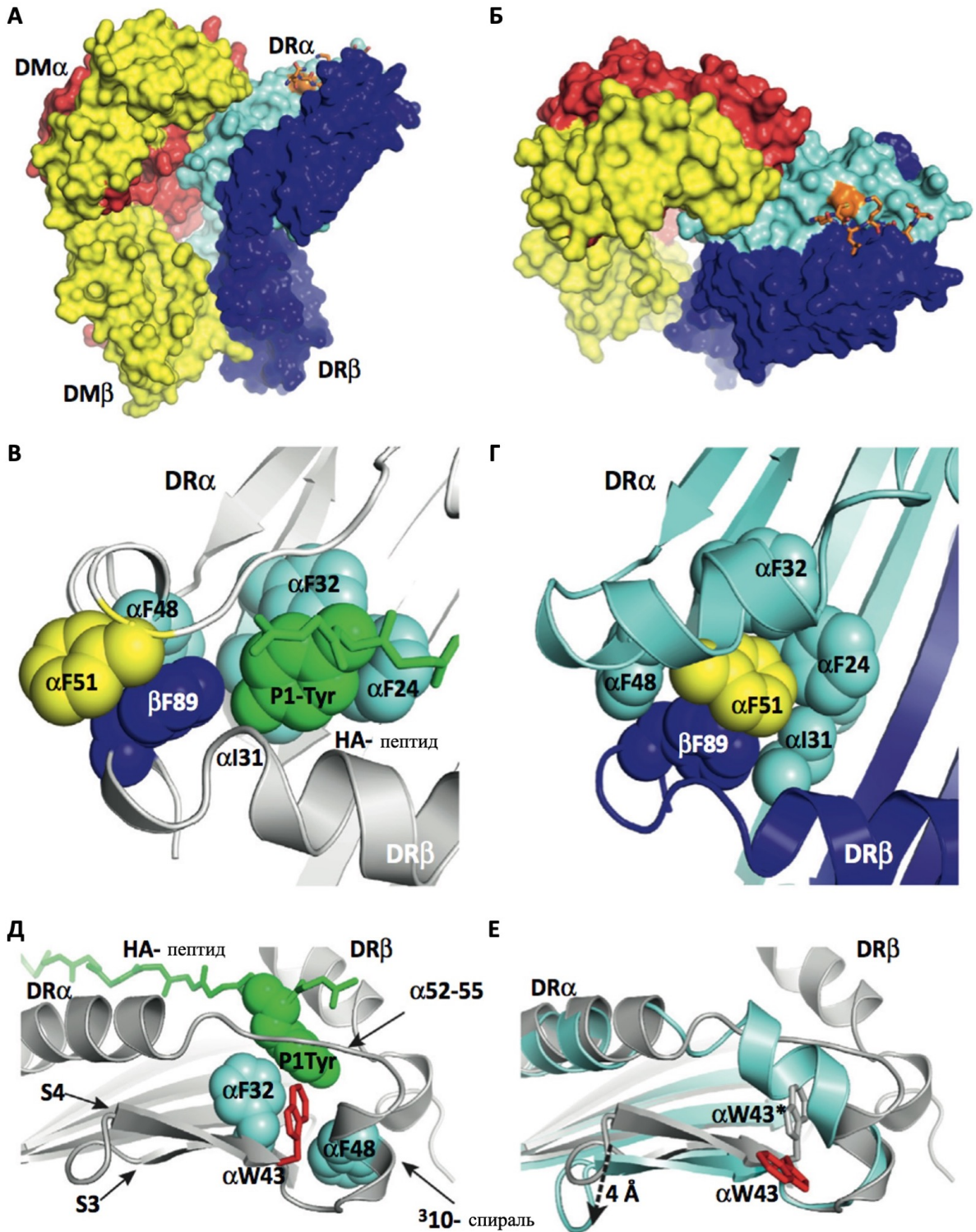


Рисунок 2.8. Структура комплекса HLA-DR1 и HLA-DM. (А) Домены DR1 и DM расположены параллельно друг другу и взаимодействуют своими боковыми сторонами. Цепи DR α и β окрашены в голубой и синий цвета соответственно, а цепи DM α и β - в красный и желтый. (Б) Вид сверху комплекса DR1–DM, показывающий, что большая часть борозды не имеет стабильно связанного пептида (оранжевый). Домены DM α1 (красный)

и $\beta 1$ (желтый) взаимодействуют с DR $\alpha 1$. **(В)** Расположение ключевых остатков DR1, когда борозда занята высокоаффинным пептидом HA_{306–318}. Остаток Tyr308 пептида занимает гидрофобный карман P1. DR α F51 направлен вне борозды. **(Г)** Перераспределение в кармане P1 DR1 без пептида в комплексе с DM. DR α F51 переместился в гидрофобный карман P1, где он стабилизирован DR β F89. **(Д, Е)** Для связывания DM необходим поворот DR α W43. В комплексе DR1-HA **(Д)** DR α W43 взаимодействует в P1 с остатком Tyr пептида и соседними ароматическими остатками (DR α F32 и F48). В комплексе DR1-DM без пептида этот триптофан уходит из кармана P1 **(Е)**. Конформационные изменения в сегменте DR α 46–55 и слое S3/S4 основания борозды отмечены на **(Е)** наложением цепи DR α структур DR1-HA (серый) и DR1-DM (голубой) (48).

Также дополнительная стабилизация обуславливается водородной связью между DR α E48 и DR β N82. По причине данных конформационных перегруппировок происходит поворот DR α W43, который ранее стабилизировал тирозин пептида в P1. В результате поворота DR α W43 попадает в карман DM, где он взаимодействует с DM α N125. Весь этот процесс означает, что DM вызывает диссоциацию пептида за счет препятствия повторного связывания частично диссоциированного пептида. Новые пептиды могут быть стабильно связаны только тогда, когда они эффективно конкурируют с аминокислотными остатками DR за доступ к сайту P2 и карману P1. Таким образом происходит отбор пептидов на силу связывания **(Рисунок 2.9(4))**.

Такое высокоаффинное связывание пептида обращает все конформационные изменения в первоначальное положение и вызывает диссоциацию DM (49) **(Рисунок 2.9(5))**. Такой механизм делает процесс замены пептида за счет DM быстрым и эффективным, что способствует ускорению презентации пептидов. Однако полное доскональное понимание механизма действия DM остается до сих пор не до конца изученным.

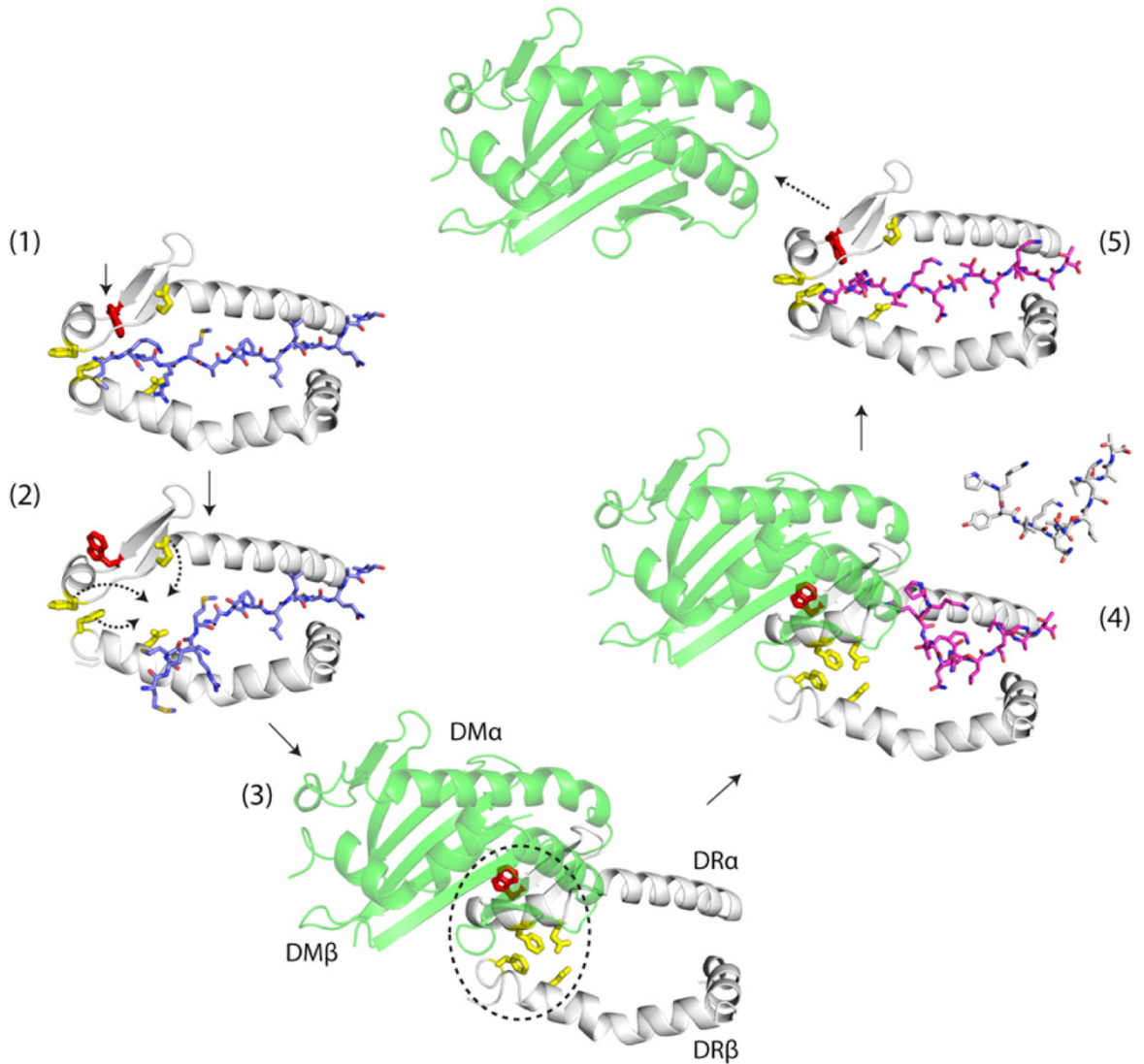


Рисунок 2.9. Модель этапов обмена пептида на HLA-DR при взаимодействии с HLA-DM. (1) CLIP (синий) связан в борозде DR (серый), а DR α W43 (красный) стабилизирует карман P1. (2) N-конец пептида диссоциирует из борозды DR, и DR α W43 разворачивается, уходя из кармана P1 и становясь доступным для взаимодействия с DM. Другие аминокислотные остатки DR (желтый) перемещаются в глубь борозды при переходе в состояние, связанное с DM. (3) DM (зеленый) стабилизирует пустой DR, а DR α F51 и β F89 (желтый) защищают гидрофобный карман P1. (4) Быстрое связывание пептидов (малиновый) с частично доступной бороздой; пептиды (серый), которые эффективно не конкурируют с остатками DR (желтые) за сайт P2 и карман P1, не являются стабильно связанными. (5) Связывание N-конца пептида обращает конформационные изменения и приводит к диссоциации DM (48).

2.4. Рассеянный склероз

МНС II играет одну из ключевых ролей в патологии различных аутоиммунных заболеваний за счет презентации аутоантигенных пептидов на поверхности АПК (51). Рассеянный склероз (РС) представляет собой одно из таких хронических аутоиммунных заболеваний центральной нервной системы (ЦНС). РС является классическим аутоиммунным нейровоспалительным заболеванием с нейродегенерацией и демиелинизацией (52–55).

2.4.1. Эпидемиология и нейропатология рассеянного склероза

Этиология РС все еще в значительной степени неизвестна, но есть доказательства роли как генетических факторов, так и факторов окружающей среды (56). РС является основной причиной неврологической инвалидности у молодых людей и, следовательно, имеет значительные персональные, социальные и экономические издержки. В развитых странах лечение больных РС обеспечивают из государственного бюджета, что обосновывает востребованность разработки персонализированных подходов лечения со стороны государства. Триггерные механизмы, способствующие развитию РС до сих пор нераскрыты, что существенно затрудняет поиск путей лечения заболевания. Предполагается, что инфекционный агент может вызвать заболевание у генетически восприимчивых людей. Географическое распространение РС является эпидемиологическим признаком этого. В целом, распространенность РС ниже среди населения, живущего вблизи экватора, и увеличивается с широтой как в северном, так и в южном полушариях. Заболевание наиболее распространено в популяциях североευропейского происхождения, особенно в Скандинавии, на Британских островах, в северной части Соединенных Штатов и на юге Канады (57). В этих регионах распространенность РС составляет около 100/100 000 человек.

Говоря о генетических факторах развития заболевания, их роль подтверждается исследованиями семей с РС. Частота совпадений у монозиготных близнецов составляла 20–30% против 3–5% у дизиготных близнецов в этих популяциях (58). У братьев и сестер риск развития РС в 15–40 раз выше, а у приемных детей и супругов не наблюдается влияния общей среды вовсе (59–62). Среди генетических факторов именно аллели МНС II, HLA-DRB1, оказывают наиболее сильный генетический эффект на РС (63,64). Более подробно о главном генетическом факторе риска РС и ассоциациях в разных популяциях изложено в следующем разделе. Однако исследования геномных ассоциаций выявили существование множества генов, не относящихся к HLA, с умеренным влиянием на РС, включая рецептор

α интерлейкина-7 (IL7RA), рецептор α интерлейкина-2 (IL2RA), 16 член А семейства лектинового домена типа С (CLEC16A), антиген-3, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-3; CD58), член 1А суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF1A), регуляторный фактор интерферона 8 (IRF8) и CD6 (5,65–68).

Эпидемиологические и иммиграционные исследования показали, что не только генетические факторы, но и факторы окружающей среды увеличивают риск развития РС (69). Крупномасштабные исследования иммигрантов показали, что риск рассеянного склероза уменьшается, если дети мигрируют из региона с высоким уровнем риска, и риск возрастает, когда дети мигрируют из региона с низким уровнем риска. Факторами с наиболее убедительными доказательствами вовлечения в РС, являются вирусные инфекции, такие как вирус Эпштейна-Барра (EBV), вирус гриппа А, курение и дефицит витамина D (70,71). Было обнаружено, что почти все люди с РС (99%) были инфицированы EBV по сравнению с контрольной группой того же возраста (94%) (56,72). Относительно недавно в лаборатории биокатализа ИБХ РАН было показано, что EBV имеет стойко выраженный иммунологический ответ в сыворотках крови больных РС (73). Скрининг библиотеки генов иммуноглобулинов, созданный на основании мРНК больных РС с помощью библиотеки пептидных фрагментов аутоантигена MBR продемонстрировал наличие аутоантител, способных связывать как MBR, так и LMP1, белок вируса Эпштейна-Барра. Таким образом, доказаны молекулярные основы кросс-реактивности этих аутоантигенов, что свидетельствует в пользу теории индукции заболевания РС.

Воздействие солнечного света и дефицит витамина D являются потенциальными объяснениями связи между широтой и частотой возникновения РС (74–76). Низкие уровни витамина D в сыворотке связаны с более высоким риском развития РС (77,78) и с повышенным риском рецидивов (79–81). Витамин D обладает иммунорегуляторными функциями. Он ингибирует пролиферацию CD4 Т-клеток и продукцию провоспалительных цитокинов и стимулирует выработку противовоспалительных цитокинов (82). Было показано, что курение повышает риск возникновения рассеянного склероза, и, следовательно, содействие прекращению курения будет одним из самых простых вмешательств, доступных для снижения заболеваемости рассеянным склерозом (83).

РС чаще встречается у женщин, чем у мужчин (84–87), но исследования в целом по геному не обнаружил какие-либо гены, ассоциированные с РС, в X-хромосоме. Следовательно, повышенная частота РС у женщин может быть связана с физиологией, специфичной для женщины, и, следовательно, может быть связана с гормонами (88,89). Было показано, что половые гормоны (эстрогены, прогестины, андрогены) модулируют иммунные реакции, а

также повреждение головного мозга (90). Особенно эстрадиолы и тестостерон играют важную модулирующую роль в повреждении мозга при РС.

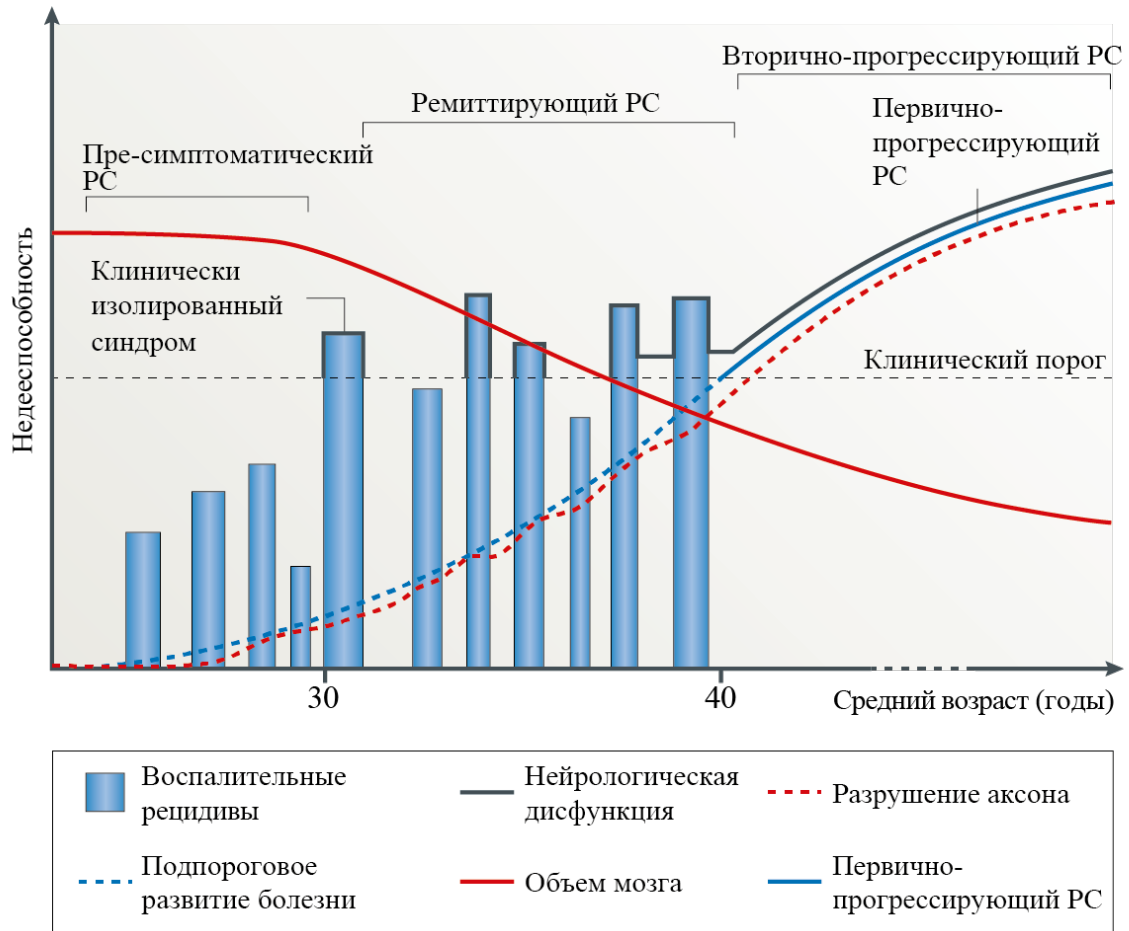


Рисунок 2.10. Клинический прогресс РС. Схематическое представление прогресса недееспособности в зависимости от среднего возраста. Представлены три клинических подтипа РС: ремиттирующий (RRMS), вторично-прогрессирующий (SPMS) и первично-прогрессирующий (PPMS). Изменение объема мозга подразумевает атрофию мозга (адаптировано из (91)).

РС характеризуется переменным клиническим течением, гетерогенной и сложной патологией и патогенезом. Существует три клинических подтипа РС, включая ремиттирующий (RRMS), вторично-прогрессирующий (SPMS) и первично-прогрессирующий РС (PPMS) (Рисунок 2.10). Большинство пациентов (85%) изначально имеют ремиттирующий РС, который характеризуется рецидивами с последующим улучшением. Во время этих эпизодов воспаления клинические приступы обычно развиваются в течение нескольких дней, становятся максимальными через 1-2 недели и постепенно проходят в течение нескольких недель или месяцев. Первый приступ проявляется как односторонний неврит зрительного нерва, синдром ствола мозга или

частичный миелит. Эти проявления известны как клинически изолированный синдром (CIS) (92). Ремиттирующий РС наиболее типично проявляется у молодых пациентов. После 10-20 лет RRMS у большинства этих пациентов наступает фаза прогрессирования с приступами или без них, называемая вторично-прогрессирующий РС. Меньшинство пациентов (15%) имеют первично-прогрессирующий РС с начала заболевания. Болезнь этих пациентов прогрессирует медленно без рецидивов. Этот подтип считается в основном невоспалительным (93,94).

Патологически РС характеризуется наличием крупных, многоочаговых, демиелинизированных поражений ЦНС во множестве областей, ведущих к рубцовой ткани, называемой склерозом. Этот процесс демиелинизации сопровождается аутоиммунными воспалительными реакциями, которые опосредуются главным образом Т-клетками, В-клетками и макрофагами. Основными мишенями являются миелиновые оболочки и олигодендроциты, но также затрагиваются аксоны, нервные клетки и астроциты (95,96). Миелинизированное нервное волокно состоит из аксона, заполненного внутриклеточной жидкостью - аксоплазмой. Аксон окружает многослойная миелиновая оболочка, состоящая из сфинголипидов и белков и выполняющая структурную и защитную функции. Сфинголипиды снижают прохождение ионного тока через мембрану в 5000 раз, тем самым обеспечивая изоляцию (97). Было показано, что по миелинизированным волокнам нервный импульс проводится до 10 раз быстрее вследствие плотного соприкосновения намотанных слоёв мембраны олигодендроцита вокруг аксона. Примерно через каждые 1-3 мм вдоль миелиновой оболочки имеется перехват Ранвье – неизолированный участок, длиной 2-3 мкм, где ионный транспорт идет с обычной скоростью (97). Потенциал действия возникает только в перехватах Ранвье и проводится от перехвата к перехвату, формируя так называемое скачкообразное проведение (98). Таким образом, разрушение миелиновой оболочки замедляет и блокирует проведение нервного импульса. Было определено, что потери всей миелиновой оболочки между двумя соседними перехватами Ранвье более чем достаточно для блокировки проведения в «типичном» аксоне (99).

Основной патологический механизм, вовлеченный в разрушение ЦНС, также неоднороден. В настоящее время патологические исследования предполагают четыре различных иммунопатологических паттерна демиелинизации при ранних поражениях РС, которые различаются у разных пациентов. Чаще всего повреждению подвергается белое вещество вокруг желудочков мозга, в стволе мозга, в мозжечке и в шейном отделе спинного мозга. Несмотря на то, что рассеянный склероз считается болезнью белого вещества, в нем также задействовано и серое вещество, особенно в коре головного мозга (100–102). Кортикальные поражения наблюдались у 80% пациентов с PPMS. Главным образом РС является

воспалительным демиелинизирующим заболеванием ЦНС, однако повреждение и потеря аксонов также происходят в очагах РС и связаны с развитием постоянной инвалидности у пациентов (103,104). Это говорит о том, что прогрессирующая потеря аксонов может вызвать переход от ремиттирующего к вторично-прогрессирующему РС (105).

2.4.2. Иммунология рассеянного склероза

Врожденная иммунная система - первая линия защиты от вторжения патогенных микроорганизмов, включающая макрофаги, дендритные клетки (ДК), тучные клетки, нейтрофилы, эозинофилы и натуральные киллеры (НК) (106). Адаптивная иммунная система подразделяется на гуморальный и клеточный иммунитет с участием В- и Т-клеток соответственно. В-клетки секретируют антитела, которые связываются с эпитопами при проникновении патогенных микроорганизмов, идентифицируя их для удаления другими компонентами иммунной системы, такими как макрофаги. Клеточно-опосредованная иммунная система включает активацию Т-клеток. Большинство Т-клеток экспрессируют только один Т-клеточный рецептор (TCR), который после распознавания специфического антигена пролиферирует путем клональной экспансии (107).

Т-лимфоциты или Т-клетки, которые характеризуются наличием молекул корецептора CD4 или CD8, возглавляют клеточный иммунитет человека. Центральным элементом взаимодействия между Т-клетками и антигеном (представленным в сочетании с главным комплексом гистосовместимости (МНС) или HLA у людей, причем, I класса в случае взаимодействия с CD8 и II класса – с CD4) является Т-клеточный рецептор (TCR). Большинство Т-клеточных рецепторов являются гетеродимерами, состоящими из двух субъединичных цепей (α - и β -), которые содержат как константные, так и переменные домены (**Рисунок 2.11**). Из-за необходимости большого количества уникальных TCR, учитывая количество потенциальных взаимодействий TCR/антиген, иммунная система обладает уникальным способом введения разнообразия. Разнообразие TCR генерируется на ранних стадиях развития Т-клеток в тимусе. Во время клеточного деления происходит обширная рекомбинация генов между V- (вариабильным) и J- (соединительным) сегментами в гене TCR α , и V-, D- (разнообразным) и J-сегментами в гене TCR β . Данный процесс называется рекомбинация V(D)J. Область TCR β , которая охватывает соединения V-D и D-J, известна как третья область, определяющая комплементарность (CDR3), и является уникальной для каждого варианта TCR β . После этого процесса Т-клетки, которые не обладают достаточным сродством к молекулам МНС, и те, которые распознают аутоантигены, элиминируются в результате положительного и отрицательного отборов в тимусе, соответственно.

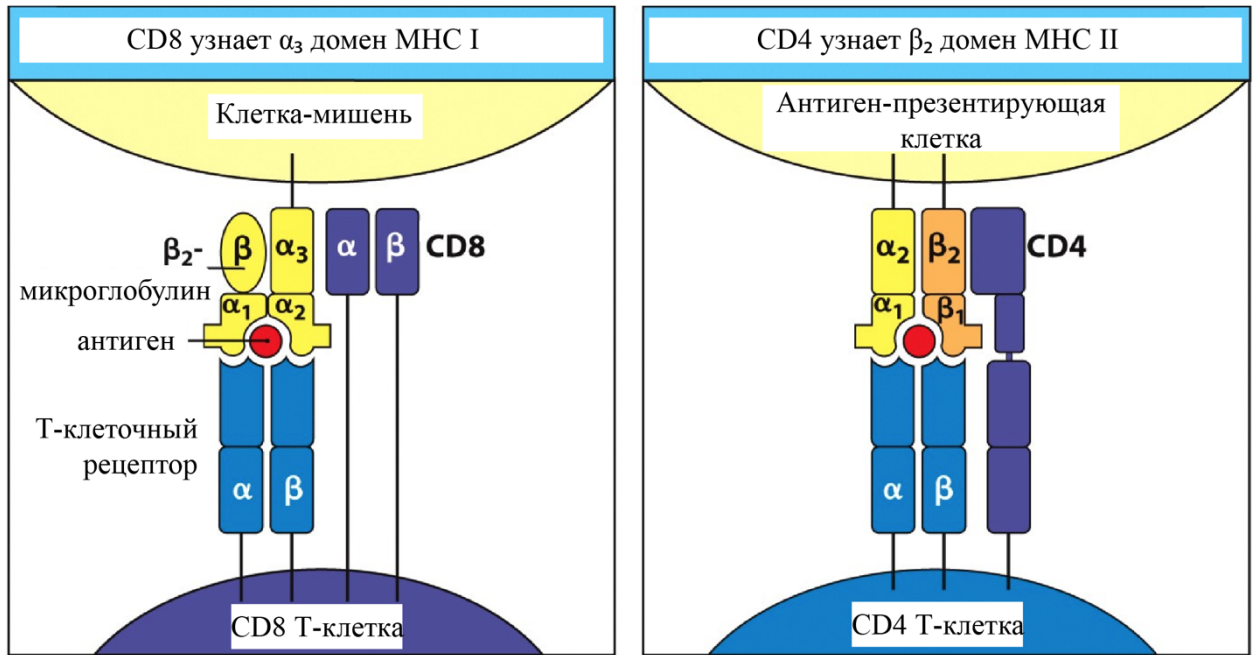


Рисунок 2.11. Схема взаимодействия T-клеток с другими клетками и строения T-клеточного рецептора и МНС. CD8 T-клетка узнает посредством T-клеточного рецептора и CD8 комплекс пептид/МНС класса I на поверхности клетки-мишени. CD4 T-клетка узнает посредством T-клеточного рецептора и CD4 комплекс пептид/МНС класса II на поверхности антиген-презентирующей клетки (адаптировано из (108)).

Причина РС до сих пор неизвестна, и ее патогенетические пути до конца не изучены. Считается, что данное заболевание опосредовано действием воспалительных лимфоцитов, которые мигрируют в ЦНС и вызывают повреждение тканей и неврологические нарушения. Исследования экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ), животной модели для РС, показали роль миелин-специфичных CD4 T-клеток Th1 и Th17 в качестве движущей силы в аутоиммунных процессах, а также и других типов клеток, которые способствуют патогенезу РС, таких как CD8 T-клетки, В-клетки или НК-клетки (109). Запрограммированная гибель иммунных клеток, апоптоз, также является важным патофизиологическим механизмом воспаления при РС. Он регулирует элиминацию аутореактивных T- и В-клеток и макрофагов из кровообращения и предотвращает их попадание в ЦНС. Нарушение регуляции апоптоза и других иммунных функций может привести к воспалению в ткани ЦНС и последующему развитию повреждения ткани (110,111).

Начальным этапом активации иммунных клеток является активация дендритных клеток (ДК) с помощью Toll-подобных рецепторов, которые распознают очень специфические микробные продукты, и далее эти клетки начинают продуцировать интерферон (IFN) I типа.

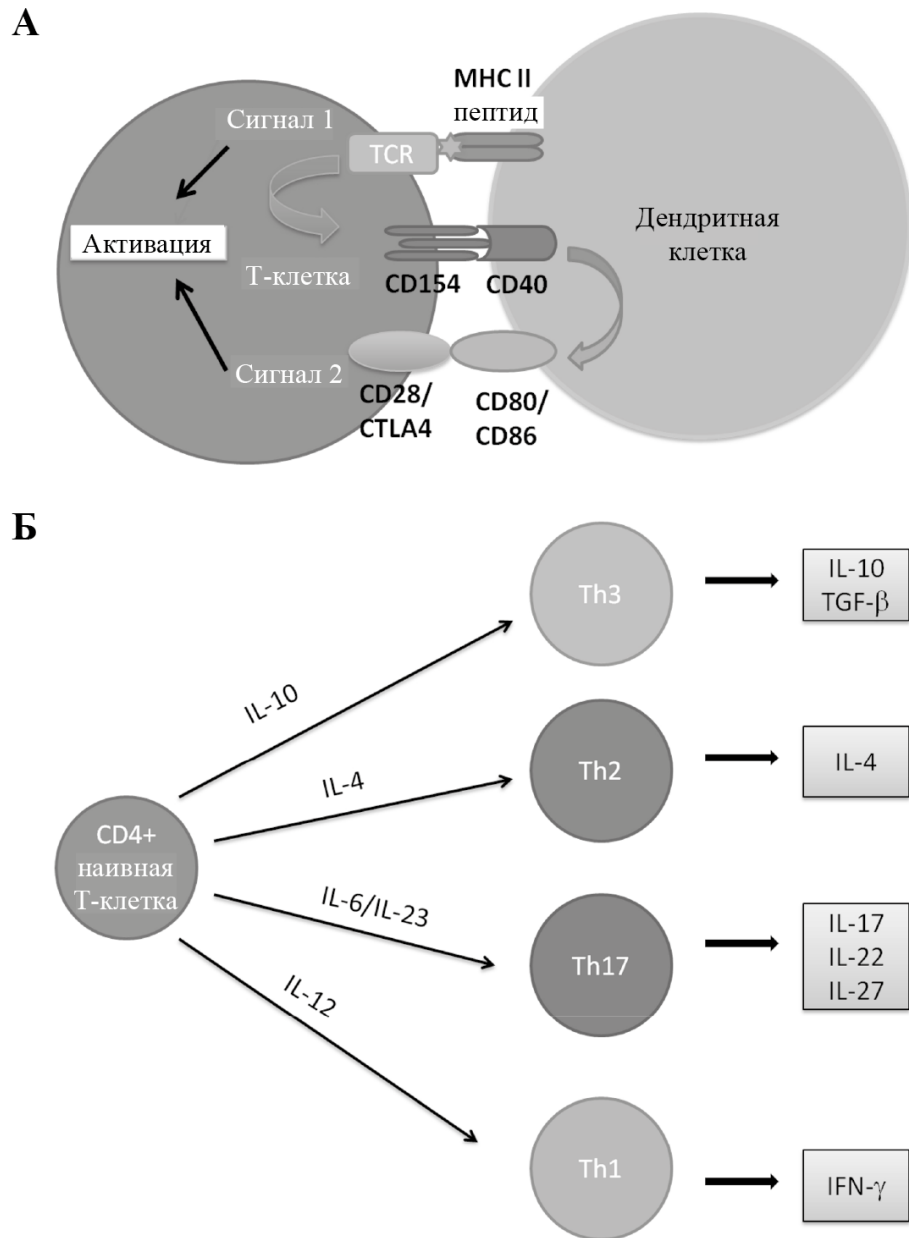


Рисунок 2.12. Активация и дифференциация наивных CD4 T-клеток. (А) При активации дендритные клетки (ДК) взаимодействуют с TCR на поверхности T-клеток (сигнал 1). Это вызывает активацию лиганда CD40 (CD154) на T-клетке, который связывает свой рецептор CD40 на ДК, что индуцирует активацию CD80 и CD86 на ДК, которые в свою очередь взаимодействуют с CD28 и CTLA4 на T-клетке (сигнал 2), что в конечном итоге активирует T-клетки и приводит к секреции цитокинов ДК. (Б) Дифференцировка наивных CD4 T-клеток зависит от цитокиновой среды. Секреция интерлейкинов IL-10, IL-4, IL-12 или комбинации IL-6 и IL-23 способствует дифференцировке в T-хелперов Th3, Th2, Th1 и Th17, соответственно (адаптировано из (112,113)).

После активации CD4 Т-клетки взаимодействуют с ДК через молекулу HLA класса II, которая распознает Т-клеточный рецептор (TCR) на Т-клетках (сигнал 1) во вторичном лимфоидном органе (**Рисунки 2.12А и 2.13(1)**). Однако активация Т-клеток также требует дополнительных сигналов. Взаимодействие HLA и TCR индуцирует активацию лиганда CD40 (CD154) на поверхности Т-клеток, которая связывается со своим рецептором CD40 на поверхности ДК. Это взаимодействие в свою очередь индуцирует активацию CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) на поверхности ДК, которые взаимодействуют с CD28 и антигеном-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA4) на поверхности Т-клеток (сигнал 2). CD28 связан с активацией Т-клеток, тогда как CTLA4 (CD158) является более регуляторным. После сигнала 2 ДК начинают продуцировать важные цитокины, которые связываются с рецепторами на поверхности Т-клеток и стимулируют их секретировать различные цитокины. Например, секреция интерлейкинов IL-10, IL-12, IL-4 или комбинации интерлейкинов IL-6/IL-1/IL-23 способствует дифференцировке в Th3, Th1, Th2 и Th17, соответственно (**Рисунок 2.12Б**) (112).

Периферически активированные Т-клетки попадают в различные микроокружения ЦНС через гематоэнцефалический барьер (BBB) в паренхиме ЦНС и через гематоэнцефалический барьер (BCB) в сосудистом сплетении (**Рисунок 2.13(2)**). Плотные соединения между эндотелиальными клетками BBB и эпителиальными клетками BCB ограничивают доступ иммунных клеток в ЦНС (114). Однако активированные Т-клетки памяти могут трансмигрировать в ЦНС, поскольку они экспрессируют молекулы адгезии, хемокиновые рецепторы и интегрины, которые позволяют этим клеткам легко преодолевать эти барьеры (115,116). К адгезионным белкам относят VCAM-1, ICAM-1, E-селектины и MHC II, экспрессия которых в значительной степени возрастает под действием провоспалительных цитокинов, в первую очередь таких как IFN γ и TNF α . Миграция лейкоцитов из крови в ЦНС включает хронологические лейкоцит-эндотелиальные взаимодействия. Привязывание и перекатывание лейкоцитов на поверхности эндотелия сосудов инициируют этот процесс, который опосредуется селектинами и углеводными рецепторами. Во время перекатывания лейкоциты также взаимодействуют с хемокинами, которые вырабатываются на поверхности эндотелия. Стимуляция хемокинами вызывает повышенную регуляцию молекул адгезии семейства интегринов на поверхности лейкоцитов и приводит к прочной адгезии лейкоцитов к эндотелию сосудов путем связывания с молекулами клеточной адгезии или компонентом внеклеточного матрикса. Этот процесс в конечном итоге приводит к трансмиграции лейкоцитов в ЦНС (117).

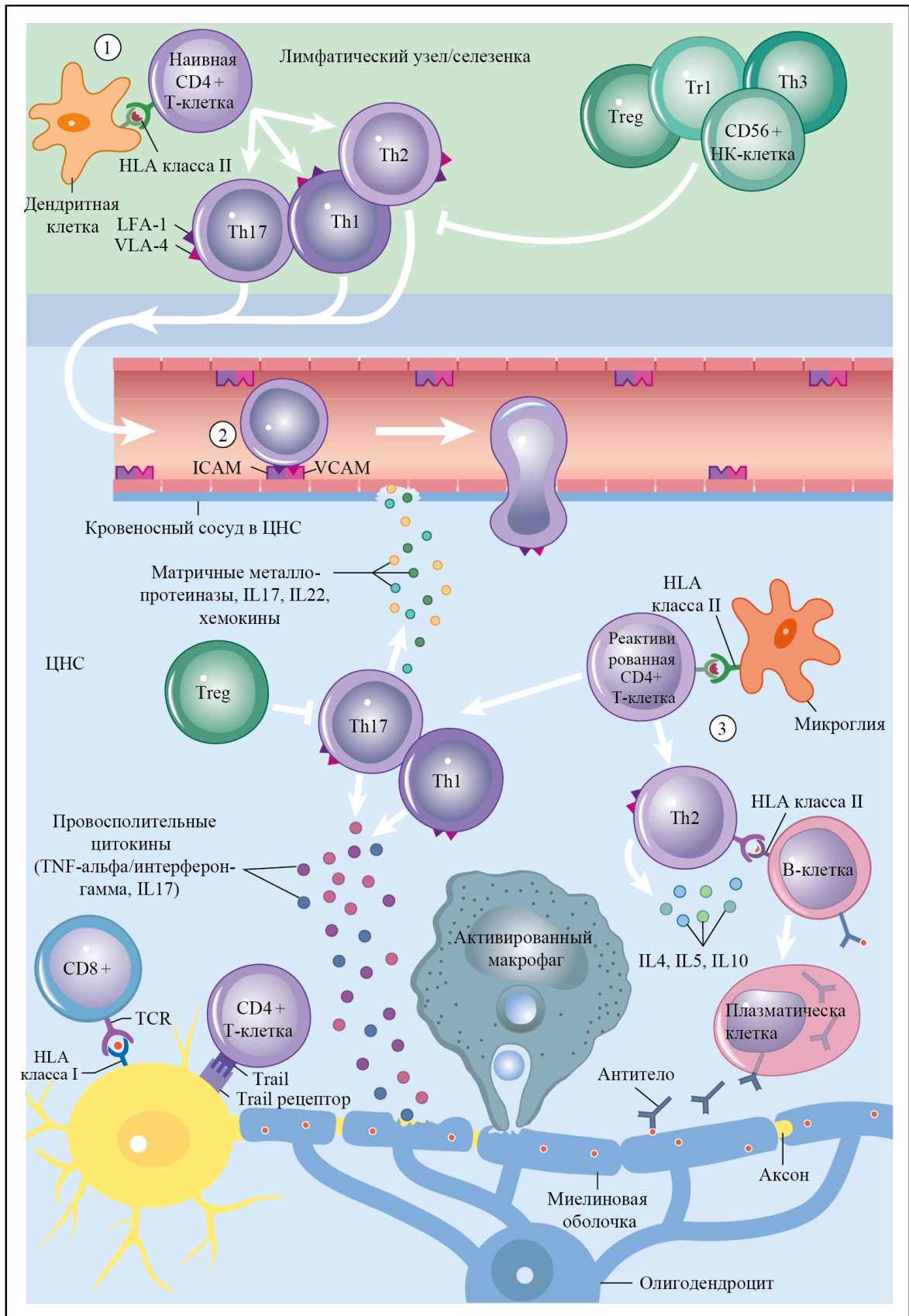


Рисунок 2.13. Современное понимание иммунологических явлений при РС. (1) Аутореактивные T-клетки активируются во вторичной лимфоидной ткани. (2) Активированные T-клетки экспрессируют молекулы адгезии, что позволяет им мигрировать в ЦНС. (3) В ЦНС миелин-специфичные T-клетки реактивируются и

начинают продуцировать цитокины, подобно тому, как Т-хелперы Th1 и Th17 продуцируют фактор некроза опухоли (TNF) и интерферон (IFN), которые могут повреждать олигодендроциты и нейроны. Th2-клетки секретируют провоспалительные цитокины, которые способствуют повреждению тканей, опосредованному В-клетками. ICAM - молекула внутриклеточной адгезии, VCAM - белок адгезии сосудистых клеток (адаптировано из (118)).

В ЦНС CD4 Т-клетки реактивируются и затем опосредуют активацию макрофагов/микроглии, В-клеток и цитотоксических CD8 Т-клеток (**Рисунок 2.13(3)**). Повреждение тканей при воспалительном поражении головного и спинного мозга может быть вызвано многочисленными механизмами, такими как механизмы, опосредованные клетками, цитокинами, антителами и радикалами (54).

Активированные макрофаги и микроглия играют важную роль в развитии поражения ЦНС. Они производят большое количество токсичных молекул, таких как протео- и липолитические ферменты, цитотоксические цитокины, эксцитотоксины и активные формы кислорода или интермедиаты оксида азота (NO), которые являются потенциальными индукторами повреждения аксонов. Для повреждения аксонов кислород и радикалы NO, по-видимому, имеют особое значение (119,120).

Т-клетки также играют центральную роль в развитии поражения РС. Как CD4 (Th1 и Th17), так и CD8 Т-клетки могут экспрессировать лиганды для рецепторов смерти. Среди них, было описано, как TNF-связанный лиганд, индуцирующий апоптоз (TRAIL), Fas-лиганд (FasL) и фактор некроза опухоли (TNF) α , опосредуют повреждение нейронов и олигодендроцитов (121). CD8 Т-клетки более распространены в очагах РС, чем CD4 Т-клетки, причем, CD8 Т-клетки могут распознавать антиген, представленный на HLA класса I на нейронах и олигодендроцитах, и убивать клетки-мишени (122,123).

Важно отметить, что развитие РС подразумевает, но не ограничивается наличием аутореактивных Т-лимфоцитов. Миелин-реактивные клоны были найдены и у условно здоровых индивидуумов, что позволяет говорить о значительно более тонком механизме, лежащем в основе этиологии РС. В настоящий момент появилось понимание значительной роли Т-регуляторных клеток (Treg) в патогенезе РС (124). Было показано, что возможно полностью подавить развитие спонтанного ЕАЕ у трансгенных мышей линии T/R-, Т-клетки которых экспрессируют исключительно MBP-специфичный TCR, путем пересадки CD4 CD25 Treg от мышей дикого типа или мышей линии T/R+, у которых лишь часть Т-клеток аутореактивна по отношению к MBP (125). Механизм действия подобных Treg, по-видимому, включает в себя сигнальный путь, опосредованный IL-10 (126).

В-клетки и антитела, продуцированные В-клетками, обнаруживаются в ЦНС пациентов с РС (127). Процесс активации В-клеток заключается в том, что В-клеточный рецептор на поверхности клеток узнает антиген и далее В-клетка начинает действовать, как антиген-презентирующая клетка и представлять антиген CD4 Т-клеткам (Th2). В случае узнавания и активации Т-клетки вырабатывают цитокины, которые в свою очередь стимулируют В-клетки пролиферировать и продуцировать антитела. Антигены-мишени гуморального иммунного ответа при РС все еще остаются до конца неизвестными, но предполагается, что основными мишенями антител являются белки миелиновой оболочки, такие как основной белок миелина (MBP), миелин-олигодендроцитарный гликопротеин (MOG) и протеолипидный белок (PLP). Возможными механизмами являются антитело-опосредованная активация комплемента и антитело-зависимая клеточная цитотоксичность через Fc-рецепторы (128,129).

2.4.3. Терапия рассеянного склероза

В течение последних 20 лет стал доступен ряд модифицирующих болезнь методов лечения (ДМТ) с частичной эффективностью для пациентов с RRMS. Все эти препараты в основном нацелены на воспалительный компонент заболевания. Все методы лечения показали свою эффективность в типе RRMS, но не в PPMS. До сих пор наиболее часто используемые методы лечения, одобренные для RRMS, включают бета-IFN 1-го типа и глатирамера ацетат (GA) (130). В нескольких последующих исследованиях была проведена оценка эффективности терапии при РС, и было показано, что лечение снижает частоту рецидивов и уменьшает количество поражений (131–134).

Интерфероны — это цитокины, которые обычно высвобождаются из лимфоцитов в ответ на патогены. Существует три типа интерферонов: IFN- α , - β и - γ . IFN- β одобрен для лечения РС. Механизм его действия до конца не изучен, но было показано, что он ингибирует пролиферацию Т-клеток, снижает миграцию Т-клеток из периферии в ЦНС и изменяет секрецию цитокинов Т-клеток в ответ на противовоспалительные реакции (135).

GA представляет собой синтетический полипептид (40-100 аминокислот), состоящий из случайных последовательностей из четырех аминокислот (тирозин, глутамат, аланин и лизин), которые обладают высоким процентом содержания в основном белке миелина (MBP). Клиническая эффективность GA объясняется смещением провоспалительных реакций в сторону противовоспалительных (136,137).

Поскольку будущие терапевтические агенты, вероятно, будут нацелены конкретно на патофизиологические пути, идентификация возможных иммунологических подтипов отдельных пациентов с РС может позволить более целенаправленное применение

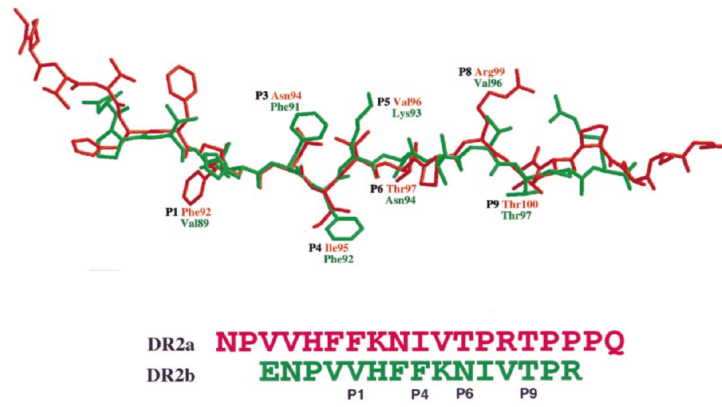
различных методов лечения (138). Существует острая необходимость в биомаркере *in vivo*, который отражал бы основной иммунопатогенез у пациентов с РС. Более того, конечной целью открытия биомаркеров при РС является разработка инструментов для прогнозирования исхода заболевания, более точной оценки активности заболевания и прогнозирования терапевтических реакций.

2.4.4. Аутоантигены рассеянного склероза

В патологии РС известны несколько антигенов. Одним из основных антигенов является основной белок миелина (МВР), который изначально был выявлен в качестве одного из возможных возбудителей экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ) (139). Следующим изученным антигеном, обладающим энцефалитогенной активностью, стал протеолипидный белок (PLP), второй по встречаемости белок миелиновых оболочек (140). Среди миелиновых антигенов при РС важную роль также играет MOG (миелин-олигодендроцитарный гликопротеин), так как он является миелиновым белком ЦНС и, располагаясь на поверхности олигодендроцитов, может вызвать продукцию демиелинизирующих патогенных аутоантител и обладает энцефалитогенностью. Продукция аутоантител ведет к разрушению белой материи. Однако MOG составляет лишь небольшой процент среди миелиновых белков 0.01-0.05% (141). Другие миелиновые белки, например, MAG (миелин-ассоциированный гликопротеин), вызывали воспаление и Т-клеточную реактивность как у больных РС, так и у здоровых людей, но не могли возбудить ЕАЕ.

Наиболее изученным антигеном в вопросе презентации при РС на данный момент является МВР. Ранее были получены кристаллические структуры комплексов двух МНС II гаплотипа HLA-DR2a (*DRA5*01:01, DRB5*01:01*) – HLA-DR2b (*DRA1*01:01, DRB1*15:01*) – DQ6.2 (*DQA1*01:02, DQB1*06:02*). Оба белка HLA-DR могут презентировать иммунодоминантный пептид МВР₈₄₋₁₀₂ CD4 Т-клеткам с известными TCR-клонами. HLA-DR2a связывает в пептид-связывающей борозде фрагмент МВР₈₆₋₁₀₅, а HLA-DR2b - МВР₈₅₋₉₉ (**Рисунок 2.14**). Существуют несколько теорий, объясняющих кросс-презентацию антигена разными молекулами МНС II. Первая заключается в том, что связывание пептида происходит одинаково эффективно из-за структурной схожести строения двух пептид-связывающих борозд МНС II и одинаковой конформации и выравнивания пептида в борозде. По второй теории при связывании пептида происходит конформационное изменение пептида и осуществляется другой вариант выравнивания в борозде. Взаимодействие МВР₈₄₋₁₀₂ с HLA-DR2a и HLA-DR2b осуществляется по последней схеме (142).

A



Б

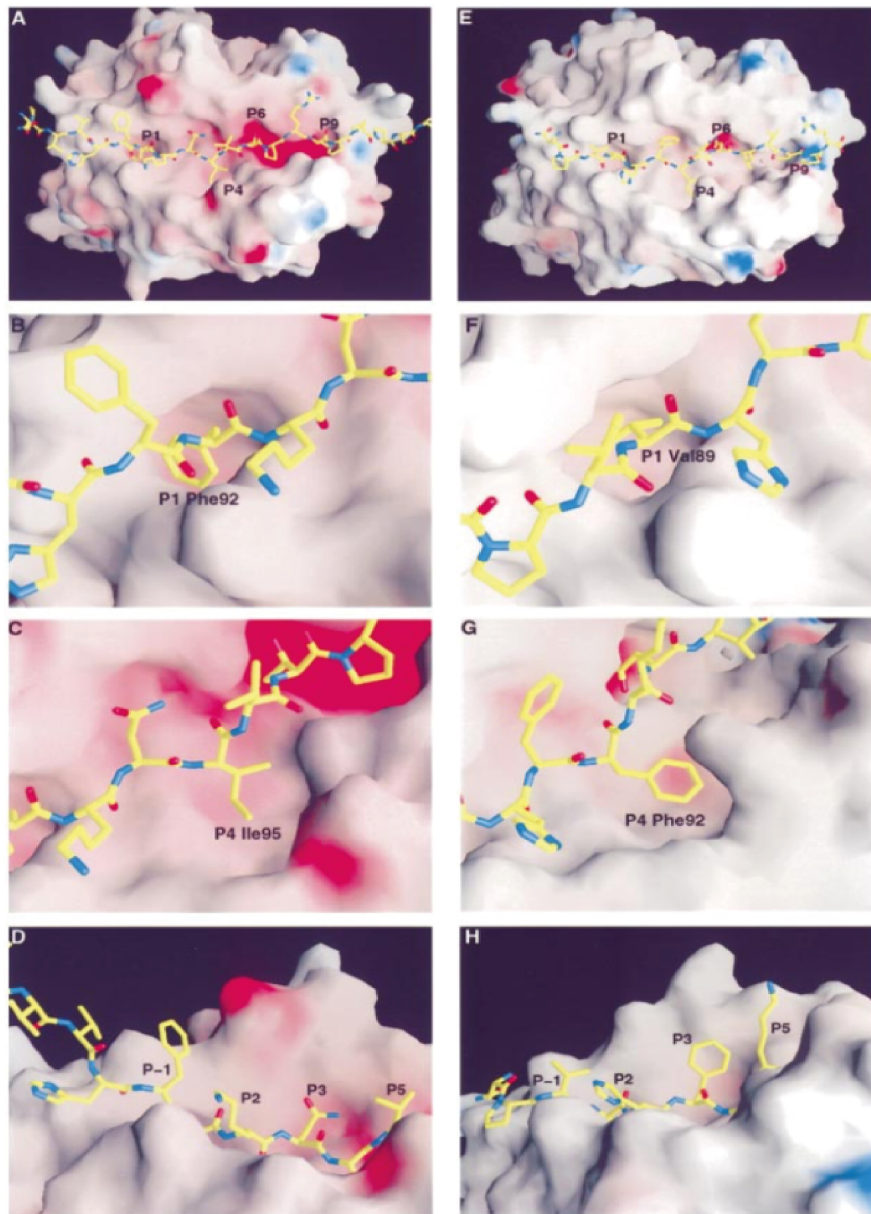


Рисунок 2.14. (A) Положения и последовательности пептидов MBP₈₆₋₁₀₅ (красным), связанного с HLA-DR2a, и MBP₈₅₋₉₉ (зеленым), связанного с HLA-DR2b. (Б) Сравнение кристаллических структур комплексов HLA-DR2a-MBP₈₆₋₁₀₅ (A-D) и HLA-DR2b-MBP₈₅₋₉₉ (E-H) (142).

Молекулы HLA-DR2a и HLA-DR2b отличаются по размеру основных, участвующих в связывании, карманов P1 и P4. У HLA-DR2a P1 достаточно глубокий и способен вместить Phe92, а P4 маленький и занят Ile95, то есть не способен вмещать крупные ароматические аминокислотные остатки. В случае HLA-DR2b ситуация обратная: в P1 содержится Val89, а в P4 - Phe92. P1 у HLA-DR2b меньше, чем у других HLA-DR в связи с положением β 86. В случае HLA-DR2a глицин в этом положении позволяет войти туда стерически остатку ароматической аминокислоты, однако в случае HLA-DR2b валин в этом положении позволяет войти только лишь Val89. Ситуация с P4, образованным главным образом Tyr β 78 и Phe β 26, обратная: у HLA-DR2b в положении β 71 – аланин, который создает достаточное пространство для Phe92. В случае других HLA-DR карман P4 значительно меньше в связи с тем, что в положении β 71 встречаются аргинин или лизин (143). С-концевая часть пептида MBP₈₅₋₉₉ связывается в борозде частично, тем самым немного приподнята. Данные факты свидетельствуют о происходящем смещении в выравнивании пептида в пептид-связывающей борозде, что может вести к созданию различных T-клеточных эпитопов, активирующие T-клетки (142). В случае HLA-DR2a у больных РС был найден аутореактивный T-клеточный клон 3A6 (144), а в случае HLA-DR2b - Ob.1A12, которые уходят от отрицательной селекции в тимусе (145,146).

2.4.5. Отрицательная селекция T-клеток в тимусе, как способ протективности против развития аутоиммунных заболеваний

Чтобы вызвать аутоиммунное заболевание, аутореактивные T-клетки должны уйти от отрицательной селекции в тимусе, но все еще быть способными передавать сигнал после узнавания собственных антигенов в органах-мишенях. Селекция в тимусе основана в первую очередь на узнавании комплексов MHC II-собственный пептид: слабое взаимодействие с комплексом MHC II-пептид способствует выживаемости T-клеток (положительная селекция) тогда, как результатом сильного взаимодействия является апоптоз (отрицательная селекция) (147–149). Такой механизм можно считать одним из способов протективности против развития аутоиммунных заболеваний. Невыполнение отрицательной селекции возможно вследствие сниженной аффинности TCR к MHC II-пептид так, что комплекс с TCR слишком нестабильный или коротко-живущий, чтобы вызвать отрицательную селекцию, но все еще стабильный для активации в периферии при высоких локальных концентрациях антигена (150) или для активации кросс-реактивными чужеродными пептидами (151). Альтернативным механизмом может быть слабое связывание собственного пептида с MHC II, что дестабилизирует комплекс с TCR (152,153).

Рассмотрим несколько примеров, относящиеся именно к случаю рассеянного склероза. Типично TCR располагается диагонально над поверхностью, образованной пептидом и α -спиралями МНС II. Варибельный домен α -цепи ($V\alpha$) TCR располагается над N-концевой половиной пептида, а варибельный домен β -цепи ($V\beta$) – над C-концевой. Каноническая диагональная ориентация была показана на примере структуры TCR HA1.7 человека, образующего тримолекулярный комплекс с пептидом гемагглютинина вируса гриппа и HLA-DR1 (**Рисунок 2.15**) (154). Определяющие комплементарность участки (CDR) рецептора, CDR3 α и CDR3 β , располагаются над центральным аминокислотным остатком (P5) связанного пептида. Петли CDR1 и CDR2 образуют в основном контакты с α -спиралями МНС. Центральная диагональная ориентация в комплексе HA1.7-HA-DR1 лучше всего обеспечивает оптимальное связывание для максимального взаимодействия между TCR и МНС, результатом которого является высокая аффинность (1-50 μ M).

Топология структуры TCR Ob.1A12, связанного с MBP-DR2b заметно отличается от комплексов, включающих чужеродные пептиды (146). Для TCR, который уходит от отрицательной селекции, Ob.1A12 связывает MBP-DR2b с низкой аффинностью ($K_D > 100 \mu$ M). TCR не располагается над центральной областью комплекса МНС-пептид, а образует контакты с N-концевой половиной пептида MBP.

Еще один TCR, уходящий от отрицательной селекции, - 3A6, узнающий комплекс MBP-DR2a также с низкой аффинностью ($K_D > 100 \mu$ M) (144). Как и Ob.1A12, 3A6 сдвинут в сторону N-концевой части пептида, однако ориентация над МНС типично диагональная. Низкая аффинность 3A6 достигается за счет полного отсутствия водородных и солевых связей с аминокислотными остатками пептида. Взаимодействие между 3A6 и пептидом MBP основано на Ван-дер-Ваальсовых контактах.

В качестве другого варианта взаимодействия TCR одного из пациентов с РС MS2-3C8 узнает пептид MBP₁₁₁₋₁₂₉ и HLA-DR4 с канонической диагональной ориентацией с высокой аффинностью ($K_D = 5 \mu$ M) (155). Этот случай является примером альтернативного механизма ухода от отрицательной селекции, когда слабое связывание собственного пептида с МНС дестабилизирует комплекс с TCR. Нестабильное взаимодействие объясняется тем, что пептид сидит в борозде МНС не так глубоко, как, например, пептид HA, в связи со стерически большими аминокислотными остатками в положениях P6 и P7 пептида (Gln-Arg).

Таким образом нестабильность тримолекулярного комплекса, позволяющая уходить от отрицательной селекции, может достигаться за счет альтернативного неклассического докинга TCR к комплексу МНС-пептид либо за счет слабого связывания пептида МНС.

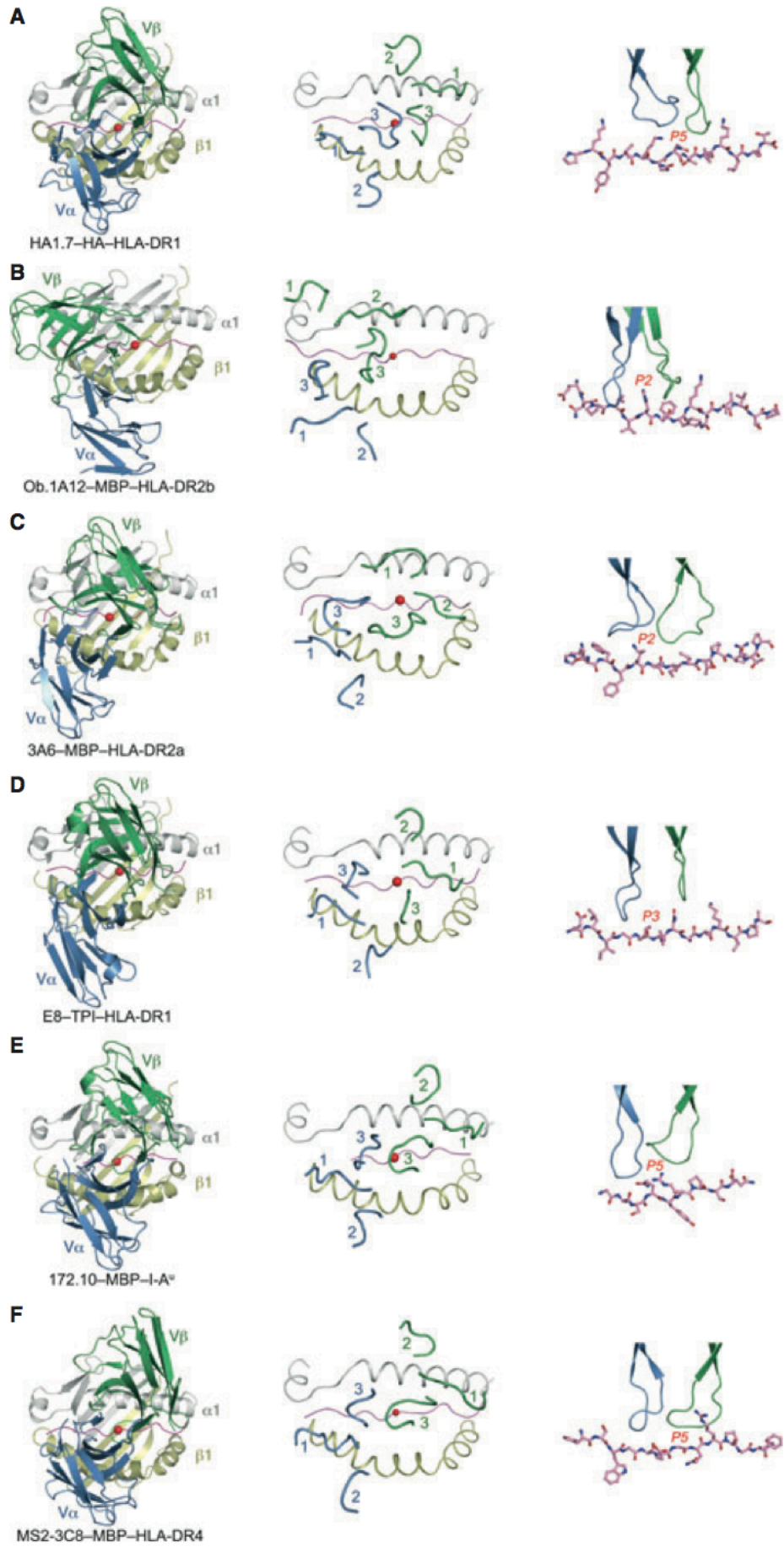


Рисунок 2.15. Сравнение аутоиммунных комплексов TCR-пептид-MHC II.

2.5. Ассоциация аллелей гена HLA-DRB1 с рассеянным склерозом

HLA является важным генетическим фактором при рассеянном склерозе также, как и при других аутоиммунных заболеваниях. Носительство разных аллелей гена HLA-DRB1 определяет высокую или низкую предрасположенность к РС.

HLA-DRB1*15:01 является одним из самых значимых аллелей риска для северно-европейской популяции, особенно в гаплотипе HLA-DRB1*15:01-HLA-DRB5*01:01-HLA-DQA1*01:02-HLA-DQB1*06:02 (*Таблица 2.1*) (156). Поскольку все эти аллели обладают существенным неравновесным сцеплением, долгое время оставалось неясным, какой именно из аллелей в наибольшей степени отвечает за предрасположенность к РС. Продвинувшись в разрешении этой задачи позволило исследование связи генов МНС II с РС в популяции афроамериканцев. У них в меньшей степени проявляется неравновесное сцепление, и была показана преимущественная ассоциация аллеля HLA-DRB1*15:01 с РС, что говорит о его главенствующей роли среди четырех входящих в гаплотип аллелей (157). Однако, в японской популяции данный аллель считается вторым по значимости. Он проявляет выраженный положительно ассоциированный эффект лишь в случае отсутствия основных ассоциированных аллелей японской популяции HLA-DRB1*04:05 и HLA-DPB1*03:01 (158). В популяции Сардин (сардов) с высокой встречаемостью РС положительно ассоциированными считаются гаплотипы HLA-DRB1*13:03-HLA-DQB1*03:01, HLA-DRB1*04:05-HLA-DQB1*03:01 и HLA-DRB1*03:01-HLA-DQB1*02:01 (159). Группа аллелей (далее аллель) HLA-DRB1*13 признана положительно ассоциированной в популяции Израиля (160). Частота встречаемости HLA-DRB1*03 значительно выше у больных РС, чем у здоровых доноров. При носительстве данного аллеля представителями европеоидной расы, ассоциированность с заболеванием проявлялась лишь у гомозигот. Однако, в популяции Сардин (159), Японии (158), Ирана и афроамериканцев Северной Америки (161) выраженный положительно ассоциированный эффект проявлялся и в случае гетерозигот.

Наиболее значимым протективным аллелем северно-европейской популяции считается HLA-DRB1*14, а также HLA-DRB1*07 и HLA-DRB1*16 (63). Аллель HLA-DRB1*0901 обладает высокой частотой встречаемости в азиатских странах и обладает выраженным протективным эффектом для японской популяции. Также значительными протективными свойствами обладает HLA-DRB1*11, широко встречаемый в популяции афроамериканцев (161), в Канаде (162) и на Сардинах (159).

Частота встречаемости аллелей HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*08 и HLA-DRB1*10 в северо-европейской популяции среди больных РС и здоровых индивидов не позволила отнести их к положительно ассоциированным или протективным аллелям (63).

Таблица 2.1. Ассоциация аллелей HLA-DRB1 с рассеянным склерозом в разных популяциях.

Группа аллелей HLA-DRB1	Популяции с высокой частотой встречаемости данной группы аллелей	Ассоциация
HLA-DRB1*03	Японская, Сардины, Иранская, Афроамериканская	положительная
HLA-DRB1*04	Японская, Сардины	положительная
HLA-DRB1*07	Европеоидная	отрицательная
HLA-DRB1*09	Японская	отрицательная
HLA-DRB1*11	Канадская, Сардины	отрицательная
HLA-DRB1*13	Сардины, Израильская	положительная
HLA-DRB1*14	Северно-европейская	отрицательная
HLA-DRB1*15	Европеоидная (в основном), менее выраженный эффект среди азиатских стран	положительная

Говоря о русской популяции, положительная ассоциация аллеля HLA-DRB1*15 с РС была показана в результате анализа ограниченной независимой когорты этнически русских (163). Что касается других аллелей, то они мало изучены в плане прогностических факторов предрасположенности или протективности развития РС в русской популяции. Более того, механизмы протективности в вопросе HLA-DR в патологии аутоиммунных заболеваний остаются до сих пор непонятными, кроме очевидной неспособности аллельных вариантов с низкой предрасположенностью к заболеванию в той или иной популяции HLA-DR, -DQ или -DP связывать фрагменты аутоантигенов и презентировать их на поверхности антиген-презентирующих клеток.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Химические реактивы, буферные растворы и сопутствующие материалы

Среды:

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

2хУТ-агар: 2хУТ, 18 г/л агара.

SOB: 20 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л NaCl, 250 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂.

SOC: SOB, 50 мМ глюкоза.

Среда для ведения клеточной культуры S2: Schneider's Drosophila Medium (Gibco) с добавлением антибиотиков Penicillin-Streptomycin (Gibco), Glutamax (Gibco), 10% FBS HyClone (Gibco).

Среда для экспрессии клеточной культуры S2: Insect Express Medium с добавлением антибиотиков Penicillin-Streptomycin (Gibco), Glutamax (Gibco).

Среда для ведения клеточной культуры НЕК293F: FreeStyle (Gibco) с добавлением 10% FBS HyClone (Gibco), антибиотик-антимикотик (Gibco).

Среда для ведения клеточной культуры гибридом L243: 50% advanced DMEM (Gibco), 50% advanced RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% FBS HyClone (Gibco), Glutamax (Gibco), антибиотик-антимикотик (Gibco).

Растворы:

Лизирующий буфер для выделения плазмидной ДНК: 50 мМ глюкоза, 25 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 10 мМ ЭДТА.

Соленый спирт: 70% EtOH, 30% 0,14М NaCl.

TE: 10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0.

TBE (10x): 0,89 М Трис-основание, 0,89 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА, pH 8,0.

Буфер нанесения образцов для электрофореза в агарозном геле (10x): 0,1% бромфеноловый синий, 0,5% SDS, 0,1 М ЭДТА, pH 8,0, 50% глицерина.

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 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,5.

Буфер элюции для аффинной хроматографии Protein G: 100 мМ Gly-HCl, pH 2,5.

Буфер элюции для аффинной хроматографии L243: 100 мМ Gly-NaOH, pH 11,5.

Буфер нанесения для металл-хелатной хроматографии: 50 мМ фосфат натрия, 300 мМ NaCl, 2 мМ имидазол, pH 8,0.

Буфер промывки для металл-хелатной хроматографии: 50 мМ фосфат натрия, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, pH 8,0.

Буфер элюции для металл-хелатной хроматографии: 50 мМ фосфат натрия, 300 мМ NaCl, 300 мМ имидазол, pH 8,0.

Буфер А (Mono S): 50 мМ ацетат натрия, pH 5,0.

Буфер Б (Mono S): 50 мМ ацетат натрия, 1М NaCl, pH 5,0.

Буфер А (Mono Q): 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0.

Буфер Б (Mono Q): 20 мМ Tris-HCl, 1 М NaCl, pH 8,0.

Концентрирующий гель: 5% смеси акриламид-бисакриламид (29:1), 0,1% SDS, 0,125 М Tris-HCl, pH 6,8.

Разделяющий гель: 12% смеси акриламид-бисакриламид (29:1), 0,1% SDS, 0,375 М Tris-HCl, pH 8,9.

Буфер нанесения образцов для электрофореза по Леммли (2x): 5% 2-меркаптоэтанола, 4% SDS, 0,25 М Tris-HCl, pH 6,8, 4 мМ ЭДТА, 10% глицерина, 0,25 мг/мл бромфенолового синего.

Электродный буфер для электрофореза по Леммли (5x): 72 г/л глицина, 5 г/л SDS, 6,5 г/л Tris-HCl, pH 8,3.

Раствор для окрашивания полиакриламидного геля: 15% этанола, 25% уксусной кислоты, 0,3 г/л красителя Кумасси синий R-250 и 0,45 г/л пятиводного сульфата меди.

Карбонатный буфер: 1,5 г/л Na₂CO₃, 29,3 г/л NaHCO₃, pH 9,6.

Блокирующий буфер для вестерн-блоттинга и ИФА: PBS, 2% обезжиренного сухого молока.

Конъюгатный буфер для вестерн-блоттинга и ИФА: PBS, 0,2% обезжиренного сухого молока, 0,05% Tween-20.

Буфер для переноса для иммуноблоттинга: 39 мМ глицин, 48 мМ Tris-HCl, 0,0375% SDS, 20% этанола.

Цитратный буфер для реакции: 50 мМ цитрат натрия, 150 мМ NaCl, pH 5,3.

Антибиотики:

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

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

3.2. Методы работы с клетками бактерий

Получение электрокомпетентных клеток бактерий

Для всех процессов генной инженерии использовали клетки *E. coli* штамма DH5 α . Клетки из музея истощающим штрихом высевали на чашку Петри с 2хYT-агаром без антибиотика и далее инкубировали 14 часов при 37°C в воздушном термостате. Единичную колонию переносили и инкубировали в 5 мл среды 2хYT без антибиотика для получения ночной культуры и растили при 37°C с хорошей аэрацией. По 250 мкл ночной культуры высевали с разбавлением 1:1000 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 на льду около десяти минут, стерильно переносили в заранее охлажденные центрифужные стаканы на 250 мл, центрифугировали 10 минут 4000 об/мин при 4°C на центрифуге Beckman J-21 с ротором JA-14. Удаляли среду и ресуспендировали клетки в небольшом объеме ледяной стерильной деионизированной воды, доводили водой до 200 мл, центрифугировали в тех же условиях. Промывку водой повторяли еще 2 раза, затем клетки отмывали охлажденным 10% глицерином. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл 10% глицерина, аликвотили по 100 мкл в стерильные охлажденные эппендорфы, после чего замораживали в жидком азоте и хранили при -80°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 (BioRad). К размороженной на льду аликвоте (100 мкл) электрокомпетентных клеток *E. coli* 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 заранее термостатированной при 37°C 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 клетки (100 мкл при трансформации плазмидой, 1 мл при трансформации лигазной смесью) на чашку Петри с 2хYT-агаром с селективным антибиотиком и инкубировали в воздушном термостате при 37°C 14-16 часов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для клональной селекции

Аmplификацию проводили на приборе DNA Cycler 480 (Perkin-Elmer) по следующей схеме. Готовили реакционную смесь следующего состава (объемы приведены на одну реакцию): 2 мкл десятикратного буфера для Taq-полимеразы (Fermentas), по 10 пмоль прямого (for) и обратного (rev) праймеров, 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата (Fermentas), 0,2 мкл Taq-полимеразы (Fermentas), стерильная вода до 20 мкл. Раствор разносили по ПЦР-пробиркам по 20 мкл в каждую. Бактериальные колонии переносили петлей в пробирки и одновременно делали штрихи на свежей размеченной чашке Петри. Пробирки помещали в прибор, проводили денатурацию при 94°C 3 минуты и осуществляли 25 циклов ПЦР (денатурация 94°C 30 сек, отжиг праймеров $X = 2^{\circ}\text{C} \times n(\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times n(\text{G}+\text{C}) - 5^{\circ}\text{C}$ 30 сек, элонгация 72°C 30-90 сек из расчета скорости полимеразы 1000 пар в минуту и длины фрагмента). Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в агарозном геле.

Ночная культура

Бактериальную колонию сеяли в 5 мл среды 2xYT с добавлением селективного антибиотика. Клетки инкубировали при 37°C и интенсивной аэрации около 12-14 часов.

3.3. Методы работы с нуклеиновыми кислотами

Аmplификация фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции

Аmplификацию проводили на приборе DNA Cycler 480 (Perkin-Elmer) по следующей схеме. Готовили реакционную смесь следующего состава: 10 нг матричной ДНК, 5 мкл десятикратного буфера для Taq-полимеразы (Fermentas), по 15 пмоль прямого и обратного праймеров, 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата (Fermentas), 1 мкл Taq-полимеразы (Fermentas), стерильная вода до 50 мкл. Реакции помещали в прибор, проводили денатурацию при 94°C 3 минуты и осуществляли 25 циклов ПЦР в случае плазмидной ДНК в качестве матрицы и 35 циклов в случае геномной ДНК (денатурация 94°C 30 сек, отжиг праймеров $X = 2^{\circ}\text{C} \times n(\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times n(\text{G}+\text{C}) - 5^{\circ}\text{C}$ 30 сек, элонгация 72°C 30-90 сек из расчета скорости полимеразы 1000 пар в минуту и длины фрагмента). В случае перекрывающейся ПЦР проводили в два этапа: на первом этапе получали 2-3 фрагмента по отдельности с помощью стандартной программы ПЦР, на втором этапе полученные перекрывающиеся фрагменты использовали в качестве матрицы и праймеры добавляли

после 5 циклов, чтобы перекрывающиеся фрагменты успели отжечься друг на друга. Продукты полимеразной цепной реакции анализировали электрофорезом в агарозном геле. Полученные продукты ПЦР обрабатывали DpnI для удаления матричной ДНК и дальнейшую очистку проводили с помощью набора Cleanup Standart (Евроген).

Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции

Рестрикцию ДНК (буфер, температура и время инкубации, количество) проводили согласно рекомендациям производителя соответствующих ферментов. При рестрикции плазмидной ДНК в последние 10 минут инкубации добавляли панкреатическую рибонуклеазу до конечной концентрации 1 мкг/мл. Очистку ДНК проводили с помощью набора Cleanup Standart (Евроген).

Лигирование фрагментов ДНК

Для лигирования использовали ДНК-лигазу фага T4 и стандартный буферный раствор (Fermentas). Лигирование проводили в объеме 20 мкл, при молярном соотношении вектора и вставки 1:10, в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем в лигазную смесь добавляли 1/10 объема тРНК (соосадителя), обрабатывали равным объемом хлороформа, и пересаждали водную фазу 3 объемами этанола. Центрифугировали 10 минут на скорости 13200 об/мин (настольная центрифуга Eppendorf) при комнатной температуре, промывали осадок 70% спиртом, затем растворяли в 6 мкл воды.

Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК в большинстве случаев проводили по (164) с некоторыми модификациями. Одну бактериальную колонию сеяли в 5 мл 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. Осадок ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 400 мкл свежеприготовленного раствора 0,2 М NaOH и 1% SDS, 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 ресуспендировали в 100 мкл ледяного 2 М NH_4Ac , 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, инкубировали 10 минут при комнатной температуре, центрифугировали 10 минут в тех же условиях. Осадок промывали 300 мкл соленого спирта, подсушивали на воздухе, растворяли в 20 мкл ТЕ 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 NH_4Ac , pH 7,0, инкубировали 5 минут при 0°C и центрифугировали 5 минут на скорости 13200 об/мин при комнатной температуре. Далее супернатант переосаждали изопропанолом, как описано выше. Осадок, полученный после третьего переосаждения изопропанолом, растворяли в 49 мкл ТЕ, добавляли 1 мкг/мл панкреатической РНКазы и инкубировали 15 минут при 37°C. Добавляли 25 мкл 2 М NH_4Ac , 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 1,0-1,5% агарозный гель, приготовленный на однократном TBE с бромистым этидием в концентрации 0,5 мкг/мл. Пробы смешивали в соотношении 1:10 с буфером нанесения. Электрофорез проводили в буфере TBE 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 TBE. Толщина аналитического геля составляла 0,75 мм, препаративного – 1,5 мм. В течение 10 минут проводили предварительный электрофорез при 90-110 В. Пробы смешивали в соотношении 1:10 с буфером нанесения и наносили на гель. Электрофорез начинали 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 1% агарозных или 5% 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 электрофорезной 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 тремя 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.

Секвенирование плазмидной ДНК

Секвенирование плазмидной ДНК проводили методом Сенгера при помощи автоматического секвенатора ABI PRISM в Межинститутском ЦКП «Геном» ИМБ РАН.

3.4. Создание генетических конструкций

Все карты полученных генетических конструкций представлены в **Разделе 7 (Приложение)**.

pMT-V5/His_DRA, pRmHa_DRB1_0101 и pRmHa_DRB1_1501 для экспрессии HLA-DRB1*01:01 и HLA-DRB1*15:01

Генетические конструкции pMT-V5/His_DRA и pRmHa_DRB1_0101, кодирующие внеклеточные вариабельные и константные домены α - и β -цепей HLA-DR1 с собственными лидерными пептидами, были любезно предоставлены профессором Ю.К. Сыкулевым (Университет Томаса Джефферсона, Филадельфия, США). На базе pRmHa_DRB1_0101 была получена генетическая конструкция pRmHa_DRB1_1501, кодирующая β -цепь HLA-DR15. С помощью метода ПЦР были получены два перекрывающихся фрагмента DRB15-1 и DRB15-2, соответствующие экзонам 2 и 3 β -цепи HLA-DR15, соответственно. В качестве

матрицы была взята геномная ДНК, выделенная из клеток крови нормального индивидуума с гетерозиготным генотипом HLA-DRB1*01:01/*15:01 с помощью кита QIAamp genomic DNA (Qiagen). ПЦР-продукт DRB15-1 был получен с помощью праймеров DRB15-1 for и DRB15-1 rev, а ПЦР-продукт DRB15-2 - DRB15-2 for и DRB15-2 rev. Температуру отжига праймеров использовали 60°C, а время элонгации – 20 сек. С помощью метода перекрывающейся ПЦР был получен полный фрагмент DRB15. В качестве матрицы были взяты ПЦР-продукты DRB15-1 и DRB15-2. ПЦР-продукт DRB15 был получен с использованием праймеров DRB15-1 for и DRB15-2 rev. Температуру отжига праймеров использовали 60°C, а время элонгации – 40 сек. Полученный фрагмент был лигирован в pRmHa_DRB1_0101 по сайтам рестрикции эндонуклеаз NheI и SacI с удалением последовательности DRB1*01:01. В результате была получена конструкция pRmHa_DRB1_1501.

pRmHa_DRB1_0101_CLIP и pRmHa_DRB1_1501_CLIP для экспрессии HLA-DRB1*01:01 и HLA-DRB1*15:01 с CLIP

На базе плазмид pRmHa_DRB1_0101 и pRmHa_DRB1_1501 были получены две генетические конструкции, содержащие на N-конце аминокислотной последовательности β-цепей HLA-DR1 и HLA-DR15, соответственно, пептид CLIP (PVSKMRMATPLLMQA) с серин-глициновым линкером с сайтом тромбина (GGGGSLVPRGSGGGGS).

С помощью метода ПЦР были получены два фрагмента DRB1CLIP-1/DRB15CLIP-1 и DRB1CLIP-2/DRB15CLIP-2. В качестве матрицы была взята конструкция pRmHa_DRB1_0101/pRmHa_DRB1_1501. ПЦР-продукт DRB1CLIP-1/DRB15CLIP-1 был получен с помощью праймеров DRB for и DRB1CLIP-1/DRB15CLIP-1 rev, а ПЦР-продукт DRB1CLIP-2/DRB15CLIP-2 - DRB1CLIP-2/DRB15CLIP-2 for и DRB rev. Температуру отжига праймеров использовали 60°C, а время элонгации – 25 сек. С помощью метода ПЦР был получен полный фрагмент DRB1CLIP/DRB15CLIP. В качестве матрицы были взяты ПЦР-продукты DRB1CLIP-1/DRB15CLIP-1 и DRB1CLIP-2/DRB15CLIP-2. ПЦР-продукт DRB1CLIP/DRB15CLIP был получен с помощью праймеров DRB for и DRB rev. Температуру отжига использовали 60°C, а время элонгации – 40 сек. Полученные фрагменты DRB1CLIP и DRB15CLIP были лигированы в pRmHa_DRB1_0101 и pRmHa_DRB1_1501, соответственно, по сайтам рестрикции эндонуклеаз NheI и Eco81I с удалением соответствующих последовательностей DRB1*01:01 и DRB1*15:01. В результате были получены конструкции pRmHa_DRB1_0101_CLIP и pRmHa_DRB1_1501_CLIP.

pMT-V5/His_DRA_Fos_Avitag, pRmHa_DRB1_0101_Jun, pRmHa_DRB1_0101_CLIP_Jun, pRmHa_DRB1_1501_Jun и pRmHa_DRB1_1501_CLIP_Jun

В целях повышения уровня экспрессии и стабильности комплекса на С-конец цепей HLA-DR были добавлены последовательности лейциновых мотивов факторов транскрипции c-fos в случае α -цепи и c-jun в случае β -цепей с глициновым линкером с сайтом тромбина. Кроме того, на С-конец α -цепи был добавлен Avitag – сайт биотинилирования специфической биотин-лигазы BirA.

Синтезированный фрагмент Fos-Avitag был лигирован в pMT-V5/His_DRA по сайтам EcoRI и AgeI. Синтезированный фрагмент Jun был лигирован в pRmHa_DRB1_0101, pRmHa_DRB1_0101_CLIP, pRmHa_DRB1_1501 и pRmHa_DRB1_1501_CLIP по сайтам SacI и SalI. В результате были получены конструкции pMT-V5/His_DRA_Fos_Avitag, pRmHa_DRB1_0101_Jun, pRmHa_DRB1_0101_CLIP_Jun, pRmHa_DRB1_1501_Jun и pRmHa_DRB1_1501_CLIP_Jun.

HLA-DM

pGEM5zf_DMA в качестве промежуточной стадии для сборки α -цепи HLA-DM

С помощью метода ПЦР были получены два фрагмента DMA-2 и DMA-3, соответствующие экзонам 2 и 3 α -цепи HLA-DM, соответственно. В качестве матрицы была взята геномная ДНК. ПЦР-продукт DMA-2 был получен с помощью праймеров DMA-2 for и DMA-2 rev, а ПЦР-продукт DMA-3 – DMA-3 for и DMA-3 rev. Температуру отжига праймеров использовали 68°C, а время элонгации – 25 сек. Полученные фрагменты DMA-2 и DMA-3 были лигированы в вектор pGEM5zf(-) (Promega) по сайтам рестрикции эндонуклеаз EcoRV/SalI и EcoRV/NdeI, соответственно. В результате были получены конструкции pGEM5zf_DMA-2 и pGEM5zf_DMA-3.

Фрагмент DMA-4 был получен отжигом праймеров DMA-4 for и DMA-4 rev друг на друга при температуре от 95°C с понижением. DMA-4 был лигирован в pGEM5zf_DMA-3 по сайтам MunI и SacI. В результате была получена конструкция pGEM5zf_DMA-34.

Фрагмент DMA-34 был переставлен в pGEM5zf_DMA-2 по сайтам SalI/XhoI и SacI. В результате была получена конструкция pGEM5zf_DMA.

pGEM5zf_DMB в качестве промежуточной стадии для сборки β -цепи HLA-DM

С помощью метода ПЦР были получены два фрагмента DMB-2 и DMB-3, соответствующие экзонам 2 и 3 β -цепи HLA-DM, соответственно. В качестве матрицы была взята геномная ДНК. ПЦР-продукт DMB-2 был получен с помощью праймеров DMB-2 for и DMB-2 rev, а ПЦР-продукт DMB-3 – DMB-3 for и DMB-3 rev. Температуру отжига праймеров использовали 68°C, а время элонгации – 25 сек. Полученные фрагменты DMB-2 и DMB-3 были лигированы в вектор pGEM5zf(-) (Promega) по сайтам рестрикции эндонуклеаз EcoRV и NotI. В результате были получены конструкции pGEM5zf_DMB-2 и pGEM5zf_DMB-3.

Фрагмент DMB-4 был получен отжигом праймеров DMB-4 for и DMB-4 rev друг на друга при температуре от 95°C с понижением. DMB-4 был лигирован в pGEM5zf_DMB-3 по сайтам SmaI и NcoI. В результате была получена конструкция pGEM5zf_DMA-34.

Фрагмент DMB-34 был переставлен в pGEM5zf_DMB-2 по сайтам NotI и NdeI. В результате была получена конструкция pGEM5zf_DMB.

pFUSE_Fc_myc_Avitag, pFUSE_Ih_Fc_myc_Avitag, pFUSE_Fc_FLAG и pFUSE_Ih_Fc_FLAG в качестве системы экспрессии

В целях повышения уровня экспрессии и стабильности комплекса на С-конец α - и β -цепей HLA-DM была добавлена последовательность константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина человека (Fc), причем, с эпитопами myc и Avitag на α -цепи и с 3xFLAG на β -цепи для дальнейшего анализа.

С помощью метода ПЦР был получен фрагмент Fc-FLAG с помощью праймеров Fc for и Fc-FLAG rev. В качестве матрицы была взята, полученная ранее в нашей лаборатории, конструкция pFUSE_Fc со стандартным hinge. Температуру отжига праймеров использовали 60°C, а время элонгации – 50 сек. Полученный фрагмент был лигирован в pFUSE_Fc по сайтам рестрикции эндонуклеаз NcoI и NheI с удалением последовательности Fc. В результате была получена конструкция pFUSE_Fc_FLAG.

С помощью метода ПЦР был получен фрагмент Fc с помощью праймеров Fc for и Fc rev, а фрагмент myc-Avitag был получен отжигом праймеров Fc-myc-Avitag-1 for, Fc-myc-Avitag-2 for, Fc-myc-Avitag-1 rev и Fc-myc-Avitag-2 rev друг на друга при температуре от 95°C с понижением. Для ПЦР в качестве матрицы была взята конструкция pFUSE_Fc со стандартным hinge. Температуру отжига праймеров использовали 60°C, а время элонгации – 50 сек. С помощью метода перекрывающегося ПЦР был получен полный фрагмент Fc-myc-Avitag. В качестве матрицы были взяты ПЦР-продукт Fc и фрагмент myc-Avitag. ПЦР-

продукт Fc-мус-Avitag был получен с помощью праймеров Fc for и Fc-мус-Avitag-2 rev. Температуру отжига праймеров использовали 60°C, а время элонгации – 50 сек. Полученный фрагмент был лигирован в pFUSE_Fc по сайтам рестрикции эндонуклеаз NcoI и NheI с удалением последовательности Fc. В результате была получена конструкция pFUSE_Fc_мус_Avitag.

Для анализа влияния удлиненного hinge (long hinge, lh) с помощью метода ПЦР были получены фрагменты LH с помощью праймеров LH for и LH rev, Fc-мус-Avitag-OL (overlap) с помощью праймеров Fc-OL for и Fc-мус-Avitag-2 rev и Fc-FLAG-OL с помощью праймеров Fc-OL for и Fc-FLAG rev. В качестве матрицы были взяты конструкции pFUSE_lh_Fc (полученная ранее в нашей лаборатории) с длинным hinge, pFUSE_Fc_мус_Avitag и pFUSE_Fc_FLAG, соответственно. Температуру отжига праймеров использовали 60°C, а время элонгации – 50 сек. С помощью метода перекрывающегося ПЦР были получены полные фрагменты LH-Fc-мус-Avitag из LH и Fc-мус-Avitag-OL и LH-Fc-FLAG из LH и Fc-FLAG-OL. В качестве матрицы были взяты ПЦР-продукты LH и Fc-мус-Avitag-OL/Fc-FLAG-OL, соответственно. ПЦР-продукты LH-Fc-мус-Avitag и LH-Fc-FLAG были получены с помощью праймеров LH for и Fc-мус-Avitag rev/Fc-FLAG rev, соответственно. Температуру отжига праймеров использовали 60°C, а время элонгации – 60 сек. Полученные фрагменты были лигированы в pFUSE_Fc по сайтам рестрикции эндонуклеаз NcoI и NheI с удалением последовательности Fc. В результате были получены конструкции pFUSE_lh_Fc_мус_Avitag и pFUSE_lh_Fc_FLAG.

***pFUSE_DMA_Fc_мус_Avitag, pFUSE_DMA_N165D_Fc_мус_Avitag,
pFUSE_DMB_Fc_FLAG и pFUSE_DMB_N92D_Fc_FLAG для экспрессии HLA-DM***

В связи с вероятностью гликозилирования HLA-DM в клетках НЕК было принято решение заменить два потенциальных сайта гликозилирования N165D на α -цепи и N92D на β -цепи (49) и создать 4 комбинации: DM1 – pFUSE_DMA_Fc_мус_Avitag и pFUSE_DMB_Fc_FLAG; DM2 – pFUSE_DMA_Fc_мус_Avitag и pFUSE_DMB_N92D_Fc_FLAG; DM3 – pFUSE_DMA_N165D_Fc_мус_Avitag и pFUSE_DMB_Fc_FLAG; DM4 – pFUSE_DMA_N165D_Fc_мус_Avitag и pFUSE_DMB_N92D_Fc_FLAG.

С помощью метода ПЦР были получены фрагменты DMAN165D-1 с использованием праймеров DMA-2 for и DMAN165D-1 rev, DMAN165D-2 – DMA-2 for и DMA-4 rev, DMBN92D-1 – DMB-2 for и DMBN92D-1 rev, DMBN92D-2 – DMBN92D-2 for и DMB-4 rev. В качестве матрицы были взяты конструкции pGEM5zf_DMA для DMAN165D-1 и DMAN165D-2, pGEM5zf_DMB для DMBN92D-1 и DMBN92D-2. Температуру отжига

праймеров использовали 60°C, а время элонгации – 40 сек. С помощью метода перекрывающегося ПЦР были получены полные фрагменты DMAN165D с использованием праймеров DMA-2 for и DMA-4 rev и DMBN92D – DMB-2 for и DMB-4 rev. В качестве матрицы были взяты пары ПЦР-продуктов DMAN165D-1/DMAN165D-2 и DMBN92D-1/DMBN92D-2, соответственно. Температуру отжига праймеров использовали 60°C, а время элонгации – 55 сек.

Фрагмент DMA, вырезанный из pGEM5zf_DMA, и ПЦР-продукт DMAN165D были лигированы в pFUSE_Fc_myc_Avitag по сайтам рестрикции эндонуклеаз EcoRI и NcoI. В результате были получены конструкции pFUSE_DMA_Fc_myc_Avitag и pFUSE_DMA_N165D_Fc_myc_Avitag, соответственно. Фрагмент DMB, вырезанный из pGEM5zf_DMB, и ПЦР-продукт DMBN92D были лигированы в pFUSE_Fc_FLAG по сайтам рестрикции эндонуклеаз EcoRI и NcoI. В результате были получены конструкции pFUSE_DMB_Fc_FLAG и pFUSE_DMB_N92D_Fc_FLAG, соответственно.

pFUSE_DMA_lh_Fc_myc_Avitag, pFUSE_DMA_N165D_lh_Fc_myc_Avitag, pFUSE_DMB_lh_Fc_FLAG и pFUSE_DMB_N92D_lh_Fc_FLAG для экспрессии HLA-DM с удлиненным hinge

Фрагмент DMA, вырезанный из pGEM5zf_DMA, и ПЦР-продукт DMAN165D, полученные в предыдущем разделе, были лигированы в pFUSE_lh_Fc_myc_Avitag по сайтам рестрикции эндонуклеаз EcoRI и NcoI. В результате были получены конструкции pFUSE_DMA_lh_Fc_myc_Avitag и pFUSE_DMA_N165D_lh_Fc_myc_Avitag, соответственно. Фрагмент DMB, вырезанный из pGEM5zf_DMB, и ПЦР-продукт DMBN92D, полученные в предыдущем разделе, были лигированы в pFUSE_lh_Fc_FLAG по сайтам рестрикции эндонуклеаз EcoRI и NcoI. В результате были получены конструкции pFUSE_DMB_lh_Fc_FLAG и pFUSE_DMB_N92D_lh_Fc_FLAG, соответственно.

pET32bCH_Pep_Trx для экспрессии пептидов, слитных с тиоредоксином

Панель рекомбинантных пептидных фрагментов MBP в составе белков, слитных с тиоредоксином (Trx), была получена ранее в нашей лаборатории (165). Для этого были созданы соответствующие конструкции на основе вектора pET32bCH для экспрессии под контролем T7 промотора. Двенадцать последовательно перекрывающихся коротких фрагментов MBP (25-30 аминокислот) были добавлены на С-конец бактериального тиоредоксина через гибкий линкер (SGGGG)₃S, несущий тэг His₆ для очистки. Конструкцию только с тиоредоксином и линкером, использовали в качестве

отрицательного контроля. В этой работе были созданы новые пептиды, слитные с тиоредоксином, с использованием библиотеки эпитопов MBP в качестве матрицы. Аминокислотные последовательности новых, сконструированных миелиновых с точечными мутациями, вирусных и химерных пептидов представлены в *Таблице 3.1*.

Таблица 3.1. Аминокислотные последовательности новых сконструированных пептидов.

Пептид	Последовательность (Pep)
MBP ₈₁₋₁₀₄	QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQG
MBP ₈₁₋₁₀₄ P85A	QDENAVVHFFKNIVTPRTPPPSQG
MBP ₈₁₋₁₀₄ V86A	QDENPAVHFFKNIVTPRTPPPSQG
MBP ₈₁₋₁₀₄ V87A	QDENPVAHFFKNIVTPRTPPPSQG
MBP ₈₁₋₁₀₄ F89A	QDENPVVHFAFKNIVTPRTPPPSQG
MBP ₈₁₋₁₀₄ F90A	QDENPVVHFAKNIVTPRTPPPSQG
MBP ₁₄₆₋₁₇₀	AQGTLISKIFKLGGRDSRSGSPMARR
MBP ₁₄₆₋₁₇₀ L150A	AQGTASKIFKLGGRDSRSGSPMARR
MBP ₁₄₆₋₁₇₀ I153A	AQGTLSKAFKLGGRDSRSGSPMARR
MBP ₁₄₆₋₁₇₀ F154A	AQGTLSKIAKLGGRDSRSGSPMARR
HA	PKYVKQNTLKLAT
HA-MBP ₁₅₇₋₁₆₄	PKYVKQGGRDSRSG
HA-CLIP	PKYVKQTPLMQA
MBP ₁₅₁₋₁₆₄	SKIFKLGGRDSRSG
MBP ₁₅₁₋₁₅₆ -HA	SKIFKLNTLKLAT
MBP ₁₅₁₋₁₅₆ -CLIP	SKIFKLTPLLMQA
CLIP	PVSKMRMATPLMQA
CLIP-HA	PVSKMRMANTLKLAT
CLIP-MBP ₁₅₇₋₁₆₄	PVSKMRMAGGRDSRSG
MBP ₈₈₋₁₀₀	HFFKNIVTPRTPP
MBP ₈₈₋₉₃ -HA	HFFKNINTLKLAT
HA-MBP ₉₄₋₁₀₀	PKYVKQVTPRTPP
pp65	MSIYVYALPLKMLNI
pp65-MBP ₉₁₋₉₇	MSIYVYKNIVTPR
MBP ₈₅₋₉₇	PVVHFFKNIVTPR

Схема клонирования была универсальна для всех пептидов. С помощью метода ПЦР были получены фрагменты Pep (интересующий пептид) с помощью праймеров Pep for и Pep rev и Trx с помощью праймеров Trx for и Trx rev. В качестве матрицы была взята конструкция pET32bCN_Trx, полученная ранее в нашей лаборатории. Температуру отжига праймеров использовали 60°C, а время элонгации – 40 сек. С помощью метода перекрывающегося ПЦР

был получен полный фрагмент Рер-Trx. В качестве матрицы были взяты ПЦР-продукты Рер и Trx. ПЦР-продукт Рер-Trx был получен с помощью праймеров Рер for и Trx rev. Температуру отжига праймеров использовали 60°C, а время элонгации – 50 сек. Полученный фрагмент был лигирован в рЕТ32bСН_Trx по сайтам рестрикции эндонуклеаз XhoI и XbaI с удалением последовательности Trx. В результате была получена конструкция рЕТ32bСН_Рер_Trx.

3.5. Методы работы с эукариотическими клетками

Поддержание в культуре и разгон эукариотических клеток гибридомы L243

Клетки растили в среде для ведения клеточной культуры гибридом в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ в культуральных флаконах (25 см²). При достижении монослоя клетки рассевали. 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 ресуспендировали в 4,5 мл свежей среды. Затем клетки рассевали по 1/5 объема суспензии. Для продукции антител клетки полностью пересевали в 50 мл среды в большой флакон (150 см²) и разгоняли до максимально возможного количества флаконов (около 20). При достижении монослоя клетки инкубировали в течение 5 дней, далее меняли среду и инкубировали еще 5 дней. Всю собранную среду объединяли.

Поддержание в культуре и разгон эукариотических клеток насекомых Drosophila melanogaster линии S2

Клетки растили в среде для ведения клеточной культуры S2 в термостате при 28°C, в культуральных флаконах (25 см²). В связи с тем, что данная линия клеток является полуприкрепленной, клетки растили до плотности, при которой происходило практически полное открепление. Клетки пересевали по 1/5 объема суспензии в 4,5 мл свежей среды. Для экспрессии клетки полностью (5 мл) пересевали последовательно следующим образом: в 10 мл среды для экспрессии клеточной культуры S2 в средний флакон (75 см²), затем в 35 мл в большой флакон (150 см²), в 75 мл в маленькую колбу (500 мл), в 125 мл в среднюю колбу (1 л), в 250 мл в большую колбу (2 л) и разгоняли до максимальной плотности (около 10 млн/мл) с качанием.

Поддержание в культуре и разгон эукариотических клеток линии HEK293F

Клетки растили в 30 мл среды для ведения клеточной культуры HEK293F в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ в колбе (125 мл). В связи с тем, что данная линия клеток является суспензионной, клетки растили до плотности не более 5 млн/мл. Клетки пересевали по 1/5 объема суспензии в 25 мл свежей среды. Для экспрессии клетки полностью (30 мл) пересевали в 100 мл среды FreeStyle в колбу (500 мл), разгоняли до плотности около 1 млн/мл для трансфекции и после трансфекции инкубировали в течение 5 дней с качанием для экспрессии.

Приготовление музея эукариотических клеток

При достижении 100% плотности клеток использовали всю суспензию или в случае прикрепленной культуры монослой клеток 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 ресуспендировали в смеси 90% FBS и 10% DMSO из расчета 1 мл на 2-3 миллиона клеток. Клеточную суспензию переносили в заранее подписанные криовиалы и помещали на -20°C на 1-2 часа до полного замораживания. Затем криовиалы 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 10 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 ресуспендировали в 5 мл теплой среды с 10% FBS. Суспензию клеток переносили в культуральный флакон (25 см²) и помещали в инкубатор при 37°C, 5% CO₂ и влажности 98% или термостат при 28°C.

Трансфекция и отбор стабильных клеточных линий эукариотических клеток насекомых *Drosophila melanogaster* линии S2

Полученные плазмиды, кодирующие α - и β -цепи HLA-DR, были трансфицированы в культуру клеток линии S2 с помощью трансфицирующего агента Effectene (Qiagen). Для

этого в шестилуночную плашку за 3 часа были посеяны клетки по 2 миллиона в лунку. Для каждой лунки была приготовлена смесь, состоящая из 320 мкл буфера (buffer EC), 14,4 мкл энхансера, 2,4 мкг смеси плазмид (по 1,2 мкг каждой плазмиды) и 100 нг отдельной плазмиды устойчивости к антибиотику бластицидину (pCoBlast (Invitrogen)). Таким образом, плазмиды, кодирующие α - и β -цепи HLA-DR, и плазида устойчивости были взяты в соотношении 12:12:1 по массе, соответственно. По прошествии пяти минут добавили по 12 мкл Effectene и оставили еще на 10 минут при комнатной температуре. После этого добавили полученную смесь к клеткам в 1.5 мл среды для ведения клеточной культуры S2 в каждой лунке. Плашку инкубировали 5 часов в термостате при 28°C. Через 5 часов отобрали среду из лунок и заменили ее на среду, содержащую 2 мкг/мл антибиотика бластицидина. В качестве контроля использовали клетки, которые не подвергались трансфекции, но в их среде также присутствовал бластицидин в той же концентрации. Далее инкубировали в термостате при 28°C. В дальнейшем среду меняли каждые три дня, каждый раз увеличивая содержание антибиотика (4, 8, 20 мкг/мл) до тех пор, пока в контроле не оставалось живых клеток. Из оставшихся клеток разгоняли отобранную линию до максимальной плотности.

Трансфекция эукариотических клеток линии HEK293F

Полученные плазмиды, кодирующие α - и β -цепи HLA-DM, были трансфицированы в культуру клеток линии HEK293F с помощью трансфицирующего агента PEI max. Для этого в случае подбора варианта HLA-DM в шестилуночную плашку были посеяны клетки с плотностью 1 млн/мл по 2 мл среды FreeStyle в лунку, а в случае финальной экспрессии были разогнаны клетки в колбе до плотности 1 млн/мл в 130 мл среды FreeStyle. Для каждого случая была приготовлена смесь, состоящая из смеси плазмид, кодирующих α - и β -цепи HLA-DM, и PEI max. Причем, компоненты смешивались в среде OptiMEM (Gibco) в соотношении 1:2, т.е. из расчета на 1 млн клеток брали 1 мкг ДНК (по 0,5 мкг каждой плазмиды) и 2 мкл PEI max. По прошествии 20 минут инкубации при комнатной температуре смесь добавляли к клеткам. Плашку или колбу инкубировали в течение 5 дней с качанием для экспрессии.

3.6. Хроматографические методы работы с белками

Выделение и очистка антител L243

Выделение моноклональных антител мыши класса G к HLA-DR L243 проводили с применением следующей методики. После продукции антител клетками гибридом всю собранную среду объединяли и глобулиновую фракцию получали высаливанием 50% сульфатом аммония, осаждением и растворением осадка в PBS. Дальнейшую очистку IgG осуществляли на аффинной колонке HiTrap Protein G Sepahrose (GE Healthcare) в PBS. Колонку промывали до прекращения дрейфа базовой линии, но не менее чем 10 объемами буфера нанесения. Антитела элюировали 5 объемами буфера элюции для аффинной хроматографии Protein G и немедленно нейтрализовали 2M раствором Трис до pH 7,6. Полученный элюат переводили в TBS концентрированием на центрифужных фильтровальных элементах Amicon (Millipore) с фильтром в 100 кДа и хранили при 4°C. Отсутствие видимых белковых примесей в очищенных препаратах антител контролировали электрофоретически с последующим окрашиванием Кумасси синим. Конъюгацию полученных антител L243 с BrCN-активированной сефарозой 4B (Sigma) проводили согласно инструкции производителя из расчета 10 мг антител на 1 мл смолы, причем концентрация антител была не менее 5 мг/мл.

Выделение и очистка HLA-DR

Плазмиды, кодирующие HLA-DR, содержат индуцибельный промотер МТ, соответствующий металлотионину, связывающий ионы двухвалентных металлов. После разгона клеток *Drosophila melanogaster* линии S2 до плотности около 10 млн/мл индукцию экспрессии осуществляли ионом Cu^{2+} , концентрация которого в среде составляла 1 мМ. После этого культуру клеток инкубировали в колбах с качанием со скоростью 160 rpm в течение 7 дней при температуре 26°C.

Далее клеточную культуру центрифугировали при 11290 g 20 минут при 4°C, супернатант фильтровали через фильтр 0,22 мкм и концентрировали методом ультрафильтрации на приборе Pellicon (Millipore) в 10 раз. Концентрат диализовали в течение 16 часов против PBS при 4°C. Первым этапом аффинную хроматографию проводили на колонке с BrCN-активированной сефарозой с ковалентно пришитыми антителами L243. Диализованную пробу наносили в PBS на скорости 0,2 мл/мин, проскок собирали для последующего перенесения. Процедуру повторяли 3-4 раза. Колонку промывали 10 объемами PBS, содержащим 0,05% NP-40, и 10 объемами PBS. HLA-DR элюировали 5 объемами буфера

элюции для аффинной хроматографии L243. После элюции щелочной рН нейтрализовали добавлением 2М Tris-HCl, рН 8,0. Полученный элюат был переведен в буфер А (Mono Q) для ионообменной хроматографии методом концентрирования на центрифужных фильтровальных элементах Amicon с фильтром в 10 кДа.

Вторым этапом анионообменную хроматографию осуществляли на колонке Mono Q (GE Healthcare) со скоростью 1 мл/мин. Нанесение проводили в буфере А (Mono Q), а элюцию - в буфере В (Mono Q) 20 объемами градиента 0 - 1М NaCl. Фракции по 1 мл с наибольшим содержанием HLA-DR, определенные с помощью ИФА, объединяли, переводили в TBS концентрированием на Amicon и хранили при 4°C.

Те полученные белковые комплексы HLA-DR1 и HLA-DR15, которые содержали пептид CLIP на N-конце β цепей ковалентно через линкер с сайтом тромбина, обрабатывали биотинилированным тромбином (Millipore) из расчета 2 U на 1 мг HLA-DR в реакции. Это было необходимо для возможности осуществления обмена CLIP на другой пептид. Смесь инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Для удаления из смеси биотинилированного тромбина смесь наносили на смолу стрептавидин-агарозу (Millipore) на 30 мин. Далее смолу центрифугировали, супернатант отбирали, переводили в TBS и хранили при 4°C.

Выделение и очистка HLA-DM

После экспрессии клеток линии HEK293F в колбе в течение 5 дней культуральную среду центрифугировали при 11290 g 20 минут при 4°C, фильтровали через фильтр 0,22 мкм и концентрировали методом ультрафильтрации на приборе Pellicon (Millipore) в 10 раз. Полученный концентрат наносили на аффинную колонку Protein G (GE Healthcare), уравновешенную PBS. Элюцию проводили 5 объемами буфера элюции для аффинной хроматографии Protein G и немедленно нейтрализовали 2М раствором Трис до рН 7,6. Элюаты переводили в TBS концентрированием на центрифужных фильтровальных элементах Amicon с фильтром в 30 кДа и хранили при 4°C.

Выделение и очистка пептидов, слитных с тиоредоксином

Ночную культуру клеток *E. coli* штамма BL21 (DE3), трансформированных соответствующей плазмидой pET32bCH_Pep_Trx, высевали в среду 2xYT в разведении 1:100 и растили до достижения оптической плотности 0,6-0,8 оптических единиц при 37°C в течение 2-3 часов. Экспрессию рекомбинантных белков индуцировали добавлением 1 мМ

IPTG и далее инкубировали 3-4 часа при 37°C. Клетки из 250 мл среды осаждали центрифугированием в течение 5 минут на скорости 5000 об/мин при 4°C. Осадок ресуспендировали в 20 мл буфера нанесения для металл-хелатной хроматографии. К суспензии клеток добавляли 1/50 объема свежеприготовленного раствора лизоцима до концентрации 0,2 мг/мл и инкубировали на льду 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. Полученный раствор центрифугировали на скорости 10000 об/мин 20 минут при 4°C. Надосадочную жидкость отбирали и фильтровали через фильтр 0,22 мкм в чистую пробирку.

Первым этапом полученный раствор белков разделяли при помощи металл-хелатной хроматографии, которую проводили на колонке, содержащей смолу Ni-NTA (Qiagen). Колонку промывали буфером нанесения для металл-хелатной хроматографии, в пробу для нанесения добавляли имидазол до концентрации 2 мМ для предотвращения неспецифического связывания. После нанесения пробы, колонку промывали 10 объемами буфера промывки для металл-хелатной хроматографии для отмыывания неспецифически связавшихся белков. Элюцию проводили 5 объемами буфера элюции для металл-хелатной хроматографии. Полученный элюат был переведен в буфер А (Mono S) для ионообменной хроматографии методом концентрирования на центрифужных фильтровальных элементах Amicon с фильтром в 10 кДа.

Вторым этапом катионообменную хроматографию осуществляли на колонке Mono S (GE Healthcare) со скоростью 1 мл/мин. Нанесение проводили в буфере А (Mono S), а элюцию - в буфере В (Mono S) 20 объемами градиента 0 - 1М NaCl. Фракции по 1 мл с наибольшим содержанием пептидов, слитных с тиоредоксином, выбранные электрофоретически, объединяли, переводили в TBS концентрированием на Amicon и хранили при -20°C.

Реакцию биотинилирования 200 мкг каждого очищенного пептида, слитного с тиоредоксином, проводили с использованием Сульфо-NHS-LC-биотина (Thermo Fisher Scientific) в молярном соотношении 1:20. Реакционную смесь инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Удаление биотина после реакции проводилось путем последовательного концентрирования и разведения смеси в 50 мМ Трис-HCl, pH 9,0 и далее в TBS на Amicon с фильтром в 10 кДа. Биотинилированные пептиды хранили также при -20°C. Анализ биотинилирования осуществляли при помощи метода иммуноблоттинга.

3.7. Аналитические методы работы с белками

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле.

Электрофорез проводили по стандартной методике Лэммли (166). Для этого готовили двухкомпонентный гель следующего состава: 5% концентрирующий и 12% разделяющий гели. 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 в электродном буфере при напряжении 90 В до перемещения красителя в разделяющий гель, после чего выставляли силу тока 25 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 полиакриламидного геля

Разделяющий гель инкубировали 5 минут в горячем растворе, содержащем 10% этанола и 10% уксусной кислоты. Далее его помещали на 10 минут в горячий раствор для окрашивания. Затем гель многократно отмывали в горячем растворе, содержащем 10% этилового спирта и 10% уксусной кислоты до полного исчезновения фонового окрашивания. Денситометрию пластин геля проводили при помощи прибора GelDoc (Bio-Rad).

Иммуноблоттинг

Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях по Лэммли с использованием предокрашенного маркера (Fermentas). Разделяющий гель отделяли и проводили перенос на мембрану HyBond C extra (GE Healthcare) на приборе для полусухого электропереноса Bio-Rad Trans-blot Turbo (Bio-Rad) согласно инструкции производителя. Для этого вырезали мембрану, 3 листа бумаги Whatman 3ММ размером с гель и 3 листа Whatman на 1 см больше с каждого края, смачивали все в буфере для переноса. На нижний электрод установки для переноса помещали стопку бумаги Whatman 3ММ (листы большего размера), сверху мембрану, затем гель, стопку бумаги Whatman 3ММ, накрывали верхним электродом и вели электроперенос в течение 1 часа при силе тока 0,8 мА/см². По окончании процесса мембрану помещали в блокирующий буфер на качающейся платформе.

Инкубацию проводили 1 час при 37°C. Далее мембрану отмывали 3 раза по 5 минут в PBS, содержащем 0,05% Tween-20.

Гибридизацию со специфическими моноклональными антителами или стрептавидином, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1:10000 – 1:20000 проводили в течение 1 часа в конъюгатном буфере, после чего мембрану отмывали 3 раза по 5 минут и проявляли при помощи ECL-Developing Kit или ECL-Plus Kit (GE Healthcare). Денситометрию окрашенных мембран проводили при помощи прибора GelDoc (Bio-Rad).

Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ проводили по схеме sandwich ELISA. На первом этапе в лунки иммобилизовали моноклональные антитела в карбонатном буфере (5 мкг/мл) и инкубировали 14 часов при 4°C. Лунки промывали 3 раза по 5 мин раствором PBS-Tween 0,15% и далее блокировали 1 час 250 мкл в лунку блокирующего буфера при 37°C с качанием. Затем блокирующий буфер удаляли, а лунки промывали 3 раза по 5 мин раствором PBS-Tween 0,15%. Изучаемые белки или их разведения в конъюгатном буфере, а также контрольные образцы вносили по 50 мкл в лунку и инкубировали 1 час при 37°C, после чего снова трижды промывали. Затем добавляли по 50 мкл моноклональных антител или стрептавидина, конъюгированных с пероксидазой хрена, в разведении 1:10000 – 1:20000 конъюгатным буфером и инкубировали 1 час при 37°C, после чего снова трижды промывали. Визуализацию проводили, добавляя во все лунки по 50 мкл раствора тетраметилбензидина. Реакцию останавливали 10% раствором фосфорной кислоты и измеряли абсорбцию при длине волны 450 нм на планшетном спектрофотометре Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific).

Иммуноферментный анализ экспрессии вариантов HLA-DM

После экспрессии временно трансфицированных линий с разными вариантами HLA-DM в шестилучной плашке клетки в лунках ресуспендировали, и суспензии центрифугировали 5 минут при 13000 об/мин. Культуральные среды концентрировали в 10 раз на центрифужных фильтровальных элементах Amicon с фильтром в 10 кДа, а клетки растворяли в буфере нанесения образцов для электрофореза. Среда анализировали с помощью ИФА и иммуноблоттинга, а клетки – с помощью иммуноблоттинга. В ИФА в качестве иммобилизованных антител использовали моноклональные антитела к антителам человека, а в качестве вторичных антител - моноклональные антитела к Fc-фрагменту

человека, конъюгированные с пероксидазой хрена. В иммуноблоттинге визуализацию проводили с помощью моноклональных антител к эпитопу FLAG, конъюгированных с пероксидазой хрена.

Иммуноферментный анализ связывания пептидов HLA-DR и определение константы диссоциации

Биотинилированные синтетические и слитные с тиоредоксином пептиды MBP (750 нМ) из библиотеки эпитопов MBP и с точечными мутациями инкубировали в течение 14 часов при 37°C в 50 мкл PBS с HLA-DR (HLA-DRB1*01:01 или HLA-DRB1*15:01) (150 нМ). Комплексы DR/пептид затем добавляли к антителам L243, иммобилизованным в плашке и блокированным блокирующим буфером. Связанный с HLA-DR, биотинилированный пептид количественно определяли с помощью стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена.

В конкурентном анализе биотинилированные, слитные с тиоредоксином пептиды HA и pp65 (150 нМ) инкубировали с HLA-DR в присутствии небитинилированных HA, pp65, миелиновых или химерных пептидов (в концентрациях 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6 и 7,8 нМ) в течение 18 часов. Вся процедура была такой же, как описано выше.

Для определения константы диссоциации биотинилированные синтетические и слитные с тиоредоксином пептиды инкубировали в тех же условиях, как описано выше, с HLA-DR (5 нМ) в следующих концентрациях: 10000, 3000, 1000, 300, 100, 30, 10, 3 и 0,1 нМ. Комплексы DR/пептид определяли количественно методом DELFIA с использованием меченого европием стрептавидина и раствора для усиления.

Иммуноферментный анализ кинетики загрузки пептидов на HLA-DR

ИФА в реальном времени использовали для измерения кинетики пептидного обмена на HLA-DR, катализируемого HLA-DM. DR-CLIP (150 нМ) инкубировали с HLA-DM (150 нМ) или без него в 50 мкл цитратного буфера при 37°C в присутствии биотинилированных синтетических или слитных с тиоредоксином HA, pp65, миелиновых или химерных пептидов (150 нМ) в течение 7, 5, 3, 1 и 0 часов. Каждую временную точку смешивали отдельно, начиная с крайнего времени инкубации (7 ч), каждые 2 часа, после чего все временные точки вносили в плашку одновременно. ИФА проводили, как описывалось выше, лишь с разницей в том, что время инкубации реакционных смесей в плашке и со стрептавидином сократили до 30 минут.

В конкурентном анализе кинетические эксперименты с биотинилированными пептидами НА и рр65 проводили, как описано выше. Кинетику измеряли в присутствии возрастающих концентраций (0, 30, 100, 300 и 1000 нМ) небитинилированных, слитных с тиоредоксином НА, рр65, миелиновых или химерных пептидов в моменты времени 8, 6, 4, 2 и 0 часов. Тиоредоксин без какого-либо пептида использовали в качестве отрицательного контроля.

3.8. Методы работы с материалом пациентов с рассеянным склерозом и здоровых индивидов

Пациенты и контроли

Эта часть работы была проведена совместно с профессором О.О. Фаворовой, доцентом О.Г. Кулаковой и Лабораторией медицинской геномики РНИМУ им. Н.И. Пирогова, профессором А.Н. Бойко и Московским центром рассеянного склероза. 565 неродственных пациентов с ремиттирующим РС с диагнозом по критерию Макдональда (167), были выбраны для исследования. 471 здоровый индивид без неврологических расстройств и семейного анамнеза РС был включен в контрольную группу. Все пациенты с РС и здоровые индивиды жили в Московской области и были самоопределены, как русские. Демографические и клинические данные для всех участников представлены в *Таблице 3.2*. Никаких существенных различий в демографических характеристиках (возраст и соотношение полов) между двумя группами не наблюдалось. Это исследование было проведено в соответствии с рекомендациями местного этического комитета Московского центра рассеянного склероза. Все субъекты дали письменное информированное согласие в соответствии с Хельсинкской декларацией. Протокол № 13 от 15 сентября 2014 года был утвержден местным этическим комитетом Московского центра рассеянного склероза.

Таблица 3.2. Демографические и клинические данные для пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом и здоровых людей (все русские).

	RRMS, n = 565	Здоровые индивиды, n = 471
Соотношение полов (женский/мужской)	2,3:1 (395/170)	1,9:1 (310/161)
Возраст (годы), среднее \pm SD	38,8 \pm 10,6	44,2 \pm 16,4
Индивиды с семейной историей РС (%)	27 (4,8%)	0
Возраст в начале (годы), среднее \pm SD	27,4 \pm 9,2	-
Длительность болезни (годы), среднее \pm SD	11,4 \pm 7,4	-
EDSS, среднее \pm SD	2,8 \pm 1,2	-
MSSS, среднее \pm SD	3,4 \pm 1,9	-
EDSS – расширенная шкала статуса инвалидности; MSSS – оценка тяжести рассеянного склероза; SD – стандартное отклонение; RRMS – ремиттирующий рассеянный склероз.		

Генотипирование и статистический анализ

Геномную ДНК выделяли из образцов периферической крови с помощью наборов QIAamp DNA Blood Midi (Qiagen). Генотипирование локуса HLA-DRB1 с низким разрешением (двухзначное) проводили с использованием набора для генотипирования HLA-DRB1 с помощью ПЦР в режиме реального времени (ДНК-технология). Аллели и генотипы HLA-DRB1, связанные с риском развития РС, были идентифицированы с использованием программного обеспечения APSampler (<http://apsampler.sourceforge.net/>) и подтверждены точным тестом Фишера, включенным в программное обеспечение. Ассоциация считалась номинально значимой, если нескорректированные p -значения (p_f) для идентифицированных аллелей/генотипов были менее 0,05, а 95%-ный доверительный интервал (CI) для отношения шансов (OR) не пересекал 1. Для каждого случая выполнялся стандартный тест перестановки с 100 прогонами APSampler в качестве коррекции тестирования множественных гипотез. Порог значимости был установлен на уровне p_{perm} менее 0,05.

Подготовка дендритных клеток человека и идентификация связавшихся пептидов

Фракцию мононуклеарных клеток (МК), содержащую предшественники дендритных клеток (ДК), выделяли из крови человека в соответствии со стандартным протоколом (168). 20-50 мл крови от каждого донора разбавляли в 3 раза PBS-ЭДТА (PBS с 2 мМ EDTA), аккуратно подслоили 1/4 объема раствором фиколла (1,077 г/см³, Панэко) и центрифугировали при 750 g в течение 30 минут при комнатной температуре. Плотную полосу МК аккуратно отобрали, перенесли в пробирку на 50 мл, разбавили в 3 раза PBS-ЭДТА, центрифугировали при 200 g в течение 10 минут при 4°C и осадок клеток один раз промыли PBS-ЭДТА. Затем его ресуспендировали в среде RPMI Advanced с 10% FBS, Glutamax и антибиотиком-антимикотиком (Thermo Fisher Scientific) и посеяли в культуральный флакон (25 см²) в плотности 6 млн/мл. Через два часа неприкрепившиеся клетки удаляли и среду заменяли на свежую с факторами роста ДК - IL4 (100 нг/мл) и GM-CSF (50 нг/мл) (StemCells) и затем культивировали в течение 6 дней с заменой 1/2 объема среды каждый второй день, как описано в (169). Через 6 дней полный объем среды поменяли на свежую с бактериальным липополисахаридом (10 мкг/мл) и культивировали в течение 24 часов для созревания ДК. Через 7 дней ДК сняли клеточным скребком, лизировали в PBS с 0,25% дезоксихолата натрия вместе с полным набором ингибиторов (Roche), PMSF, пепстатином и ЭДТА в течение 1 часа при 4°C с последующим

центрифугированием при 16000 g в течение 20 мин. Затем клеточные лизаты наносили на колонку для гель-фильтрации Superdex75 (GE Healthcare). Наличие молекул МНС II в нескольких высокомолекулярных фракциях, соответствующих комплексам МНС II, подтверждали с помощью ИФА, где молекулы МНС II определяли путем связывания с предварительно иммобилизованными антителами L243 и последующей инкубацией с анти-МНС II поликлональными антителами кроличьей сыворотки и вторичными анти-кроличьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma). Эти фракции были лиофилизованы.

Анализ LC-MS/MS и анализ данных

Эта часть работы была проведена совместно с Р.Х. Зиганшиным и лабораторией протеомики ИБХ РАН. Выделенные пептиды были обессолены с использованием SDB-RPS StageTips, как это было описано ранее (170). Анализ LC-MS/MS проводили с использованием настольного масс-спектрометра Orbitrap Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific), который был подключен к системе Ultimate 3000 Nano LC (Thermo Fisher Scientific) через источник наноэлектроспрея (Thermo Fisher Scientific). Система ВЭЖХ была настроена в режиме ловушки-элюирования. Пептидный раствор наносили на колонку-ловушку Acclaim PepMap 100 (100 мкм × 2 см) и отделяли на колонке Acclaim PepMap 100 (75 мкм × 50 см) (обе от Thermo Fisher Scientific). Корреляцию спектров MS/MS с пептидными последовательностями осуществляли с использованием программного обеспечения PEAKS Studio 8.0 build 20160908 (171). Списки пептидов, сгенерированные PEAKS Studio, были проверены по базе данных Homo sapiens Uniprot FASTA (154257 видов, версия июля 2016 г.), а также по метиониновому окислению и дезамидированию аспарагина/глутамин в качестве переменных модификаций. Частота ложных открытий (FDR) для совпадений спектра пептидов была установлена на уровне 0,01 и была определена путем поиска в обратной базе данных. Идентификацию пептидов проводили с допустимым отклонением массы исходного предшественника до 10 ppm и допустимым отклонением массы фрагмента 0,05 Да.

Анализ пролиферации T-клеток с помощью CFSE

Эта часть работы была проведена совместно с чл.-корр. РАН, профессором М.Р. Хаитовым, И.П. Шиловским, А.С. Порошиной и Институтом иммунологии ФМБА России. Мононуклеарные клетки выделяли по стандартному протоколу из 30 мл периферической

крови человека. Было собрано примерно 30 млн МК. Для мечения красителем CFSE клетки промывали и ресуспендировали в 1 мкМ растворе CFSE в PBS и дополнительно инкубировали в течение 20 мин при 37°C. Затем клетки промывали PBS с добавлением 5% FBS, и осадок клеток ресуспендировали в среде UltraCULTURE (Lonza). Далее клетки сеяли в 96-луночные плашки с круглым дном (200 000 клеток на лунку) в концентрации 1 млн/мл. Пролиферацию CD4-позитивных Т-клеток анализировали в трех повторностях. Три разные концентрации синтетического пептида MBP₁₄₆₋₁₇₀ (5 мкМ, 0,5 мкМ и 0,05 мкМ) были использованы. Клетки без стимуляции и клетки, стимулированные анти-CD3/CD8 магнитными шарами, использовали в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. МК культивировали в течение 7 дней при 37°C и 5% CO₂. Затем клетки промывали PBS и ресуспендировали в 50 мкл раствора FVD (разведение 1:1000, Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C в темноте. Далее клетки промывали буфером FC (PBS с добавлением 2% FBS и NaN₃), ресуспендировали в 50 мкл 10% нормальной сыворотки мыши (Invitrogen) в PBS и инкубировали в течение 20 минут при 4°C в темноте для блокирования рецепторов Fc. После промывания клетки ресуспендировали в 30 мкл на лунку раствора смеси антител в PBS (анти-CD3 PE-конъюгированное антитело, ThermoFisher Scientific; анти-CD4 PE-Cy7-конъюгированное антитело, Thermo Fisher Scientific), 0,5 мкг/мл каждого. Плашку дополнительно инкубировали в течение 20 мин при 4°C в темноте. Затем клетки промывали буфером FC, ресуспендировали в 300 мкл буфера FC и далее анализировали на проточном цитометре (BD).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Генетическая ассоциация вариантов гена HLA-DRB1 с рассеянным склерозом

Рассеянный склероз (РС), как следует из данных, представленных в литературном обзоре, 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 (172), у 565 пациентов с ремиттирующим РС и 471 здорового человека (русской этнической принадлежности), используя метод генотипирования низкого разрешения (двузначное) (Раздел 3.8). Коллективом указанных исследователей при нашем непосредственном участии были обнаружены существенные различия в частоте носительства нескольких групп аллелей HLA-DRB1 (далее «аллели») (Таблица 4.1 и Рисунок 4.1). Как видно из рисунка, 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 (163). Для HLA-DRB1*15, который широко известен как самый сильный генетический фактор риска рассеянного склероза, наблюдалось значение OR, равное 2,84, что аналогично результатам, полученным для большинства европейских и

североамериканских популяций (среднее OR = 3,08) (172). Что касается других аллелей, то они хуже изучены в плане прогностических факторов предрасположенности или протективности развития РС.

Таблица 4.1. Ассоциация носительства групп аллелей HLA-DRB1 с рассеянным склерозом.

Группа аллелей HLA-DRB1	Носители, n (%)		Значения p_f	Значения p_{perm}	OR [95% CI]
	Случай РС (n=565)	Здоровые индивидуумы (n=471)			
<i>DRB1*01</i>	95 (16,8)	127 (26,9)	5.16×10⁻⁵	0.00062	0.55 (0.41-0.74)
<i>DRB1*03</i>	118 (20,9)	61 (13,0)	0.00047	0.0056	1.77 (1.27-2.49)
<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)	9.35×10⁻⁵	0.0011	0.56 (0.42-0.76)
<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)	4.86×10⁻¹⁵	5.8×10⁻¹⁴	2.84 (2.17-3.72)
<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 - доверительный 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.

Опубликованные данные об ассоциации аллелей HLA-DRB1*03, *01 и *11 с РС в разных популяциях представлены в **Таблице 4.2**. Среди 15 исследований, в которых эти три аллеля были рассмотрены одновременно, положительная ассоциация с HLA-DRB1*03 наблюдалась в пяти сообщениях (в популяциях иранцев с высоким OR = 5,66 (173), афроамериканцев (161), европейцев США и Великобритании (63) и Сардинии с близким OR = 1,7 (159)), отрицательная ассоциация с HLA-DRB1*01 - в семи (в популяциях шведов и норвежцев (174), литовцев с близким OR = 0,56 (175), японцев (176), басков с низким OR = 0,28 (177), испанцев (178), канадцев (162) и финнов (14)), а с *11 - только в трех (в популяциях афроамериканцев с близким OR = 0,61 (161), канадцев (162) и Сардинии (159)).

Результаты мета-анализа, т.е. обобщенного статистического анализа результатов разных исследований, проведенного для европеоидов в 2011 году, выявили ассоциации с РС частоты (фенотипа) носительства для HLA-DRB1*03 и *01, но не для *11, а значения OR

для аллелей *03 и *01 были близки к наблюдаемым в нашем исследовании (179). Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что русские могут носить ассоциированные с РС аллели HLA-DRB1*03 и *01 также, как и другие европеоиды.

Таблица 4.2. Ассоциация аллелей HLA-DRB1*01, *03 и *11 с риском рассеянного склероза в разных популяциях.

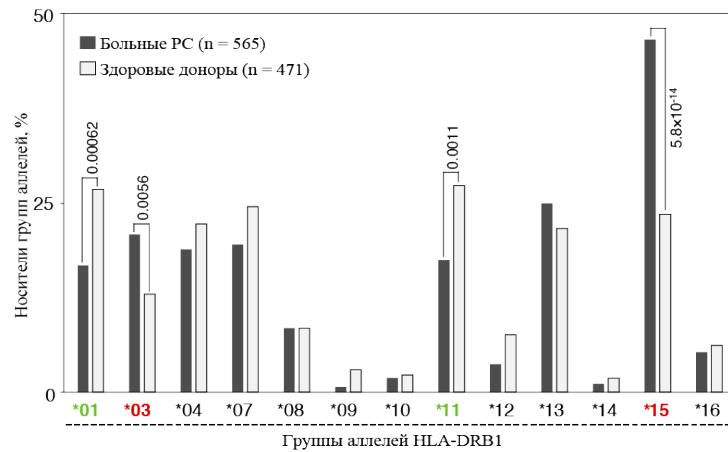
Популяция	Выборка	Опубликованные данные	Ссылка
Колумбийская	103 РС vs 202 ЗИ	DRB1*01 – нет ассоциации DRB1*03 – нет ассоциации DRB1*11 – нет ассоциации	(180)
Словацкая	282 РС vs 238 ЗИ	DRB1*01 – нет ассоциации DRB1*03 – нет ассоциации DRB1*11 – нет ассоциации	(181)
Иранская	73 РС vs 40 ЗИ	DRB1*01 – нет ассоциации DRB1*03 – положительная ассоциация с РС (OR = 5.66, $p = 0.0021$) DRB1*11 – нет ассоциации	(173)
Сардинская	2555 РС vs 1365 ЗИ	DRB1*01 – нет ассоциации DRB1*0301 – положительная ассоциация с РС в гаплотипе с DQB1*02:01 (OR = 1.7, $p_c = 7.9 \times 10^{-22}$) DRB1*11 – отрицательная ассоциация с РС (OR = 0.8, $p_c = 0.027$)	(159)
Афроамериканская	1162 РС vs 2092 ЗИ	DRB1*0101 – нет ассоциации DRB1*0301 – положительная ассоциация с РС (OR = 1.54, $p = 3.01 \times 10^{-5}$) DRB1*1101 – отрицательная ассоциация с РС (OR = 0.61, $p = 0.002$)	(161)
Шведская и норвежская	1784 РС vs 1660 ЗИ	DRB1*01 – отрицательная ассоциация с РС (OR = 0.82, $p = 0.034$). DRB1*03 – нет ассоциации DRB1*11 – нет ассоциации	(174)
Литовская	120 РС vs 120 ЗИ	DRB1*01 – отрицательная ассоциация с РС (OR = 0.56, $p < 0.0001$) DRB1*03 – отрицательная ассоциация с РС (OR = 0.69, $p = 0.034$) DRB1*11 – нет ассоциации	(175)
Японская	108 РС vs 127 ЗИ	DRB1*01 – отрицательная ассоциация с РС (OR = 0.394, $p_c = 0.0406$) DRB1*03 – нет ассоциации DRB1*11 – нет ассоциации	(176)
Бразильская	119 РС vs 305 ЗИ	DRB1*01 – нет ассоциации DRB1*03 – нет ассоциации DRB1*11 – нет ассоциации	(182)
Баски	197 РС vs 200 ЗИ	DRB1*0101 – отрицательная ассоциация с РС (OR = 0.284, $p = 0.00003$) DRB1*0301 – нет ассоциации DRB1*1101 – нет ассоциации	(177)
Испанская	21 РС vs 156 ЗИ	DRB1*01 – отрицательная ассоциация с РС (14% vs 31%, $p_c = 0.011$)	(178)

		<i>DRB1*03</i> – нет ассоциации <i>DRB1*11</i> – нет ассоциации	
Канадская	TDT-тест, 1432 семей с РС	<i>DRB1*01</i> – аллель устойчивости у носителей HLA- <i>DRB1*01/15</i> <i>DRB1*03</i> – нет ассоциации <i>DRB1*11</i> – аллель устойчивости	(162)
Европейская из США и Великобритании	PDT-тест, 1019 семей с РС	<i>DRB1*01</i> – нет ассоциации <i>DRB1*03</i> – аллель риска у гомозиготного генотипа HLA- <i>DRB1*03/03</i> <i>DRB1*11</i> – нет ассоциации	(63)
Финская	TDT-тест, 249 семей с РС	<i>DRB1*01</i> – аллель устойчивости в гаплотипе HLA- <i>DRB1*01-DQB1*0501</i> <i>DRB1*03</i> – нет ассоциации <i>DRB1*11</i> – нет ассоциации	(183)
Сардинская	240 РС vs 170 ЗИ	<i>DRB1*01</i> – нет ассоциации <i>DRB1*0301</i> – положительная ассоциация с РС (31% vs 21%, $p_c = 0.003$) <i>DRB1*11</i> – нет ассоциации	(184)

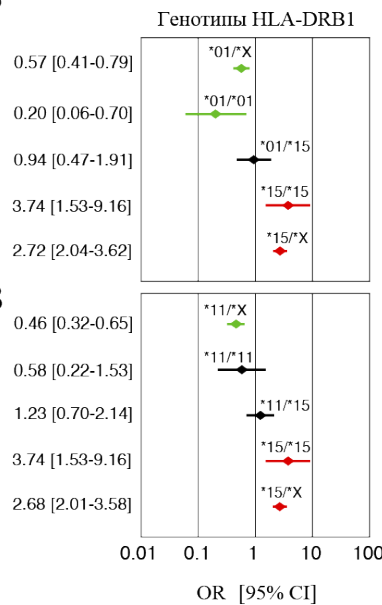
ЗИ – здоровые индивидуумы; *РС* – рассеянный склероз; *OR* – отношение шансов.

Кроме того, были проанализированы частоты гетерозиготных генотипов, включающих один аллель риска (HLA-*DRB1*03* или *15) и один аллель устойчивости (HLA-*DRB1*01* или *11), то есть *01/*15, *11/*15, *01/*03 и *11/*03 у пациентов с РС и здоровых людей. Ни один из этих генотипов практически не был ассоциирован с РС: 95% CI для OR больше 1 (**Рисунки 4.1Б-Д**), в то время как значения p_f находились в интервале между 0,25 и 0,51. Эти данные демонстрируют компенсаторный эффект любых идентифицированных протективных аллелей и аллелей предрасположенности *in trans*, другими словами, значения OR для гетерозиготных вариантов стремятся к 1, кроме варианта *01/*03. В таком случае развитие заболевания может быть равновероятным. Кроме того, эффект дозы аллеля (увеличение в геноме количества копий определенного гена аллеля вызывает пропорциональное повышение уровня его белкового продукта) наблюдался при сравнении гомозигот *01/*01, *03/*03 и *15/*15 с гетерозиготами, содержащими аллели HLA-*DRB1*01*, *03 или *15 в сочетании с аллелями, не связанными с РС (обозначено как «X» на **Рисунках 4.1Б-Д**). В случае аллеля HLA-*DRB1*01* значение OR увеличился с 0,2 до 0,56/0,57, для HLA-*DRB1*03* OR уменьшился с 8,47 до 1,59/1,68, а для HLA-*DRB1*15* OR изменился от 3,74 до 2,68/2,72. Для аллеля HLA-*DRB1*11* (**Рисунки 4.1В и 4.1Д**) эффект дозы не наблюдался.

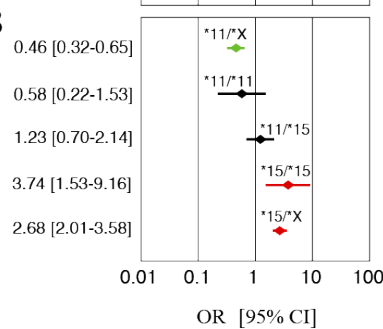
A



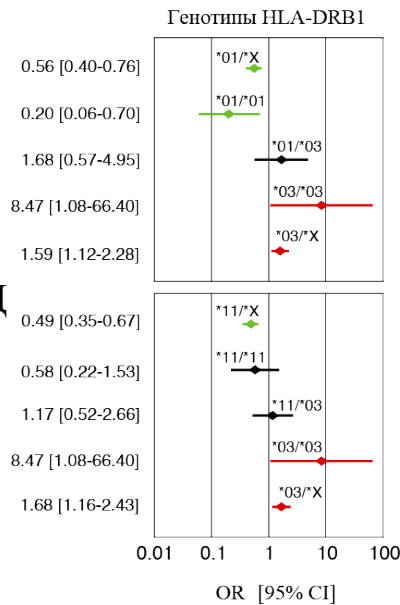
Б



В



Г



Д

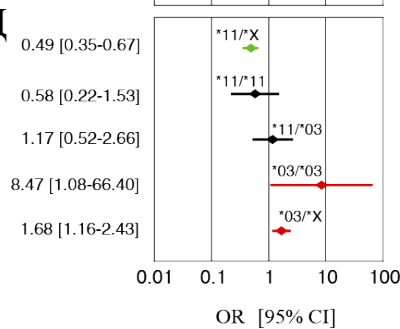


Рисунок 4.1. Генетическая ассоциация вариантов гена HLA-DRB1 с рассеянным склерозом. (А) Частота носительства аллелей HLA-DRB1 у пациентов с РС и здоровых людей. Значения p_{perm} для аллелей HLA-DRB1*01, *03, *11 и *15, значительно ассоциированных с РС после коррекции для множественных сравнений, представлены. **(Б – Д)** Форест-графики демонстрируют отношения шансов (OR) и их 95% доверительные интервалы (95% CI) для генотипов HLA-DRB1, которые включают идентифицированные предрасполагающие к РС и протективные аллели в виде гомозигот и в гетерозиготных комбинациях друг с другом или с остальными аллелями HLA-DRB1. **(Б)** HLA-DRB1*01 и *15; **(В)** HLA-DRB1*11 и *15; **(Г)** HLA-DRB1*01 и *03; **(Д)** HLA-DRB1*11 и *03. Для каждого графика **(Б – Д)** набор всех аллелей HLA-DRB1, исключая представляющие интерес аллели, обозначен буквой «X»; значения OR [95% CI] отмечены красным цветом для положительной ассоциации генотипов с РС, зеленым цветом для отрицательно ассоциированных генотипов и черным цветом для незначимых генотипов.

Значения OR для HLA-*DRB1**15, *03 и *01 были заметно выше у людей, которые гомозиготны по этим аллельным вариантам, по сравнению с гетерозиготами, содержащими те же аллели (**Рисунки 4.1Б и 4.1Г**). Эти данные выявили дозозависимый эффект не только для аллелей риска HLA-*DRB1**15 и *03, который был показан ранее (63), но также и для протективного аллеля HLA-*DRB1**01. Для всех генотипов, содержащих один протективный и один аллель риска, не наблюдались существенные различия в частотах генотипа между пациентами с РС и здоровыми контролями. Небольшая выборка людей, несущих каждый из этих гетерозиготных генотипов среди пациентов или здоровых людей (от 5 до 32 человек), не позволяет делать окончательные выводы, но оценочные значения OR, близкие 1, а также относительно узкие CI могут свидетельствовать о взаимной компенсации аллельных эффектов у гетерозигот. Наиболее заметный компенсаторный эффект наблюдался для генотипа HLA-*DRB1**01/*15 (OR = 0,94 [CI: 0,47–1,91]), тогда как значения OR для гомозигот *01/*01 и *15/*15 равны 0,2 и 3,74, соответственно. Хотя точные механизмы, с помощью которых продукты HLA, кодируемые различными аллелями HLA-*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.

4.2. Получение HLA-DR и HLA-DM и подбор условий кинетического анализа загрузки пептида на HLA-DR

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 миелина, или механизм протективности и заключается в неспособности HLA-DR связывать и тем самым презентировать аутоантигены. Было бы важно провести сравнение протективного аллеля с аллелью риска *HLA-DRB1*15* в механизмах связывания антигенов.

В связи с вышесказанным и на основе результатов, описанных в Разделе 4.1, 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* (<http://allelefreqencies.net/hla6006a.asp>), а *HLA-DRB1*15:01*, как наиболее изученный фактор риска в патологии РС (172). Для достижения поставленных целей нами были получены генетические конструкции (Раздел 3.4) для экспрессии рекомбинантных внеклеточных доменов цепей HLA-DR (*HLA-DRB1*01:01* и *HLA-DRB1*15:01*) α и β (с или без пептида CLIP), созданные на основе векторов pMT-V5/His и pRmHa, соответственно (Рисунок 4.2). α - и β -цепи HLA-DR несли части лейцинового мотива факторов транскрипции c-fos и c-jun, соответственно, для стабилизации комплекса, образуя двойную спираль и имитируя трансмембранные домены цепей HLA-DR, и повышения уровня экспрессии, как описано ранее (185). Пептид CLIP (PVSKMRMATPLLMQA) был ковалентно связан через линкер с сайтом тромбина на N-конце β -цепи. В природе CLIP предзагружен на HLA-DR в клетке для защиты пептид-связывающей борозды и обменивается на антигенный пептид в эндосоме, поэтому он необходим для изучения кинетики процесса.

Для экспрессии рекомбинантных молекул HLA-DR методом липофекции были получены индивидуальные стабильные линии клеток *Drosophila melanogaster* S2, несущие оба гена соответствующих цепей HLA-DR α и β (с или без пептида CLIP) и отдельную плазмиду pCoBlast с устойчивостью к бластицидину для селектирования линии. Клетки насекомых использовали для получения свободных комплексов HLA-DR по причине отсутствия неспецифических пептидов внутри клеток, которые могли бы потенциально загружаться на

HLA-DR во время экспрессии. Белки HLA-DRB1*01:01 и HLA-DRB1*15:01 с CLIP и без него были экспрессированы в среде SF900III в течение 7 дней после индукции 1 мМ Cu^{2+} при 26°C с качанием. Затем концентрат клеточной культуры наносили на аффинную смолу анти-МНСII (L243) в PBS с последующим элюированием 100 мМ глициновым буфером (pH 11,5) и быстрой нейтрализацией элюата 2 М Трис-НСl (pH 8,0) (185). На следующем этапе примеси удаляли с помощью анионообменной колонки MonoQ в градиенте 0 - 1 М NaCl. В случае HLA-DR-CLIP пептид CLIP был отрезан при помощи тромбина. Анализ одного из изолированных препаратов HLA-DRB1*01:01 представлен на **Рисунке 4.4Б**. Для всех препаратов выход составил примерно 1 мг с литра среды, а чистота препаратов составила не менее 95%.

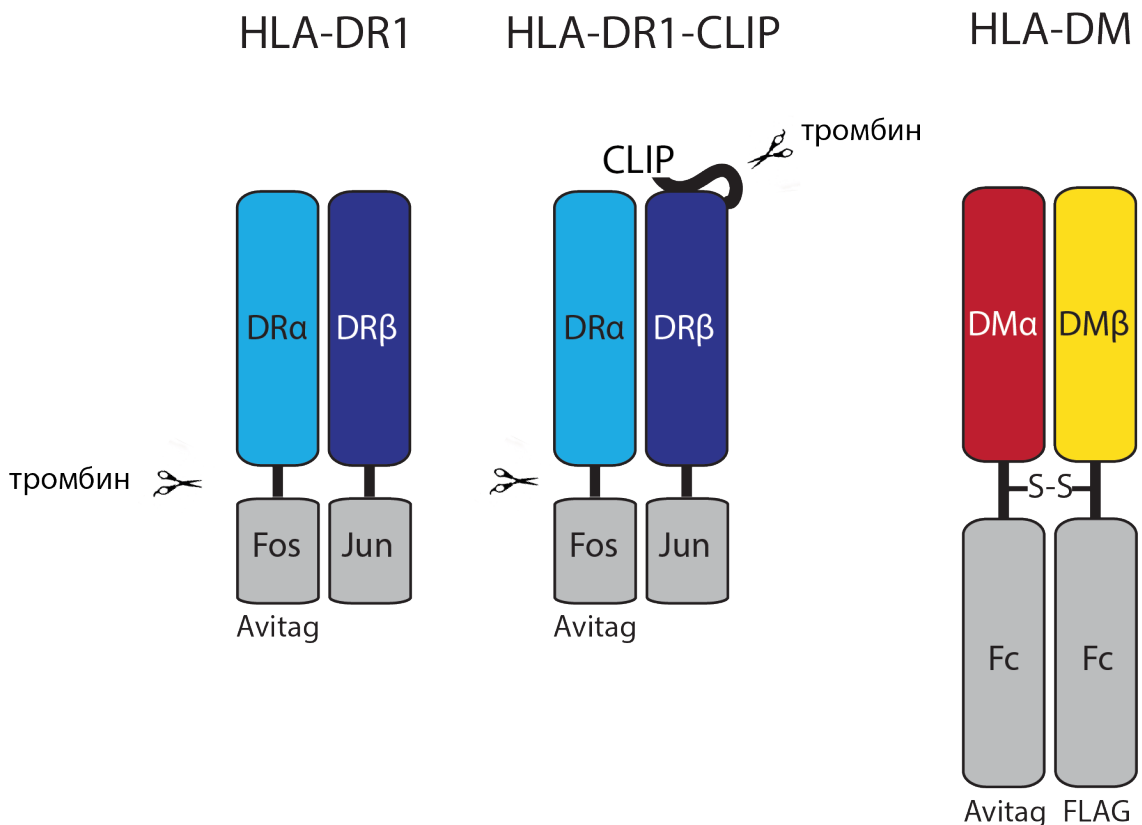


Рисунок 4.2. Схематические структуры *HLA-DR1*, *HLA-DR1-CLIP* и *HLA-DM*. α- (голубой) и β-цепи (синий) *HLA-DR* слитны с частями лейцинового мотива факторов транскрипции *c-fos* (*Fos*) и *c-jun* (*Jun*), соответственно, через линкер с тромбиновым сайтом. Пептид *CLIP* ковалентно связан через линкер с сайтом тромбина на N-конце β-цепи. α- (красный) и β-цепи (желтый) *HLA-DM* слитны с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина человека (*Fc*). *Avitag* – этипон узнавания биотин-лигазы *BirA*. *FLAG* – этипон *3xFLAG*.

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. В случае экспрессионной системы *Drosophila melanogaster* S2 попытки получения белка были безуспешными, поэтому была выбрана другая система высокоэффективных суспензионных клеток HEK293F. Для экспрессии в этих клетках были получены генетические конструкции (**Раздел 3.4**), кодирующие внеклеточные домены цепей HLA-DM α и β , созданные на основе вектора pFUSE (**Рисунок 4.2**). α - и β -цепи всех вариантов HLA-DM были слитными с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина человека (Fc), причем, с 3xFLAG на β -цепи для дальнейшего анализа. Эта модификация улучшает стабильность комплекса за счет димеризации Fc, имитируя трансмембранные домены цепей HLA-DM, увеличивает уровень экспрессии и обеспечивает эффективную одностадийную аффинную изоляцию с использованием Protein G. В связи с возможностью гликозилирования HLA-DM в клетках HEK были введены две замены в потенциальных сайтах гликозилирования N165D на α -цепи и N92D на β -цепи (49) и тем самым созданы четыре комбинации: DM1, DM2, DM3 и DM4 (**Рисунок 4.3А**). Временная трансфекция с полученными генетическими конструкциями была проведена для определения оптимальной комбинации DM. С помощью иммуноферментного анализа и вестерн-блоттинга культуральных сред и клеточных лизатов после экспрессии временно трансфицированных линий было определено, что наивысший уровень экспрессии был получен для DM3, который состоял из DM α N165D и DM β дикого типа (**Рисунки 4.3Б и 4.3В**). Этот вариант был выбран для дальнейших исследований.

На следующем этапе для выбранного DM3 было принято решение сравнить стандартный hinge и удлиненный hinge (примерно в 2 раза) (lh), который может положительно сказаться на уровне выхода целевого белка, т.к. по всей видимости может способствовать реализации правильного фолдинга. По данным ИФА культуральных сред после экспрессии временно трансфицированных линий эффект удлиненного hinge в 4 раза превзошел стандартный hinge (**Рисунок 4.3Г**). В итоге всех проведенных исследований варианты DM α N165D lhFc и DM β lhFc были выбраны для дальнейшего получения HLA-DM.

Экспрессию проводили в бессывороточной среде FreeStyle в течение 5 дней. Полученную культуральную среду наносили на Protein G и элюировали 100 мМ глициновым буфером (pH 2,5). Собранные фракции нейтрализовали 2 М Трис. Выход HLA-DM составил 24 мг на 1 л среды, а чистота не менее 98% (**Рисунок 4.4А**).

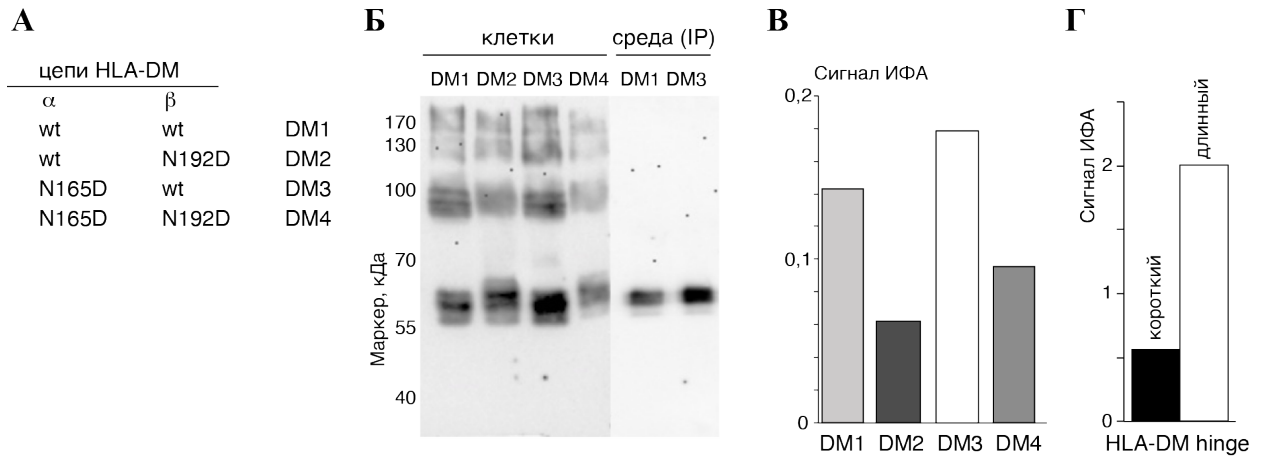


Рисунок 4.3. (А) Анализируемые комбинации цепей HLA-DM. (Б) Вестерн-блот культуральных сред и клеточных лизатов после экспрессии временно трансфицированных линий комбинациями α и β цепей DM. Визуализация: моноклональные антитела к эпитопу FLAG (В, Г) ИФА культуральных сред после экспрессии временно трансфицированных линий комбинациями α - и β -цепей DM (В) и DM3 со стандартным и удлиненным hinge (Г). Имобилизованные антитела представляют собой моноклональные антитела к антителам человека, вторичные антитела представляют собой моноклональные антитела к Fc-фрагменту человека, конъюгированные с пероксидазой хрена.

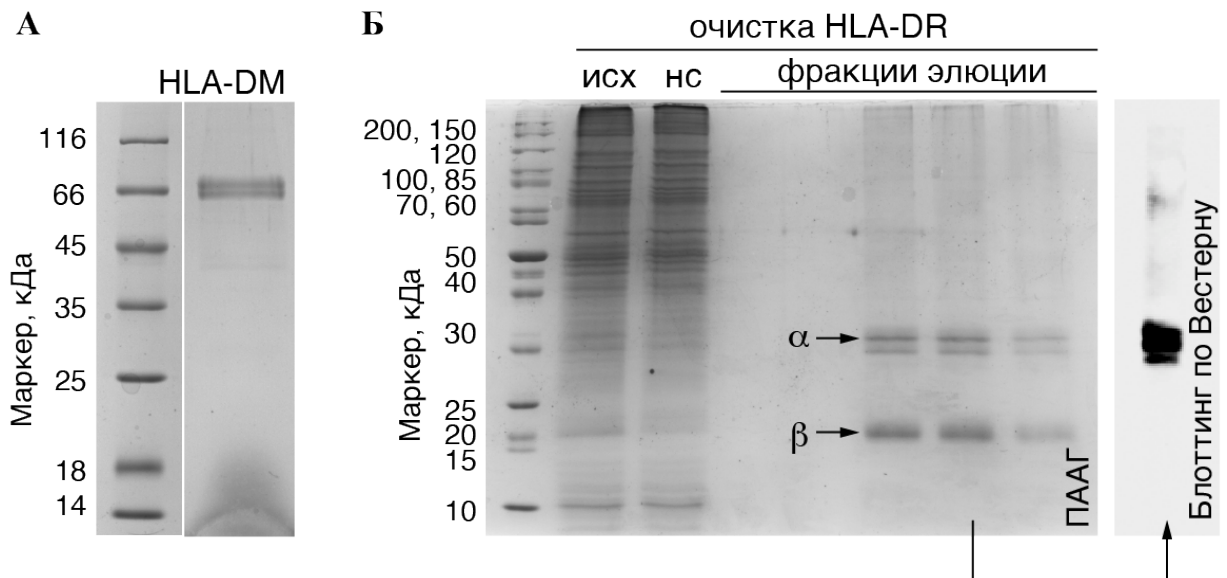


Рисунок 4.4. (А) Электрофореграмма в ПААГ в денатурирующих условиях очищенного HLA-DM. (Б) Электрофореграмма в ПААГ в денатурирующих условиях и вестерн-блот очищенного HLA-DR1. Стрелками показаны полосы, соответствующие α - и β -цепям. Визуализация: моноклональные антитела к α -цепи, конъюгированное с пероксидазой хрена.

Ранее в нашей лаборатории была получена библиотека фрагментов МВР, слитных с тиоредоксином для повышения растворимости и уровня экспрессии и дальнейшего анализа (165). Библиотека состоит из двенадцати последовательных перекрывающихся коротких фрагментов МВР (25-30 аминокислот), слитных с С-концом бактериального тиоредоксина через гибкий линкер (SGGGG)₃S, несущий His-тэг для очистки (**Рисунок 4.5**). Данная библиотека покрывает полную последовательность МВР и в этой работе подходила для того, чтобы, сканируя всю последовательность, найти фрагмент МВР, который связывает протективный HLA-DRB1*01:01. Для дальнейшего получения этих фрагментов МВР были использованы генетические конструкции на базе вектора pET32bCH_Trx, созданные ранее в нашей лаборатории. Субстратную конструкцию, несущую только тиоредоксин с линкером (Trx), использовали в качестве отрицательного контроля.

А



Б

1					60
	MASQKRPSQRH	GSKYLATAST	MDHARHGFLP	RHRDTGILDS	IGRFFGGDRG APKRGSGKDS
1-28	MASQKRPSQRH	GSKYLATAST	MDHARHG		43-68 RFFGGDRG APKRGSGKDS
		17-41 TAST	MDHARHGFLP	RHRDTGILDS	I 53-81 KRGSGKDS
			25-54 RHGFLP	RHRDTGILDS	IGRFFGGDRG APKR
61					120
	HHPARTAHYG	SLPQKSHGRT	QDENPVVHFF	KNIVTPRTPP	PSQGKGRGLS LSRFSWGAEG
43-68	HHPARTAH		81-104 QDENPVVHFF	KNIVTPRTPP	PSQG
53-81	HHPARTAHYG	SLPQKSHGRT	Q	91-114 KNIVTPRTPP	PSQGKGRGLS LSRF
	65-92 RTAHYG	SLPQKSHGRT	QDENPVVHFF	KN	107-132 RGLS LSRFSWGAEG
121					170
	QRPFGYGGGR	ASDYKSAHKG	FKGVDAQGTL	SKIFKLGGRD	SRSGSPMARR
123-140	QRPFGYGGGR	ASDYKSAHKG	F		
		130-156 R	ASDYKSAHKG	FKGVDAQGTL	SKIFKL
107-132	QRPFGYGGGR	AS		146-170 AQGTL	SKIFKLGGRD SRSGSPMARR

Рисунок 4.5. Библиотека эпитопов МВР человека. (А) Схематическая структура пептида, слитного с тиоредоксином через линкер. His₆ – эпитоп с 6 гистидинами, S(G)₄ – серин-глициновый линкер. (Б) Аминокислотная последовательность МВР человека. Указаны перекрывающиеся пептиды библиотеки эпитопов.

В этой работе также были созданы новые пептиды, слитные с тиоредоксином, с помощью библиотеки эпитопов MBP, структура которой была взята в качестве основы: HA, pp65, CLIP, MBP с точечными мутациями и химерные пептиды (Раздел 3.4). Все слитные с тиоредоксином пептиды были получены путем экспрессии в клетках *E. coli* BL21 (DE3) в растворимой форме и очистки в две стадии с помощью метал-хелатной хроматографии на Ni-NTA и катионообменной хроматографии на MonoS (165). Выход пептидов составил примерно 10 мг на 1 л среды, а чистота не менее 95% (Рисунок 4.6). Для дальнейших аналитических экспериментов пептиды химически биотинилировали с помощью Sulfo-NHS-LC-биотина в молярном соотношении 1:20 в течение 30 минут при 25°C.

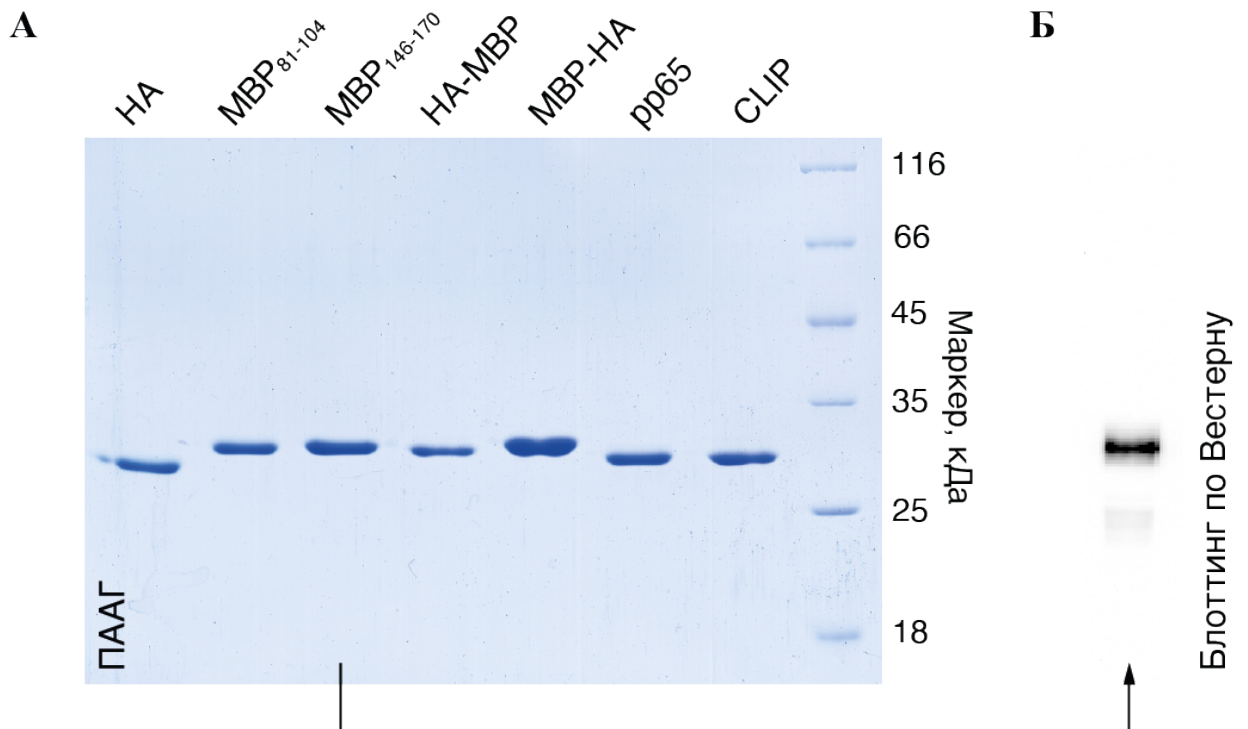


Рисунок 4.6. (А) Электрофореграмма в ПААГ в денатурирующих условиях очищенных пептидов HA, MBP₈₁₋₁₀₄, MBP₁₄₆₋₁₇₀, HA-MBP, MBP-HA, pp65 и CLIP, слитных с тиоредоксином. (Б) Вестерн-блот очищенного MBP₁₄₆₋₁₇₀, слитного с тиоредоксином. Визуализация: стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена.

Как отмечалось выше, нами было высказано предположение, что в ходе дискриминации пептидов, связывающихся специфически с МНС, важную роль играет не только специфичность связывания, но и скорость процесса. В этой связи было необходимо разработать метод измерения кинетических параметров процесса загрузки на основе ИФА и подобрать оптимальные концентрации участников и условия данной реакции. В качестве контрольного пептида, необходимого для подтверждения функциональности полученных

HLA-DR1 и HLA-DM нами был выбран классический для загрузки на HLA-DR1 иммунодоминантный пептид гемагглютиниона вируса гриппа HA₃₀₆₋₃₁₈ (17).

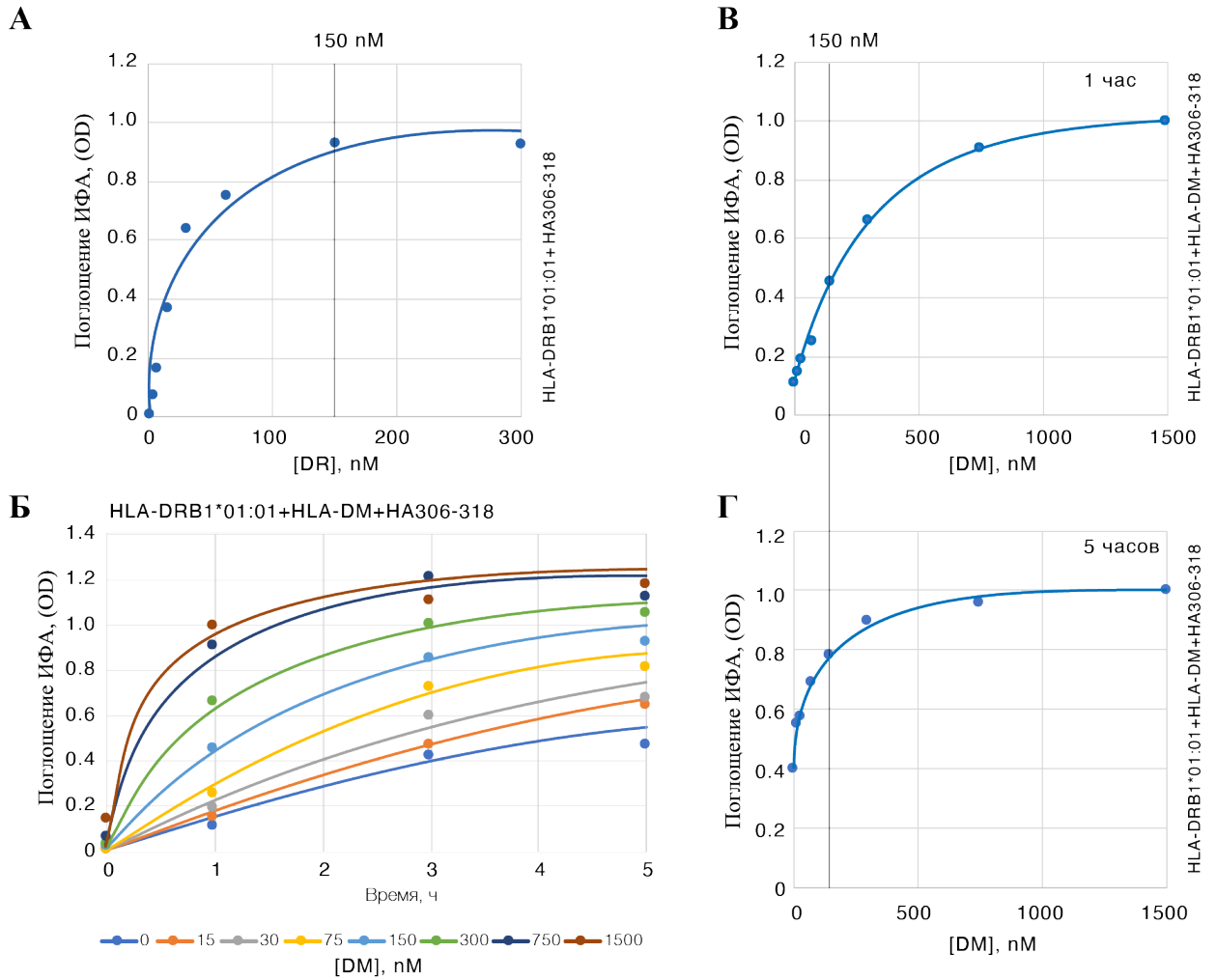


Рисунок 4.7. (А) Концентрационная зависимость HLA-DRB1*01:01 (0 – 300 нМ) в реакции с биотинилированным пептидом HA₃₀₆₋₃₁₈ (750 нМ), слитным с тиоредоксином, после 18 ч инкубации. (Б) Кинетика связывания биотинилированного пептида HA₃₀₆₋₃₁₈ (150 нМ), слитного с тиоредоксином, с HLA-DRB1*01:01 (150 нМ), катализируемого HLA-DM в диапазоне возрастающих концентраций (0 нМ - 1,5 мкМ). (В, Г) Концентрационные зависимости HLA-DM представлены для 1 ч (В) и 5 ч (Г) инкубации. Визуализация: стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена.

Для выбора адекватного концентрационного режима проведения кинетических опытов нами была определена концентрация HLA-DR1, необходимая для последующего кинетического титрования. Было необходимо найти минимальную концентрацию с максимальным уровнем сигнала ИФА по причине того, что иммобилизованные антитела L243 к HLA-DR1 лимитируют количество комплекса, и тем самым снижается уровень

сигнала (**Рисунок 4.7А**). По этому критерию в диапазоне 0 – 300 нМ концентрацию HLA-DR1 выбрали 150 нМ, причем, концентрация биотинилированного пептида HA, слитного с тиоредоксином, была выбрана 750 нМ, т.е. в 5 раз большая, чем для HLA-DR1. Такая концентрация HA значительно выше K_D (по литературным данным среднее значение порядка 20 нМ), что необходимо для максимального связывания пептида. Далее, стояла задача определить концентрацию HLA-DM, необходимую для полумаксимальной скорости реакции загрузки пептида. Именно при полумаксимальной скорости можно наблюдать разницу в скорости загрузки в течение нескольких часов, что было важно в дальнейших исследованиях. В случае максимальной скорости загрузки разные пептиды будут полностью загружаться в течение часа без видимой разницы в скорости, что осложняет использование метода ИФА. Для определения необходимой концентрации HLA-DM проводили кинетические измерения в течение 5 часов, варьируя концентрацию HLA-DM в диапазоне 0 – 1,5 мкМ (**Рисунок 4.7Б**). Для HLA-DR1 использовали выбранную концентрацию в 150 нМ, а для пептида HA в этот раз - эквимолярно 150 нМ для того, чтобы также наблюдать разницу в скорости загрузки. В результате измерений необходимая концентрация HLA-DM составила также 150 нМ (**Рисунки 4.7В и 4.7Г**). Таким образом все участники реакции смешиваются в эквимолярном соотношении в концентрации 150 нМ, что максимально приближено к природной ситуации.

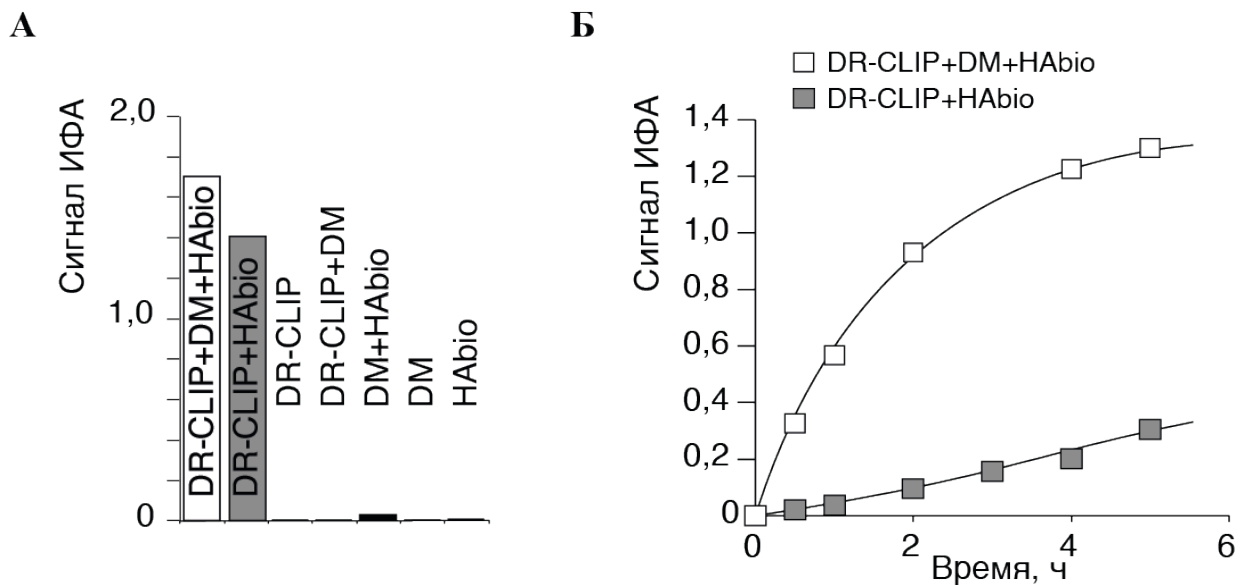


Рисунок 4.8. (А) ИФА реакций загрузки пептида HA₃₀₆₋₃₁₈ (PKYVKQNTLKLAT; 750 нМ) на HLA-DR1 (150 нМ) с HLA-DM и без него (150 нМ) после 18 часов. (Б) Кинетика реакции загрузки пептида HA (150 нМ) на HLA-DR1 (150 нМ) в течение 5 часов с HLA-DM (150 нМ) и без него. Имобилизованными антителами являлись специфические моноклональные антитела L243 к комплексу HLA-DR, визуализация: стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена.

На **Рисунке 4.8** представлен кинетический анализ загрузки пептида HA на HLA-DR1-CLIP с и без HLA-DM с новыми подобранными концентрациями. Данный анализ показал, что в сравнении с некатализируемой реакцией процесс загрузки ускоряется примерно в 10 раз в присутствии HLA-DM, причем такое различие можно наблюдать в первые часы реакции (**Рисунок 4.8Б**). После 18 часов инкубации наблюдалось практически полное насыщение также и в отсутствии HLA-DM (**Рисунок 4.8А**). В случае отрицательных контролей, где анализировали каждый компонент реакции в отдельности, а также пары DR-CLIP/DM и DM/HA_{bio}, сигналы ИФА были близки к нулю. Подобранный методика была использована в дальнейших исследованиях.

4.3. Отбор фрагментов МВР из библиотеки и определение эпитопов для HLA-DRB1*01:01

На следующем этапе было необходимо определить, может ли рекомбинантный HLA-DRB1*01:01 связываться с фрагментами МВР, используя ранее созданную библиотеку эпитопов МВР, слитных с тиоредоксином (**Рисунок 4.9А**). Для этого методом ИФА проанализировали взаимодействие HLA-DRB1*01:01 и HLA-DRB1*15:01 с 12 перекрывающимися фрагментами МВР, слитными с тиоредоксином (**Раздел 3.7**). Тиоредоксин без пептида (Тгх) был взят в качестве отрицательного контроля. Как видно из **Рисунка 4.9**, HLA-DRB1*01:01 специфически связывал МВР₁₄₆₋₁₇₀ и менее эффективно связывал три других пептида МВР₁₃₀₋₁₅₆, МВР₈₁₋₁₀₄ и МВР₆₅₋₉₂ (**Рисунок 4.9Б**), причем важно обратить внимание на то, что пары МВР₈₁₋₁₀₄/МВР₆₅₋₉₂ и МВР₁₃₀₋₁₅₆/МВР₁₄₆₋₁₇₀ перекрываются и скорее всего представляют два возможных эпитопа связывания 81-92 и 146-156. Однако в случае МВР₁₃₀₋₁₅₆/МВР₁₄₆₋₁₇₀ эпитоп сдвинут в сторону МВР₁₄₆₋₁₇₀ по причине большего сигнала. Как и предполагалось, HLA-DRB1*15:01 специфически распознавал энцефалитогенный пептид МВР₈₁₋₁₀₄ (**Рисунок 4.9Б**). Как было показано ранее, данный фрагмент МВР является классической аутоантигенной детерминантой при РС для HLA-DRB1*15:01, вызывающей Т-клеточный иммунный ответ (139). Кроме того, еще два фрагмента, а именно МВР₂₅₋₅₄ и МВР₁₃₀₋₁₅₆, были связаны HLA-DRB1*15:01, однако со значительно меньшей эффективностью, чем МВР₈₁₋₁₀₄. Полученные данные были также проверены методом ИФА с использованием химически синтезированных биотинилированных пептидов НА₃₀₆₋₃₁₈, МВР₈₁₋₁₀₄, МВР₁₄₆₋₁₇₀ и МВР₁₇₋₄₁ (**Рисунок 4.9В**). HLA-DRB1*01:01 распознал свой классический лиганд, вирусный пептид НА₃₀₆₋₃₁₈, взятый в качестве положительного контроля. Говоря о миелиновых пептидах, HLA-DRB1*01:01 связал МВР₈₁₋₁₀₄ и МВР₁₄₆₋₁₇₀, а HLA-DRB1*15:01 - только МВР₈₁₋₁₀₄, 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 МВР₁₇₋₄₁, взятый в качестве отрицательного контроля.

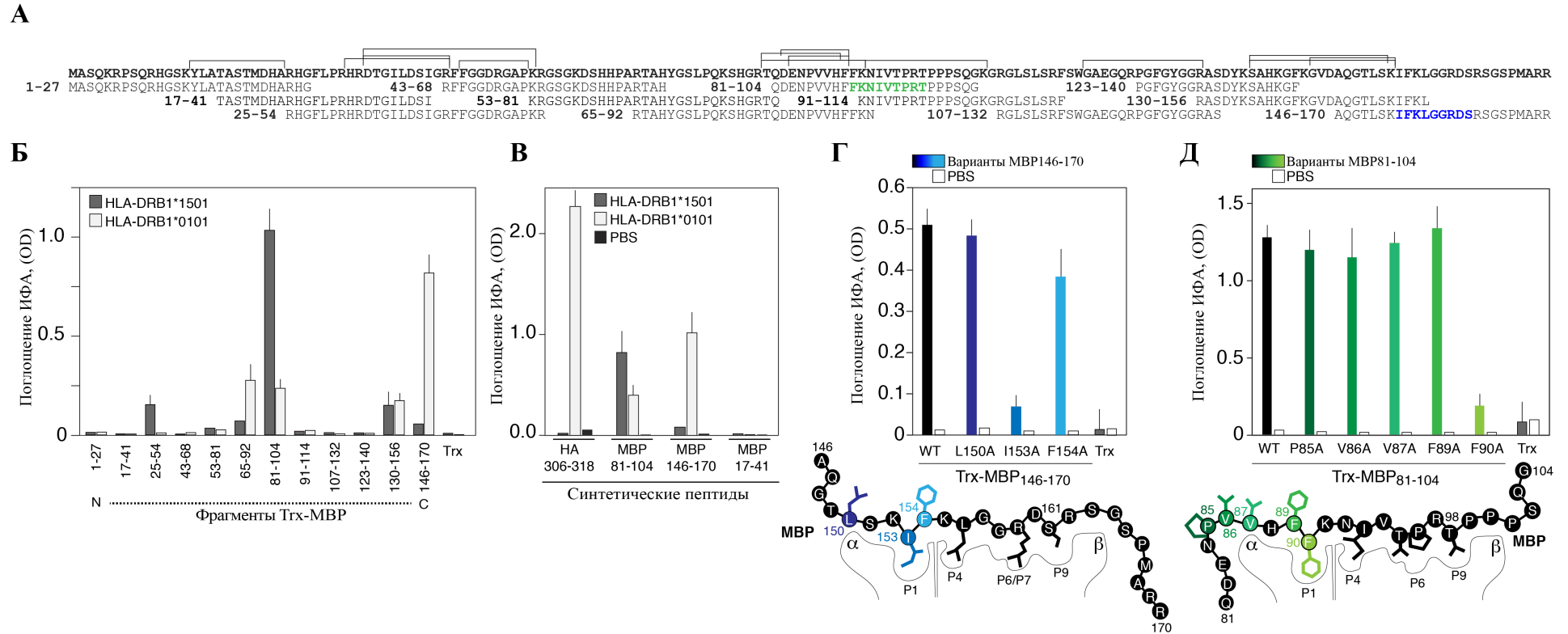


Рисунок 4.9. Отбор фрагментов MBP из библиотеки и определение эпитопов для HLA-DRB1*01:01. (А) Аминокислотная последовательность MBP. Указаны перекрывающиеся пептиды библиотеки эпитопов. Два эпитопа HLA-DRB1*01:01 отмечены зеленым и синим цветами. Квадратные скобки соответствуют последовательностям пептидов, 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. Trx обозначает тиоредоксин. Стандартное отклонение отмечено. **(В)** Распознавание химически синтезированных пептидов, представляющих фрагменты MBP и пептида HA₃₀₆₋₃₁₈ (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. **(Г, Д)** Связывание слитных с тиоредоксином пептидов MBP₁₄₆₋₁₇₀ **(Г)** и MBP₈₁₋₁₀₄ **(Д)** 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.

Как было продемонстрировано выше, протективный главный комплекс гистосовместимости HLA-DRB1*01:01 способен связывать фрагменты аутоантигена МВР, 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. Далее из клеточных лизатов с помощью гель-фильтрации была выделена фракция, соответствующая комплексам МНС II со всеми связавшимися пептидами. Анализ LC-MS/MS (Раздел 3.8) пептидов, связанных с HLA, экспонированными на поверхности дендритных клеток, выявил три основных области МВР, что соответствовало МВР₈₁₋₁₀₄, МВР₂₅₋₅₄ и МВР₁₃₀₋₁₅₆, которые, как было показано выше, связывались HLA-DRB1*15:01. В то же время нам не удалось обнаружить какие-либо пептиды, относящиеся к МВР₁₄₆₋₁₇₀, связанные с HLA-DRB1*01:01 (Рисунок 4.9А). Таким образом нами было показано, что HLA-DRB1*01:01 не способен презентировать миелиновые аутоантигены или презентует их в недетектируемых количествах на поверхности антиген-презентирующих клеток в отличие от аллеля риска HLA-DRB1*15:01. Полученные данные свидетельствуют в пользу выдвинутой нами выше концепции о протективном характере HLA-DRB1*01:01.

Анализ *ex vivo* HLA-ассоциированного пептидома из гетерозиготных HLA-DRB1*01/*15-положительных дендритных клеток выявил наличие фрагментов МВР, связанных с HLA-DRB1*15, но не с HLA-DRB1*01. Даже в этом случае наблюдаемый компенсаторный эффект протективного аллеля HLA-DRB1*01 и предрасполагающего к РС аллеля HLA-DRB1*15, которые кодоминантно экспрессируются в гетерозиготах, можно объяснить дисперсией комплексов HLA-DRB1*15, загруженных фрагментами МВР, молекулами HLA-DRB1*01 в кластерах МНС. Данные кластеры встречаются в иммунологических синапсах, образованных между Т-клетками и антиген-презентирующими клетками (186). Действительно, плотность функциональных молекул МНС в мембранных кластерах оказалась важным фактором, регулирующим Т-клеточные ответы (187).

Как следует из представленных данных, протективный аллель способен связывать фрагменты МВР, однако далее было важно определить точные эпитопы связывания, распознаваемые HLA-DRB1*01:01, которые входят в состав МВР₈₁₋₁₀₄ и МВР₁₄₆₋₁₇₀. 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 МВР₁₄₆₋₁₇₀; P85A, V86A, V87A, F89A и F90A для МВР₈₁₋₁₀₄. Данный анализ для пептида МВР₁₄₆₋₁₇₀ (Рисунок 4.9Г)

показал, что карман P1 в HLA-DRB1*01:01, несущий MBR₁₄₆₋₁₇₀, был занят изолейцином в положении 153 (по номенклатуре MBR₁₋₁₇₀ человека). Такой вывод был сделан, исходя из того, что в случае замены I153A наблюдалось падение сигнала ИФА, что говорит о том, что MBR₁₄₆₋₁₇₀ 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 MBR₈₁₋₁₀₄, слитного с тиоредоксином (Рисунок 4.9Д), 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 MBR₈₁₋₁₀₄, были заняты треонином, пролином и треонином в положениях 95, 96 и 98, соответственно. Таким образом можно заключить, что эпитопы связывания MBR₈₁₋₁₀₄ и MBR₁₄₆₋₁₇₀ с HLA-DRB1*01:01 были определены, как 90-98 и 153-161, соответственно.

4.4. 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 (Раздел 3.7) с целью определения K_D для комплексов HLA-DRB1*01:01 с миелиновыми пептидами MBP₈₁₋₁₀₄ и MBP₁₄₆₋₁₇₀ и вирусным HA₃₀₆₋₃₁₈ в качестве положительной детерминанты. В данном эксперименте были использованы как химически синтезированные пептиды (Рисунок 4.10А), так и рекомбинантные, слитные с тиоредоксином (Trx) (Рисунок 4.10Б). 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 4.10В). 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 (49,188). Другими словами, данный процесс обладает кинетикой, параметры которой были определены с помощью метода ИФА с подобранными выше условиями (Рисунки 4.10Г и 4.10Д, Таблица 4.3). В данном исследовании были измерены скорости связывания химически синтезированных пептидов (Рисунок 4.10Г) и их рекомбинантных аналогов, слитных с тиоредоксином (Рисунок 4.10Д), содержащих вирусный HA₃₀₆₋₃₁₈, миелиновые MBP₈₁₋₁₀₄ и MBP₁₄₆₋₁₇₀, с HLA-DRB1*01:01, а также MBP₈₁₋₁₀₄ с HLA-DRB1*15:01. Оба HLA-DR были предзагружены 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 MBP₈₁₋₁₀₄ и MBP₁₄₆₋₁₇₀, тогда как HLA-DRB1*15:01 связывался с MBP₈₁₋₁₀₄ 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 4.10Г и Таблица 4.3). Изучение загрузки этих пептидов в составе белков, слитных с тиоредоксином, на HLA привело практически к идентичным результатам (Рисунок 4.10Д и Таблица 4.3).

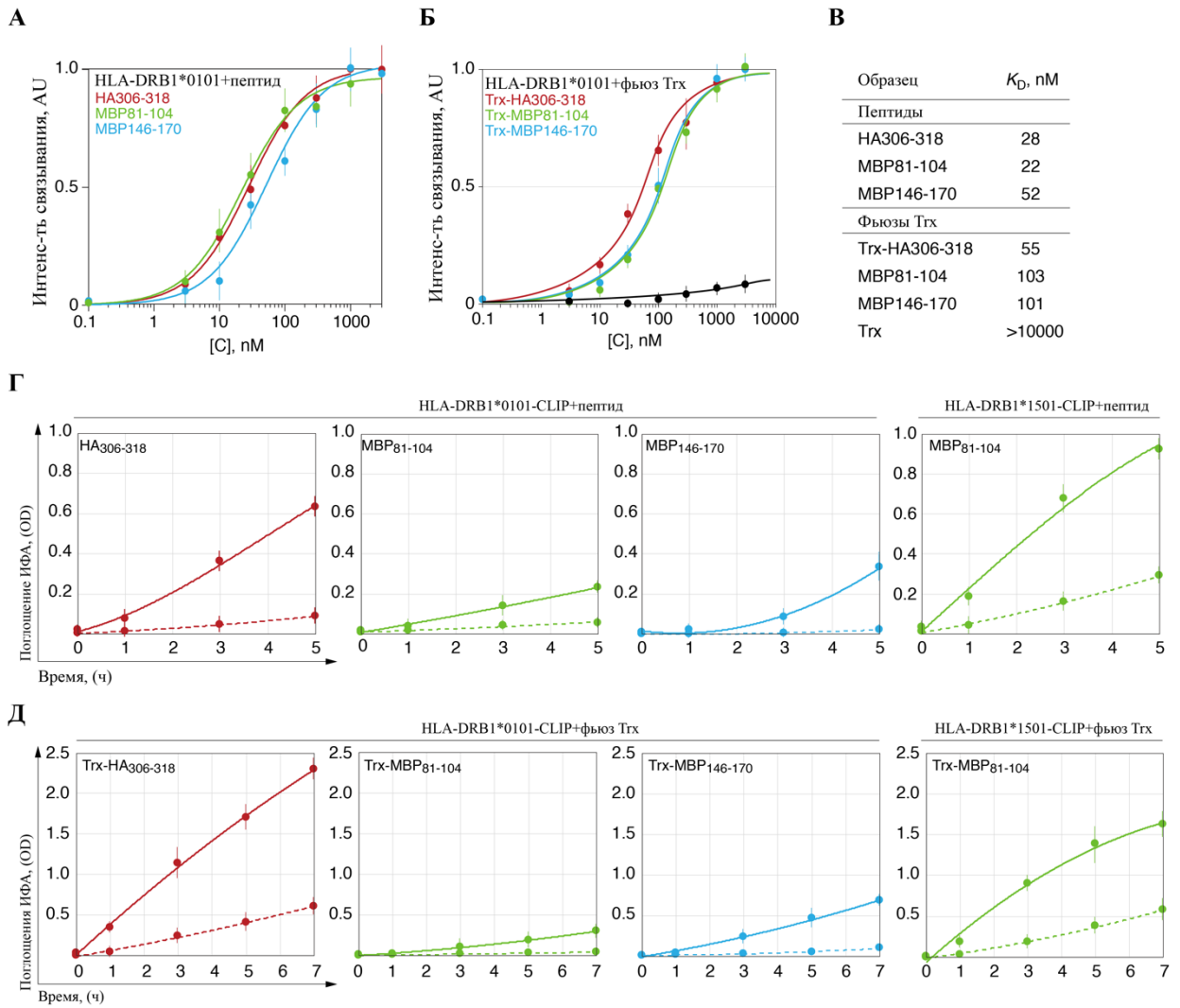


Рисунок 4.10. Определение констант диссоциации и кинетики связывания HLA-DRB1*01:01 с вирусным пептидом HA и фрагментами MBP. Связывание химически синтезированных пептидов HA₃₀₆₋₃₁₈ (красная кривая), MBP₈₁₋₁₀₄ (зеленая кривая) и MBP₁₄₆₋₁₇₀ (синяя кривая) (А) и их аналогов, слитных с тиоредоксином (Б), 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. АУ обозначает относительные единицы, а Тгх обозначает тиоредоксин. Константы диссоциации приведены в (В). Кинетика связывания химически синтезированных пептидов (Г) и их рекомбинантных аналогов, слитных с тиоредоксином (Д), содержащих HA₃₀₆₋₃₁₈ (красная кривая), MBP₈₁₋₁₀₄ (зеленая кривая) и MBP₁₄₆₋₁₇₀ (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).

Таблица 4.3. Начальные скорости взаимодействия пептидов с HLA-DRB1*01:01 или HLA-DRB1*15:01.

Пептид	HLA-DRB1	V, *10 ⁻¹² M/c	
		+ HLA-DM	- HLA-DM
HA ₃₀₆₋₃₁₈	*01:01	4,1	0,54
Trx-HA ₃₀₆₋₃₁₈	*01:01	3,9	0,79
MBP ₈₁₋₁₀₄	*01:01	1,04	0,47
Trx-MBP ₈₁₋₁₀₄	*01:01	0,46	0,09
MBP ₁₄₆₋₁₇₀	*01:01	0,97	0,07
Trx-MBP ₁₄₆₋₁₇₀	*01:01	0,98	0,1
MBP ₈₁₋₁₀₄	*15:01	6,2	1,3
Trx-MBP ₈₁₋₁₀₄	*15:01	6,4	1,2

Тем самым было показано, что наиболее распространенный аллельный вариант HLA-DRB1*01:01 связывает С-концевой и энцефалитогенный пептидные фрагменты MBP со скоростью, сравнимым с таковым у экзогенных вирусных пептидов, как в случае HA, или даже у эндогенных пептидов с высокой аффинностью и медленной кинетикой диссоциации (189). 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 сродство 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 MBP₈₁₋₁₀₄ 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.

4.5. 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 низкой скорости загрузки миелиновых пептидов на HLA-DRB1*01:01. Загрузка пептида на МНС II опосредована многоступенчатым механизмом, включающим высвобождение CLIP (**Рисунок 2.9**), чему способствует связывание HLA-DM с HLA-DR. Кроме того, карманы Р6-Р9 заняты С-концевым «хвостом» пептида, что облегчает взаимодействие N-концевой «головы» пептида с карманами Р1 и Р4 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 HA₃₀₆₋₃₁₈, CLIP₁₀₃₋₁₁₇, MBP₁₅₁₋₁₆₄ и MBP₈₈₋₁₀₀, слитные с тиоредоксином (**Таблица 4.4**). Граница раздела «головы» и «хвоста» проходила между положениями Р4 и Р5. Данные пептиды были получены с помощью стандартной методики, как и все пептиды, слитные с тиоредоксином (**Раздел 3.6**).

Таблица 4.4. Химерные пептиды.

Пептид	Последовательность
HA	PKYVKQNTLKLAT
HA-MBP ₁₅₇₋₁₆₄	PKYVKQGGRDSRSG
HA-CLIP	PKYVKQTPLLMQA
MBP ₁₅₁₋₁₆₄	SKIFKLGGRDSRSG
MBP ₁₅₁₋₁₅₆ -HA	SKIFKLN ^{TL} KLAT
MBP ₁₅₁₋₁₅₆ -CLIP	SKIFKLT ^{PLLMQA}
CLIP	PVSKMRMATPLLMQA
CLIP-HA	PVSKMRMANTLKLAT
CLIP-MBP ₁₅₇₋₁₆₄	PVSKMRMAGGRDSRSG
MBP ₈₈₋₁₀₀	HFFKNIVTPRTPP
MBP ₈₈₋₉₃ -HA	HFFKNIN ^{TL} KLAT
HA-MBP ₉₄₋₁₀₀	PKYVKQV ^{TPRTPP}
pp65	MSIYVYALPLKMLNI
pp65-MBP ₉₁₋₉₇	MSIYVYKNIVTPR
MBP ₈₅₋₉₇	PVVHFFKNIVTPR

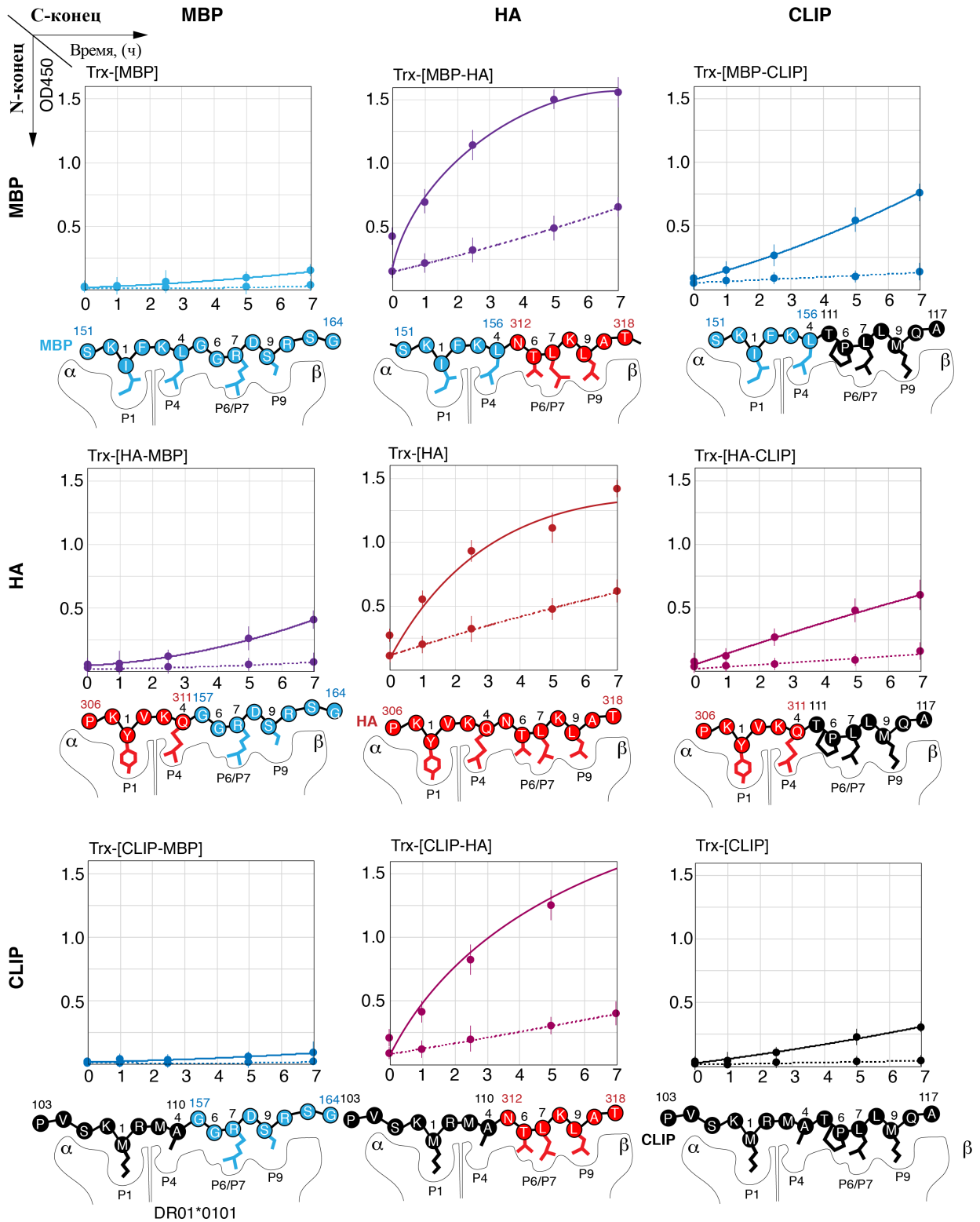


Рисунок 4.11. Кинетика связывания химерных пептидов (150 нМ), слитных с тиоредоксином, состоящих из N- и C-концевых частей HA₃₀₆₋₃₁₈ (красный), MBP₁₅₁₋₁₆₄ (синий) и CLIP (черный), с HLA-DRB1*01:01 (150 нМ) в присутствии (сплошные линии) или в отсутствие (пунктирные линии) HLA-DM (150 нМ). Визуализация: стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена. Якорные остатки указаны.

Таблица 4.5. Начальные скорости взаимодействия химерных пептидов с HLA-DRB1*01:01.

Пептид	HLA-DRB1	V, *10 ⁻¹² M/c	
		+ HLA-DM	- HLA-DM
HA	*01:01	10,2	3,7
HA-MBP ₁₅₇₋₁₆₄	*01:01	1,1	0,28
HA-CLIP	*01:01	2,4	0,5
MBP ₁₅₁₋₁₆₄	*01:01	0,56	0,09
MBP ₁₅₁₋₁₅₆ -HA	*01:01	12,8	3,9
MBP ₁₅₁₋₁₅₆ -CLIP	*01:01	2,4	0,8
CLIP	*01:01	1,02	0,25
CLIP-HA	*01:01	7,6	2,0
CLIP-MBP ₁₅₇₋₁₆₄	*01:01	0,31	0,09

Для поставленной цели методом ИФА с подобранными выше условиями (**Раздел 4.2**) были измерены кинетические параметры обмена предзагруженного CLIP на химерные пептиды, несущие N- и C-концевые части HA₃₀₆₋₃₁₈, CLIP₁₀₃₋₁₁₇, MBP₁₅₁₋₁₆₄ и MBP₈₈₋₁₀₀, на HLA-DRB1*01:01 с или без HLA-DM (**Рисунки 4.11 и 4.12**). Как видно из кинетических данных, химерные пептиды с C-концевой частью HA (Тгх-[HA], Тгх-[MBP₁₅₁₋₁₅₆-HA], Тгх-[MBP₈₈₋₉₃-HA] и Тгх-[CLIP-HA]) загружались на HLA-DRB1*01:01 с одинаковой скоростью независимо от N-концевой части. И наоборот, ни один из химерных пептидов с C-концевой частью пептидов MBP₁₅₁₋₁₆₄ или MBP₈₈₋₁₀₀ (Тгх-[MBP₁₅₁₋₁₆₄], Тгх-[HA-MBP₁₅₇₋₁₆₄], Тгх-[CLIP-MBP₁₅₇₋₁₆₄], Тгх-[MBP₈₈₋₁₀₀], Тгх-[HA-MBP₉₄₋₁₀₀]) не был способен эффективно связывать HLA-DRB1*01:01. Причем, скорости различались более, чем в 5 раз (**Таблицы 4.5 и 4.6**). Подобно этим результатам, замена N-концевой части CLIP фрагментами HA или MBP₁₅₁₋₁₆₄ (Тгх-[HA-CLIP] и Тгх-[MBP₁₅₁₋₁₅₆-CLIP]) оказала лишь умеренное влияние на связывание HLA-DRB1*01:01.

Тем самым можно сделать вывод, что связывание химерных пептидов с HLA-DRB1*01:01 свидетельствует о важности C-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 MBP₈₈₋₁₀₀, и гидрофобный изолейцин в положении 153 в случае MBP₁₅₁₋₁₆₄. Однако можно предположить, что именно наличие пролина в положении 96 в C-концевой части пептидов MBP₈₈₋₁₀₀ и HA-MBP₉₄₋₁₀₀, а также объемного остатка аргинина в положении 159 в C-концевой части пептидов MBP₁₅₁₋₁₆₄ и HA-MBP₁₅₇₋₁₆₄ изменило угол и положение

пептидов в борозде связывания, соответственно, тем самым ухудшило взаимодействие пептидов с карманом связывания P6/7. В сравнении, у пептидов HA, MBP₈₈₋₉₃-HA и MBP₁₅₁₋₁₅₆-HA в положении 314 С-концевой части в кармане P6/7 находится гидрофобный остаток лейцина, благоприятствующий связыванию.

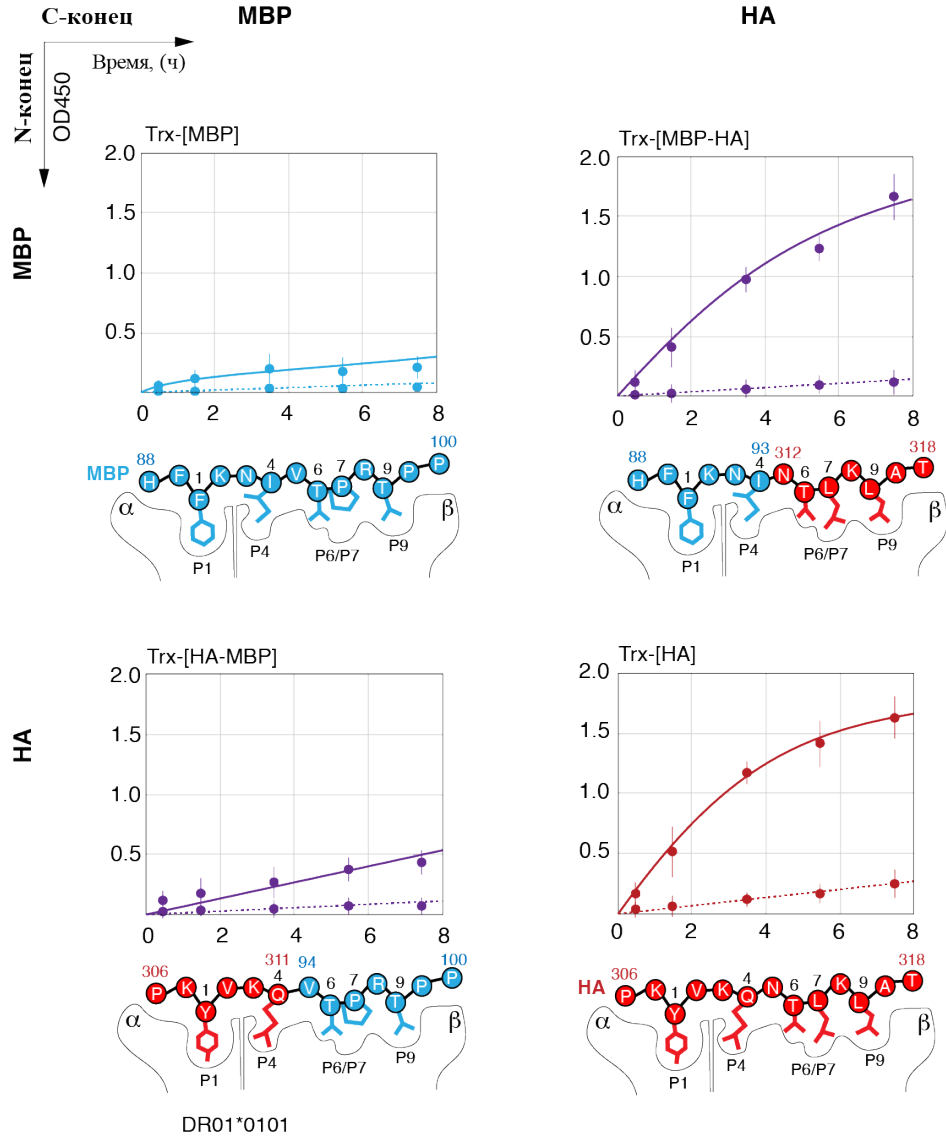


Рисунок 4.12. Кинетика связывания химерных пептидов (150 нМ), слитных с тиоредоксином, состоящих из N- и С-концевых частей HA₃₀₆₋₃₁₈ (красный) и MBP₈₈₋₁₀₀ (синий) с HLA-DRB1*01:01 (150 нМ) в присутствии (сплошные линии) или в отсутствие (пунктирные линии) HLA-DM (150 нМ). Измерено методом ИФА, визуализация: стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена. Якорные остатки указаны.

Таблица 4.6. Начальные скорости взаимодействия химерных пептидов с HLA-DRB1*01:01.

Пептид	HLA-DRB1	V, *10 ⁻¹² M/c	
		+ HLA-DM	- HLA-DM
HA	*01:01	10,6	0,74
HA-MBP ₉₄₋₁₀₀	*01:01	1,6	0,22
MBP ₈₈₋₉₃ -HA	*01:01	7,1	0,37
MBP ₈₈₋₁₀₀	*01:01	1,3	0,2

Для сравнения с аллелем риска HLA-DRB1*15:01 также были получены кинетические кривые связывания HLA-DRB1*15:01 с вирусным детерминантным пептидом pp65₁₀₉₋₁₂₃ структурного белка цитомегаловируса (190), миелиновым пептидом MBP₈₅₋₉₇ и созданным химерным пептидом pp65-MBP₉₁₋₉₇, представляющий собой слитную конструкцию из N-концевой части pp65 и C-концевой части MBP₈₅₋₉₇ (**Рисунок 4.13**). Полученные данные показали, что все пептиды (Trx-[pp65], Trx-[pp65-MBP₉₁₋₉₇] и Trx-[MBP₈₅₋₉₇]) загружались на HLA-DRB1*15:01 практически с одинаково высокой скоростью в присутствии HLA-DM (**Таблица 4.7**).

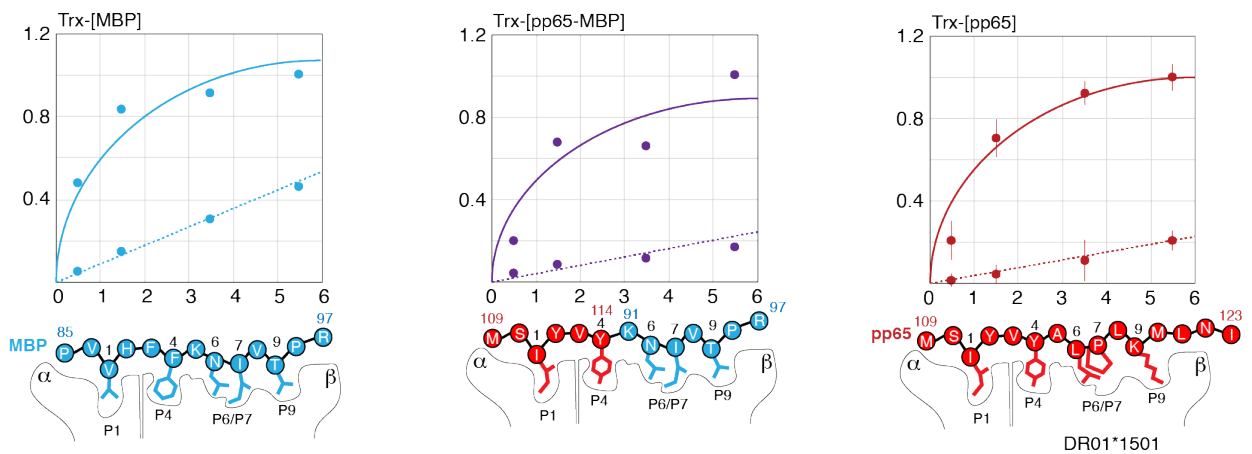


Рисунок 4.13. Кинетика связывания химерных пептидов (150 нМ), слитных с тиоредоксином, состоящих из N- и C-концевых частей pp65₁₀₉₋₁₂₃ (красный) и MBP₈₅₋₉₇ (синий) с HLA-DRB1*15:01 (150 нМ) в присутствии (сплошные линии) или в отсутствие (пунктирные линии) HLA-DM (150 нМ). Измерено методом ИФА, визуализация: стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена. Якорные остатки указаны.

Таблица 4.7. Начальные скорости взаимодействия химерных пептидов с HLA-DRB1*15:01.

Пептид	HLA-DRB1	V, *10 ⁻¹² М/с	
		+ HLA-DM	- HLA-DM
pp65	*15:01	50	4,2
pp65-MBP ₉₁₋₉₇	*15:01	55	2,8
MBP ₈₅₋₉₇	*15:01	60	1,4

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 (*Таблицы 4.5, 4.6 и 4.7*).

4.6. 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.

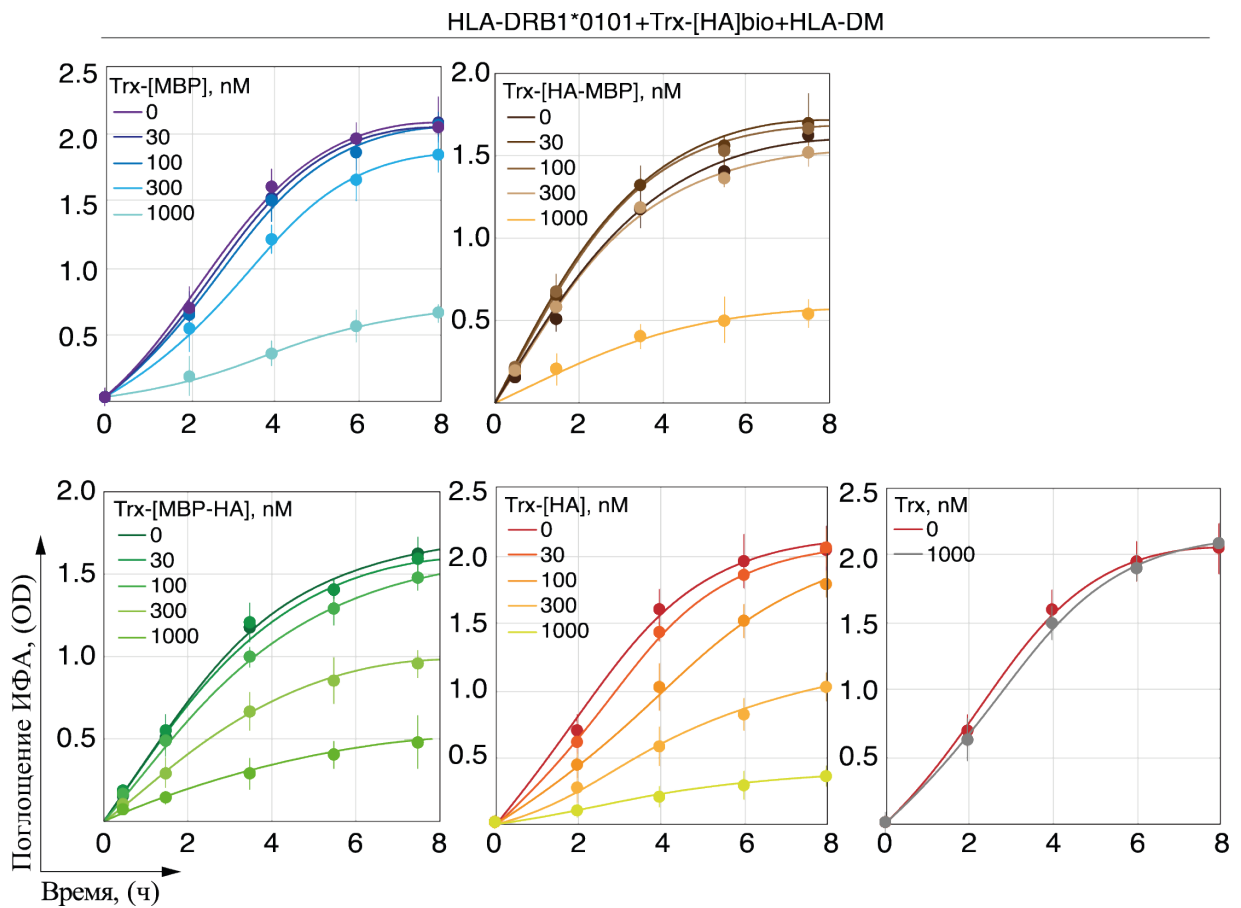


Рисунок 4.14. Кинетика взаимодействия HLA-DRB1*01:01 (150 нМ) и HLA-DM (150 нМ) с биотинилированным, слитным с тиоредоксином HA₃₀₆₋₃₁₈ (Trx-[HA]bio) (150 нМ) в присутствии увеличивающихся концентраций (0-1 мкМ) небитинилированных, слитных с тиоредоксином пептидов MBP₁₅₁₋₁₆₄ (Trx-[MBP]), HA₃₀₆₋₃₁₁-MBP₁₅₇₋₁₆₄ (Trx-[HA-MBP]), MBP₁₅₁₋₁₅₆-HA₃₁₂₋₃₁₈ (Trx-[MBP-HA]) и HA₃₀₆₋₃₁₈ (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.

В данных экспериментах сравнивались слитные с тиоредоксином HA₃₀₆₋₃₁₈ (Trx-[HA]), MBP₁₅₁₋₁₆₄ (Trx-[MBP₁₅₁₋₁₆₄]) или их химерные варианты MBP₁₅₁₋₁₅₆-HA (Trx-[MBP₁₅₁₋₁₅₆-HA]) и HA-MBP₁₅₇₋₁₆₄ (Trx-[HA-MBP₁₅₇₋₁₆₄]) в возрастающих концентрациях 0, 30, 100, 300 и 1000 нМ в конкуренции с биотинилированным, слитным с тиоредоксином HA₃₀₆₋₃₁₈ (Trx-[HA]bio) (150 нМ) (Рисунок 4.14). 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).

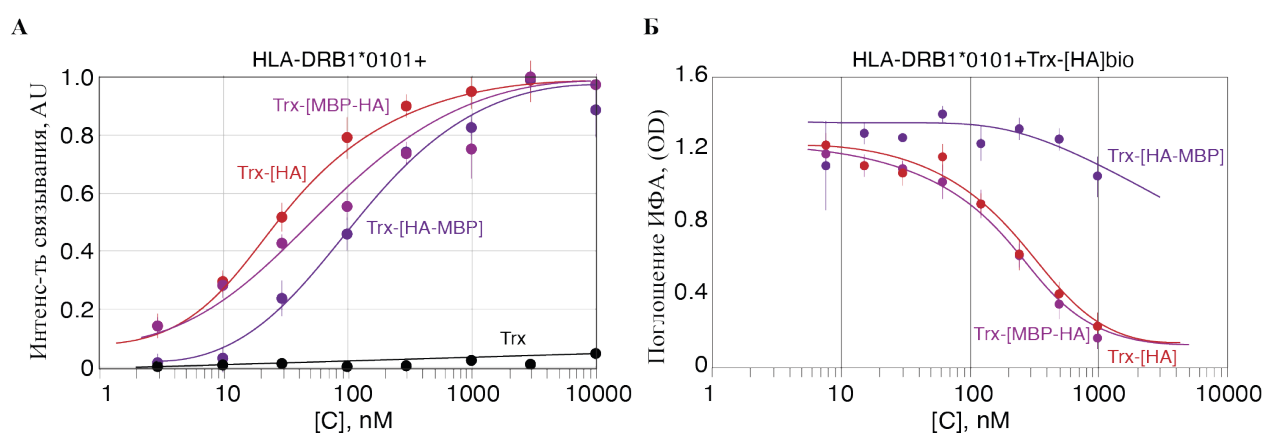


Рисунок 4.15. (А) DELFIA с определением флуоресценции с разрешением по времени взаимодействия слитных с тиоредоксином HA₃₀₆₋₃₁₈ и химерных пептидов, состоящих из N- и C-концевых частей HA₃₀₆₋₃₁₈ и MBP₁₅₁₋₁₆₄ (Trx-[MBP-HA] и Trx-[HA-MBP]), в разных концентрациях (3 нМ - 10 мкМ) с HLA-DRB1*01:01 (5 нМ). (Б) ИФА взаимодействия HLA-DRB1*01:01 (150 нМ) с биотинилированным, слитным с тиоредоксином HA₃₀₆₋₃₁₈ (Trx-[HA]bio) (150 нМ) в присутствии возрастающих концентраций (7,8 нМ - 1 мкМ) небитинилированных, слитных с тиоредоксином HA₃₀₆₋₃₁₈ (Trx-[HA]) и химерных пептидов, состоящих из N- и C-концевых частей HA₃₀₆₋₃₁₈ и MBP₁₅₁₋₁₆₄ (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 4.14 и 4.15, Trx-[MBP₁₅₁₋₁₆₄] и Trx-[HA-MBP₁₅₇₋₁₆₄] не смогли конкурировать с Trx-[HA]bio до концентрации 1 мкМ, тогда как небитинилированные Trx-[HA] и Trx-[MBP₁₅₁₋₁₅₆-HA] уменьшали связывание Trx-[HA]bio, начиная с концентрации 100 нМ. В качестве отрицательного контроля, тиоредоксин без пептида (Trx) в высокой концентрации 1 мкМ не конкурировал с Trx-[HA]bio. Чтобы убедиться, что наблюдаемое различие вызвано неподходящими остатками в положениях Р6/Р7 и Р9 пептида MBP₁₅₁₋₁₆₄, как было показано в случае кинетической дискриминации

миелиновых и вирусных пептидов, была определена аффинность двух химерных пептидов Trx-[HA-MBP₁₅₇₋₁₆₄] и Trx-[MBP₁₅₁₋₁₅₆-HA] (**Рисунок 4.15А**) в сравнении с их способностью конкурировать с Trx-[HA]bio за связывание HLA-DRB1*01:01 (**Рисунок 4.15Б**). Наши данные свидетельствуют о том, что при сопоставимых термодинамических свойствах этих пептидов ингибирующая способность Trx-[HA-MBP₁₅₇₋₁₆₄] минимум на порядок ниже, чем Trx-[HA] и Trx-[MBP₁₅₁₋₁₅₆-HA] (**Таблица 4.8**).

Таблица 4.8. Константы диссоциации взаимодействия пептидов с HLA-DRB1*01:01 и значения концентраций полумаксимального ингибирования этих пептидов в конкуренции с HAbio за связывание с HLA-DRB1*01:01.

Пептид	K _D , нМ	IC ₅₀ , нМ
HA	30	120
MBP ₁₅₁₋₁₅₆ -HA	60	115
HA-MBP ₁₅₇₋₁₆₄	105	>1000

Эксперименты по изучению конкуренции за связывание с HLA-DRB1*01:01 были проведены и для второго миелинового пептида MBP₈₈₋₁₀₀ (Trx-[MBP₈₈₋₁₀₀]) и его химерных пептидов HA-MBP₉₄₋₁₀₀ (Trx-[HA-MBP₉₄₋₁₀₀]) и MBP₈₈₋₉₃-HA (Trx-[MBP₈₈₋₉₃-HA]) в сравнении с HA₃₀₆₋₃₁₈ (Trx-[HA]) точно также, как и в случае MBP₁₅₁₋₁₆₄. Кинетические эксперименты показали, что к эффективной конкуренции с вирусным биотинилированным пептидом Trx-[HA]bio за связывание с HLA-DRB1*01:01 способны Trx-[HA] и химерный пептид Trx-[MBP₈₈₋₉₃-HA], причем, падение сигнала ИФА начинается с концентрации 100 нМ (**Рисунки 4.16 и 4.17**). В отличие от них конкурентное взаимодействие Trx-[HA]bio с миелиновым Trx-[MBP₈₈₋₁₀₀] и химерным Trx-[HA-MBP₉₄₋₁₀₀] понижает сигнал ИФА незначительно, лишь начиная с высокой концентрации 1 мкМ. IC₅₀ этих пар пептидов различаются минимум на порядок, что говорит практически о неспособности миелинового пептида MBP₈₈₋₁₀₀ конкурировать с вирусным HA (**Таблица 4.9**), как и в случае другого миелинового пептида MBP₁₅₁₋₁₆₄.

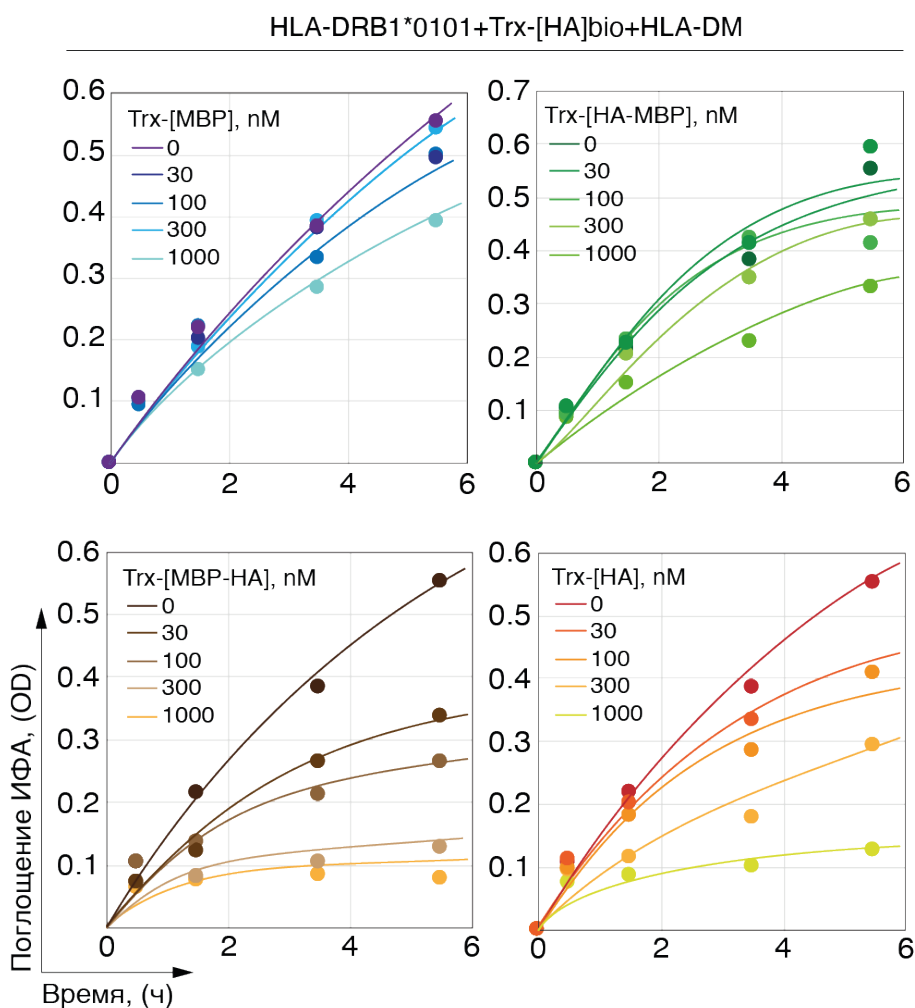


Рисунок 4.16. Кинетика взаимодействия HLA-DRB1*01:01 (150 нМ) и HLA-DM (150 нМ) с биотинилированным, слитным с тиоредоксином HA₃₀₆₋₃₁₈ (Trx-[HA]bio) (150 нМ) в присутствии увеличивающихся концентраций (0-1 мкМ) небитинилированных, слитных с тиоредоксином пептидов MBP₈₈₋₁₀₀ (Trx-[MBP]), HA₃₀₆₋₃₁₁-MBP₉₄₋₁₀₀ (Trx-[HA-MBP]), MBP₈₈₋₉₃-HA₃₁₂₋₃₁₈ (Trx-[MBP-HA]) и HA₃₀₆₋₃₁₈ (Trx-[HA]). В моменты времени 5,5, 3,5, 1,5, 0,5 и 0 часов количество связанного Trx-[HA]bio определяли добавлением стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена.

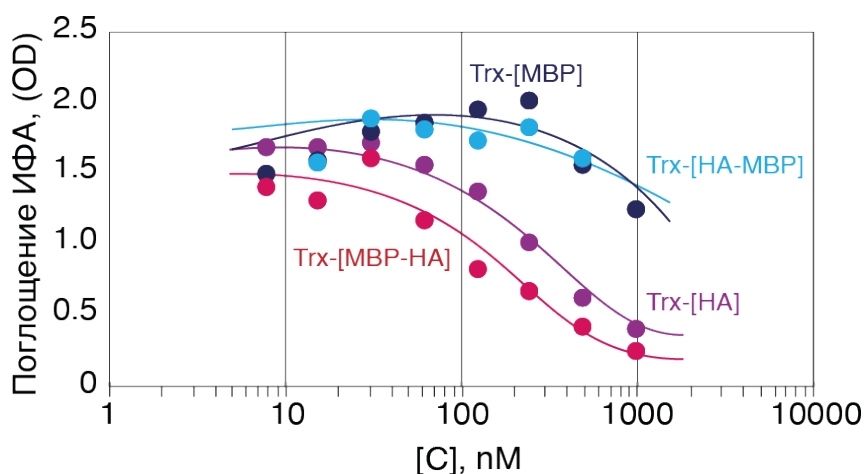


Рисунок 4.17. ИФА взаимодействия HLA-DRB1*01:01 (150 нМ) с биотинилированным, слитным с тиоредоксином HA₃₀₆₋₃₁₈ (Trx-[HA]bio) (150 нМ) в присутствии возрастающих концентраций (7,8 нМ - 1 мкМ) небитинилированных, слитных с тиоредоксином HA₃₀₆₋₃₁₈ (Trx-[HA]), MBP₈₈₋₁₀₀ (Trx-[MBP]) и химерных пептидов, состоящих из N- и C-концевых частей HA₃₀₆₋₃₁₈ и MBP₈₈₋₁₀₀ (Trx-[MBP-HA] и Trx-[HA-MBP]). После 18 часов инкубации количество связанного Trx-[HA]bio определяли добавлением стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена.

Таблица 4.9. Значения концентраций полумаксимального ингибирования пептидов в конкуренции с HAbio за связывание с HLA-DRB1*01:01.

Пептид	IC ₅₀ , нМ
HA	300
MBP ₈₈₋₉₃ -HA	200
HA-MBP ₉₄₋₁₀₀	>1000
MBP ₈₈₋₁₀₀	>1000

Кроме того, была проанализирована способность MBP₈₅₋₉₇ конкурировать с pp65₁₀₉₋₁₂₃ за связывание с HLA-DRB1*15:01. Для этого HLA-DRB1*15:01 инкубировали с HLA-DM и биотинилированным, слитным с тиоредоксином pp65₁₀₉₋₁₂₃ (Trx-[pp65]bio) в присутствии возрастающих концентраций небитинилированных pp65₁₀₉₋₁₂₃ (Trx-[pp65]) или MBP₈₅₋₉₇ (Trx-[MBP₈₅₋₉₇]) (**Рисунок 4.18**). Было показано, что Trx-[MBP₈₅₋₉₇] способен конкурировать с Trx-[pp65]bio, подобно небитинилированному Trx-[pp65], уменьшая связывание Trx-[pp65]bio, начиная с концентрации 100 нМ. Термодинамическая ингибирующая способность Trx-[MBP₈₅₋₉₇] сравнима с Trx-[pp65] и Trx-[pp65-MBP₉₁₋₉₇] и даже больше (**Рисунок 4.19**), причем, IC₅₀ пептида MBP₈₅₋₉₇ в 3.3 раза меньше, чем у pp65, тем самым миелиновый пептид даже более конкурентоспособен вирусного (**Таблица 4.10**).

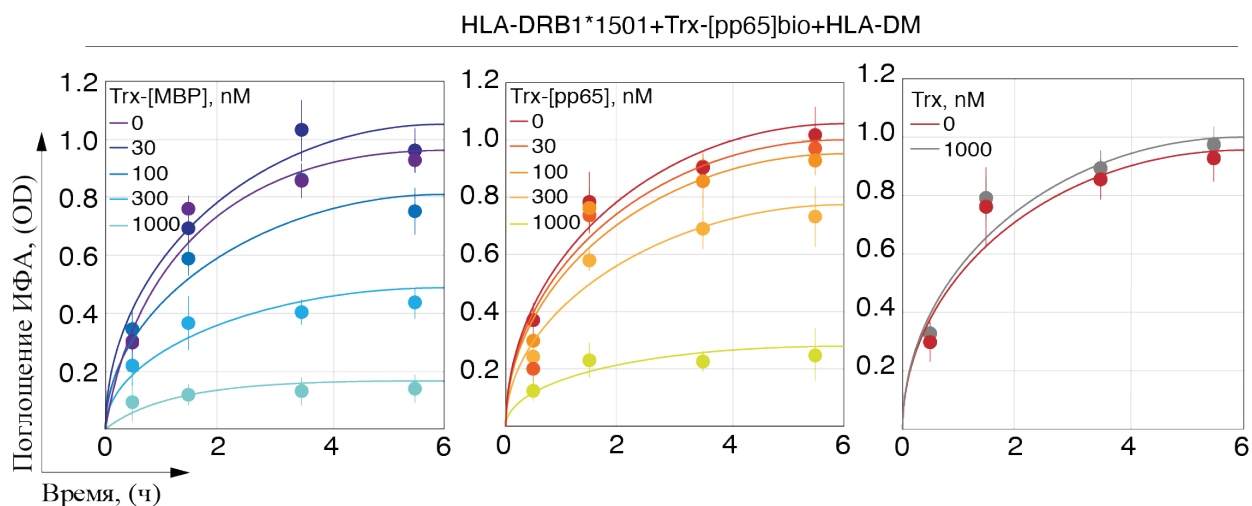


Рисунок 4.18. Кинетика взаимодействия HLA-DRB1*15:01 (150 нМ) и HLA-DM (150 нМ) с биотинилированным, слитным с тиоредоксином pp65₁₀₉₋₁₂₃ (Trx-[pp65]bio) (150 нМ) в присутствии увеличивающихся концентраций (0-1 мкМ) небитинилированных, слитных с тиоредоксином пептидов MBP₈₅₋₉₇ (Trx-[MBP]) и pp65₁₀₉₋₁₂₃ (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.

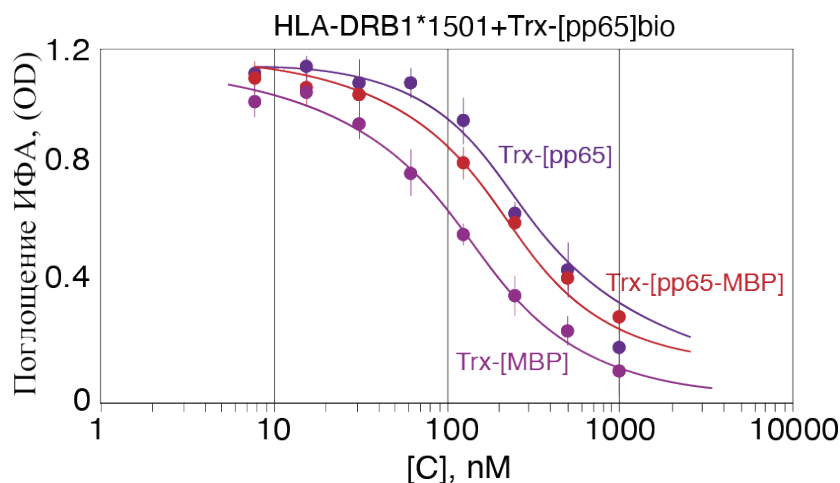


Рисунок 4.19. ИФА взаимодействия HLA-DRB1*15:01 (150 нМ) с биотинилированным, слитным с тиоредоксином pp65₁₀₉₋₁₂₃ (Trx-[pp65]bio) (150 нМ) в присутствии возрастающих концентраций (7,8 нМ - 1 мкМ) небитинилированных, слитных с тиоредоксином MBP₈₅₋₉₇ (Trx-[MBP]), pp65₁₀₉₋₁₁₄-MBP₉₁₋₉₇ (Trx-[pp65-MBP]) и pp65₁₀₉₋₁₂₃ (Trx-[pp65]). После 18 часов инкубации количество связанного Trx-[pp65]bio определяли добавлением стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена.

Таблица 4.10. Значения концентраций полумаксимального ингибирования пептидов в конкуренции с pp65bio за связывание с HLA-DRB1*15:01.

Пептид	IC ₅₀ , нМ
pp65	350
pp65-MBP ₉₁₋₉₇	250
MBP ₈₅₋₉₇	120

Результаты данного и предыдущего разделов свидетельствуют о том, что связывание эпитопов MBP₁₅₃₋₁₆₁ и MBP₈₈₋₁₀₀ 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 HA 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 4.20). Тем самым, вирусный HA 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 сродство положениях P1 и P4 находятся высоко аффинные аминокислотные остатки у обоих пептидов, а положения P6/P7/P9 не играют такой роли, как в случае HLA-DRB1*01:01.

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 (191), 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 эквимолярной 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 (**Раздел 4.3**) 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.

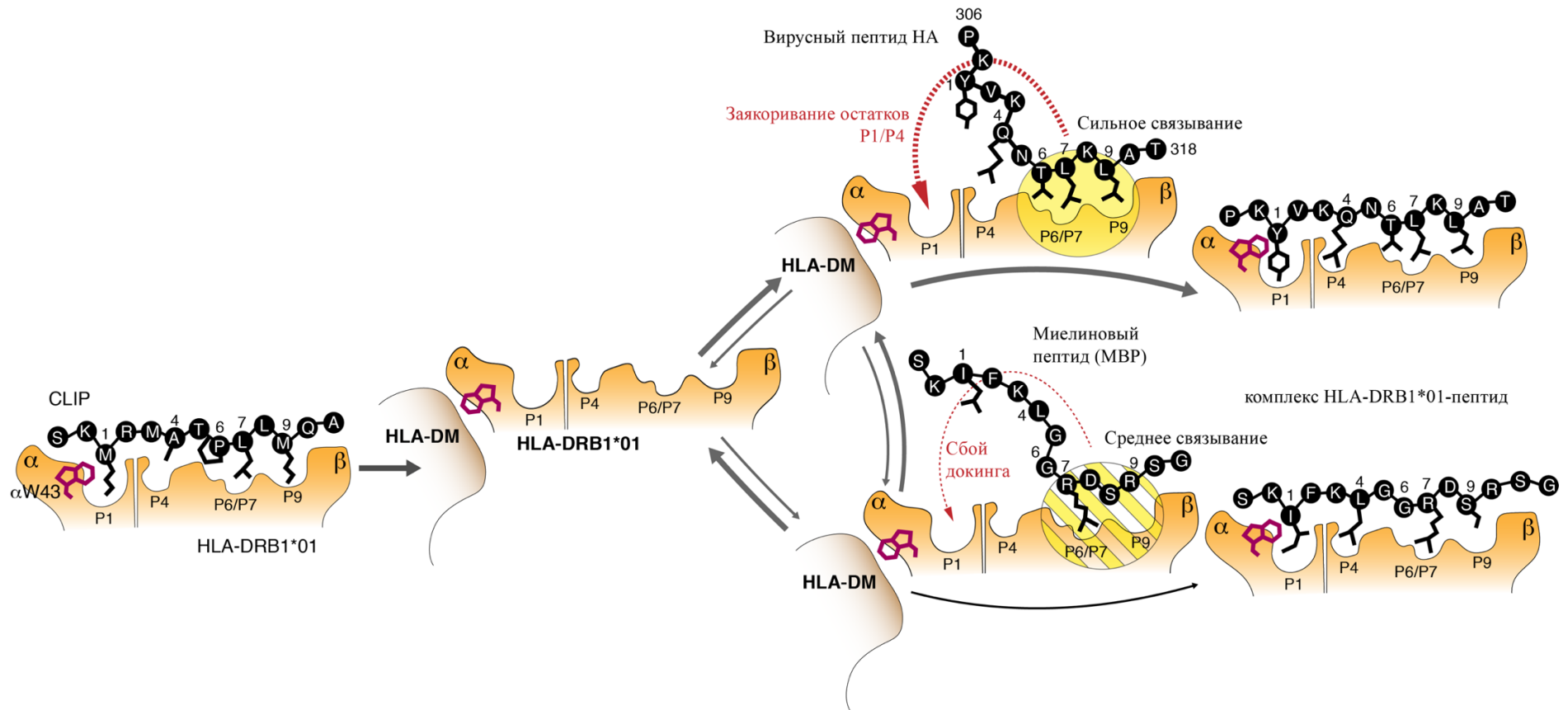


Рисунок 4.20. Молекулярный механизм кинетического отбора, опосредованного комплексом HLA-DM – HLA-DRB1*01:01, который ограничивает загрузку аутоантигенных пептидов. Высвобождение CLIP сопровождается образованием комплекса HLA-DM – HLA-DRB1*01:01, где триптофан 43 α -цепи HLA связывается HLA-DM. Миелиновые 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.

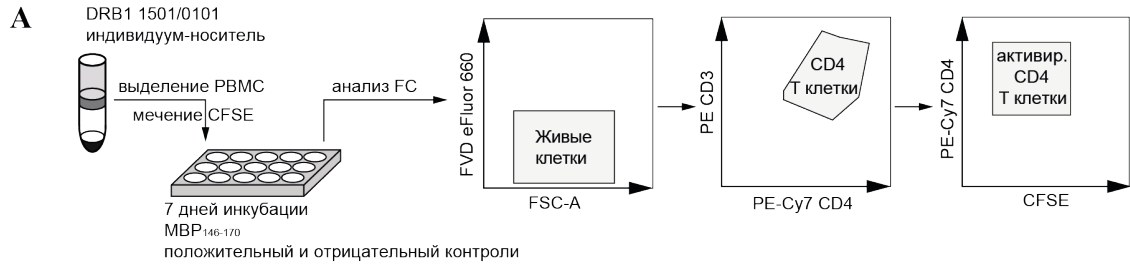
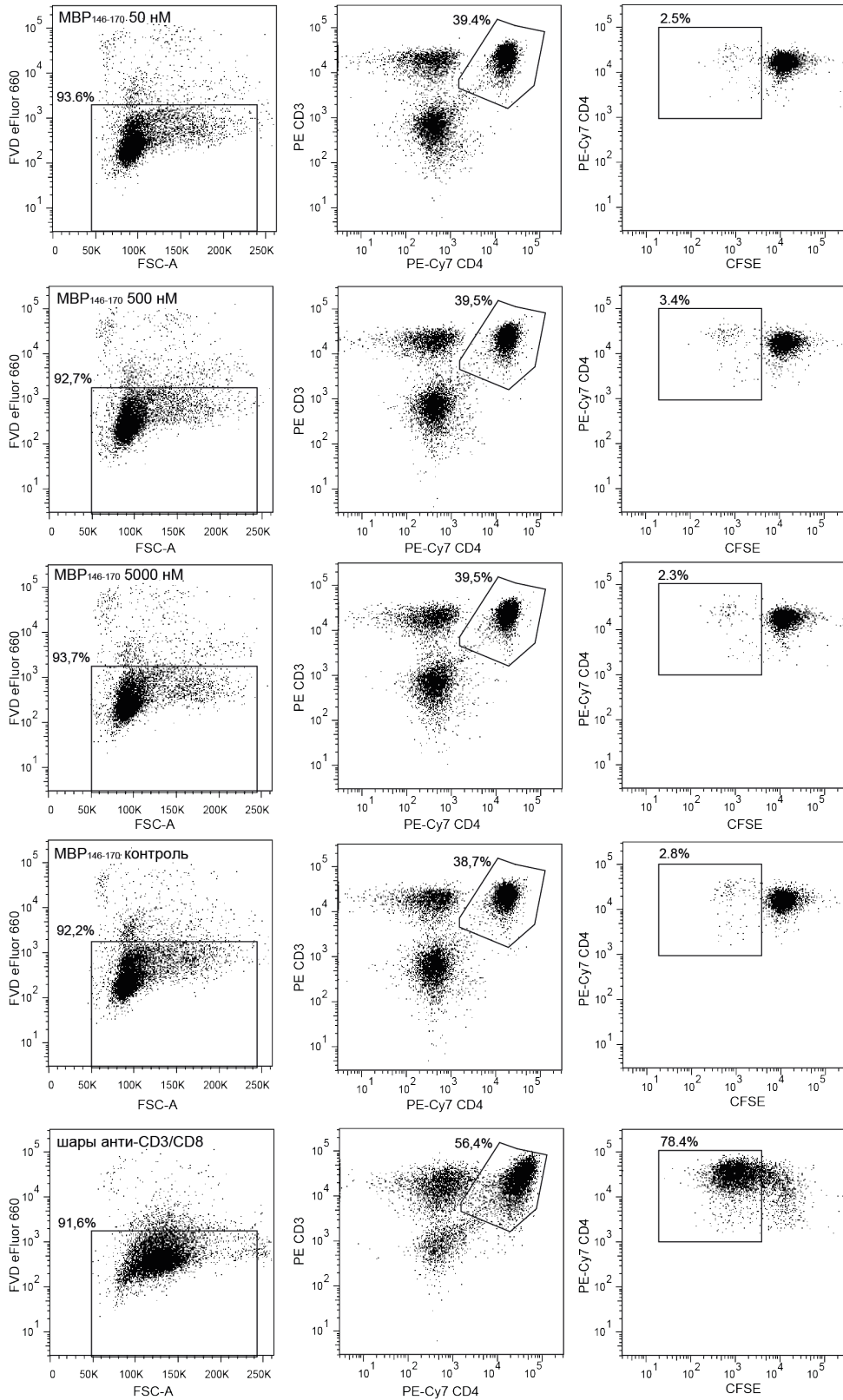
4.7. Анализ активации Т-клеток при добавлении С-концевого миелинового пептида.

Как было показано в предыдущем разделе (**Раздел 4.3**) с помощью анализа LC-MS/MS спектра пептидов, связанных с HLA, экспонированными на поверхности дендритных клеток, достаточное количество С-концевого миелинового пептида не было детектировано. Однако поскольку вероятность презентации миелиновых пептидов в очень низких недетектируемых количествах протективным HLA-DRB1*01:01 на поверхности антиген-презентирующих клеток очень мала, но все-таки сохраняется, то вопрос активации Т-клеток остается открытым. Для того, чтобы выяснить, происходит ли активация CD4 Т-клеток в присутствии пептида MBP₁₄₆₋₁₇₀, был проведен анализ Т-клеточной пролиферации при помощи красителя CFSE (**Раздел 3.8**).

Из крови нормального индивидуума с гетерозиготным генотипом HLA-DRB1*01:01/*15:01 была выделена фракция моноклеарных клеток, в состав которых входят и CD4 Т-клетки. Далее клетки окрашивали 1 мкМ раствором CFSE и разделяли на пять частей. К трем из них добавляли миелиновый синтетический пептид MBP₁₄₆₋₁₇₀ в трех концентрациях 50, 500 и 5000 нМ. Одну часть не стимулировали ничем и использовали в качестве отрицательного контроля. А последнюю часть стимулировали магнитными шарами с пришитыми анти-CD3/CD8 антителами в качестве положительного контроля. После семи дней инкубации клетки отмывали и проводили специфическую визуализацию CD4 Т-клеток с помощью добавления смеси анти-CD3 антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой PE, и анти-CD4 антител, конъюгированных с парой флуоресцентных меток PE-Cy7. Краситель FVD использовали для визуализации живых клеток. Далее все образцы анализировали при помощи цитофлуориметра (**Рисунок 4.21А**).

В случае пролиферации CD4 Т-клетки начинают делиться и количество немеченых CFSE клеток увеличивается. Как показано на **Рисунке 4.21Б**, во всех образцах количество живых клеток было практически одинаково и больше 90%. В случае образцов с добавлением MBP₁₄₆₋₁₇₀ и отрицательного контроля популяция CD4 Т-клеток была примерно одинакова и составила около 39% от общего числа живых клеток. В случае образца, стимулированного магнитными шарами анти-CD3/CD8, популяция CD4 Т-клеток составила 56%. При этом процент активированных Т-клеток в случае добавления пептида MBP₁₄₆₋₁₇₀ независимо от концентрации был сравним с отрицательным контролем (значения были незначительны и составляли лишь около 2-3% от популяции CD4 Т-клеток) (**Рисунки 4.21В и 4.21Г**). В случае положительного контроля процент активированных Т-клеток составил 78%, что говорит о пролиферации Т-клеток. В соответствии с этими данными можно сделать вывод

о том, что пептид MBP₁₄₆₋₁₇₀ не активировал пролиферацию CD4-позитивных Т-клеток нормального индивидуума с гетерозиготным генотипом HLA-DRB1*01:01/*15:01. Тем самым нами было продемонстрировано, что С-концевой миелиновый пептид MBP₁₄₆₋₁₇₀ с высокой аффинностью к протективному HLA-DRB1*01:01 загружается с низкой скоростью на этот HLA-DR. Весьма вероятно, что он не презентуется на поверхности дендритных клеток, что в свою очередь не активирует Т-клеточный ответ.

**Б**

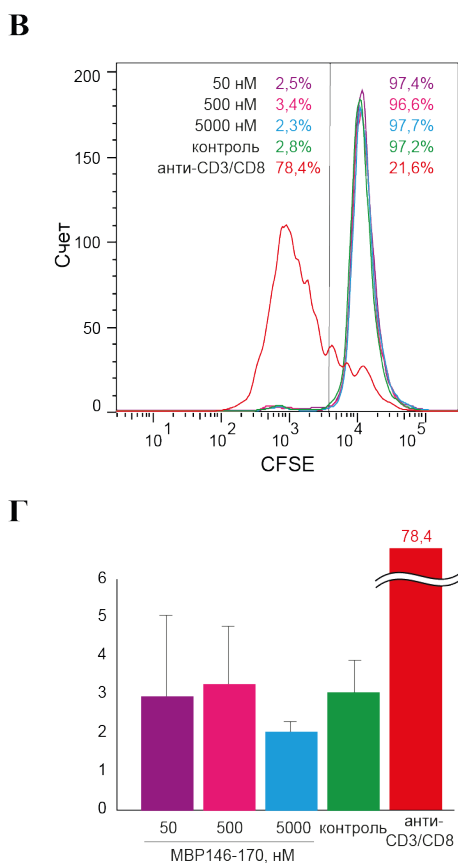


Рисунок 4.21. Анализ T-клеточной пролиферации с использованием CFSE. (А) РВМС человека, выделенные из индивидуума с гетерозиготным генотипом HLA-DRB1*01:01/*15:01, метили CFSE и дополнительно инкубировали с MBP₁₄₆₋₁₇₀ в различных концентрациях (0-5000 нМ) или с магнитными шарами анти-CD3/CD8 в течении 7 дней. Затем клетки окрашивали FVD и антителами анти-CD3 -CD4 и далее анализировали проточной цитометрией. (Б) Сверху вниз: CD4-положительные T-клетки, стимулированные 50, 500 и 5000 нМ MBP₁₄₆₋₁₇₀, нестимулированные клетки и клетки, стимулированные магнитными шарами анти-CD3/CD8. (В) Гистограмма, представляющая интенсивность флуоресценции CFSE в CD4-положительных T-клетках с различной стимуляцией, проанализированных методом проточной цитометрии. (Г) График демонстрирует процент пролиферирующих CD4-положительных T-клеток в зависимости от стимуляции. Столбцы представляют стандартное отклонение (n=3).

Сумма полученных данных обеспечивает новый вектор оптимизации пептидных лигандов с точки зрения кинетической дискриминации антигенов HLA класса II. Как видно из **Рисунка 4.20**, 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 MHC 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 пролиферирующих T-клеток в тимусе.

5. 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 НЕК293F был экспрессирован и далее очищен HLA-DM; а 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 MBP₁₄₆₋₁₇₀ и менее эффективно MBP₁₃₀₋₁₅₆, MBP₈₁₋₁₀₄ и MBP₆₅₋₉₂. HLA-DRB1*15:01 специфически распознавал энцефалитогенный пептид MBP₈₁₋₁₀₄ и менее эффективно MBP₂₅₋₅₄ и MBP₁₃₀₋₁₅₆. Были определены эпитопы связывания MBP₈₁₋₁₀₄ и MBP₁₄₆₋₁₇₀ 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 MBP₁₄₆₋₁₇₀ и MBP₈₈₋₁₀₀ связывались с HLA-DRB1*01:01 со скоростью, минимум в 4 раза меньшей по сравнению с вирусным пептидом HA, а также по сравнению с MBP₈₅₋₉₇ 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 связывании 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 MBP₈₅₋₉₇ более конкурентоспособный вирусного 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 MBP₁₄₆₋₁₇₀ 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.

6. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cho JH, Feldman M. Heterogeneity of autoimmune diseases: Pathophysiologic insights from genetics and implications for new therapies. *Nature Medicine*. 2015.
2. Parkes M, Cortes A, Van Heel DA, Brown MA. Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases. *Nature Reviews Genetics*. 2013.
3. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *The Lancet Neurology*. 2010.
4. Rosenblum MD, Remedios KA, Abbas AK. Mechanisms of human autoimmunity. *J Clin Invest*. 2015;
5. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med*. 2007;
6. Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. Vol. 14, *Trends in Immunology*. 1993. p. 349–52.
7. Gruen JR, Weissman SM. Human MHC class III and IV genes and disease associations. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2001.
8. Hansen TH, Bouvier M. MHC class I antigen presentation: Learning from viral evasion strategies. *Nature Reviews Immunology*. 2009.
9. Reith W, Mach B. The Bare Lymphocyte Syndrome and the Regulation of MHC Expression. *Annu Rev Immunol*. 2001;
10. Goronzy JJ, Weyand CM. Rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews*. 2005.
11. Svejgaard A. The immunogenetics of multiple sclerosis. *Immunogenetics*. 2008.
12. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*. 1994.
13. Zakharova MY, Belyanina TA, Sokolov A V., Kiselev IS, Mamedov AE. The Contribution of Major Histocompatibility Complex Class II Genes to an Association with Autoimmune Diseases. *Acta Naturae* [Internet]. 2019 Dec 15;11(4):4–12. Available from: <http://actanaturae.ru/2075-8251/article/view/10865>
14. Hauptmann G, Bahram S. Genetics of the central MHC. *Current Opinion in Immunology*. 2004.
15. Cresswell P. Antigen Presentation: Getting peptides into MHC class II molecules. *Curr Biol*. 1994;
16. Runnels HA, Weber DA, Moore JC, Westerman LE, Jensen PE. Intact proteins can bind to class II histocompatibility molecules with high affinity. *Mol Immunol*. 1997;

17. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*. 1994;368(6468):215–21.
18. Lamb CA, Cresswell P. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR- invariant chain complexes. *J Immunol*. 1992;
19. Anderson KS, Cresswell P. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J*. 1994;
20. Cresswell P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell*. 1996.
21. Newcomb JR, Cresswell P. Structural analysis of proteolytic products of MHC class II-invariant chain complexes generated in vivo. *J Immunol*. 1993;
22. Roche PA, Marks MS, Cresswell PJ. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature*. 1991;
23. Deussing J, Roth W, Saftig P, Peters C, Ploegh HL, Villadangos JA. Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;
24. Nakagawa T, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J, et al. Cathepsin L: Critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* (80-). 1998;
25. Riese RJ, Wolf PR, Brömme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL, et al. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity*. 1996;
26. Lim JP, Gleeson PA. Macropinocytosis: An endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and Cell Biology*. 2011.
27. West MA, Wallin RPA, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren HG, et al. Enhanced dendritic cell antigen capture via Toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* (80-). 2004;
28. Rock KL, Benacerraf B, Abbas AK. Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes: I. Role of surface immunoglobulin receptors. *J Exp Med*. 1984;
29. Platt CD, Ma JK, Chalouni C, Ebersold M, Bou-Reslan H, Carano RAD, et al. Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;
30. Stuart LM, Ezekowitz RAB. Phagocytosis: Elegant complexity. *Immunity*. 2005.
31. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2000.
32. Crotzer VL, Blum JS. Autophagy and adaptive immunity. *Immunology*. 2010.
33. Schmid D, Pypaert M, Münz C. Antigen-Loading Compartments for Major

- Histocompatibility Complex Class II Molecules Continuously Receive Input from Autophagosomes. *Immunity*. 2007;
34. Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(4):203–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3818>
 35. Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee HG, Coligan JE, et al. Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides. *J Immunol*. 1994;
 36. Lanzavecchia A, Reid PA, Watts C. Irreversible association of peptides with class II MHC molecules in living cells. *Nature*. 1992;
 37. Pieters J. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. 1997;
 38. Todd J a, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronck Z, Jacob CO, et al. A molecular basis for MHC class II--associated autoimmunity. *Science*. 1988;240:1003–9.
 39. Marks MS, Roche PA, Van Donselaar E, Woodruff L, Peters PJ, Bonifacio JS. A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the β chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J Cell Biol*. 1995;
 40. Lindstedt R, Liljedahl M, Péléraux A, Peterson PA, Karlsson L. The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif. *Immunity*. 1995;
 41. Denzin LK, Cresswell P. HLA-DM induces clip dissociation from MHC class II $\alpha\beta$ dimers and facilitates peptide loading. *Cell*. 1995;82(1):155–65.
 42. Sloan VS, Cameron P, Porter G, Gammon M, Amaya M, Zaller DM. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. Vol. 375, *Nature*. 1995. p. 802–6.
 43. Kropshofer H, Vogt AB, Moldenhauer G, Hammer J, Blum JS, Hämmerling GJ. Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J* [Internet]. 1996;15(22):6144–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8947036>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC452435>
 44. Weber DA, Evavold BD, Jensen PE. Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science* [Internet]. 1996 Oct 25;274(5287):618–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8849454>
 45. Cho S, Attaya M, Monaco JJ. New class II-like genes in the murine MHC. *Nature*. 1991;
 46. Kelly AP, Monaco JJ, Cho S, Trowsdale J. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature*. 1991;
 47. Mosyak L, Zaller DM, Wiley DC. The structure of HLA-DM, the peptide exchange

- catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity*. 1998;9(3):377–83.
48. Pos W, Sethi DK, Call MJ, Schulze MSED, Anders AK, Pyrdol J, et al. Crystal structure of the HLA-DM-HLA-DR1 complex defines mechanisms for rapid peptide selection. *Cell* [Internet]. 2012;151(7):1557–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.025>
 49. Anders AK, Call MJ, Schulze MSED, Fowler KD, Schubert DA, Seth NP, et al. HLA-DM captures partially empty HLA-DR molecules for catalyzed removal of peptide. *Nat Immunol* [Internet]. 2011;12(1):54–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1967>
 50. Doebele RC, Busch R, Scott HM, Pashine A, Mellins ED. Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules. *Immunity*. 2000;
 51. Nepom GT, Erlich H. MHC class-II molecules and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1991;9:493–525. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1910687>
 52. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* [Internet]. 2015;14(4):406–19. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70305-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70305-9)
 53. Nave K-A, Trapp BD. Axon-Glial Signaling and the Glial Support of Axon Function. *Annu Rev Neurosci*. 2008;
 54. Lassmann H. Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: What have we learnt from animal models. *Experimental Neurology*. 2010.
 55. Stadelmann C. Multiple sclerosis as a neurodegenerative disease: Pathology, mechanisms and therapeutic implications. *Curr Opin Neurol*. 2011;
 56. Ramagopalan S V., Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *The Lancet Neurology*. 2010.
 57. Compston A. Genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. 1997.
 58. Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GPA, Bulman D, Hashimoto L, Party DW, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins: Update. *Ann Neurol*. 1993;
 59. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Nature*. 1995;
 60. Robertson NP, Clayton D, Fraser M, Deans J, Compston DAS. Clinical concordance in sibling pairs with multiple sclerosis. *Neurology*. 1996;
 61. Sadovnick AD, Ebers GC, Dymant DA, Risch NJ. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. *Lancet*. 1996;

62. Ebers GC, Yee IML, Sadovnick AD, Duquette P. Conjugal multiple sclerosis: Population-based prevalence and recurrence risks in offspring. *Ann Neurol.* 2000;
63. Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP, Baranzini SE, Thomson G, Briggs F, et al. Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2006;15(18):2813–24.
64. Yeo TW, De Jager PL, Gregory SG, Barcellos LF, Walton A, Goris A, et al. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2007;
65. Ramagopalan S V., Anderson C, Sadovnick AD, Ebers GC. Genomewide study of multiple sclerosis [3]. *New England Journal of Medicine.* 2007.
66. Sawcer S, Booth D, Heard R, Stewart G, Goris A, Dobosi R, et al. Refining genetic associations in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology.* 2008.
67. Rubio JP, Stankovich J, Field J, Tubridy N, Marriott M, Chapman C, et al. Replication of KIAA0350, IL2RA, RPL5 and CD58 as multiple sclerosis susceptibility genes in Australians. *Genes Immun.* 2008;
68. De Jager PL, Jia X, Wang J, De Bakker PIW, Ottoboni L, Aggarwal NT, et al. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet.* 2009;
69. Kurtzke JF. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clinical Microbiology Reviews.* 1993.
70. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmunity Reviews.* 2010.
71. Oikonen M, Laaksonen M, Aalto V, Ilonen J, Salonen R, Erälinna JP, et al. Temporal relationship between environmental influenza A and Epstein-Barr viral infections and high multiple sclerosis relapse occurrence. *Mult Scler J.* 2011;
72. Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: A meta-analysis. *Annals of Neurology.* 2006.
73. Gabibov AG, Belogurov AA, Lomakin YA, Zakharova MY, Avakyan ME, Dubrovskaya V V., et al. Combinatorial antibody library from multiple sclerosis patients reveals antibodies that cross-react with myelin basic protein and EBV antigen. *FASEB J.* 2011;
74. Van Der Mei IAF, Dwyer t., Blizzard l., Ponson AL, Simmons R, Taylor B V., et al. Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: Case-control study. *BMJ.* 2003;
75. Islam T, Gauderman WJ, Cozen W, Mack TM. Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins. *Neurology.* 2007;

76. Kampman MT, Wilsgaard T, Mellgren SI. Outdoor activities and diet in childhood and adolescence relate to MS risk above the Arctic Circle. *J Neurol*. 2007;
77. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *J Am Med Assoc*. 2006;
78. Lucas RM, Ponsonby AL, Dear K, Valery PC, Pender MP, Taylor B V., et al. Sun exposure and vitamin D are independent risk factors for CNS demyelination. *Neurology*. 2011;
79. Soilu-Hänninen M, Airas L, Mononen I, Heikkilä A, Viljanen M, Hänninen A. 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2005;
80. Smolders J, Menheere P, Kessels A, Damoiseaux J, Hupperts R. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008;
81. Simpson S, Taylor B, Blizzard L, Ponsonby AL, Pittas F, Tremlett H, et al. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010;
82. Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Hupperts R. Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *Journal of Neuroimmunology*. 2008.
83. Hawkes CH. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: A metanalysis. *Mult Scler*. 2007;
84. Wallin MT, Page WF, Kurtzke JF. Multiple Sclerosis in US Veterans of the Vietnam Era and Later Military Service: Race, Sex, and Geography. *Ann Neurol*. 2004;
85. Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan S V., Sadovnick AD, et al. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol*. 2006;
86. Alonso A, Hernán MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: A systematic review. *Neurology*. 2008;
87. Hirst C, Ingram G, Pickersgill T, Swingler R, Compston DAS, Robertson NP. Increasing prevalence and incidence of multiple sclerosis in south east wales. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;
88. Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nature Immunology*. 2001.
89. Voskuhl R. Sex differences in autoimmune diseases. *Biology of Sex Differences*. 2011.
90. Tomassini V, Pozzilli C. Sex hormones, brain damage and clinical course of Multiple Sclerosis. *J Neurol Sci*. 2009;
91. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*. 2015.
92. Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: Natural history, pathogenesis,

- diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurology*. 2005.
93. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology*. 1996.
 94. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. In: *Lancet*. 2002.
 95. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Medical progress: Multiple sclerosis - The plaque and its pathogenesis. *New England Journal of Medicine*. 2006.
 96. Trapp BD, Nave K-A. Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder? *Annu Rev Neurosci*. 2008;
 97. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology ELEVENTH EDITION*. Textbook of Medical Physiology. 2006.
 98. Bunge RP. Glial cells and the central myelin sheath. *Physiological reviews*. 1968.
 99. Smith KJ, McDonald WI. The pathophysiology of multiple sclerosis: The mechanisms underlying the production of symptoms and the natural history of the disease. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 1999;
 100. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*. 2000;
 101. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: Implications for diagnosis and therapy. *Trends in Molecular Medicine*. 2001.
 102. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: An overview. In: *Brain Pathology*. 2007.
 103. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1998;
 104. Bjartmar C, Kidd G, Mörk S, Rudick R, Trapp BD. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 2000;
 105. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009;
 106. Janeway CA, Medzhitov R. INNATE IMMUNE RECOGNITION . *Annu Rev Immunol*. 2002;
 107. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *New England Journal of Medicine*. 2000.
 108. Parham P. *The Immune System 3rd Edition*. In: *The Immune System*. 2009.
 109. Batoulis H, Addicks K, Kuerten S. Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis

- beyond the CD4/TH1 paradigm. *Annals of Anatomy*. 2010.
110. Zipp F. Apoptosis in multiple sclerosis. *Cell and Tissue Research*. 2000.
 111. Pender MP. Treating autoimmune demyelination by augmenting lymphocyte apoptosis in the central nervous system. *Journal of Neuroimmunology*. 2007.
 112. Kasper LH, Shoemaker J. Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system. *Neurology*. 2010;
 113. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2010.
 114. Holman DW, Klein RS, Ransohoff RM. The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2011.
 115. Engelhardt B, Martin-Simonet MTG, Rott LS, Butcher EC, Michie SA. Adhesion molecule phenotype of T lymphocytes in inflamed CNS. *J Neuroimmunol*. 1998;
 116. Engelhardt B. Immune cell entry into the central nervous system: Involvement of adhesion molecules and chemokines. *J Neurol Sci*. 2008;
 117. Prendergast C, Anderton S. Immune Cell Entry to Central Nervous System - Current Understanding and Prospective Therapeutic Targets. *Endocrine, Metab Immune Disord - Drug Targets*. 2012;
 118. Holmøy T, Hestvik ALK. Multiple sclerosis: Immunopathogenesis and controversies in defining the cause. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2008.
 119. Jack C, Ruffini F, Bar-Or A, Antel JP. Microglia and multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*. 2005.
 120. Van Horssen J, Witte ME, Schreibelt G, de Vries HE. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2011.
 121. Aktas O, Prozorovski T, Zipp F. Death ligands and autoimmune demyelination. *Neuroscientist*. 2006.
 122. Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*. 1986;
 123. Friese MA, Fugger L. Pathogenic CD8 + T cells in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2009.
 124. Zozulya AL, Wiendl H. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. Vol. 4, *Nature Clinical Practice Neurology*. 2008. p. 384–98.
 125. Hori S, Haury M, Coutinho A, Demengeot J. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell

- receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;
126. Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*. 2004;
 127. Baranzini SE, Jeong MC, Butunoi C, Murray RS, Bernard CC, Oksenberg JR. B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *J Immunol*. 1999;
 128. Franciotta D, Salvetti M, Lolli F, Serafini B, Aloisi F. B cells and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2008.
 129. Weber MS, Hemmer Bernhard B, Cepok S. The role of antibodies in multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2011.
 130. Barten LJ, Allington DR, Procacci KA, Rivey MP. New approaches in the management of multiple sclerosis. *Drug Design, Development and Therapy*. 2010.
 131. Paty DW, Li DKB. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis: Ii. Mri analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology*. 1993;
 132. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: Results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. *Neurology*. 1995;
 133. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1996;
 134. Ebers GC, Rice G, Lesaux J, Paty D, Oger J, Li DKB, et al. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon β -1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet*. 1998;
 135. Markowitz CE. Interferon-beta: Mechanism of action and dosing issues. *Neurology*. 2007;
 136. Farina C, Weber MS, Meinl E, Wekerle H, Hohlfeld R. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: Update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurology*. 2005.
 137. Johnson KP. Glatiramer acetate and the glatiramoid class of immunomodulator drugs in multiple sclerosis: An update. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 2010.
 138. Andreas Lutterotti, Thomas Berger, Markus Reindl. Biological Markers for Multiple Sclerosis. *Curr Med Chem [Internet]*. 2007 Aug 1;14(18):1956–65. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=14&issue=18&spage=1956>
 139. Musse AA, Harauz G. Molecular “Negativity” May Underlie Multiple Sclerosis: Role of

- the Myelin Basic Protein Family in the Pathogenesis of MS. *International Review of Neurobiology*. 2007.
140. Zamanzadeh Z, Ataei M, Nabavi SM, Ahangari G, Sadeghi M, Sanati MH. In silico perspectives on the prediction of the PLP's epitopes involved in multiple sclerosis. *Iran J Biotechnol*. 2017;
 141. Kerlero De Rosbo N, Hoffman M, Mendel I, Yust I, Kaye J, Bakimer R, et al. Predominance of the autoimmune response to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis: Reactivity to the extracellular domain of MOG is directed against three main regions. *Eur J Immunol*. 1997;
 142. Li Y, Li H, Martin R, Mariuzza RA. Structural basis for the binding of an immunodominant peptide from myelin basic protein in different registers by two HLA-DR2 proteins. *J Mol Biol*. 2000;304(2):177–88.
 143. Smith KJ, Pyrdol J, Gauthier L, Wiley DC, Wucherpfennig KW. Crystal Structure of HLA-DR2 (DRA*0101, DRB1*1501) Complexed with a Peptide from Human Myelin Basic Protein. *J Exp Med* [Internet]. 1998;188(8):1511–20. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.188.8.1511>
 144. Li Y, Huang Y, Lue J, Quandt JA, Martin R, Mariuzza RA. Structure of a human autoimmune TCR bound to a myelin basic protein self-peptide and a multiple sclerosis-associated MHC class II molecule. *EMBO J*. 2005;24(17):2968–79.
 145. Wucherpfennig KW, Hafler D a, Strominger JL. Structure of human T-cell receptors specific for an immunodominant myelin basic protein peptide: positioning of T-cell receptors on HLA-DR2/peptide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1995;92(19):8896–900. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=41074&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 146. Hahn M, Nicholson MJ, Pyrdol J, Wucherpfennig KW. Unconventional topology of self peptide-major histocompatibility complex binding by a human autoimmune T cell receptor. *Nat Immunol*. 2005;6(5):490–6.
 147. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*. 1987;
 148. Daniels MA, Teixeira E, Gill J, Hausmann B, Roubaty D, Holmberg K, et al. Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature*. 2006;
 149. Zehn D, Bevan MJ. T Cells with Low Avidity for a Tissue-Restricted Antigen Routinely Evade Central and Peripheral Tolerance and Cause Autoimmunity. *Immunity*. 2006;

150. Ohashi PS. Negative selection and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*. 2003.
151. Hemmer B, Fleckenstein BT, Vergelli M, Jung G, McFarland H, Martin R, et al. Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J Exp Med*. 1997;
152. Anderton SM, Radu CG, Lowrey PA, Ward ES, Wraith DC. Negative selection during the peripheral immune response to antigen. *J Exp Med*. 2001;
153. Stadinski BD, Zhang L, Crawford F, Marrack P, Eisenbarth GS, Kappler JW. Diabetogenic T cells recognize insulin bound to IA2 in an unexpected, weakly binding register. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;
154. Hennecke J, Carfi A, Wiley DC. Structure of a covalently stabilized complex of a human alphabeta T-cell receptor, influenza HA peptide and MHC class II molecule, HLA-DR1. *EMBO J*. 2000;19(21):5611–24.
155. Yin Y, Li Y, Kerzic MC, Martin R, Mariuzza RA. Structure of a TCR with high affinity for self-antigen reveals basis for escape from negative selection. *EMBO J* [Internet]. 2011;30(6):1137–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.21>
156. Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*. 2015.
157. Oksenberg JR, Barcellos LF, Cree BAC, Baranzini SE, Bugawan TL, Khan O, et al. Mapping Multiple Sclerosis Susceptibility to the HLA-DR Locus in African Americans. *Am J Hum Genet*. 2004;
158. Yoshimura S, Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Masaki K, Sato S, et al. Genetic and Infectious Profiles of Japanese Multiple Sclerosis Patients. *PLoS One*. 2012;
159. Cocco E, Murru R, Costa G, Kumar A, Pieroni E, Melis C, et al. Interaction between HLA-DRB1-DQB1 Haplotypes in Sardinian Multiple Sclerosis Population. *PLoS One*. 2013;8(4):1–12.
160. Karni A, Kohn Y, Safirman C, Abramsky O, Barcellos L, Oksenberg JR, et al. Evidence for the genetic role of human leukocyte antigens in low frequency DRB1*1501 multiple sclerosis patients in Israel. *Mult Scler*. 1999;
161. Isobe N, Gourraud P-A, Harbo HF, Caillier SJ, Santaniello A, Khankhanian P, et al. Genetic risk variants in African Americans with multiple sclerosis. *Neurology* [Internet]. 2013;81(3):219–27. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3770164&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
162. Ramagopalan S V., Morris AP, Dymant DA, Herrera BM, DeLuca GC, Lincoln MR, et al. The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS Genet*. 2007;3(9):1607–

- 13.
163. Sudomoina MA, Boiko AN, Demina TL, Gusev EI, Boldyreva MN, Trofimov DY, et al. Association of multiple sclerosis in the Russian population with HLA-DRB1 gene alleles. *Mol Biol*. 1998;32(2).
164. Lee SY, Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *Biotechniques*. 1990;
165. Belogurov AA, Kurkova IN, Friboulet A, Thomas D, Misikov VK, Zakharova MY, et al. Recognition and degradation of myelin basic protein peptides by serum autoantibodies: novel biomarker for multiple sclerosis. *J Immunol* [Internet]. 2008;180(2):1258–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18178866>
166. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;
167. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292–302.
168. Sreevalsan T. Isolation of dendritic cells from human blood for in vitro interaction studies with fungal antigens. *Methods Mol Biol*. 2009;
169. Markov O V., Mironova NL, Shmendel E V., Serikov RN, Morozova NG, Maslov MA, et al. Multicomponent mannose-containing liposomes efficiently deliver RNA in murine immature dendritic cells and provide productive anti-tumour response in murine melanoma model. *J Control Release*. 2015;
170. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc*. 2007;
171. Ma B, Zhang K, Hendrie C, Liang C, Li M, Doherty-Kirby A, et al. PEAKS: Powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003;
172. Canto E, Oksenberg JR. Multiple sclerosis genetics. *Mult Scler*. 2018;
173. Abolfazli R, Samadzadeh S, Sabokbar T, Siroos B, Armaki SA, Aslanbeiki B, et al. Relationship between HLA-DRB1* 11/15 genotype and susceptibility to multiple sclerosis in IRAN. *J Neurol Sci*. 2014;345(1):92–6.
174. Link J, Kockum I, Lorentzen AR, Lie B a, Celius EG, Westerlind H, et al. Importance of human leukocyte antigen (HLA) class I and II alleles on the risk of multiple sclerosis. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(5):e36779. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3346735&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

175. Balnyte R, Rastenyte D, Mickevičiene D, Vaitkus A, Skrodeniene E, Vitkauskiene A. Frequency of HLA-DRB1 gene alleles in patients with multiple sclerosis in a Lithuanian population. *Med.* 2012;48(1):9–14.
176. Isobe N, Matsushita T, Yamasaki R, Ramagopalan S V., Kawano Y, Nishimura Y, et al. Influence of HLA-DRB1 alleles on the susceptibility and resistance to multiple sclerosis in Japanese patients with respect to anti-aquaporin 4 antibody status. *Mult Scler.* 2010;16(2):147–55.
177. Fernández O, R-Antigüedad A, Pinto-Medel MJ, Mendibe MM, Acosta N, Oliver B, et al. HLA class II alleles in patients with multiple sclerosis in the Biscay province (Basque Country, Spain). *J Neurol.* 2009;256(12):1977–88.
178. Fernandez-Morera JL, Rodriguez-Rodero S, Tunon A, Martinez-Borra J, Vidal-Castineira JR, Lopez-Vazquez A, et al. Genetic influence of the nonclassical major histocompatibility complex class I molecule MICB in multiple sclerosis susceptibility. *Tissue Antigens.* 2008;72(1):54–9.
179. Zhang Q, Lin CY, Dong Q, Wang J, Wang W. Relationship between HLA-DRB1 polymorphism and susceptibility or resistance to multiple sclerosis in Caucasians: A meta-analysis of non-family-based studies. *Autoimmunity Reviews.* 2011.
180. Toro J, Cuellar-Giraldo D, Díaz-Cruz C, Burbano LE, Guío CM, Reyes S, et al. HLA-DRB1*14 is a protective allele for multiple sclerosis in an admixed colombian population. *Neurol Neuroimmunol NeuroInflammation.* 2016;3(1).
181. Michalik J, Čierny D, Kantorová E, Kantárová D, Juraj J, Párnická Z, et al. The association of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles with genetic susceptibility to multiple sclerosis in the Slovak population. *Neurol Res.* 2015;37(12):1060–7.
182. Kaimen-Maciel DR, Vissoci Reiche EM, Borelli SD, Morimoto HK, Melo FC, Lopes J, et al. HLA-DRB1* allele-associated genetic susceptibility and protection against multiple sclerosis in Brazilian patients. *Mol Med Rep.* 2009;2(6):993–8.
183. Laaksonen M, Pastinen T, Sjöroos M, Kuokkanen S, Ruutiainen J, Sumelahti ML, et al. HLA class II associated risk and protection against multiple sclerosis-a Finnish family study. *J Neuroimmunol [Internet].* 2002;122(1–2):140–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11777553>
184. Marrosu MG, Murru MR, Costa G, Cucca F, Sotgiu S, Rosati G, et al. Multiple sclerosis in Sardinia is associated and in linkage disequilibrium with HLA-DR3 and -DR4 alleles. *Am J Hum Genet [Internet].* 1997;61(2):454–7. Available from: <http://www.cell.com/article/S0002929707640749/fulltext>
185. Mamedov AE, Ponomarenko NA, Belogurov AA, Gabibov AG. Erratum to: Heterodimer

- HLA-DM Fused with Constant Fragment of the Heavy Chain of the Human Immunoglobulin Accelerates Influenza Hemagglutinin Peptide HA306-318 Loading to HLA-DR1 (Bulletin of Experimental Biology and Medicine, (2016), 161, 1, (92-95), 10. Vol. 161, Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2016. p. 442–6.
186. Vogt AB, Spindeldreher S, Kropshofer H. Clustering of MHC-peptide complexes prior to their engagement in the immunological synapse: Lipid raft and tetraspan microdomains. *Immunol Rev.* 2002;189(1):136–51.
187. Anikeeva N, Gakamsky D, Schøller J, Sykulev Y. Evidence that the density of self peptide-MHC ligands regulates T-cell receptor signaling. *PLoS One.* 2012;
188. Yin L, Maben ZJ, Becerra A, Stern LJ. Evaluating the Role of HLA-DM in MHC Class II–Peptide Association Reactions. *J Immunol* [Internet]. 2015;195(2):706–16. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1403190>
189. Yin L, Trenh P, Guce A, Wieczorek M, Lange S, Sticht J, et al. Susceptibility to HLA-DM protein is determined by a dynamic conformation of major histocompatibility complex class II molecule bound with peptide. *J Biol Chem.* 2014;289(34):23449–64.
190. Muixi L, Carrascal M, Alvarez I, Daura X, Marti M, Armengol MP, et al. Thyroglobulin Peptides Associate In Vivo to HLA-DR in Autoimmune Thyroid Glands. *J Immunol* [Internet]. 2008;181(1):795–807. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.181.1.795>
191. Rabinowitz JD, Vrljic M, Kasson PM, Liang MN, Busch R, Boniface JJ, et al. Formation of a highly peptide-receptive state of class II MHC. *Immunity.* 1998;9(5):699–709.

7. ПРИЛОЖЕНИЕ

Карты генетических конструкций (Раздел 3.4):

