

УДК 571.27

Смещение репертуара генов зародышевой линии В-клеточных рецепторов при рассеянном склерозе

Я. А. Ломакин¹, Л. А. Овчинникова¹, М. Н. Захарова², М. В. Иванова², Т. О. Симанив²,
М. Р. Кабилов³, Н. А. Быкова⁴, В. С. Мухина^{4,5}, А. Н. Каминская¹, А. Е. Тупикин³,
М. Ю. Захарова¹, А. В. Фаворов⁴, С. Н. Иллариошкин², А. А. Белогуров^{1,6}, А. Г. Габибов^{1,7}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Научный центр неврологии, 6 неврологическое отделение, Москва, 125367 Россия

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

⁴Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, 119991 Россия

⁵Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, 127051 Россия

⁶Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, 127473 Россия

⁷Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

E-mail: lomakin@ibch.ru

Поступила в редакцию 02.09.2022

Принята к печати 20.10.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11794

РЕФЕРАТ Регуляторные функции В-лимфоцитов играют важную роль в развитии и подавлении иммунного ответа. Нарушение противовоспалительной функции В-клеток (Breg) может привести к развитию иммунопатологических процессов, в частности, аутоиммунных заболеваний. К сожалению, точный механизм функционирования и развития регуляторных В-клеток пока не известен, почти ничего не известно об их специфичности и структуре В-клеточного рецептора. С использованием широко-масштабного секвенирования мы проанализировали репертуар В-клеточных рецепторов субпопуляции транзиторных Breg CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} у пациентов с рассеянным склерозом (РС). Впервые показано, что частота встречаемости ряда генов зародышевой линии транзиторных Breg при развитии РС отличается от распределения генов иммуноглобулинов у условно здоровых доноров. Зарегистрированный сдвиг более выражен у пациентов с высокоактивным РС, чем у пациентов с доброкачественным течением РС. Полученные нами данные позволяют предположить, что изменение репертуара Breg при развитии РС происходит уже на раннем этапе созревания В-клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рассеянный склероз, нейродегенерация, иммуноглобулины, транзиторные В-клетки, широкомасштабное секвенирование, регуляторные В-клетки, VCR-Seq, зародышевая линия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РС – рассеянный склероз; ЦНС – центральная нервная система; ВАРС – высокоактивный рассеянный склероз; ДРС – доброкачественный рассеянный склероз; Breg – регуляторная В-клетка.

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) является наиболее распространенным хроническим аутоиммунным заболеванием центральной нервной системы (ЦНС), диагностированным более чем у 2.3 миллиона человек по всему миру [1]. Механизм запуска этой тяжелой патологии, в частности механизм иммуноопосредованной нейродегенерации, до сих пор не установлен, что существенно затрудняет поиск

стратегии лечения РС [2–4]. Ранее мы показали, что в репертуар антител больных РС входят антигена, кросс-реактивные к белкам вируса Эпштейна–Барр, и определили их структурно-функциональные особенности [5, 6]. С момента открытия РС основная роль в патогенезе этого заболевания отводилась исключительно Т-клеточному звену иммунитета. Однако за последнее десятилетие накоплено множество доказательств, подтверждающих непосред-

ственное участие В-клеток в развитии аутоиммунных процессов, в том числе и при РС [7]. Несмотря на длительность изучения РС, его точная этиология все еще неизвестна. В основе механизмов вирусной индукции заболевания могут лежать молекулярная мимикрия и перекрестная реактивность с последующим увеличением числа узнаваемых эпитопов (epitope spreading) между Т- и В-клетками [5, 8–13]. У пациентов с РС повышен титр аутореактивных антител, специфически связывающих компоненты миелиновой оболочки, у них обнаружены также каталитические иммуноглобулины, гидролизующие основной белок миелина – один из характерных аутоантигенов при РС [14–16].

В последние годы регуляторные В-клетки (Breg) привлекают все большее внимание исследователей [17, 18]. Фундаментальный интерес к этому компоненту гуморального иммунитета обусловлен стремлением понять, как именно В-клетки участвуют в подавлении воспалительного ответа, на какой стадии созревания В-клетка приобретает регуляторные функции и как на это влияет специфичность В-клеточного рецептора. С практической точки зрения Breg привлекают внимание как клетки, непосредственно участвующие в развитии аутоиммунных и лимфопролиферативных патологий. Однако на сегодняшний день невозможно прийти к однозначному выводу, какие процессы происходят при возникновении аутоиммунного воспаления: изменение количества В-регуляторных клеток, нарушение их функций или сочетание двух этих явлений. Также имеется ограниченная информация о специфичности Breg, хотя и показано, что для их правильного функционирования необходим В-клеточный рецептор [19]. Неясно, сопутствуют ли развитию аутоиммунного ответа нарушения в созревании генов иммуноглобулинов Breg, являются ли эти клетки аутореактивными? Неизвестно, на какой стадии развития происходят наиболее значимые изменения в пуле Breg: у наивных, транзитных или зрелых В-клеток. Ранее мы обнаружили повышенное содержание транзитных Breg в периферической крови пациентов с РС [20]. При этом тяжелая цепь иммуноглобулинов транзитных Breg при развитии РС содержит меньшее количество гипермутаций, чем у здоровых доноров.

В представленной работе мы решили прояснить, отличаются ли структуры В-клеточных рецепторов в одной из наиболее полно описанных субпопуляций транзитных Breg CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} у пациентов с РС и условно здоровых доноров. Анализ широкомасштабного секвенирования иммуноглобулиновых последовательностей отобранных В-клеток (BCR-Seq) показал, что распределение целого ряда

генов зародышевой линии у больных РС отличается от распределения у здорового человека. Причем анализ общего пула В-клеток периферической крови и субпопуляции регуляторных транзитных В-клеток у обследованных нами пациентов выявляет как превышение, так и уменьшение встречаемости различных генов зародышевой линии по сравнению со здоровыми донорами. Важно отметить, что это различие более выражено у пациентов со злокачественным типом течения РС – высокоактивным РС (ВАРС) [21] в сравнении с пациентами с доброкачественным течением РС (ДРС) [22].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты с РС и здоровые доноры

Произведен забор периферической крови у девяти пациентов 6 неврологического отделения Научного центра неврологии (Москва, Россия) с РС в возрасте 23–61 года (40.0 ± 9.1) и шести здоровых доноров (табл. 1). Тяжесть заболевания, оцененная по шкале EDSS, варьировала от 1.5 до 8.5 балла. Значения EDSS от 0 до 10 вычисляли по шкале Куртцке EDSS (англ. Expanded Disability Status Scale – расширенная шкала оценки степени инвалидизации) [23]. В исследование вошли пять пациентов с высокоактивным РС (ВАРС) [21] и четыре пациента с доброкачественным течением РС (ДРС) [22]. Были собраны данные о течении болезни, продолжительности и истории лечения (табл. 1). Исследование одобрено локальным этическим комитетом Научного центра неврологии и проводилось в полном соответствии с Декларацией WMA Хельсинки, ICH GCP и местным законодательством. Все пациенты предоставили письменное информированное согласие после обсуждения протокола исследования.

Выделение В-клеток из периферической крови

Мононуклеарные клетки периферической крови пациентов с РС и здоровых доноров получены путем седиментационного обогащения в градиенте фикола. Остаточную эритроцитарную фракцию удаляли с помощью лизирующего буфера АСК. Полученные мононуклеарные клетки фильтровали через 40-мм нейлоновый фильтр и окрашивали флуоресцентными антителами: α -CD19-PE-Cy7, α -CD24-PE, α -CD38-APC, α -CD45-APC-Cy7 (Bio-legend, США), и красителем мертвых клеток sytox green dead cell stain (ThermoFisher Scientific, США) в течение 60 мин при +4°C в темноте. Популяции регуляторных транзитных В-клеток (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}) и общего пула В-клеток (CD19⁺) отбирали непосредственно в микроцентрифужные пробирки с лизиру-

Таблица 1. Пациенты с РС и здоровые доноры, участвующие в исследовании

	Форма РС ¹	Возраст, лет	Пол	EDSS ²	Терапия ³	Длительность заболевания, лет
PC1	ДРС	56	Жен.	2.5	Без лечения	11
PC2	ДРС	61	Жен.	3	Без лечения	26
PC3	ДРС	43	Жен.	1.5	Без лечения	12
PC4	ДРС	36	Муж.	2.5	Без лечения	14
PC5	ВАРС	33	Муж.	6	IFNβ1b (2006–2011; 2014–2017).	12
PC6	ВАРС	23	Муж.	5	Без лечения	3
PC7	ВАРС	37	Жен.	5	IFNβ1b (2014–2016). ГА (2016–2017).	5
PC8	ВАРС	29	Жен.	8	ГА (2012–2014). IVIG (2014). IFNβ1b (2015–2016).	12
PC9	ВАРС	39	Жен.	8.5	Без лечения	8
K1	Здоровый	24	Жен.	-	-	-
K2	Здоровый	40	Жен.	-	-	-
K3	Здоровый	36	Муж.	-	-	-
K4	Здоровый	27	Жен.	-	-	-
K5	Здоровый	42	Жен.	-	-	-
K6	Здоровый	25	Жен.	-	-	-

¹ РС – пациент с доброкачественным РС; ВАРС – пациент с высокоактивным РС.

² EDSS – расширенная шкала оценки степени инвалидизации (expanded disability status scale).

³ IFNβ1b – интерферон-β-1b; ГА – глатирамера ацетат; IVIG – внутривенный иммуноглобулин.

ющим буфером Qiazol (Qiagen, Германия). Сортинг клеток проводили с помощью проточного флуориметра BD FACSAria III.

Подготовка библиотек для секвенирования переменных фрагментов генов иммуноглобулинов (RT-PCR)

РНК выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Обратную транскрипцию (RT) проводили с набором MMLV RT с oligo(dT) и случайными праймерами в соответствии с инструкциями производителя («Евроген», Россия). Для амплификации переменных фрагментов генов иммуноглобулинов человека VH и VL использовали 15 прямых праймеров для VH и четыре обратных праймера для J-фрагмента генов тяжелой цепи человека, 13 прямых праймеров Vκ, два обратных праймера Jκ для легкой капша-цепи, 16 прямых праймеров Vλ и три обратных праймера Jλ для легкой лямбда-цепи [24]. 15 прямых праймеров VH использовали по отдельности в каждом образце в 50 мкл реакционной смеси с эквимольной смесью четырех обратных праймеров JH. 13 праймеров Vκ и 16 праймеров Vλ использовали по отдельности для амплификации генов VL с соответствующей смесью двух обратных праймеров Vκ или трех обратных праймеров Vλ в 50 мкл реакционной смеси для каждого образца. В качестве матрицы в каждой

реакции ПЦР использовали 0.02 мкг кДНК и набор Hot Start Taq Master Mix («Евроген»). Условия ПЦР были следующими: 1 шаг (94°C – 3 мин); 1 цикл (94°C – 25 с, 62°C – 25 с, 72°C – 25 с); 2 цикла (94°C – 25 с, 60°C – 25 с, 72°C – 25 с); 2 цикла (94°C – 25 с, 58°C – 25 с, 72°C – 25 с); 3 цикла (94°C – 25 с, 56°C – 25 с, 72°C – 25 с); 3 цикла (94°C – 25 с, 54°C – 25 с, 72°C – 25 с); 30 циклов (94°C – 25 с, 52°C – 25 с, 72°C – 25 с); и финальная элонгация (72°C – 4 мин). Смеси ПЦР 15 образцов для генов VH, 13 образцов для генов Vκ и 16 образцов для генов Vλ были объединены по отдельности для генов VH, Vκ и Vλ и сконцентрированы до 50–80 мкл с использованием Amicon 30 кДа (Merck, Millipore). Продукты ПЦР (около 400 п.н.) VH, Vκ и Vλ наносили на 1.5% агарозные гели и очищали с помощью набора для очистки ДНК из агарозного геля (Monarch, NEB).

Глубокое секвенирование переменных фрагментов генов VH, Vκ и Vλ иммуноглобулинов

Очищенный ПЦР-продукт (1 мкг) VH, Vκ и Vλ лигировали с адаптерами NEBNext Multiplex Oligos с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК NEBNext Ultra для Illumina (NEB). Библиотеки секвенировали на Miseq с использованием набора для секвенирования 2×300 п.н. (Illumina) в ЦКП «Геномика» СО РАН (ИХБиФМ СО РАН, Новосибирск, Россия).

Анализ данных высокопроизводительного секвенирования

Данные высокопроизводительного секвенирования анализировали с использованием программы MiXCR [25] в два этапа. Сначала исходные данные обрабатывали с помощью алгоритма MiXCR по умолчанию (выравнивание, сборка, экспорт) с использованием библиотеки IMGТ в качестве референса на гены зародышевых линий. Полученные прочтения, успешно выровненные с генами зародышевой линии и содержащие полную целевую последовательность гена иммуноглобулина (CDR1 + FR2 + CDR2 + FR3 + CDR3), подвергали повторной выборке для нормирования различных количеств прочтений. При анализе частоты встречаемости генов зародышевой линии не учитывали мутации в переменных фрагментах VH, V κ и VL.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы Prism 6 с использованием теста Манна-Уитни и парного *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы появляется все больше свидетельств, доказывающих значимость В-клеток в регуляции аутоиммунных заболеваний, включая РС [26, 27]. Тем не менее, субпопуляции Breg у пациентов с РС все еще недостаточно охарактеризованы. На текущий момент опубликовано чрезвычайно мало данных о специфичности и последовательности их В-клеточных рецепторов. Чтобы глубже понять природу развития и охарактеризовать процесс созревания Breg, мы проанализировали субпопуляцию CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} – один из наиболее подтвержденных фенотипических портретов транзиторных Breg, находящихся на промежуточной стадии между незрелыми клетками костного мозга и полностью зрелыми наивными В-клетками периферической крови и вторичных лимфоидных тканей [28, 29]. Образцы периферической крови получены от 9 больных с РС и шести условно здоровых доноров (табл. 1). Мононуклеарные клетки окрашивали антителами к поверхностным маркерам CD19, CD24 и CD38. Общий пул CD19⁺ В-клеток и субпопуляцию транзиторных Breg CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} сортировали по отдельности для последующего выделения РНК и анализа последовательностей В-клеточных рецепторов. Для этого последовательности генов переменных фрагментов тяжелых (VH) и легких (VL) цепей иммуноглобулинов каждого пациента были амплифицированы с кДНК, синтезированной на основе выделенной РНК, после чего проводили широкомасштабное секвенирование генов

вариабельных фрагментов VH, V κ и VL. Целевое секвенирование репертуара иммуноглобулинов общего пула В-клеток и субпопуляции транзиторных Breg было выполнено с покрытием не менее пяти функциональных прочтений на отобранную клетку. После всех этапов биоинформатической фильтрации было получено в среднем по 83100 функциональных последовательностей тяжелой цепи, 37591 – каппа-цепи и 34565 последовательностей лямбда-цепи общего пула CD19⁺ клеток и субпопуляции CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} транзиторных Breg каждого индивида. Последовательности доступны на репозитории ArrayExpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-10859>).

Частоту встречаемости генов зародышевой линии VH, V κ , VL мы анализировали с использованием праймеров, способных амплифицировать практически все возможные варианты функциональных фрагментов V_HDJ_H, V _{κ} J _{κ} и V_LJ_L. При сравнении распределения генов IgVH у пациентов с РС и условно здоровых доноров амплифицировались все семь функциональных семейств VH. Гены зародышевой линииIGHV3 наиболее часто встречались у пациентов с РС и здоровых доноров как в общем пуле В-клеток, так и в субпопуляции транзиторных Breg. Последовательности иммуноглобулинов, относящихся к генам зародышевой линии IGHV2-26, IGHV2-5, IGHV2-70, представленные в небольшом количестве практически у каждого здорового индивида, исчезают при развитии РС (рис. 1). Необходимо отметить, что при более тяжелой форме заболевания (ВАРС) смещение репертуара генов иммуноглобулинов по сравнению с условно здоровыми донорами более значительно, чем в случае сравнения ДРС и условно здоровых доноров. Гермлайн IGHV3-66 встречается у здоровых доноров и ДРС на сопоставимом уровне, но практически полностью исчезает у пациентов с ВАРС. Один из наиболее распространенных гермлайнов IGHV5-51 выявлен у всех анализируемых доноров, но в случае развития РС частота встречаемости этого гена зародышевой линии также значимо снижается. При этом единственный ген IGHV4-31, наоборот, при РС чаще встречается как в общем пуле В-клеток, так и в субпопуляции транзиторных Breg. Это коррелирует с ранее опубликованными данными о повышенном содержании семейства IGHV4 в репертуаре В-клеток из периферической крови и цереброспинальной жидкости пациентов с РС [30, 31].

Репертуар генов, кодирующих легкие цепи иммуноглобулинов Breg, различается также у пациентов с РС и условно здоровых доноров. Гермлайн IGKV1-12, встречающийся в норме примерно в 2% иммуноглобулиновых последовательностей, падает ниже

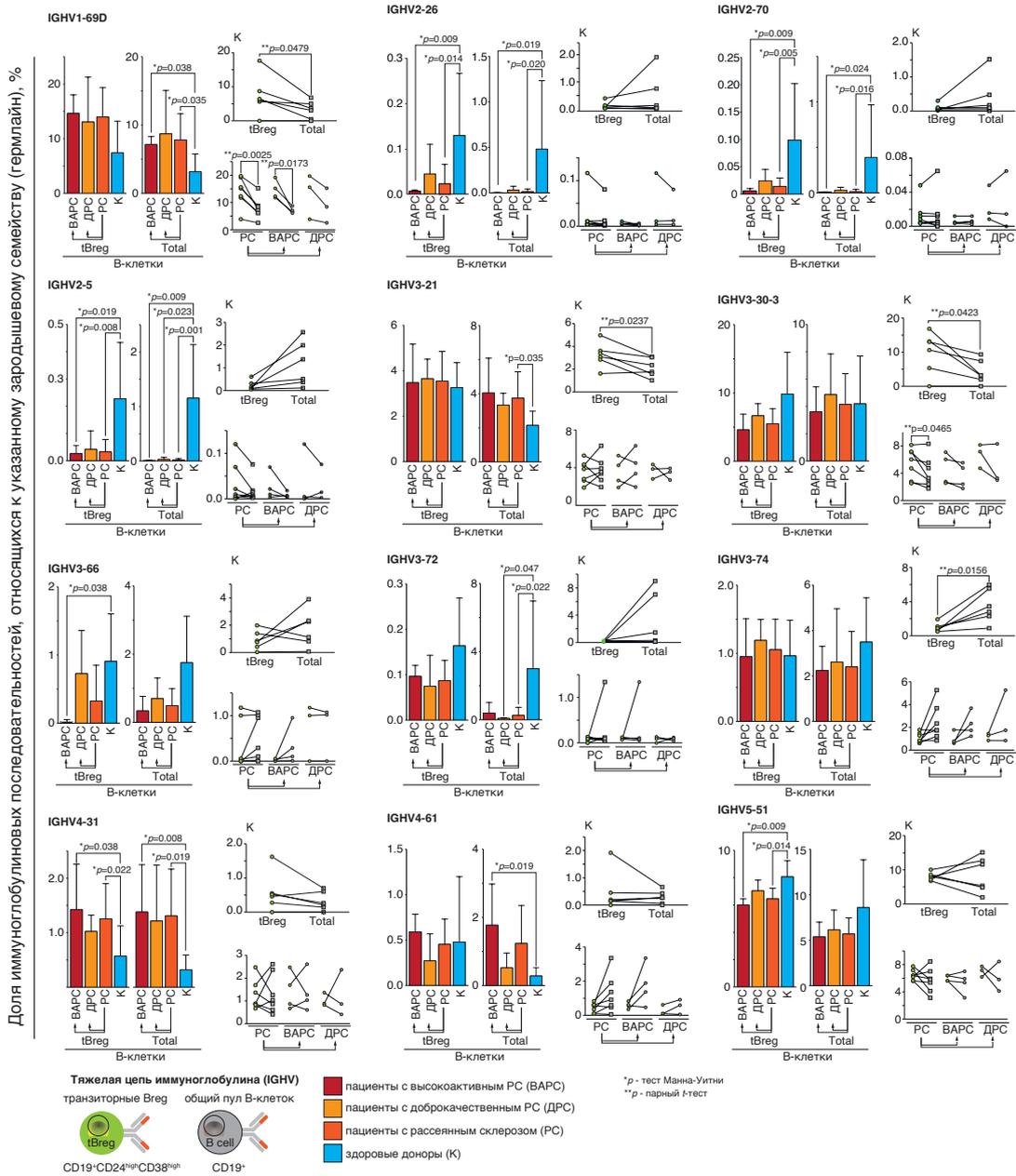


Рис. 1. Частота встречаемости генов зародышевой линии, кодирующих вариабельные фрагменты тяжелой цепи (VH) иммуноглобулинов у пациентов с РС и условно здоровых доноров. Проанализировано 49 функциональных генов VH в группах пациентов с РС, с доброкачественным течением РС (ДРС) и с высокоактивным РС (ВАРС). Контроль (К) – частота встречаемости генов иммуноглобулинов у условно здоровых доноров. Сравнивали распределение репертуара генов зародышевой линии между общим пулом В-клеток периферической крови (CD19⁺) и транзиторными Vreg (tBreg) с фенотипом CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}. Сравнение пациентов с разными типами течения РС и условно здоровых доноров изображено на гистограммах, где приведено среднее для каждой группы пациентов значение (mean ± SD) доли последовательностей Ig, относящихся к указанному гену зародышевой линии. Справа от гистограммы приведена доля иммуноглобулиновых последовательностей, относящихся к указанному гену зародышевой линии, по отдельности для каждого пациента; сравниваются общий пул периферических В-клеток (total – серые точки) и субпопуляция транзиторных регуляторных В-клеток (tBreg – зеленые точки). Приведены данные только для тех генов зародышевой линии, у которых выявлены статистически значимые различия хотя бы одного анализируемого параметра (сравнение разных типов течения РС против условно здоровых доноров – тест Манна–Уитни; сравнение общего пула В-клеток с субпопуляцией транзиторных Vreg (tBreg) – парный *t*-тест; изображены только статистически значимые значения *p*-value)

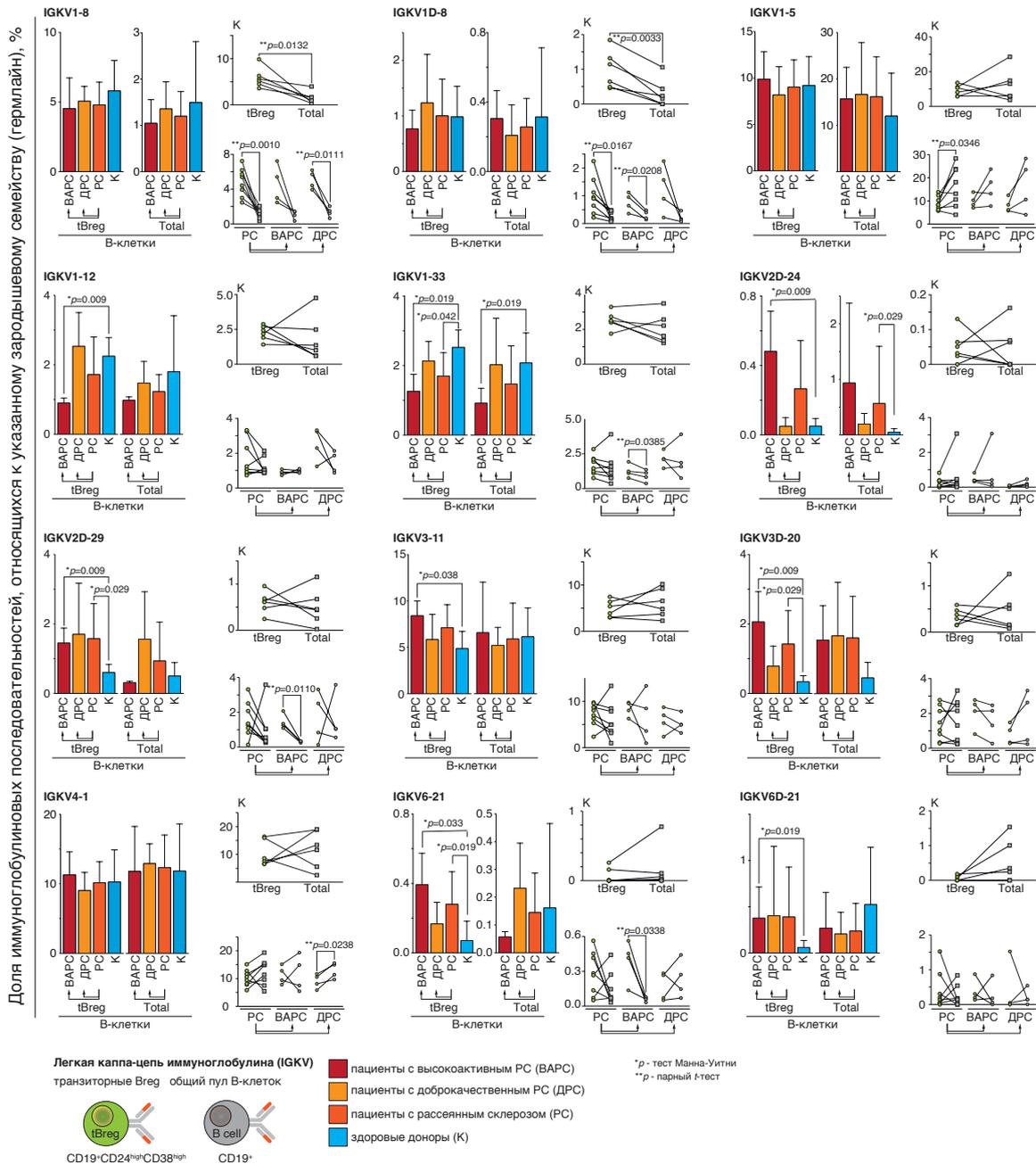


Рис. 2. Частота встречаемости генов зародышевой линии, кодирующих переменные фрагменты легкой каппа-цепи (V_κ) иммуноглобулинов у пациентов с РС и условно здоровых доноров. Проанализирован 41 функциональный ген V_κ у пациентов с РС, пациентов с доброкачественным течением РС (ДРС) и высокоактивным РС (ВАРС). Контроль (К) – частота встречаемости генов иммуноглобулинов у условно здоровых доноров. Сравнивали распределение репертуара генов зародышевой линии между общим пулом В-клеток периферической крови (CD19⁺) и транзиторными Vreg (tBreg) с фенотипом CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}. Сравнение пациентов с разными типами течения РС и условно здоровых доноров изображено на гистограммах, где приведено среднее для каждой группы пациентов значение (mean ± SD) доли последовательностей Ig, относящихся к указанному гену зародышевой линии. Справа от гистограммы приведена доля иммуноглобулиновых последовательностей, относящихся к указанному гену зародышевой линии, по отдельности для каждого пациента; сравниваются общий пул периферических В-клеток (total – серые точки) и субпопуляция транзиторных регуляторных В-клеток (tBreg – зеленые точки). Приведены данные только для тех генов зародышевой линии, у которых выявлены статистически значимые различия хотя бы одного анализируемого параметра (сравнение разных типов течения РС против условно здоровых доноров – тест Манна–Уитни; сравнение общего пула В-клеток с субпопуляцией транзиторных Vreg (tBreg) – парный t-тест; изображены только статистически значимые значения p-value)

1% при ВАРС (рис. 2). При более легком течении заболевания (ДРС) частота этого гена не отличается от частоты у условно здоровых доноров. Ген зародышевой линии IGKV1-33 встречается реже уже не только у пациентов с ВАРС, но и в объединенной группе больных РС, включающей оба течения заболевания. Гены IGKV2D-24, IGKV3-11 и IGKV6D-21, наоборот, значительно чаще встречаются у пациентов с ВАРС, чем у условно здоровых доноров. Гены IGKV2D-29, IGKV3D-20 и IGKV6-21 встречаются чаще как у пациентов с ВАРС, так и в группе РС в целом. Следует заметить, что распределение генов зародышевой линии, кодирующих легкую каппа-цепь, в популяции транзиторных Vreg не отличается статистически значимо у пациентов с ДРС и условно здоровых доноров.

При анализе изотипа лямбда легкой цепи аналогично наблюдаются различия в распределении генов зародышевой линии (рис. 3). Гермлайн IGLV1-36 практически не встречается у здоровых доноров и ДРС, но его частота резко возрастает до 0.5% у пациентов с ВАРС. Частота встречаемости генов зародышевой линии IGLV1-44 и IGLV3-21 повышена при любом типе течения РС, однако статистически значимые различия наблюдаются только между пациентами с ВАРС и условно здоровыми донорами. Распределение гермлайнов IGLV2-8, IGLV2-14 и IGLV2-23 не различается между пациентами с ДРС и условно здоровыми донорами, но их частота резко падает при развитии ВАРС. Интересно, что представленность гена зародышевой линии IGLV7-43, наоборот, находится примерно на одинаковом уровне у пациентов с ВАРС и условно здоровых доноров, но резко уменьшается у пациентов с ДРС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунологические исследования XXI века подтвердили ключевую роль В-регуляторного звена в поддержании иммунотолерантности, контроле и подавлении воспалительного ответа. На сегодняшний день все еще остается множество открытых вопросов о точном механизме регуляции, но очевидно, что нарушения в количестве Vreg и их функционировании приводят к возникновению целого ряда иммунологических патологий, среди которых особенно выделяется РС. Детальное прояснение механизмов регуляции воспалительного ответа Vreg позволит не только определить этиологию аутоиммунных патологий, но и может способствовать созданию терапии на основе Vreg в ближайшем будущем. Иммуноглобулины, экспонированные как антиген-специфичные рецепторы на поверхности В-клеток, а также в виде секретлируемых

антител играют важную роль в иммунном ответе. Прогресс последних лет в области широкомасштабного секвенирования позволяет исследовать репертуары иммуноглобулинов с беспрецедентно высоким уровнем детализации [32]. Таким образом, изучение структуры и функций иммуноглобулинов, их специфичности и эпигенетического статуса представляется чрезвычайно важным для понимания фундаментальных основ возникновения и прогрессии РС. В последние годы обнаруживается все больше закономерностей и стереотипных ответов антител, когда у разных индивидов вырабатываются иммуноглобулины, распознающие определенные антигенные эпитопы с использованием одних и тех же генов IgV [32–34]. Другими словами, определенные зародышевые линии иммуноглобулинов проявляют тропность к определенным антигенам. Соответственно, вариации использования некоторых генов зародышевой линии могут быть связаны с различной способностью организма генерировать эффективный иммунный ответ, что может проявляться в виде предрасположенности к различным заболеваниям, в том числе и аутоиммунной природы. Вполне вероятно, что различия в частоте встречаемости генов зародышевой линии у каждого конкретного индивида могут быть результатом противовирусного или аутоиммунного ответа организма. До начала антигензависимой дифференцировки В-клеток, обусловленной соматической гипермутацией генов иммуноглобулинов, разнообразие незрелых В-клеток, к которым относятся и транзиторные Vreg, практически полностью обусловлено конфигурацией генов зародышевой линии организма (V(D)J-рекомбинация). Поэтому детальное изучение репертуара иммуноглобулинов незрелых В-клеток у пациентов с различными аутоиммунными заболеваниями, в том числе РС, поможет обнаружить, какие именно перестройки в генах зародышевой линии способны приводить к функциональным нарушениям иммунной системы.

В настоящей работе показано, что распределение генов зародышевой линии иммуноглобулинов в популяции транзиторных Vreg у больных РС отличается от распределения у условно здорового человека. Особенно значимые отличия наблюдаются для гермлайнов IGLV1-44 и IGHV2-5. Ген лямбда-цепи IGLV1-44 практически не представлен в субпопуляции транзиторных Vreg условно здорового человека, но достоверно проявляется у пациентов с РС. При РС гермлайн IGHV4-31 встречается чаще как в общем пуле В-клеток, так и в субпопуляции транзиторных Vreg. С зародышевыми линиями IGHV2-26, IGHV2-5, IGHV2-70 тяжелой цепи наблюдается обратная картина – эти гермлайны,

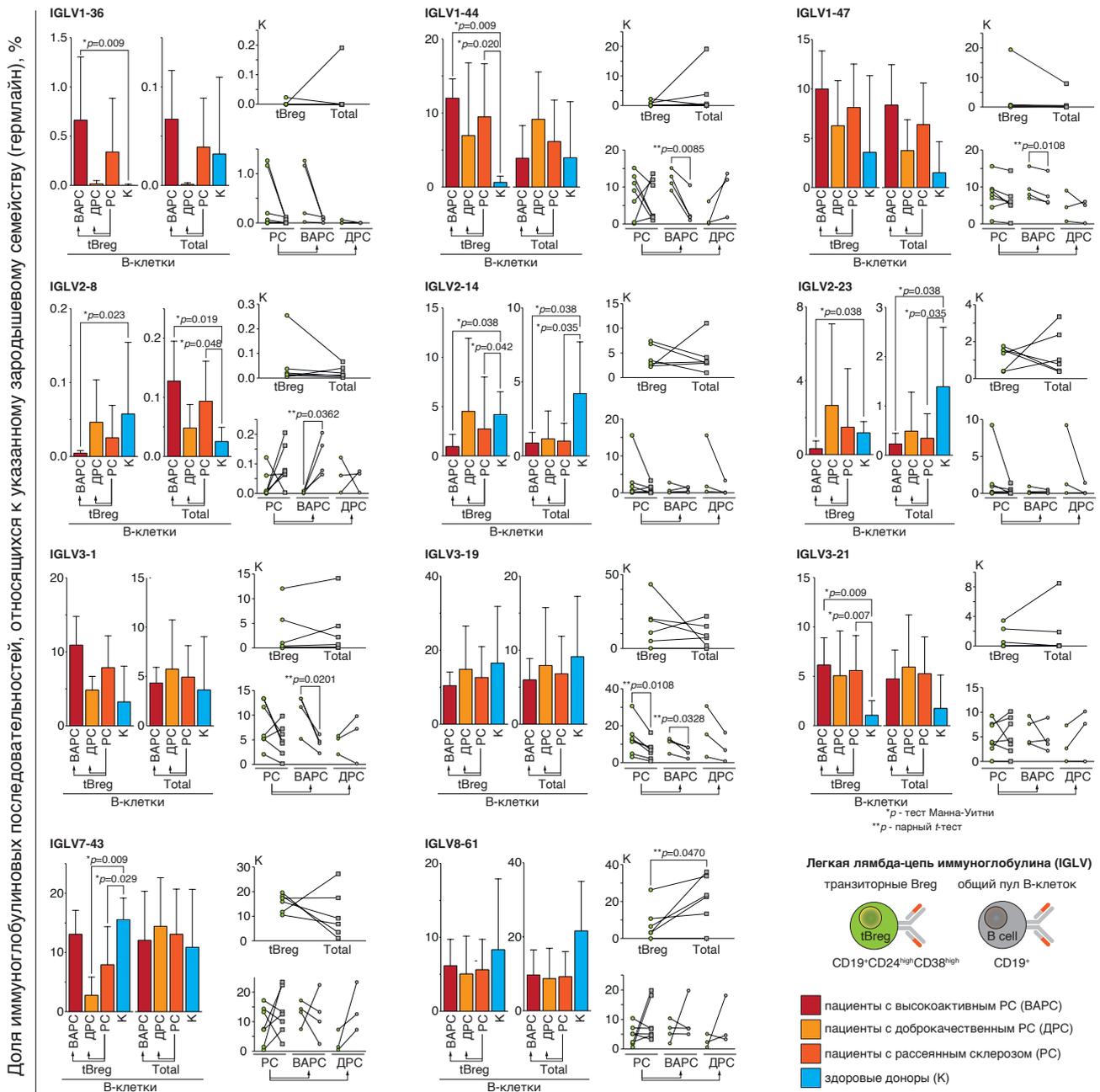


Рис. 3. Частота встречаемости генов зародышевой линии, кодирующих переменные фрагменты легкой ламбда-цепи (V_L) иммуноглобулинов у пациентов с РС и условно здоровых доноров. Проанализировано 26 функциональных V_L генов у пациентов с РС, пациентов с доброкачественным течением РС (ДРС) и высокоактивным РС (ВАРС). Контроль (К) – частота встречаемости генов иммуноглобулинов у условно здоровых доноров. Сравнивали распределение репертуара генов зародышевой линии между общим пулом В-клеток периферической крови ($CD19^+$) и транзитными Vreg ($tBreg$) с фенотипом $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$. Сравнение пациентов с разными типами течения РС и условно здоровых доноров изображено на гистограммах, где приведено среднее для каждой группы пациентов значение ($mean \pm SD$) доли последовательностей Ig, относящихся к указанному гену зародышевой линии. Справа от гистограммы приведена доля иммуноглобулиновых последовательностей, относящихся к указанному гену зародышевой линии, по отдельности для каждого пациента; сравниваются общий пул периферических В-клеток (total – серые точки) и субпопуляция транзитных регуляторных В-клеток ($tBreg$ – зеленые точки). Приведены данные только для тех генов зародышевой линии, у которых выявлены статистически значимые различия хотя бы одного анализируемого параметра (сравнение разных типов течения РС против условно здоровых доноров – тест Манна–Уитни; сравнение общего пула В-клеток с субпопуляцией транзитных Vreg ($tBreg$) – парный *t*-тест; изображены только статистически значимые значения *p*-value)

представленные, хоть и в небольшом количестве, практически у каждого здорового индивида, исчезают при развитии РС. При этом отличия от нормальных значений увеличиваются в случае более тяжелой формы заболевания. Интересно отметить, что ранее мы обнаружили также более существенные отличия в количестве транзиторных Vreg и уровне их зрелости у пациентов с ВАРС по сравнению с ДРС и условно здоровыми донорами [20]. Таким образом, нами показано, что более значимые сдвиги в репертуаре субпопуляции транзиторных В-регуляторных клеток с фенотипом CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} ассоциированы с осложненным течением РС. В целом, для всех зародышевых линий, кроме IGLV1-44, мы наблюдаем сходную картину – если при развитии РС изменяется частота встречаемости данного гена в общем пуле циркулирующих В-клеток, то сходная картина выявляется также и у транзиторных В-регуляторных клеток. Таким образом, отклонения в распределении генов иммуноглобулиновых рецепторов при развитии аутоиммунной патологии РС могут быть предопределены генетически и происходят уже

на ранней стадии созревания В-клеток. Дальнейшее развитие этой гипотезы требует расширения когорты пациентов, а также изучения различий в структуре и специфичности В-клеточных рецепторов других субпопуляций Vreg. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 18-74-10079 «Самособирающиеся генетически кодируемые наноконтейнеры как инструмент лечения рассеянного склероза», гранта РФФИ № 17-00-00229 (получение периферической крови больных рассеянным склерозом и здоровых доноров) и проекта 075-15-2021-1033 (13.2251.21.0111) в терминах широкомасштабного секвенирования.

Клеточный сортинг проводили с использованием оборудования, предоставленного ИБХ Центром коллективного пользования (ЦКП ИБХ РАН), поддержан Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (075-15-2020-807).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Thompson A.J., Baranzini S.E., Geurts J., Hemmer B., Ciccarelli O. // *Lancet*. 2018. V. 391. P. 1622–1636. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30481-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30481-1).
- Belogurov A., Kuzina E., Kudriaeva A., Kononikhin A., Kovalchuk S., Surina Y., Smirnov I., Lomakin Y., Bacheva A., Stepanov A., et al. // *FASEB J*. 2015. V. 29. P. 1901–1913. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259333>.
- Belogurov A.A., 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. P. 222–231. <https://doi.org/10.1096/fj.12-213975>.
- Belogurov A., Kudriaeva A., Kuzina E., Smirnov I., Bobik T., Ponomarenko N., Kravtsova-Ivantsiv Y., Ciechanover A., Gabibov A. // *J. Biol. Chem*. 2014. V. 289. P. 17758–17766. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.544247>.
- Gabibov A.G., Belogurov A.A., 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. P. 4211–4221. <https://doi.org/10.1096/fj.11-190769>.
- Lomakin Y.A., Zakharova M.Y., Stepanov A.V., Dronina M.A., Smirnov I.V., Bobik T.V., Pyrkov A.Y., Tikunova N.V., Sharanova S.N., Boitsov V.M., et al. // *Mol. Immunol*. 2014. V. 62. P. 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.01.013>.
- Baecher-Allan C., Kaskow B.J., Weiner H.L. // *Neuron*. 2018. V. 97. P. 742–768. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.021>.
- Ziganshin R.H., Ivanova O.M., Lomakin Y.A., Belogurov A.A., Kovalchuk S.I., Azarkin I.V., Arapidi G.P., Anikanov N.A., Shender V.O., Piradov M.A., et al. // *Mol. Cell. Proteomics*. 2016. V. 15. P. 2366–2378. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.056036>.
- Ramasamy R., Mohammed F., Meier U.C. // *Immunol. Lett*. 2020. V. 217. P. 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.imllet.2019.10.017>.
- Wekerle H., Hohlfeld R. // *N. Engl. J. Med*. 2003. V. 349. P. 185–186. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr035136>.
- Lomakin Y., Arapidi G.P., Chernov A., Ziganshin R., Tsyganov E., Lyadova I., Butenko I.O., Osetrova M., Ponomarenko N., Telegin G., et al. // *Front. Immunol*. 2017. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00777>.
- Lanz T.V., Brewer R.C., Ho P.P., Moon J.-S., Jude K.M., Fernandez D., Fernandes R.A., Gomez A.M., Nadj G.S., Bartley C.M., et al. // *Nature*. 2022. V. 603. P. 321–327. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04432-7>.
- Bjornevik K., Cortese M., Healy B.C., Kuhle J., Mina M.J., Leng Y., Elledge S.J., Niebuhr D.W., Scher A.I., Munger K.L., et al. // *Science*. 2022. V. 375. P. 296–301. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>.
- Gabibov A.G., Ponomarenko N.A., Tretyak E.B., Paltsev M.A., Suchkov S.V. // *Autoimmun. Rev*. 2006. V. 5. P. 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2006.01.004>.
- Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I., Belogurov A.A., 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. P. 281–286. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509849103>.
- Lomakin Y., Kudriaeva A., Kostin N., Terekhov S., Kaminskaya A., Chernov A., Zakharova M., Ivanova M., Simaniv T., Telegin G., et al. // *Sci. Rep*. 2018. V. 8. P. 12679. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30938-0>.
- Sokolov A.V., Shmidt A.A., Lomakin Y.A. // *Acta Naturae*. 2018. V. 10. P. 11–22.
- Ran Z., Yue-Bei L., Qiu-Ming Z., Huan Y. // *Front. Immunol*. 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01884>.
- Matsumoto M., Fujii Y., Baba A., Hikida M., Kurosaki T., Baba Y. // *Immunity*. 2011. V. 34. P. 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.016>.
- Lomakin Y.A., Zvyagin I.V., Ovchinnikova L.A., Kabilov M.R., Staroverov D.B., Mikelov A., Tupikin A.E., Zakharova M.Y., Bykova N.A., Mukhina V.S., et al. // *Front. Immunol*. 2022. V. 13. P. 3678. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.803229>.

21. Díaz C., Zarco L.A., Rivera D.M. // *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2019. V. 30. P. 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.01.039>.
22. Schaefer L.M., Poettgen J., Fischer A., Gold S., Stellmann J.P., Heesen C. // *Brain Behav.* 2019. V. 9. P. e01259. <https://doi.org/10.1002/brb3.1259>.
23. Sand I.K., Krieger S., Farrell C., Miller A.E. // *Mult. Scler. J.* 2014. V. 20. P. 1654–1657. <https://doi.org/10.1177/1352458514521517>.
24. Cheng J., Torkamani A., Grover R.K., Jones T.M., Ruiz D.I., Schork N.J., Quigley M.M., Hall F.W., Salomon D.R., Lerner R.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 560–565. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101148108>.
25. Bolotin D.A., Poslavsky S., Mitrophanov I., Shugay M., Mamedov I.Z., Putintseva E.V., Chudakov D.M. // *Nat. Meth.* 2015. V. 12. P. 380–381. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3364>.
26. Choi J.K., Yu C.R., Bing S.J., Jittayasothorn Y., Mattapallil M.J., Kang M., Park S.B., Lee H.S., Dong L., Shi G., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2021. V. 118. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2109548118>.
27. Radomir L., Kramer M.P., Perpinial M., Schottlender N., Rabani S., David K., Wiener A., Lewinsky H., Becker-Herman S., Aharoni R., et al // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. <https://doi.org/10.1038/S41467-021-22230-Z>.
28. Blair P.A., Noreña L.Y., Flores-Borja F., Rawlings D.J., Isenberg D.A., Ehrenstein M.R., Mauri C. // *Immunity.* 2010. V. 32. P. 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>.
29. Zhu H.-Q., Xu R.-C., Chen Y.-Y., Yuan H.-J., Cao H., Zhao X.-Q., et al. // *Br. J. Dermatol.* 2015. V. 172. P. 101–110. <https://doi.org/10.1111/bjd.13192>.
30. von Büdingen H.C., Kuo T.C., Sirota M., van Belle C.J., Apeltsin L., Glanville J., Cree B.A., Gourraud P.A., Schwartzburg A., Huerta G., et al. // *J. Clin. Invest.* 2012. V. 122. P. 4533–4543. <https://doi.org/10.1172/JCI63842>.
31. Owens G.P., Wings K.M., Ritchie A.M., Edwards S., Burgoon M.P., Lehnhoff L., Nielsen K., Corboy J., Gilden D.H., Bennett J.L. // *J. Immunol.* 2007. V. 179. P. 6343–6351. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.6343>.
32. Mikocziova I., Greiff V., Sollid L.M. // *Genes Immun.* 2021. V. 22. P. 205–217. <https://doi.org/10.1038/s41435-021-00145-5>.
33. Henry Dunand C.J., Wilson P.C. // *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2015. V. 370. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2014.0238>.
34. Wang Y., Yuan M., Lv H., Peng J., Wilson I.A., Wu N.C. // *Immunity.* 2022. V. 55. P. 1105–1117.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.03.019>.