

УДК 571.27

Полиреактивные аутоантитела при рассеянном склерозе: функциональный отбор из фаг-дисплейной библиотеки в сочетании с методом широкомасштабного секвенирования

Я. А. Ломакин^{1#*}, М. Ю. Захарова^{1#}, А. А. Белогуров^{1,2}, Н. А. Быкова^{3,4}, М. А. Дронина¹, А. Е. Тупикин^{5,6}, В. Д. Кнорре¹, А. Н. Бойко^{7,8}, А. В. Фаворов^{9,10,11}, М. Р. Кабилов^{5,6}, Н. А. Пономаренко¹, А. Г. Габибов^{1,2,12}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

²Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

³Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, 127994, Москва, Большой Каретный пер., 19, стр. 1

⁴Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

⁵Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

⁶Центр коллективного пользования «Геномика» СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

⁷Московский городской центр рассеянного склероза при городском госпитале № 11, 127018, Москва, ул. Двинцев, 6

⁸Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

⁹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

¹⁰Факультет онкологии, отдел биостатистики и биоинформатики, Школа медицины при Университете Джона Хопкинса, 21218, Балтимор, Мэриленд, США

¹¹Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1

¹²Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

Авторы внесли равный вклад в данную работу.

*E-mail: yasha.l@bk.ru

Поступила в редакцию 01.09.2013

РЕФЕРАТ Рассеянный склероз (РС) – хроническое воспалительное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы, поражающее в основном людей молодого и среднего возраста. На сегодняшний день можно с уверенностью сказать, что без активации В-клеточного ответа развитие данной патологии невозможно. Хотя точный механизм, лежащий в основе этиологии РС, неизвестен, многие ученые полагают, что при определенном сочетании генетических и экологических факторов индуктором заболевания может служить вирусная или бактериальная инфекция. В данной работе мы поставили своей задачей с помощью сочетания методов широкомасштабного секвенирования и функционального отбора охарактеризовать поли- и кроссреактивные антитела, способные одновременно узнавать вирусные белки и аутоантигены, инициируя таким образом развитие болезни путем механизма молекулярной мимикрии. Мы обнаружили, что кроссреактивное узнавание двух антигенов, вероятно, обусловлено сочетанием индивидуального узна-

вания легкой и тяжелой цепью своего конкретного антигена. Выявленная высокая структурная гомология исследованных аутоантител с различными противовирусными антителами позволила нам предположить, что в индукции РС главенствующая роль может принадлежать целому ряду патогенов, а не какому-то определенному вирусу.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аутореактивные В-клетки, вирусные триггеры, кроссреактивность, основной белок миеллина, рассеянный склероз, широкомасштабное секвенирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ИФА – иммуноферментный анализ; МОГ – миелин-олигодендрогликовит; ОБМ – основной белок миеллина; ЛМР-1 (latent membrane protein 1) – латентный мембранный белок 1 вируса Эпштейна–Барр; РС – рассеянный склероз; ЦНС – центральная нервная система; ЦСЖ – цереброспинальная жидкость.

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – хроническое воспалительное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы, поражающее с частотой 3 : 10000 в основном людей молодого и среднего возраста. В мире насчитывается более 2.5 млн больных РС [1]. Таким образом, РС является наиболее распространенной демиелинизирующей невроинфламаторной патологией, при которой по пока непонятным причинам иммунная система организма начинает разрушать собственные миелиновые оболочки аксонов [2]. Социальный и экономический факторы имеют огромное значение при этом заболевании вследствие тяжелых симптомов, включающих неврит зрительного нерва, потерю контроля функций кишечника и мочевого пузыря, тяжелые параличи, а также большую длительность хронического периода. В 80% случаев развитие заболевания начинается с рецидивно-ремиттирующего течения, которое со временем переходит во вторично-прогрессирующее. Значительно реже, в 20% случаев, РС сразу же принимает первично-прогрессирующую форму [3].

Несмотря на огромное количество работ, посвященных изучению этиологии РС, точная причина развития или потенциальный патоген, способный индуцировать заболевание, остаются неизвестными. Считается, что для развития РС необходимо наличие предрасположенности, т.е. лишь при определенном сочетании генетических и экзогенных факторов возможна хроническая активация иммунных клеток, приводящая к нейрональным повреждениям. Генетический скрининг выявил несколько генов-кандидатов, среди которых наиболее значимым считается локус *HLA* (human leukocyte antigen) как регион, в наибольшей степени ассоциированный с РС. К сожалению, и здесь не удалось выявить однозначных корреляций, так, например, в Северной Европе исторически выявлена связь развития заболевания с *HLA-DR2* или *HLA-DRB1*15* [4, 5], а в другой части Европы (например, Сардиния) наибольшую ассоциацию проявили *HLA-DRB1*0301*, *HLA-DRB1*0405* и *HLA-DRB1*1303* [6]. Согласно другим данным,

обнаружены и новые гаплотипы (*HLA-DRB1*03*, *HLA-DRB1*01*, *HLA-DRB1*10*, *HLA-DRB1*11*, *HLA-DRB1*14* и *HLA-DRB1*08*), коррелирующие с патологией как отрицательно, так и положительно, но при этом сила эффекта варьировала от случая к случаю [7–10]. Тем не менее однозначно установлено увеличение риска развития РС у родственников больного [11–14], при этом у ближайших родственников риск повышен примерно в 10–25 раз по сравнению с обычной популяционной выборкой. Также выявлена и связь гена *CD40* (rs6074022) с РС [15]. Доказательством генетической предрасположенности может служить и значительная генетическая детерминированность индивидуального ответа больных на лечение многими препаратами. Например, фармакогеномные исследования РС обнаружили значимую роль ряда полиморфных вариантов генов (*CCR5*, *DRB1*, *IFNG*, *TGFB1*, *IFNAR1*, *IL7RA*, а также, возможно, *TNF* и *CTLA4*) в формировании ответа на прием копаксона [16]. Эпидемиологические исследования, в свою очередь, выявили несколько факторов риска РС, включая бактериальные и вирусные инфекции, климатические условия и курение.

Хотя исходная причина, вызывающая РС, остается неизвестной, при этом заболевании всегда происходят сходные процессы, такие, как активация и увеличение количества иммунных клеток в ЦНС, что в дальнейшем приводит к демиелинизации, аксональному/нейрональному повреждению и гибели олигодендроцитов – знаковым симптомам РС [17]. Если на начальных этапах изучения РС основную роль в развитии заболевания отводили Т-лимфоцитам, то сейчас можно уверенно сказать, что для развития патологии необходима активация В-клеток. В-лимфоциты не только продуцируют патогенные аутоантитела, но и являются активными антигенпрезентирующими (АПК) и цитокинпродуцирующими клетками [18]. Список потенциальных аутоантигенов при РС постоянно расширяется и включает в себя различные белки, ассоциированные с мембраной олигодендроцитов. Среди них особо выделяют основной белок миели-

на (ОБМ), протеолипидный белок (PLP1) и миелинолигодендроцитарный гликопротеин (МОГ). Причем в сыворотке больных РС, а также мышей линии SJL с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом – моделью РС, обнаружены даже каталитические антитела к ОБМ, которые не только связывают, но и гидролизуют его [19–21].

Таким образом, выявление чужеродного, к примеру вирусного, антигена, способного индуцировать выработку аутоантител к компонентам миелиновой оболочки, и анализ структуры этих антител могут быть весьма перспективными для понимания механизмов развития заболевания, разработки новых подходов к терапии и диагностике РС.

На сегодняшний день не существует медицинского протокола, позволяющего полностью вылечить больного РС. Наиболее часто при РС применяют бетаферон, понижающий уровень воспаления в ЦНС [22], и копаксон, также уменьшающий частоту обострений [23]. Создаются вакцины, направленные на элиминацию аутореактивных В-клеток, среди которых наиболее известен уже зарегистрированный препарат – ритуксимаб – моноклональное антитело, неселективно уничтожающее все В-клетки. Существуют также экспериментальные проекты, направленные на специфическую элиминацию [24] или супрессию [25] именно аутореактивных патогенных В-клеток.

В нашей лаборатории ранее была сконструирована фаг-дисплейная библиотека одноцепочечных антител на основе генетического материала больных РС [26]. Был отобран и охарактеризован ряд моноклональных антител, связывающих ОБМ. Для одного из этих антител показана *in vitro* кроссреактивность между ОБМ и белком LMP-1 (latent membrane protein 1) вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ). В последнее время появился целый ряд работ о возможной вирусной индукции заболевания путем молекулярной мимикрии [27–29], поэтому полученные результаты стали дополнительным доказательством триггерной роли ВЭБ. В представленной работе мы решили прояснить, насколько уникальным является образование кроссреактивных аутоантител к ОБМ и LMP-1. Для этого мы целенаправленно получили кроссреактивные клоны путем последовательного обогащения библиотеки на два этих антигена. Проанализировав их структуры и принадлежность к зародышевым семействам, выявили высокое разнообразие подобных кроссреактивных клонов, которые потенциально способны индуцировать РС. Интересно отметить, что большая часть полученных антител обладает высокой гомологией с антителами к белкам других патогенов, что можно рассматривать как расширение списка потенциальных триггеров РС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы

Использовали агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco, Великобритания); одно- и двузамещенный фосфат натрия, хлорид натрия, бычий сывороточный альбумин, фракция V (BCA), бромистый этидий, β-меркаптоэтанол (Sigma, США); акриламид, N',N'-метиленабисакриламид, додецилсульфат натрия (ДСН), мочевины, нитроцеллюлозную мембрану Hybond C extra (Amersham, США); поверхностно активное вещество NP40; глицин, изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG) (Fermentas, Литва); раствор ТМВ (тетраметилбензидин) (ЗАО «НВО Иммунотех», Россия), остальные реактивы отечественного производства марки «ос. ч.».

Ферменты

Термостабильная ДНК-зависимая ДНК-полимераза, щелочная фосфатаза, Rapid DNA Ligation kit (Fermentas, Литва), эндонуклеазы рестрикции и соответствующие стандартные буферные растворы (Fermentas, Литва); дезоксирибонуклеаза I (Biozyme Laboratories Ltd., США); трипсин, лизоцим (Merck, Германия); маркеры размера фрагментов ДНК и молекулярной массы: GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Protein Molecular Weight Marker 14.4–116.0 кДа, Prestained Protein Molecular Weight Marker 19.0–118.0 кДа (Fermentas, Литва); низкомолекулярный маркер 2.5–16.9 кДа (Amersham, США).

Антитела

Антитела к с-тус-эпитопу, продуцируемые гибридомой С-МУС; антитела к 3-flag-эпитопу, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США); антитела к белку М13 фаговой оболочки, конъюгированные и неконъюгированные с пероксидазой хрена (GE Healthcare, США).

Экспрессия белка и его очистка

Препараты очищенного бычьего ОБМ и рекомбинантного человеческого МОГ (30–147 аминокислотных остатков) были приготовлены согласно ранее опубликованной методике [21]. Рекомбинантный LMP-1 экспрессировали в эукариотических клетках линии НЕК293. Клетки НЕК293 были трансфицированы плазмидой pBudCE1.4/EF/LMP1-FLAG-His-Strep с использованием унифектина-56. Клетки лизировали в буфере RIPA с добавлением 1 М мочевины и коктейля ингибиторов (Roche, Германия) в течение ночи при постоянном перемешивании при 4°C. LMP-1 очистили из лизата с использованием агарозы anti-FLAG согласно методике. N- и C-концевые домены

LMP-1 очищали методом аффинной хроматографии на смоле Talon (Clontech, США), а затем с помощью MonoQ-цефарозы (Amersham).

Обогащение библиотеки

Фаг-дисплейная библиотека одноцепочечных антител, полученная из лимфоцитов периферической крови больных РС, описана ранее [26]. Обогащение проводили согласно методике (Tomlison protocol; Source BioScience, <http://www.lifesciences.sourcebioscience.com>) с небольшими модификациями. На иммунотюбы (Immuno Tubes maxisorp, Nunc, Германия) сорбировали 10 мкг/мл антигена (ОБМ, МОГ, LMP-1) в карбонатном буфере (рН 9.2). Проводили два раунда обогащения на каждый антиген. Два дополнительных раунда с использованием ОБМ в качестве антигена были проведены в случае двойного обогащения на LMP-1/ОБМ.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Антиген, разведенный в 0.1 М карбонатном буфере до концентрации 5 мкг/мл, сорбировали на полистироловых планшетах (MaxiSorp, Дания) в течение ночи при 4°C. На следующий день после удаления антигена лунки промывали 3 раза буфером ФСБ с 0.1% Tween 20. Участки неспецифического связывания блокировали 3% раствором БСА в ФСБ, рН 7.2 (37°C, 1 ч). После этого лунки снова промывали трижды буфером ФСБ с 0.1% Tween 20, а затем инкубировали в течение 1 ч при 37°C с реагентами второго слоя в буфере ФСБ с 0.1% Tween 20. После каждой инкубации проводили отмывку трижды буфером ФСБ с 0.1% Tween 20. Антитела последнего слоя были конъюгированы с пероксидазой хрена. Проявление проводили фирменным реагентом ТМВ (ЗАО «НВО Иммунотех»), реакцию останавливали 10% H_3PO_4 . Оптическую плотность (OD_{450}) измеряли с помощью прибора Varioscan Flash microplate reader (Thermo Scientific, США).

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

Начальная фаг-дисплейная библиотека РС и четыре подбиблиотеки, обогащенные на разные антигены (ОБМ, МОГ, LMP-1, двойное обогащение LMP-1/ОБМ), были амплифицированы в клетках TG-1 *Escherichia coli*. ПЦР проводили с использованием Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Fermentas). Реакционная смесь содержала 5 нг плазмиды ДНК в качестве матрицы и 10 пмоль фланкирующих праймеров. ПЦР-продукты были очищены с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США) и лигированы с адап-

торами NEBNext Multiplex Oligos (New England Biolabs, Великобритания) с использованием NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs). После приготовления образцов библиотеки были проанализированы с помощью Qubit (Invitrogen) – количественно и 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) – качественно. На основе обчислений библиотеки нормировали до концентрации 10 нМ и смешивали в эквимольном соотношении. Амплификацию образцов проводили в соответствии с протоколом (Illumina) с использованием MiSeq с Reagent Kit v2 (2 × 250). Объединение и приведение в соответствие друг с другом связанных прочтений было сделано на базе GW CLC Bio. Характеристики антител определяли непосредственно после широкомасштабного секвенирования с использованием онлайн-ресурса IMG/High V-QUEST [30].

Параметры фильтров для анализа встречаемости гипервариабельных участков

Результаты выравнивания последовательностей, полученных методом широкомасштабного секвенирования, после анализа с помощью программы IMG/V-QUEST [31] были отфильтрованы по следующим критериям: поле «Functionality» выравнивания должно быть «productive» (последовательность антитела должна быть оценена программой как продуктивная); идентичность аллелей V-гена и зародышевого сегмента из базы IMG/V-QUEST должна быть не меньше 70%; в расчет не брали последовательности легких цепей, идентифицированных программой IMG/V-QUEST как тяжелые цепи.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе данной работы мы проанализировали представленность и структуру антител, отобранных на основные аутоантигены РС – ОБМ и МОГ, а также на вирусный белок LMP-1, для которого ранее нами была показана потенциально возможная триггерная роль при РС [26]. С этой целью мы провели по два раунда обогащения на МОГ и LMP-1 (на ОБМ обогащение проведено ранее [26]), для поиска кросс-реактивных антител – последовательно два раунда биопэннинга на LMP-1, а затем два раунда на ОБМ. Все обогащения проводили под контролем поликлонального ИФА. После селекции проанализировали полученные одноцепочечные антитела в составе фаговых частиц методом моноклонального ИФА. Клон считали положительным, если его сигнал на связывание с одним или двумя антигенами в ИФА превышал минимум в 3 раза сигнал бактериофага M13K07, используемого в качестве отрицательного контроля (в титре 10^{13} фаговых частиц/лунку). Результаты ИФА для наиболее перспективных клонов, способ-

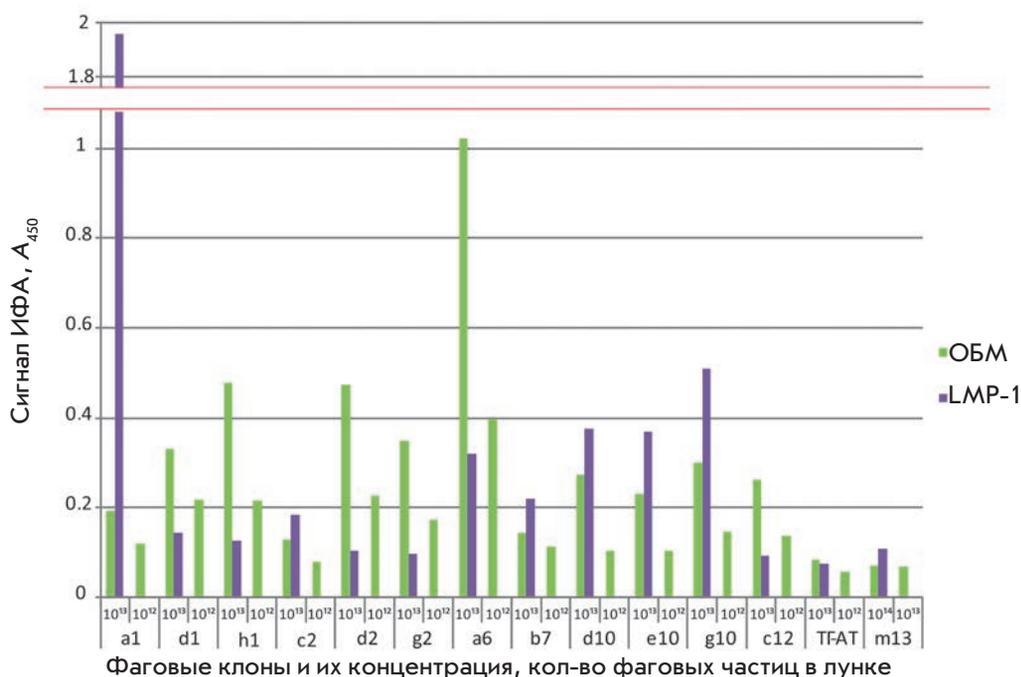


Рис. 1. Моноклональный фаговый ИФА связывания полученных антител с ОБМ (зеленые столбцы) и LMP-1 (фиолетовые столбцы). В качестве отрицательного контроля использовали бактериофаг М13К07 (m13) и бактериофаг, экспонирующий на своей поверхности одноцепочечное антитело, специфичное к тиреоглобулину (ТГ-АТ)

ных связывать и ОБМ, и LMP-1, приведены на рис. 1. Способность данных фаговых клонов связывать оба антигена подтверждена путем проведения не менее трех независимых ИФА.

В результате было отобрано несколько фаговых клонов, несущих одноцепочечные антитела, которые наиболее эффективно связывали LMP-1 или LMP-1/ОБМ. В таблице приведены данные по относительной силе связывания фаговых клонов с исследуемыми антигенами, а также аминокислотные последовательности их гипервариабельных участков и принадлежность к зародышевым семействам. Сравнивая структуры полученных одноцепочечных антител, можно отметить несколько интересных закономерностей: (1) множественный отбор отдельных легких цепей как на LMP-1, так и на два антигена; (2) встречаемость одинаковых легких цепей как в свободном виде, так и в составе одноцепочечных антител – клоны c12 и b3 LL, g3 LL, d4 LL. Селекция определенных легких цепей как в свободном виде при отборе на LMP-1 (b3 LL, g3 LL, d4 LL), так и в составе одноцепочечных антител при получении кроссреактивных клонов (c12) может свидетельствовать об их важной роли в связывании LMP-1, который мы использовали в качестве первого антигена при двойном отборе. В то же время для дальнейшего связывания ОБМ, вероятно, необходима уже их комбинация с тяжелой цепью, т.е. в данном случае связывание с двумя антигенами и потенциальная кроссреактивность определяются узнаванием свое-

го антигена тяжелой и легкой цепью по отдельности. Интересно и то, что относительная сила связывания анти-LMP-1-антител со своим антигеном значительно превышает относительную силу связывания с обоими антигенами потенциально кроссреактивных анти-LMP-1/-анти-ОБМ-антител (таблица). Эти наблюдения могут отражать природную ситуацию, происходящую при развитии РС, когда первично образованные антитела на какой-либо патоген (в частности, ВЭБ) в дальнейшем могут при попадании в ЦНС (при наличии поврежденного гематоэнцефалического барьера (ГЭБ)) взаимодействовать с ОБМ, вызывая деградацию миелиновой оболочки. По-видимому, способность таких антител к потенциальной полиреактивности, пусть и при слабом связывании, предпочтительней высокой специфичности с сильной аффинностью.

Поиск гомологов отобранных моноклональных антител проводили по аминокислотным последовательностям с помощью баз данных Protein Data Bank proteins (pdb), UniProtKB/Swiss-Prot (swissprot) и программы protein BLAST. На рис. 2 и 3 представлены данные по относительной гомологии между структурами полученных нами антител и иммуноглобулинами, специфичными к белкам различных вирусов и бактерий. Выявлен высокий уровень сходства полученных антител с целым рядом патоген-специфических антител (против вируса гриппа, вируса лихорадки Западного Нила, вируса бешенства, ротавируса, пневмококка, стрептококка и др.)

Одноцепочечные антитела, отобранные после двух раундов фагового дисплея на соответствующие антигены

Клон	Отбор на LMP-1 / ОБМ										Связывание с LMP-1	Связывание с ОБМ
	V _h	D _h	J _h	H-CDR3	V _L	J _L	L-CDR3					
b7	IGHV1-2*04	IGHD1-26*01	IGHJ4*02	VRGTYSPSGYFEY	IGKV5-2*01	IGKJ2*01	LQHDNFP				+	++
g10	IGHV1-3*01	IGHD6-13*01	IGHJ4*02	ARIFEGLSGIAAPFDY	IGKV4-1*01	IGKJ4*01	QQYFSSPLT				+	±
h1	IGHV1-8*01	IGHD4-17*01	IGHJ6*03	AREVSDYSDYGDVYYMDV	IGKV3-20*01	IGKJ5*01	QQYCCSPIT				±	±
e11	IGHV1-8*01	IGHD4-17*01	IGHJ6*03	AREVSDYSDYGDVYYMDV	IGLV1-44*01	IGLJ3*02	AAWDDGSLNGP				±	±
h11	IGHV1-18*04	IGHD3-3*02	IGHJ2*01	ARREGLYTTSPGYFGV	IGLV3-21*03	IGLJ7*02	RVWDDKQTVSRSG				±	+
e12	IGHV1-46*01	IGHD4-11*01	IGHJ6*02	ARRGFDY	IGKV1-33*01	IGKJ1*01	LQFYEFPYT				±	±
c11	IGHV1-46*03	IGHD5-12*01	IGHJ6*03	AKDLRPRDIGDMDV	IGKV1-39*01	IGKJ5*01	QQSYSSP				±	+
c12	IGHV1-69*06	IGHD1-26*01	IGHJ6*02	ARCGILRSHYFYGMVDV	IGLV1-47*01	IGLJ7*01	AAWDDSLSG				±	+
a6	IGHV3-7*01	IGHD4-11*01	IGHJ6*02	VRGGLGAGADY	IGLV4-69*01	IGLJ7*01	QTWGTGI				+	++
c3	IGHV4-b*01	IGHD2-21*01	IGHJ5*01	AGLTQSSHNDAN	IGKV2-30*01	IGKJ1*01	MQATHWP				±	+
f11 (=e1 LL)	-	-	-	-	IGLV1-47*01	IGLJ3*02	VAWDDNLSG				±	±
c2	-	-	-	-	IGLV3-1*01	IGLJ7*01	AAWDDSLNGPV				±	±
d1	-	-	-	-	IGLV6-57*01	IGLJ7*01	QSYNTSTLI				±	±
a1	-	-	-	-	IGLV10-54*01	IGLJ3*02	SVWDDSSLSA				±	±
Отбор на LMP-1												
h4 LL	IGHV3-23*01	IGHD6-13*01	IGHJ2*01	AKDIAAAAATPEY	IGKV3-11*01	IGKJ5*01	QQRSNWPPPT				+++	н.о.
c12 LL	IGHV5-51*01	IGHD4-17*01	IGHJ4*03	ARFYDSTGSCDY	IGKV1D-33*01	IGKJ2*02	SIHQXKFPLXC				+++	н.о.
d4 LL, g3 LL, b3 LL	-	-	-	-	IGLV1-47*01	IGLJ7*01	AAWDDSLSG				+++	н.о.
e1 LL (=f11)	-	-	-	-	IGLV1-47*01	IGLJ3*02	VAWDDNLSG				+++	н.о.
d2 LL (=a1)	-	-	-	-	IGLV10-54*01	IGLJ3*02	SVWDDSSLSA				+++	н.о.

Примечание. LL в названии клона обозначает, что клон отобран на LMP-1. Относительное связывание с антигенами рассчитывали как отношение сигнала ИФА связывания с антигеном определенного фагового клона к сигналу отрицательного контроля M13K07, ± – превышение над фоном в 1.5 и более раз; + – превышение в 3 раза; ++ – превышение в 6 раз; +++ – превышение в 9 и более раз. Описанные клоны показывали статистически значимое связывание с антигенами минимум в трех независимых экспериментах.

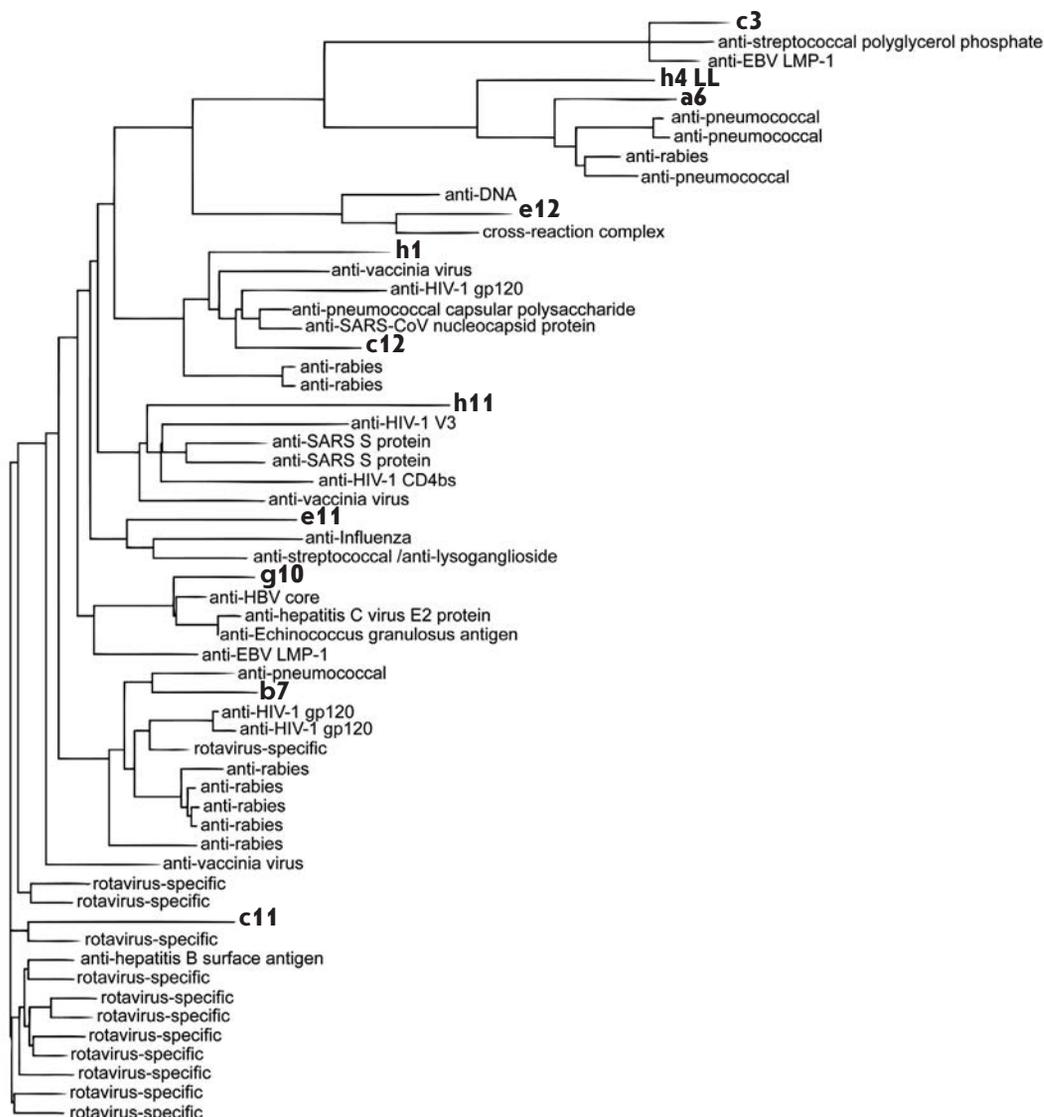


Рис. 2. Гомология тяжелых цепей отобранных антител с противовирусными антителами, известными из опубликованных данных (базы данных Protein Data Bank proteins (pdb), UniProtKB/Swiss-Prot (swissprot)). Жирным отмечены антитела, отобранные в данной работе

как для тяжелой, так и для легкой цепей. Можно отметить высокий уровень структурного сходства полученных антител с антителами из ЦСЖ РС, анти-МОГ, анти-CD152 (антиген 4 цитотоксических лимфоцитов), антителами к белку Бенс-Джонса. Крайне интересны данные по близости структур тяжелых цепей кроссреактивных антител c3 и анти-LMP-1-антитела (gb|ABA55010.1 – гомология 91%), а также кроссреактивного g10 и анти-LMP-1-антитела (gb|ABA55014.1 – гомология 86%), что косвенно подтверждает корректность отбора антител из фаговой библиотеки. Среди легких цепей высокая гомология антитела b7 и МОГ-специфичного антитела (gb|AAU15116.1 – гомология 90%) может свидетельствовать о полиреактивности отобранного антитела, а сходство a6 и антитела из ЦСЖ больного РС (gb|AAS21063.1 – гомология 94%) может косвенно подтверждать аутоиммунную

природу отобранного нами антитела. На наш взгляд, высокая провирусная гомология антител, способных связывать ОБМ, потенциально указывает на то, что первичной мишенью для этих антител могут служить многие вирусные белки. Таким образом, для запуска РС и активации патогенных В-клеток, наряду с генетическими и экологическими факторами, необходимо наличие не определенного экзогенного патогена, а его способность, проникая в ЦНС, увлекать за собой клетки иммунной системы, что в итоге приводит к их «множественной и беспорядочной» активации. То есть антителосекретирующие клетки, активированные еще на периферии в лимфатических узлах, мигрируют через поврежденный ГЭБ. Таким образом, первичные антитела к вирусным антигенам начинают взаимодействовать с собственными кроссреактивными аутоантигенами в ЦНС, вызывая

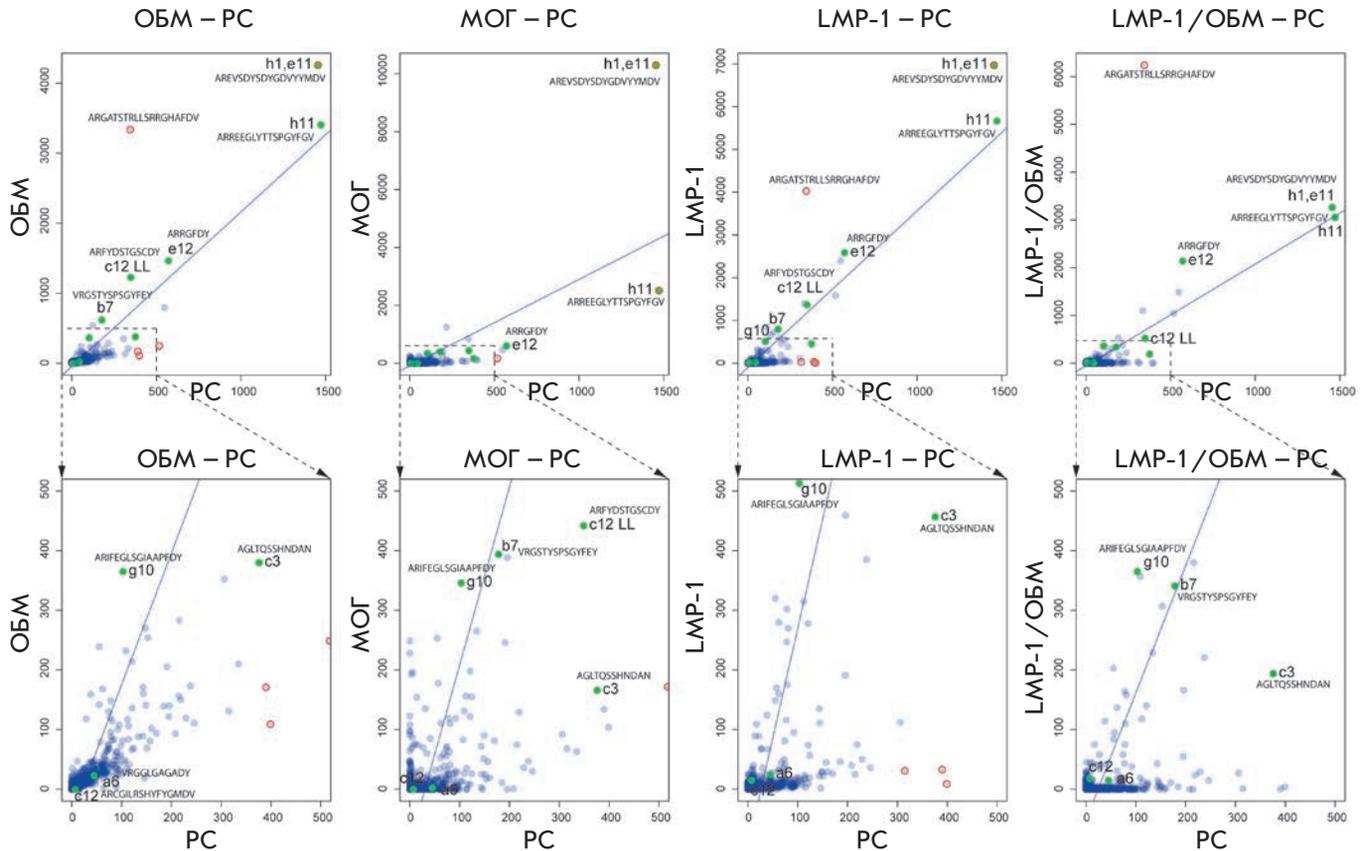


Рис. 4. Сравнение встречаемости CDR3 тяжелых цепей в обогащенных библиотеках по сравнению с исходной библиотекой PC. На представленных точечных диаграммах каждая точка обозначает CDR3 с определенной последовательностью; по оси X отложено количество прочтений для этого CDR3 в библиотеке PC, а по оси Y – в соответствующей обогащенной библиотеке. Для каждой пары PC-отбора проведен регрессионный анализ, отмечены точки выброса с помощью пакета 'car' языка R (помечены красным). Также на графиках отмечены экспериментально исследованные клоны, отобранные с помощью моноклонального фагового ИФА (зеленый цвет с указанием индивидуальной маркировки, приведенной в таблице). Указаны последовательности CDR3 наиболее интересных клонов

локальные воспаления и в дальнейшем развитие заболевания.

Для оценки результатов отбора антител на выбранные антигены проведено широкомасштабное секвенирование обогащенных библиотек. С использованием оборудования Illumina MiSeq определено около 100 000 последовательностей из каждой библиотеки (по 50000 для тяжелых и легких цепей). Далее был проведен анализ отобранных антител по встречаемости CDR3 для тяжелых и легких цепей, а также определены относительные заряды наиболее эффективно отобранных CDR3. Для этого полученные в результате широкомасштабного секвенирования последовательности были выровнены с последовательностями антител из базы данных IMGT [32] с помощью программы IMGT/V-QUEST

[31], а затем результаты выравниваний были отфильтрованы для избавления от артефактов. В дальнейшем анализировали только отфильтрованные результаты секвенирования. Сравнительному анализу подвергали представленность различных CDR3 в обогащенных библиотеках по сравнению с начальной библиотекой PC, считая мерой представленности CDR3 общее число последовательностей, несущих этот CDR3 (рис. 4, 5). На рис. 4, 5 изображена и представленность CDR3-антител, полученных с помощью функционального отбора (таблица). Точки выброса, находящиеся выше регрессионной линии, соответствуют положительному отбору на данный CDR3 (он значительно преобладает в этом отборе по сравнению с остальными CDR3), а точки выброса ниже этой линии – отрицательному

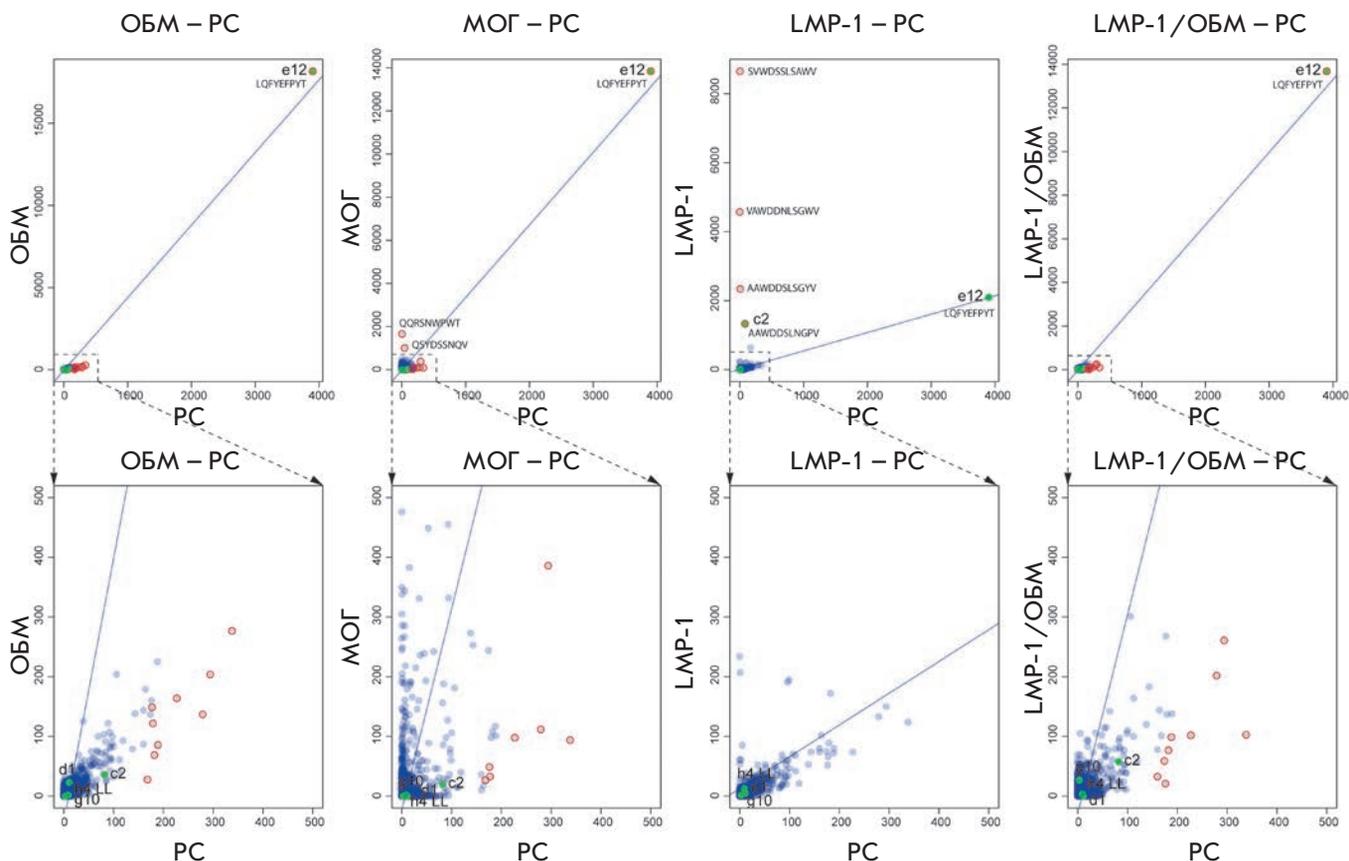


Рис. 5. Сравнение встречаемости CDR3 легких цепей в обогащенных библиотеках по сравнению с исходной библиотекой PC. На представленных точечных диаграммах каждая точка обозначает CDR3 с определенной последовательностью; по оси X отложено количество прочтений для этого CDR3 в библиотеке PC, а по оси Y – в соответствующей обогащенной библиотеке. Для каждой пары PC-отбора проведен регрессионный анализ и отмечены точки выброса с помощью пакета 'car' языка R (помечены красным). На графиках отмечены экспериментально исследованные клоны, отобранные с помощью моноклонального фагового ИФА (зеленый цвет с указанием индивидуальной маркировки, приведенной в таблице). Указаны последовательности CDR3 наиболее интересных клонов

отбору на них. Нас, в первую очередь, интересовали положительные выбросы, так как они были первыми кандидатами на функционально значимые CDR3 в каждом отборе. Как и ожидалось, среди распространенных (по количеству встречаемости) CDR3 преобладает большая часть клонов, выбранных после функционального отбора с помощью моноклонального фагового ИФА. Причем видно, что клоны h1 и e11 имеют CDR3 тяжелой цепи с повышенной полиреактивностью, так как частота его встречаемости увеличена во всех четырех обогащенных библиотеках по сравнению с исходной. А CDR3 клона h11 амплифицировался в библиотеках ОБМ, LMP-1, LMP-1/ОБМ, что может характеризовать его как часть кроссреактивного паратопа для двух общих эпитопов именно у ОБМ и LMP-1. С другой стороны, довольно интересной представляется ситуа-

ция, когда по анализу встречаемости H-CDR3 явный отбор по связыванию ОБМ и LMP-1 прошла последовательность ARGATSTRLLSRRGHAFDV, но методом моноклонального фагового ИФА мы не получили ни одного антитела с таким CDR3. Возможным объяснением может служить ограниченное число клонов, анализируемое при фаговом ИФА. Подобная ситуация может возникнуть и в результате невысокой аффинности конкретного фагового клона к двум антигенам в формате моноклонального ИФА (низкий сигнал при ИФА), в результате чего данный клон не был выбран для дальнейшего анализа. Однако в действительности он количественно прошел отбор на два антигена. В любом случае дальнейший анализ клонов с подобными гипервариабельными участками может помочь прояснить проблему кроссреактивности. Среди легких цепей потенци-

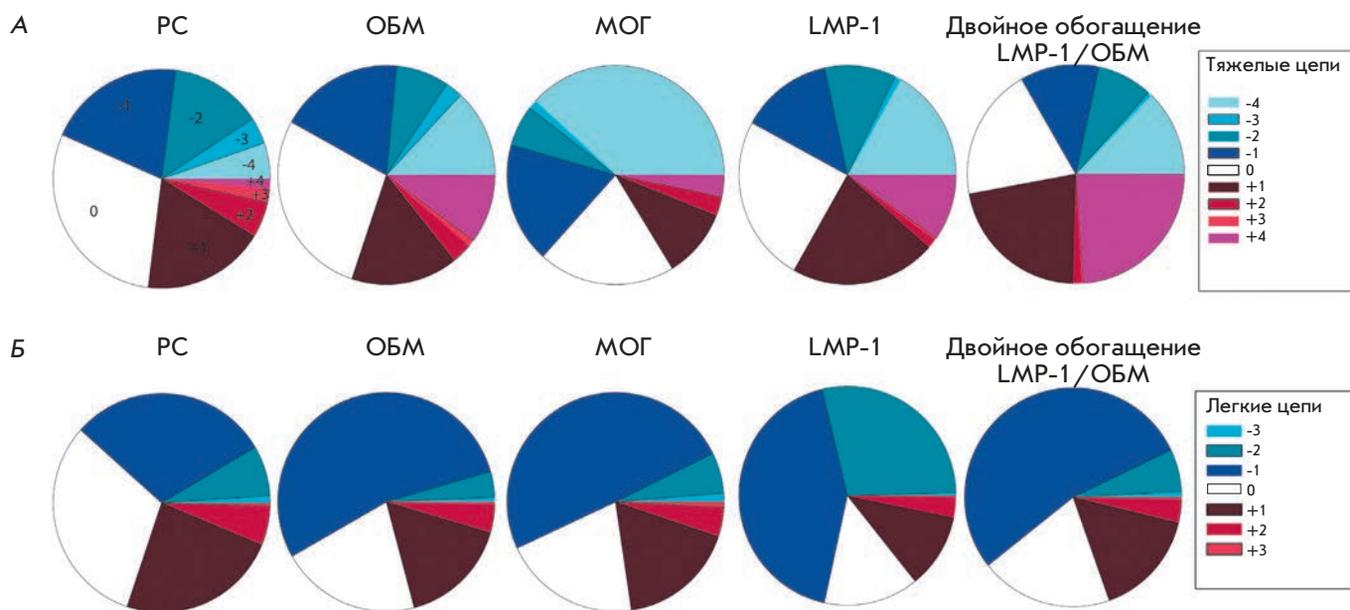


Рис. 6. Распределение суммарного заряда CDR3 в библиотеках, обогащенных на разные антигены для тяжелых (А) и легких (Б) цепей

альной повышенной кроссреактивностью между ОБМ и МОГ обладал CDR3 клон е12. При этом он был эффективно отобран и в библиотеке LMP-1/ОБМ после обогащения на ОБМ, хотя при обогащении на LMP-1 не наблюдалось эффективного отбора на данный CDR3.

Взаимодействие двух белков во многом обусловлено наличием заряда в области их соприкосновения. Так как у антитела наибольшую роль в формировании сайта связывания играет CDR3, мы решили оценить вклад электростатических взаимодействий данного региона в специфичность связывания при отборе на разные антигены, а также в отборе кроссреактивных клонов. С этой целью мы определили частоту встречаемости CDR3 с разными зарядами для тяжелых и легких цепей (рис. 6), учитывая количество прочтений для каждой последовательности. Можно отметить, что в библиотеке, обогащенной на МОГ, практически на треть уменьшилось количество нейтрально заряженных CDR3 тяжелых цепей и в 7 раз увеличилось количество CDR3 с суммарным высоким отрицательным зарядом (-4 и больше) во многом за счет сокращения положительного заряда (+1). В отборе на остальные антигены наблюдается смещение суммарного заряда в высокозаряженные области как положительные (+4), так и отрицательные (-4). Для легких цепей в основном наблюдается уменьшение количества нейтрально заря-

женных и увеличение слабоотрицательных CDR3 (-1 – у ОБМ, МОГ, двойного обогащения LMP-1/ОБМ и -1-2 у LMP-1). Из этих данных можно сделать вывод, что хотя изначально в библиотеке антител больных РС (РС на рис. 6), в некоторой степени отражающей распределение антител в организме больного, преобладают и иммуноглобулины с нейтральными CDR3, тенденцию к проявлению аутореактивности в основном имеют антитела с заряженными остатками в антигенсвязывающих центрах. Причем у тяжелых цепей по сравнению с легкими наблюдается большее смещение заряда в крайние области по модулю – как в положительную, так и в отрицательную стороны. Это может свидетельствовать о более активном участии тяжелой цепи в формировании сайта связывания.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе получены панель антител к ряду аутоантигенов при РС, а также набор кроссреактивных антител, связывающих как белок вируса Эпштейна-Барр, так и структурный элемент миелиновой оболочки – ОБМ. Высокая гомология антител, полученных к выбранным аутоантигенам и патогенам вирусной и бактериальной природы, может свидетельствовать об участии целого ряда вирусов в развитии РС. Полиреактивность аутоантител при РС может реализовываться за счет сочетания

двух цепей – тяжелой и легкой, каждая из которых в большей степени отвечает за связывание своего антигена. В случае последовательного отбора на LMP-1 и ОБМ, проведенного в данной работе, за связывание с LMP-1, более вероятно, отвечает легкая цепь антигена, тогда как комбинация с тяжелой цепью приводит к формированию полноценного кроссреактивного антитела, связывающего как LMP-1, так и ОБМ. Для аутоантител, специфичных к исследованным аутоантигенам РС – ОБМ, МОГ и потенциальному вирусному триггеру РС – LMP-1, характерно увеличение заряженных CDR3. ●

Работа поддержана РФФИ
(гранты № 12-04-01609-а, 12-04-33258,
12-04-92428-ЕМБЛ-а, 13-04-40277-Н,
09-04-12128-офи_м), грантом фонда «Сколково»
«Персонализированная терапия аутоиммунных
заболеваний и рака», программами Президиума
РАН «Фундаментальные науки – медицине»
и № 27 «Основы фундаментальных исследований
нанотехнологий и наноматериалов»,
НШ-2046.2012.4, стипендией Президента РФ
(СП 2445.2013.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hauser S.L., Oksenberg J.R. // *Neuron*. 2006. V. 52. № 1. P. 61–76.
- Hemmer B., Nessler S., Zhou D., Kieseier B., Hartung H.P. // *Nat. Clin. Practice Neurol.* 2006. V. 2. № 4. P. 201–211.
- Compston A., Coles A. // *Lancet*. 2008. V. 372. № 9648. P. 1502–1517.
- Jersild C., Fog T., Hansen G.S., Thomsen M., Svejgaard A., Dupont B. // *Lancet*. 1973. V. 2. № 7840. P. 1221–1225.
- Barcellos L.F., Oksenberg J.R., Begovich A.B., Martin E.R., Schmidt S., Vittinghoff E., Goodin D.S., Pelletier D., Lincoln R.R., Bucher P., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. V. 72. № 3. P. 710–716.
- Marrosu M.G., Murru R., Murru M.R., Costa G., Zavattari P., Whalen M., Cocco E., Mancosu C., Schirru L., Solla E., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. № 25. P. 2907–2916.
- Dyment D.A., Herrera B.M., Cader M.Z., Willer C.J., Lincoln M.R., Sadovnick A.D., Risch N., Ebers G.C. // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. № 14. P. 2019–2026.
- Masterman T., Ligiers A., Olsson T., Andersson M., Olerup O., Hillert J. // *Ann. Neurol.* 2000. V. 48. № 2. P. 211–219.
- Barcellos L.F., Sawcer S., Ramsay P.P., Baranzini S.E., Thomson G., Briggs F., Cree B.C., Begovich A.B., Villoslada P., Montalban X., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. № 18. P. 2813–2824.
- Ramagopalan S.V., Morris A.P., Dyment D.A., Herrera B.M., DeLuca G.C., Lincoln M.R., Orton S.M., Chao M.J., Sadovnick A.D., Ebers G.C. // *PLoS Genet.* 2007. V. 3. № 9. P. 1607–1613.
- Robertson N.P., Fraser M., Deans J., Clayton D., Walker N., Compston D.A. // *Brain*. 1996. V. 119. Pt 2. P. 449–455.
- Sadovnick A.D., Baird P.A., Ward R.H. // *Am. J. Med. Genet.* 1988. V. 29. № 3. P. 533–541.
- Willer C.J., Dyment D.A., Risch N.J., Sadovnick A.D., Ebers G.C., Canadian Collaborative Study G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 22. P. 12877–12882.
- Ebers G.C., Sadovnick A.D., Dyment D.A., Yee I.M., Willer C.J., Risch N. // *Lancet*. 2004. V. 363. № 9423. P. 1773–1774.
- Sokolova E.A., Malkova N.A., Korobko D.S., Rozhdestvenskii A.S., Kakulya A.V., Khanokh E.V., Delov R.A., Platonov F.A., Popova T.Y., Aref'eva E.G., et al. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 4. P. e61032.
- Царева Е.Ю., Кулакова О.Г., Макарычева О.Ю., Бойко А.Н., Щур С.Г., Лац Н.Ю., Попова Н.Ф., Гусев Е.И., Башинская В.В., Львов Д.В. и др. // *Мол. биол.* 2011. Т. 45. № 6. С. 963–972.
- Yong V.W., Marks S. // *Neurology*. 2010. V. 74. Suppl 1. P. S9–S16.
- Lund F.E., Randall T.D. // *Nat. Rev. Immunol.* 2010. V. 10. № 4. P. 236–247.
- Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I., Aleksandrova E.S., Telegin G.B., Chamborant O.G., Sidorik L.L., Suchkov S.V., Alekberova Z.S., Gnuchev N.V., et al. // *J. Immunol. Meth.* 2002. V. 269. № 1–2. P. 197–211.
- Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I., Belogurov A.A., Telegin G.B., Suchkov S.V., Misikov V.K., Morse H.C., Gabibov A.G. // *Immunol. Lett.* 2006. V. 103. № 1. P. 45–50.
- Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I., Belogurov A.A. Jr., Kurkova I.N., Petrenko A.G., Telegin G.B., Suchkov S.V., Kiselev S.L., Lagarkova M.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 2. P. 281–286.
- Paty D.W., Li D.K. // *Neurology*. 1993. V. 43. № 4. P. 662–667.
- Sela M. // *Rejuvenation Res.* 2006. V. 9. № 1. P. 126–133.
- Stepanov A.V., Belogurov A.A. Jr., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 6. P. e20991.
- Belogurov A.A. Jr., Stepanov A.V., Smirnov I.V., Melamed D., Bacon A., Mamedov A.E., Boitsov V.M., Sashchenko L.P., Ponomarenko N.A., Sharanova S.N., et al. // *FASEB J.* 2013. V. 27. № 1. P. 222–231.
- Gabibov A.G., Belogurov A.A. Jr., Lomakin Y.A., Zakharova M.Y., Avakyan M.E., Dubrovskaya V.V., Smirnov I.V., Ivanov A.S., Molnar A.A., Gurtsevitch V.E., et al. // *FASEB J.* 2011. V. 25. № 12. P. 4211–4221.
- Weckerle H., Hohlfeld R. // *N. Eng. J. Med.* 2003. V. 349. № 2. P. 185–186.
- Lunemann J.D., Jelcic I., Roberts S., Lutterotti A., Tackenberg B., Martin R., Munz C. // *J. Exp. Med.* 2008. V. 205. № 8. P. 1763–1773.
- Chastain E.M., Miller S.D. // *Immunol. Rev.* 2012. V. 245. № 1. P. 227–238.
- Alamyar E., Giudicelli V., Li S., Duroux P., Lefranc M.P. // *Immunome Res.* 2012. V. 8. № 1. P. 26.
- Brochet X., Lefranc M.P., Giudicelli V. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. P. W503–508.
- Lefranc M.P., Giudicelli V., Ginestoux C., Jabado-Michaloud J., Folch G., Bellahcene F., Wu Y., Gemrot E., Brochet X., Lane J., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. D1006–1012.