

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

На правах рукописи

Овчинникова Лейла Александровна

*Структурно-функциональный анализ В-клеточного репертуара при рассеянном
склерозе*

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Научный руководитель:
Кандидат биологических наук
Ломакин Яков Анатольевич

Москва, 2024 г.

Оглавление

1. Введение.....	6
1.1. Актуальность темы исследования	6
1.2. Цель работы и поставленные задачи	7
1.3. Научная новизна и практическая значимость работы	8
1.4. Положения, выносимые на защиту.....	9
1.5. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации.....	9
1.6. Апробация работы.....	10
2. Обзор литературы.....	13
2.1. В-клеточное звено иммунной системы и современные методы изучения репертуаров иммуноглобулинов.....	13
2.1.1. Разнообразие В-клеточных субпопуляций	13
2.1.2. Этапы развития В-клеток. От клеток-предшественников до зрелых продуцентов антител.....	14
2.1.3. Роль В-клеток в иммунном ответе	19
2.1.4. Современные подходы изучения репертуаров иммуноглобулинов	23
2.1.4.1. Комбинаторные подходы изучения репертуаров иммуноглобулинов.....	24
2.1.4.2. Комбинаторные фаговые библиотеки	24
2.1.4.3. Комбинаторные библиотеки антител	25
2.1.4.4. PhIP-Seq – иммунопреципитация фагов с дальнейшим секвенированием	26
2.1.4.5. PLATO	28
2.1.4.6. Микрофлюидные подходы для изучения репертуаров единичных клеток.....	29
2.1.4.7. Технология правильного сочетания переменных фрагментов тяжёлых и лёгких цепей иммуноглобулинов	30
2.1.4.8. Секвенирование репертуаров единичных В-клеток.....	31
2.2. Роль В-клеток в развитии рассеянного склероза	32
2.2.1. Патологические аутоантитела при рассеянном склерозе.....	37
2.2.2. Презентация антигена и активация Т-клеточного звена В-клетками при рассеянном склерозе	40
2.2.3. Дисбаланс цитокинов, продуцируемых В-клетками при РС.....	41
2.2.4. Роль регуляторных В-клеток в развитии рассеянного склероза	43
3. Материалы и методы	46

3.1.	Пациенты и здоровые доноры.	46
3.2.	Методы работы с нуклеиновыми кислотами	47
3.2.1.	Полимеразная цепная реакция	47
3.2.2.	Эмульсионная ПЦР	47
3.2.3.	Разрушение эмульсии	48
3.2.4.	Олигонуклеотидные реагенты	49
3.2.5.	Подготовка библиотеки NGS и секвенирование библиотеки.....	49
3.2.6.	Рестрикция	50
3.2.7.	Лигирование	50
3.2.8.	Выделение плазмидной ДНК	50
3.2.9.	Электрофорез ДНК в агарозном геле	51
3.2.10.	Электрофорез ДНК в полиакриламидном геле.....	51
3.2.11.	Очистка ДНК из агарозного геля	51
3.2.12.	Очистка ДНК на магнитных частицах.....	51
3.3.	Методы работы с бактериями E.coli	52
3.3.1.	Получение электрокомпетентных клеток.....	52
3.3.2.	Трансформация E.coli методом электропорации	52
3.3.3.	Ночная культура.....	53
3.3.4.	Бактериальная экспрессия белков	53
3.3.5.	Выделение белков из растворимой фракции.....	53
3.4.	Методы работы с бактериофагами	54
3.4.1.	Экспрессия рекомбинантных бактериофагов.....	54
3.4.2.	Очистка фаговых частиц	54
3.5.	Методы работы с эукариотическими линиями клеток.....	55
3.5.1.	Культивирование клеточных линий.....	55
3.5.2.	Проточная цитометрия антиген-специфичных клеток, с окрашиванием бактериофагами	56
3.5.3.	Экспрессия полноразмерных антител человека.....	56
3.5.4.	Лентивирусный дисплей на клетках Jurkat.....	57
3.6.	Методы работы с В-клетками человека.....	58
3.6.1.	Выделение В-клеток из периферической крови	59
3.6.2.	Окрашивание В-клеток для определения различных субпопуляций.....	59
3.6.3.	Подготовка библиотек для секвенирования последовательностей иммуноглобулинов (RT-PCR)	60

3.6.4.	Широкомасштабное секвенирование переменных фрагментов VH, Vκ и Vλ иммуноглобулинов.....	61
3.6.5.	Анализ данных широкомасштабного секвенирования.....	61
3.6.6.	Анализ секреции IL-10 В-клетками.....	62
3.7.	Методы работы с белками.....	63
3.7.1.	Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле.....	63
3.7.2.	Имуноферментный анализ.....	63
3.7.3.	Металл-аффинная хроматография	64
3.7.4.	Аффинная хроматография Protein G	64
3.7.5.	Гель-фильтрация	64
3.8.	Измерения констант связывания антител методом поверхностного плазмонного резонанса	65
3.9.	Статистический анализ.....	65
4.	Результаты и обсуждения.....	66
4.1.	Поиск новых мишеней аутоиммунной агрессии при рассеянном склерозе	66
4.1.1.	Создание ДНК-библиотек, кодирующих перекрывающиеся фрагменты белков, ассоциированных с аутоиммунной агрессией	67
4.1.2.	Создание фаг-дисплейной библиотеки перекрывающихся фрагментов аутоантигенов на основе вектора fADL	75
4.1.3.	Разработка платформы для высокопроизводительного скрининга антиген-специфичных иммуноглобулинов на основе модельной библиотеки вирусных иммуногенов.....	79
4.1.4.	Идентификация кандидатных маркеров РС на основе данных PhIP-Seq.....	88
4.1.5.	Исследование реактивности сывороточных антител у пациентов с РС к антигенам ВЭБ, классическим миелиновым антигенам и пептидам, отобранным по результатам PhIP-Seq.....	90
4.1.6.	Изучение кросс-реактивности антиген-специфичных аутоантител, отобранных на кандидатные маркеры у пациентов с РС	94
4.1.7.	Независимая валидация выявленных антигенов методом ИФА и их значение в качестве клинических биомаркёров	97
4.2.	Анализ репертуаров иммуноглобулинов транзистентных В-регуляторных клеток пациентов с рассеянным склерозом и здоровых доноров.....	104
4.2.1.	Характеризация субпопуляции транзистентных В-регуляторных клеток	104
4.2.2.	Анализ репертуаров BCR транзистентных В-регуляторных клеток	107

4.2.3. Анализ частоты встречаемости генов зародышевой линии V _H , V _K , V _λ	111
4.2.4. Анализ зрелости субпопуляции транзитных В-регуляторных клеток у пациентов с РС и здоровых доноров	115
4.2.5. Повышение продукции IL-10 в субпопуляции CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD38 ^{high} клеток	118
5. Выводы	121
6. Благодарности	122
7. Список сокращений.....	123
8. Список цитированной литературы.....	126
9. Приложения	144
Приложение 1. Таблица 1. Клинические характеристики пациентов с РС и здоровых доноров, принявших участие в исследовании иммунного ответа на потенциальные мишени аутоиммунитета.	144
Приложение 2. Таблица 2. Клинические характеристики пациентов с РС, боковым амиотрофическим склерозом, заболеванием спектра оптиконевромиелита и здоровых доноров, принявших участие в независимом исследовании иммунного ответа на потенциальные мишени аутоиммунитета.	146
Приложение 3. Таблица 3. Клинические характеристики пациентов с РС и здоровых доноров, принявших участие в исследовании В-клеточного репертуара и CD27 фенотипическом анализе.....	149
Приложение 4. Таблица 4. Клинические характеристики вакцинированных и невакцинированных доноров для изучения функциональности фаговой библиотеки RVD.	151
Приложение 5. Таблица 5. Список праймеров, использованных для секвенирования индивидуальных репертуаров V _H , V _K и V _λ генов иммуноглобулинов.....	152

1. Введение

1.1. Актуальность темы исследования

В-клетки являются неотъемлемой частью адаптивного звена иммунитета, обеспечивающего высокоспецифичную защиту организма от патогенов. Нарушения в правильном функционировании В-клеток способны привести к серьезным патологиям, в том числе аутоиммунного спектра. Изучение В-клеточного репертуара человека является важнейшей задачей современной иммунологии, способной прояснить молекулярные основы формирования аутоиммунных патологий, в частности, рассеянного склероза (РС) – нейровоспалительного заболевания, возникающего в результате потери толерантности к собственным антигенам у генетически предрасположенных лиц. РС является одним из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний – 35.9 случаев на 100000 [1]. Во всем мире с этим диагнозом живут порядка 2.8 млн человек. Средний возраст постановки диагноза – 32 года, при этом риск заболеть у женщин в 2 раза выше, чем у мужчин [1]. Такая высокая заболеваемость среди населения трудоспособного возраста делает РС социально значимой патологией. В настоящий момент этиология и молекулярные механизмы развития данного заболевания до конца не ясны, однако существуют неоспоримые доказательства участия В-клеточного звена в прогрессировании данного заболевания. Пробелы в знании молекулярных механизмов развития РС приводят к тому, что терапия данного заболевания сводится лишь к увеличению периодов ремиссии у пациентов и не приводит к полному выздоровлению. Большой интерес представляет изучение отдельных субпопуляций В-клеток, и в особенности, В-регуляторных клеток (Vreg). Ранее было показано, что дефицит Vreg или снижение их противовоспалительной активности может приводить к иммунологическим дисфункциям. При этом, точные механизмы развития и функционирования Vreg изучены лишь частично. Также, очень мало известно о репертуаре их В-клеточных рецепторов (BCR) у пациентов с РС. Подробное изучение репертуаров Vreg может способствовать прояснению молекулярных механизмов развития и

прогрессирования РС, что в дальнейшем позволит скорректировать терапию данного заболевания с учетом особенностей его протекания.

Для осуществления успешной терапии РС, крайне важна его ранняя диагностика, так как воспалительные процессы в ЦНС приводят к утрате жизненно важных функций и инвалидизации. Первостепенной задачей терапии РС является снижение темпов развития нейровоспаления и, соответственно, инвалидизации пациентов. Однако при поздней диагностике РС некоторые функции организма могут быть утрачены безвозвратно. В настоящее время диагностика данного заболевания возможна только после первых клинических проявлений [2] и заключается в магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного и спинного мозга [3]. Данный метод не является скрининговыми и проводится чаще всего по показаниям, что приводит к тому, что у некоторых пациентов заболевание диагностируется спустя годы, когда возможности ранней терапии уже упущены. Имеющийся арсенал потенциальных биомаркёров РС, основанный на характерных белках и аутоантителах, не является универсальным для всех доноров с РС. Даже классические антимиелиновые антитела, не присутствуют постоянно у пациентов с РС и могут также быть обнаружены у здоровых доноров. Таким образом, определение спектра целевых аутоантигенов, вызывающих аутоиммунное воспаление, имеет решающее значение как для фундаментальной науки, так и для клинической диагностики. В связи с вышесказанным, нам представляется крайне важным изучение особенностей репертуаров иммуноглобулинов у пациентов с РС и поиск новых, ранее не изученных потенциальных мишеней аутоиммунного ответа.

1.2. Цель работы и поставленные задачи

Цель данной работы заключалась в изучении репертуаров В-клеток человека в норме и при РС. Для достижения поставленной цели были предложены следующие экспериментальные **задачи**:

1. Разработка и оптимизация протокола эффективной амплификации сложных ДНК-матриц в каплях эмульсии для возможности создания библиотек

перекрывающихся пептидов с равномерным распределением индивидуальных клонов.

2. Создание фаг-дисплейной библиотеки белков человека, ассоциированных с аутоиммунными патологиями, для поиска потенциальных мишеней аутоантител у пациентов с РС.
3. Разработка платформы для высокопроизводительного скрининга репертуаров антиген-специфичных иммуноглобулинов человека.
4. Поиск потенциальных мишеней аутоиммунной агрессии у пациентов с РС с использованием полученной фаг-дисплейной библиотеки аутоантигенов и технологии фаговой иммунопреципитации.
5. Сравнительный анализ субпопуляций транзистентных регуляторных В-клеток пациентов с РС и здоровых доноров.

1.3. Научная новизна и практическая значимость работы

В теоретической части работы рассмотрена роль В-клеточного звена в развитии РС, а также новейшие методы изучения репертуаров В-клеточных рецепторов.

В практической части данной работы приводятся результаты исследований по двум смежным направлениям, полученные нами при выполнении поставленных задач. Первое направление связано с исследованием специфичности антительного ответа при РС. Нами разработан и оптимизирован метод амплификации сложных ДНК-матриц в каплях эмульсии, позволяющий добиться уменьшения количества ПЦР-ошибок и увеличения выхода продукта реакции. С использованием данного метода создана пептидная фаг-дисплейная библиотека потенциальных аутоиммунных мишеней человека. С использованием полученной библиотеки впервые выявлены 3 ранее не ассоциированных с РС кандидатных маркера (альфа цепь спектрина 1 (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄), периаксин (PRX₄₅₁₋₄₉₄), тирозинкиназа-6 (РТК₆₃₀₁₋₃₄₄)). Также нами разработана платформа, позволяющая осуществлять высокопроизводительный скрининг антиген-специфичных иммуноглобулинов. Вторая часть работы посвящена изучению транзистентных регуляторных В-клеток

(tBreg) с фенотипом CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} у пациентов с РС. В этой части работы приводятся данные, демонстрирующие замедленное созревание популяции tBreg при развитии РС.

Результаты, представленные в данной диссертационной работе, расширяют понимание молекулярных механизмов, способствующих развитию РС, и углубляют существующие знания о гетерогенности аутоиммунного ответа при РС, а также о роли В-клеток в его формировании.

1.4. Положения, выносимые на защиту

1. Показано, что проведение ПЦР в каплях эмульсии способствует более равномерной амплификации сложных матриц ДНК. Оптимизирован протокол амплификации сложных матриц ДНК в каплях эмульсии.
2. Создана платформа для высокопроизводительного скрининга иммуноглобулинов, позволяющая отбирать антиген-специфичные антитела.
3. С использованием фаг-дисплейной библиотеки идентифицированы потенциальные аутоантигены, которые могут участвовать в развитии РС (альфа цепь спектрина 1(SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄), периаксин (PRX₄₅₁₋₄₉₄), тирозинкиназа-6 (РТК₆₃₀₁₋₃₄₄)).
4. Обнаружено повышенное содержание субпопуляции tBreg (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}) в периферической крови пациентов с РС.
5. Широкомасштабное секвенирование В-клеточных рецепторов tBreg (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}) показало, что вариабельные фрагменты тяжёлых и лёгких каппа цепей иммуноглобулинов у пациентов с РС менее мутированы по сравнению с таковыми у здоровых доноров.

1.5. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Все экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации проведены лично соискателем или при его непосредственном участии под

руководством к.б.н., с.н.с. Ломакина Я. А. и академика, д.х.н. проф. Габимова А. Г. Личный вклад автора диссертации в представленной работе складывается из непосредственного участия в разработке цели и задач исследований по теме диссертационной работы, проведении исследований, обосновании полученных результатов. Основные эксперименты по оптимизации протоколов и постановке эмульсионной ПЦР, созданию фаг-дисплейной библиотеки потенциальных аутоиммунных мишеней человека, анализу антител из сывороток крови пациентов с РС, поиску потенциальных мишеней аутоиммунной агрессии у пациентов с РС, цитофлуориметрическому анализу В-клеточных субпопуляций пациентов с РС и здоровых доноров, описанные в диссертации, выполнены лично автором. Работа по изучению амплификации сложных матриц ДНК выполнена в соавторстве с Елисеевым И.Е. Автор диссертации были разработаны методы эмульсификации и подобраны условия амплификации, проведен количественный анализ продуктов. Елисеевым И.Е. был проведен анализ данных секвенирования следующего поколения (NGS) для библиотек, изучены ошибки в фрагментах ДНК и построена теоретическая модель, описывающая процесс амплификации. Работа по скринингу лиганд-рецепторных взаимодействий выполнена в соавторстве с Ишиной И.А. Автором лично были получены результаты экспериментов по подбору фагового вектора fADL и верификации специфичности связывания фаг-дисплейных библиотек с эукариотическими клетками линии *Raji*, описываемые в данной работе.

1.6. Апробация работы

V Международный форум “Дни вирусологии 2024” (30 сентября – 1 октября 2024, Санкт-Петербург, Россия), III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (3–8 октября 2021, Дагомыс, Россия), Международный конгресс “The 43rd FEBS Congress” (2018, Прага, Чехия).

По теме диссертационной работы опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах:

1. Lomakin Y.A., **Ovchinnikova L.A.**, Terekhov S.S., Dzhelad S.S., Yaroshevich I., Mamedov I., Smirnova A., Grigoreva T., Eliseev I.E., Filimonova I.N., Mokrushina Y.A., Abrikosova V., Rubtsova M.P., Kostin N.N., Simonova M.A., Bobik T.V., Aleshenko N.L., Alekhin A.I., Boitsov V.M., Zhang H., Smirnov I.V., Rubtsov Y.P., Gabibov A.G. Two-dimensional high-throughput on-cell screening of immunoglobulins against broad antigen repertoires // **Commun. Biol**, 2024. V.7., № 842.
2. **Овчинникова Л.А.**, Джелад С.С., Симанив Т.О., Захарова М.Н., Габибов А.Г., Ломакин Я.А. Уровень противовирусных антител к белку EBNA-1 в сыворотке крови пациентов с рассеянным склерозом не зависит от тяжести заболевания // **Доклады российской академии наук. Науки о жизни**, 2024. Т. 515., С. 92–96.
3. 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., Favorov A.V., Ivanova M., Simaniv T., Rubtsov Y.P., Chudakov D.M., Zakharova M.N., Illarioshkin S.N., Belogurov A.A., Gabibov A.G. Deconvolution of B cell receptor repertoire in multiple sclerosis patients revealed a delay in tBreg maturation // **Front Immunol**, 2022. V.13.
4. **Ovchinnikova L.A.**, Zalevsky A.O., Lomakin Y.A. Extracellular Vesicles in Chronic Demyelinating Diseases: Prospects in Treatment and Diagnosis of Autoimmune Neurological Disorders // **Life (Basel)**, 2022. V.12., № 11.
5. Ломакин Я.А., **Овчинникова Л.А.**, Захарова М.Н., Иванова М.В., Симанив Т.О., Кабилов М.Р., Быкова Н.А., Мухина В.С., Каминская А.Н., Тупикин А.Е., Захарова М.Ю., Фаворов А.В., Иллариошкин С.Н., Белогуров А.А., Габибов А.Г. Смещение репертуара генов зародышевой линии В-клеточных рецепторов при рассеянном склерозе // **Acta Naturae**, 2022. Т. 14., № 4. С. 84–93.
6. Terekhov S.S., Eliseev I.E., **Ovchinnikova L.A.**, Kabilov M.R., Prjibelski A.D., Tupikin A.E., Smirnov I.V., Belogurov A.A., Severinov K.V., Lomakin

Y.A., Altman S., Gabibov A.G. Liquid drop of DNA libraries reveals total genome information. // **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2020. V. 117., № 44. P. 27300-27306.

7. Ishina I.A., Filimonova I.N., Zakharova M.Y., **Ovchinnikova L.A.**, Mamedov A.E., Lomakin Y.A., Belogurov A.A. Exhaustive Search of the Receptor Ligands by the CyCLOPS (Cytometry Cell-Labeling Operable Phage Screening) Technique // **Int J Mol Sci**, 2020. V. 21., № 17.

2. Обзор литературы

2.1. В-клеточное звено иммунной системы и современные методы изучения репертуаров иммуноглобулинов

2.1.1. Разнообразие В-клеточных субпопуляций

С момента выделения В-клеток в отдельную популяцию [4], им приписывается важнейшая роль в функционировании иммунитета, особенно в контексте аутоиммунных патологий, иммунодефицитов, инфекций и онкологических заболеваний. С течением времени существенно прогрессировало понимание того, как В-клетки развиваются, созревают и функционируют, эти знания легли в основу различных стратегий классификации В-клеток. Субпопуляции В-клеток выделяют на основании их статуса дифференцировки (В-клетки-предшественники, периферические В-клетки), локализации в компартментах В-клеточного фолликула (В-клетки маргинальной зоны, В-клетки лимфоцитарной короны, В-клетки центра фолликула) и линии развития (В-1, В-2) [5]. Основная, самая многочисленная субпопуляция В-клеток – В-2, возникает из клеток костного мозга и может быть дополнительно классифицирована на фолликулярные В-клетки и В-клетки маргинальной зоны [6]. Фолликулярные В-2 клетки составляют порядка 70% от общего пула В-клеток в организме человека, их принято считать классическими В-лимфоцитами. В-2 клетки являются частью адаптивного иммунного ответа, вносят основной вклад в элиминацию чужеродных антигенов и опосредуют гуморальный иммунитет. Клетки В-2 могут продуцировать высокоаффинные антитела и генерировать иммунологическую память [7]. В-1-клеточная субпопуляция возникает из печени плода. Часто данная субпопуляция подразделяется на В-1а (CD5⁺) и В-1б (CD5⁻). Данные клетки эффективно распознают аутоантигены и обеспечивают иммунитет слизистых оболочек и пищеварительного тракта [8]. Отвечая, в основном, на тимус-независимые антигены, В-1 клетки продуцируют низкоаффинные антитела IgM с широкой реактивностью [9]. Работы по анализу генов цепей иммуноглобулинов показали, что использование V-генов тяжёлых цепей клетками В-1 более

ограничено, чем у взрослых клеток В-2, и напоминает использование V-генов В-клетками эмбрионального происхождения. Также клетки В-1 имеют меньше нематричных нуклеотидных вставок в своих генах иммуноглобулинов, чем клетки В-2 [10].

Общие для большинства В-клеток поверхностные маркеры – CD45 (общий лейкоцитарный антиген), CD19 и CD20 (В-лимфоцитарные антигены), однако для выделения определённых В-клеточных субпопуляций могут использоваться такие маркеры как CD22, CD24, CD38, CD27 и другие (**Рисунок 1**).

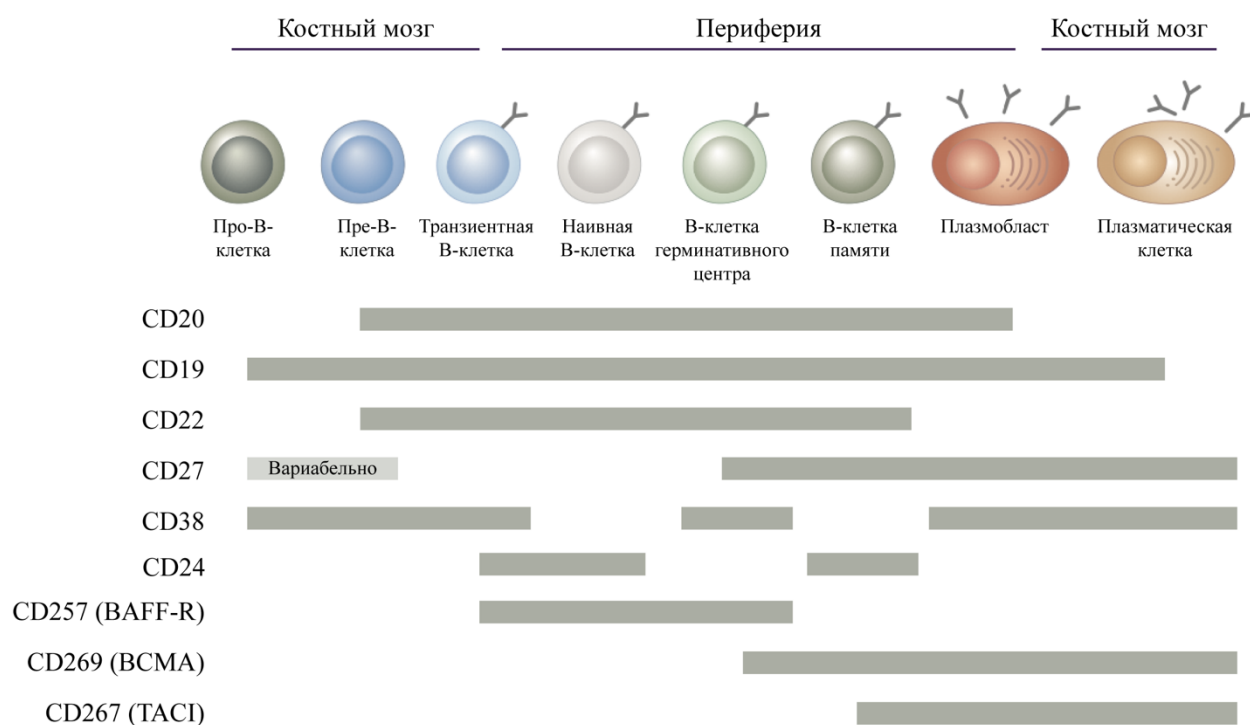


Рисунок 1. Характерные маркеры В-клеток. На рисунке представлена обобщенная схема дифференцировки В-клеток и экспрессия различных молекулярных маркеров на поверхности клеток. Горизонтальные полосы обозначают экспрессию конкретных маркеров на разных стадиях развития В-клеток. Адаптировано из [11], данные по экспрессии CD24, BAFF-R, BCMA, TACI из [12,13].

2.1.2. Этапы развития В-клеток. От клеток-предшественников до зрелых продуцентов антител.

Развитие В-клеток начинается в костном мозге (КМ), где под действием специальных сигналов, из стволовых кроветворных клеток (HSC) формируются мультипотентные клетки-предшественники (MPP), затем общие предшественники

лимфоидных клеток (CLP), которые превратятся в В-клетки, Т-клетки [14], либо врожденные лимфоидные клетки [15]. Ранние стадии развития В-клеток напрямую зависят от стромальных клеток КМ и поступающих от них сигналов. Для запуска дифференцировки из HSC в MPP, рецепторной тирозинкиназе FLT3, экспрессированной на HSC необходимо связаться со своим лигандом на стромальной клетке [16]. Для удержания клеток предшественников лимфоцитов стромальные клетки КМ экспрессируют хемокин CXCL12 [17]. Дальнейшая дифференцировка MPP в CLP происходит благодаря связыванию IL-7, который также продуцируется стромальными клетками [18]. Другой важный для развития В-лимфоцитов цитокин – фактор стволовых клеток (SCF). Он взаимодействует с рецепторной тирозинкиназой c-KIT на поверхности предшественников В-клеток – ранних про-В-клеток [19]. Выбор В-клеточного пути развития происходит за счёт индукции фактора транскрипции, специфичного к В-клеточной линии (E2A), который в свою очередь запускает экспрессию раннего В-клеточного фактора (EBF). Данные факторы транскрипции работают синергично, способствуя экспрессии генов В-клеточной линии. Фактор транскрипции Pax5 при этом блокирует альтернативные линии развития. Вместе данные факторы определяют путь развития В-клеток [20]. Факторы E2A и EBF индуцируют экспрессию белков, запускающих реаранжировку генов иммуноглобулинов – V(D)J-рекомбинацию. Данный процесс затрагивает сначала только гены тяжёлых цепей иммуноглобулинов и начинается на стадии общего лимфоидного предшественника, при этом основные события происходят на стадии ранних про-В-клеток. Успешная перестройка тяжёлых цепей приводит к появлению тяжёлой цепи у раннего пре-В-клеточного рецептора (BCR, B cell receptor). Далее запускается перестройка генов лёгких цепей иммуноглобулинов, успешное завершение которой характеризуется экспрессией полной молекулы IgM на поверхности клеток. Такие клетки переходят в стадию незрелых лимфоцитов и покидают КМ для дальнейшего созревания.

По мере своего развития предшественники В-клеток мигрируют внутри КМ. Преобладающей локализацией стволовых клеток является внутренняя поверхность

полостей трубчатых костей, далее предшественники В-клеток контактируют со стромальными клетками в трабекулярных пространствах и постепенно, по мере созревания, мигрируют в центральный синус, чтобы выйти из КМ и продолжить созревание в периферических лимфоидных органах.

Для запуска гуморального иммунного ответа необходимо, чтобы В-клетка встретила свой антиген. Это событие происходит во вторичных лимфоидных органах (селезёнка, лимфатические узлы, Пейеровы бляшки) с участием специфических иммунных клеток, презентующих обработанный антиген наивным В-клеткам. В лимфатическом узле, например, существуют фолликулярные дендритные клетки (ФДК), которые эффективно захватывают и экспонируют опсонизированные антигены на сети своих дендритных отростков. В отличие от других клеток, способных захватывать антигены, ФДК не являются фагоцитирующими клетками и способны экспонировать интактные антигены на своей поверхности в течении нескольких недель [21]. Другая роль ФДК – продукция хемокина CXCL13 [22], привлекающего В-клетки в фолликулы. ФДК также являются важным источником факторов и цитокинов, необходимых для выживания лимфоцитов, в частности, фактора семейства TNF, активирующего В-клетки – BAFF (англ. B-cell activating factor) и индуцирующего пролиферацию лиганда – APRIL (англ. A proliferation-inducing ligand). BAFF и APRIL относятся к семейству лигандов TNF, обеспечивающие выживание В-клеток на различных этапах развития [23]. BAFF и APRIL имеют два общих рецептора: TACI (англ. Transmembrane activator and CAML interactor; CD267) и антиген созревания В-клеток (BCMA, англ. B-cell maturation antigen; CD269). Кроме того, BAFF связывается с рецептором BAFF (BAFF-R; CD257). Данные рецепторы (BAFF-R, TACI и BCMA) имеют различные паттерны экспрессии, основанные на стадиях развития В-клеток и связанные с их отдельными функциями (**Рисунок 1**) [24]. BAFF жизненно важен для созревания В-клеток, поддерживает переход В-клеток на различные стадии развития, а также необходим для поддержания зрелых В-клеток, способствуя их выживанию и гомеостазу. Функции APRIL более ограничены по сравнению с BAFF. В первую очередь он влияет на более поздние

стадии развития В-клеток, особенно на дифференцировку плазматических клеток [25]. Дизрегуляция или сверхэкспрессия любого из данных цитокинов способны приводить к аутоиммунным заболеваниям вследствие выживания аутореактивных клонов В-клеток [24].

В фолликуле происходит встреча В-клеток с антигеном. Передача сигнала от BCR, запускает в клетке каскады реакций, приводящие к её активации. Несмотря на фундаментальную значимость данного процесса, фактический механизм, с помощью которого связывание антигена активирует BCR остается изученным не до конца [26]. Одна модель описывает кластеризацию BCR в ответ на связывание антигена, другая напротив – диссоциацию таких кластеров после связывания антигенов. Однако крайне важным для дальнейшей активации клетки является связывание корцепторными молекулами своих лигандов. Наивные В-клетки экспрессируют мембраносвязанный иммуноглобулин IgM и/или IgD, в котором отсутствуют значительные внутриклеточные домены, поэтому передача сигнала зависит от ассоциированных молекул, в частности, $Ig\alpha$ и $Ig\beta$. Данные молекулы связаны с IgM и IgD и содержат внутриклеточные мотивы ITAM, которые могут фосфорилироваться тирозинкиназами и таким образом передавать сигнал внутрь клетки. Дополнительный сигнал передается через молекулы CD19, которые запускают сигнальные пути PI3/Akt [27]. Таким образом, сигналы, передаваемые от комплекса BCR-корцепторные молекулы, приводят к изменениям в экспрессии многочисленных генов, включая активацию костимулирующих молекул (CD86, CD80), молекул адгезии (ICAM1), рецепторов миграции, молекул, способствующих выживанию, и клеточных рецепторов и генов, связанных с клеточным циклом [26]. После связывания антигена, BCR интернализуется для того, чтобы связанный антиген процессировался и подвергнулся презентации Т-хелперам в составе главного комплекса гистосовместимости 2 класса (MHC-II, major histocompatibility complex). Дальнейший этап, необходимый В-клеткам для формирования ответа на антиген – клеточная пролиферация. Классический механизм, запускающий пролиферацию В-клеток, заключается в получении сигналов от Т-хелперов, а именно – взаимодействие с CD40L и связывание IL-21 и

II-4. Однако, существуют также Т-независимые ответы на антиген. Т-независимый ответ 1-го типа происходит при наличии сильного сигнала от корцепторных молекул (например, TLR). Т-независимый ответ 2-го типа запускается поливалентными антигенами и усиливается в присутствии цитокинов [28]. После активации В-клетки может пройти переключение классов иммуноглобулинов. Во время данного процесса происходит перестройка константной части локуса IGH, переменная часть при этом остается нетронутой [29]. Переключение классов иммуноглобулинов является важным этапом для В-клетки, так как различные классы иммуноглобулинов выполняют в организме различные функции. Процесс переключения классов является динамическим – в течение жизни клетка может несколько раз поменять класс секретируемых иммуноглобулинов. При этом наиболее медленно протекает процесс переключения с незрелых IgM/IgD на активированные IgG/IgA/IgE [29]. Важнейшее отличие зрелых рецепторов от незрелых IgM/IgD – наличие внутриклеточных сигнальных доменов, способных усиливать сигнал от BCR и проводить его внутрь клетки [30]. Дальнейшее развитие активированных В-клеток может пойти по трём возможным направлениям: (1) дифференцировка в короткоживущие плазматические клетки, (2) дифференцировка в В-клетки герминативного центра, которые после повторной активации способны дифференцироваться в долгоживущие плазматические клетки или В-клетки памяти, (3) дифференцировка в клетки памяти, независимые от герминативного центра [31]. Было показано, что начальная аффинность наивного BCR по отношению к антигену, а также количество клеток предшественников с определенным классом генов зародышевой линии влияют на выбор пути дифференцировки и эффективность иммунного ответа. На примере антигена ВИЧ в модели иммунизации мышей установлено, что использование антигена с высокой аффинностью к BCR при низкой частоте клеток-предшественников (~1 клетка на 1 000 000 В-клеток) приводит к значительной экспансии клонов и формированию клеток памяти. При низкой аффинности антигена формирование клеток памяти было минимально [32].

2.1.3. Роль В-клеток в иммунном ответе

В организме человека В-клетки выполняют множество функций (**Рисунок 2**). Особо выделяют: (1) эффекторную функцию – способность при помощи провоспалительных цитокинов активировать эффекторные клетки, (2) регуляторную функцию – подавление клеточной активации за счет противовоспалительных цитокинов, (3) презентацию антигена Т-клеткам и (4) продукцию антител.

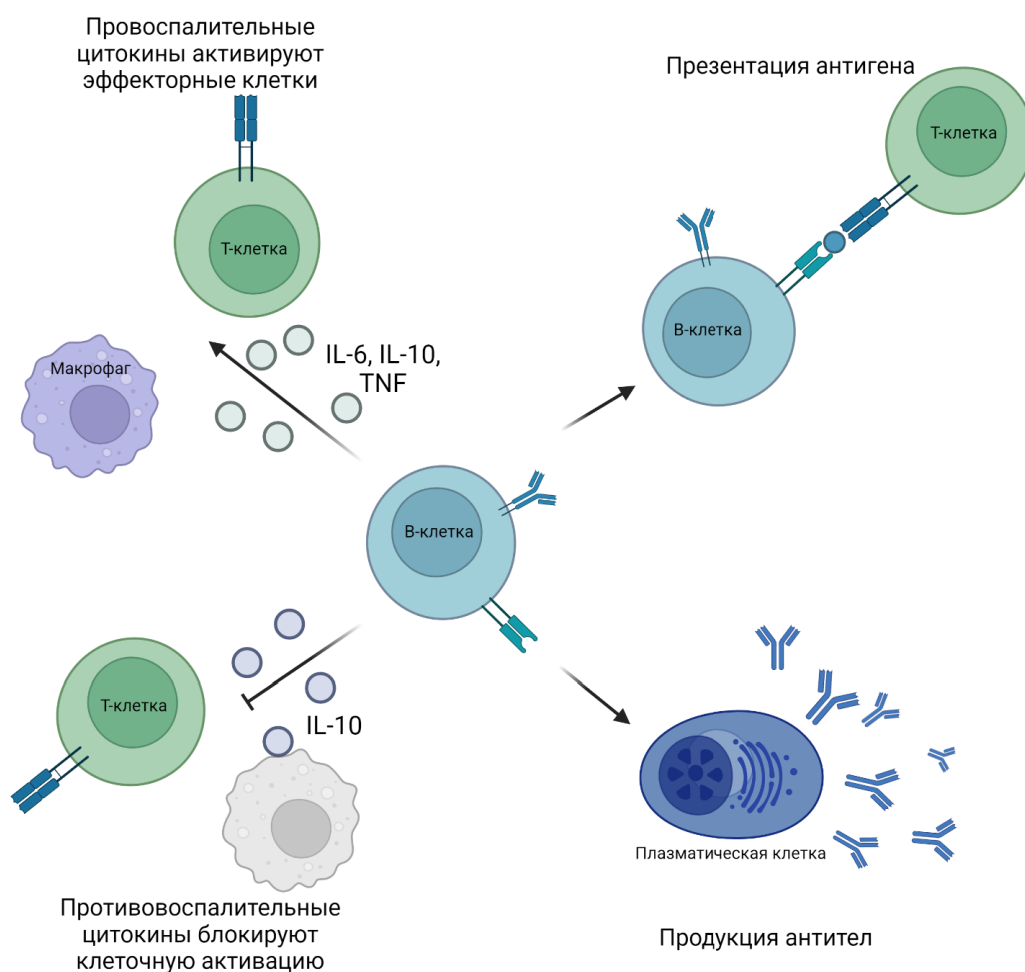


Рисунок 2. Роль В-клеток в иммунитете. Изображены четыре основные функции В-клеток в организме: (1) эффекторная функция, заключающаяся в активации эффекторных Т-клеток и макрофагов при помощи провоспалительных цитокинов; (2) регуляторная функция, реализующаяся за счёт секреции противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-35, TGF- β) и/или межклеточных взаимодействий; (3) презентация антигена и (4) продукция антител.

Традиционно основной функцией В-клеток в организме считалась продукция антител. Текущая модель В-клеточного иммунитета предполагает наличие двух

рубежей защиты организма от патогенов при помощи антител. На первом рубеже защиты чужеродные антигены эффективно связываются высокоаффинными антителами долгоживущих плазматических клеток [31]. Такие клетки прошли множество раундов соматических гипермутаций и конститутивно секретируют полностью созревшие высокоаффинные антитела [33]. Эти долгоживущие плазматические клетки могут существовать в течение всей жизни человека, не претерпевая клеточное деление [34]. Однако, некоторые вариативные патогены могут избегать связывания такими антителами за счёт сформировавшейся изменчивости. Поэтому второй рубеж составляют В-клетки памяти, продуцирующие менее аффинные, но более разнообразные антитела [31]. В-клетки памяти человека характеризуются экспрессией поверхностного маркера CD27. Эти клетки находятся в состоянии покоя, не требуют постоянной антигенной стимуляции для выживания. Во время реактивации В-клетки памяти могут дифференцироваться в клетки, секретирующие антитела, и/или В-клетки зародышевого центра, и это зависит от класса иммуноглобулинов, которые они несут на своей поверхности. IgG⁺ В-клетки памяти человека дифференцируются в клетки, секретирующие антитела, а IgM⁺ В-клетки памяти предрасположены к образованию В-клеток зародышевого центра [35]. Немного обособленно от В-клеток памяти и долгоживущих плазматических клеток находятся короткоживущие плазматические клетки. Данные клетки секретируют низкоаффинные антитела, которые важны для начальной защиты от патогенов, и живут всего несколько дней [36].

С момента открытия в 1975 году Кёлером и Мильштейном гибридомной технологии, моноклональные антитела активно используются для различных терапевтических и научных целей. Серологический ответ после вирусной инфекции или вакцинации состоит из пула поликлональных антител против различных антигенных детерминант. Молекулярная деконволюция репертуара антител после вакцинации может обеспечить более полное понимание эффективности и механизма действия вакцин, чем традиционные методы. Развитие технологий скрининга репертуаров В-клеток и методов биоинженерии позволяют

отбирать природные антитела с заданной специфичностью. На данный момент, несмотря на потенциальные ограничения, терапевтические антитела активно используются в клинике для купирования различных состояний. Примером использования таких антител являются моноклональные антитела против CD38. Такие препараты на их основе, как Daratumumab и Isatuximab используются для терапии множественной миеломы и обладают плеiotропным действием, включая Fc-зависимые иммунные эффекторные механизмы, прямую апоптотическую активность и иммуномодулирующие эффекты за счет элиминации CD38⁺ иммуносупрессорных клеток [37]. Антитела также могут использоваться для терапии аутоиммунных состояний, например для лечения РС используют анти-CD20 [38]. Эпидемия COVID-19 стала катализатором поиска вирус-нейтрализующих антител. Всего за несколько лет были разработаны десятки терапевтических антител [39,40].

Важнейшей функцией В-клеток, не связанной с продукцией антител является презентация антигена [41]. Способность В-клеток захватывать антигены и представлять их Т-хелперам в виде пептидных фрагментов на молекулах комплекса МНС-II является одним из ключевых этапов адаптивного иммунного ответа. При этом имеется большое число антигенов, которые могут быть презентируемы исключительно В-клетками, а не другими АПК [42]. Более удивительна недавно открытая способность В-клеток презентировать комплексы МНС-II-пептид, которые они получают от ДК. В процессе, называемом трогацитозом, В-клетки маргинальной зоны при помощи рецептора CR2 способны переносить комплекс МНС-II-пептид от мембраны ДК на свою мембрану и таким образом презентировать Т-клеткам МНС-II, которые они не генерируют сами, а приобретают из ДК [43].

При стимуляции через BCR, TLR и/или CD40L В-клетки активируются и могут начать продуцировать различные цитокины, как противовоспалительные IL-10, IL-35, трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), так и провоспалительные IL-6, TNF [44]. В-клетки способны продуцировать и другие эффекторные молекулы, такие как лимфотоксины [45] и гранзимы [46]. Полученный из В-клеток

гранзим В (GrB) может опосредовать множество функций: лизис зараженных или опухолевых клеток [47], апоптотическую гибель аутореактивных В-клеток, а также подавление других иммунных клеток [46]. Кроме того, для противовирусной защиты В-клетки могут активировать секрецию лимфотоксина TNF- β . Связывание лимфотоксинов с рецепторами LT β R инициирует дифференцировку стромальных клеток и макрофагов в лимфоидных органах и быструю продукцию IFN-I в ответ на вирусные инфекции независимо от традиционных сигнальных систем TLR [48].

В-клетки, способные секретировать противовоспалительные цитокины выделяют в отдельную субпопуляцию регуляторных В-клеток (Breg). Фундаментальный интерес к этой популяции 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 контроле аутоиммунных и лимфопролиферативных патологий. Ранее было показано, что субпопуляция транзистентных Breg продуцирует IL-10, регулирует пролиферацию/дифференцировку CD4⁺ Т-клеток в сторону Т-хелперных эффекторных клеток [49] и способствует дисбалансу цитокинов при аутоиммунных заболеваниях [50]. Таким образом, для выполнения своих функций В-регуляторные клетки взаимодействуют со множеством других клеток иммунной системы (**Рисунок 3**). Известно, что Breg необходимы для правильного функционирования здоровой иммунной системы, а также могут играть как протективную, так и патологическую роль при различных заболеваниях [51].

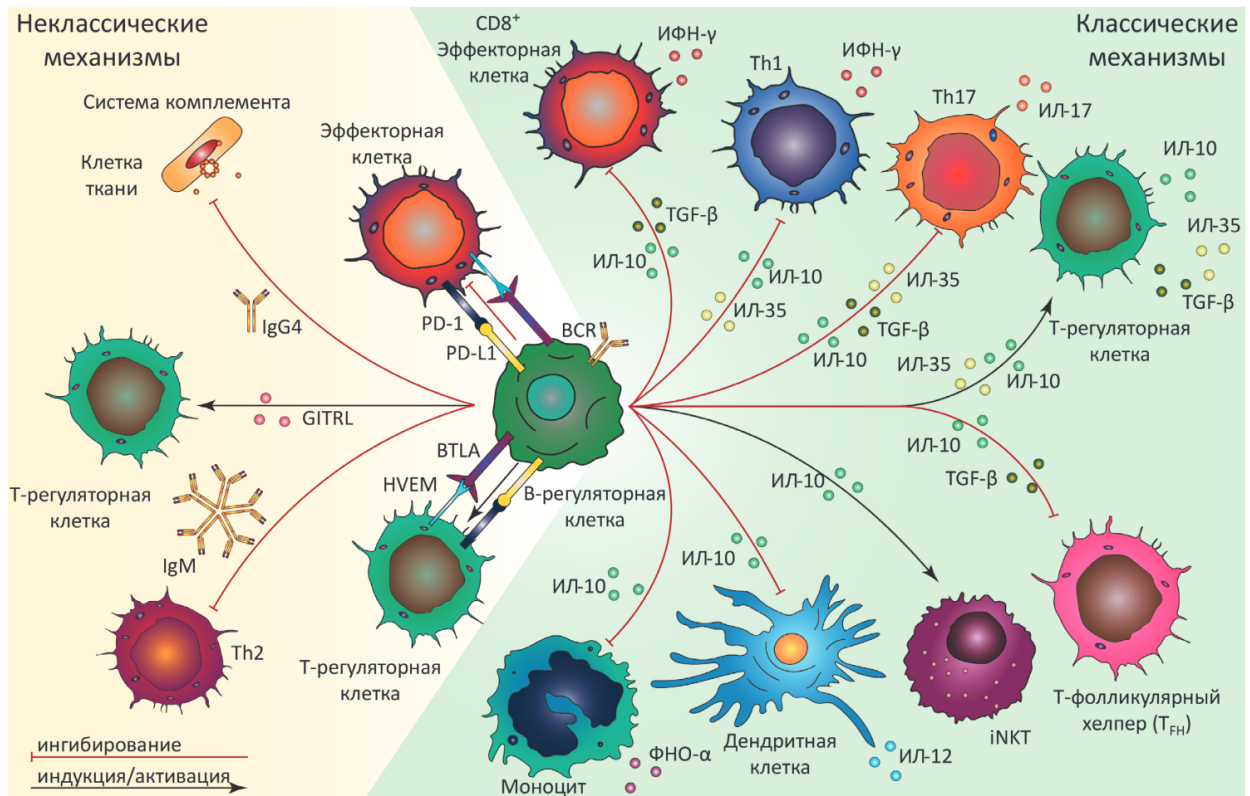


Рисунок 3. Влияние Breg на клетки иммунной системы [51]. Регуляторные В-клетки вырабатывают противовоспалительные цитокины (IL-10, TGF- β , IL-35) и таким образом ингибируют экспрессию провоспалительных цитокинов моноцитами и дендритными клетками, а также ингибируют дифференцировку различных субпопуляций Т-клеток. Breg способны подавлять воспалительные реакции за счет экспрессии VTLA (В- и Т-клеточный аттенюатор), PD-L1 (лиганд рецепторов клеточной смерти), IgM и IgG4.

2.1.4. Современные подходы изучения репертуаров иммуноглобулинов

Развитие новейших методов молекулярной диагностики существенно расширило представление научного сообщества о репертуарах В-клеточных рецепторов и их роли в развитии различных патологий. Новое поколение высокопроизводительных технологий позволяет получить количественные и функциональные характеристики адаптивных иммунных реакций. Развитие микрофлюидных технологий позволило совершить переход от анализа усредненного поликлонального ответа к изучению детального портрета репертуара индивидуальных моноклональных клеток. Также появление методов широкомасштабного секвенирования и усовершенствование методов масс-спектрометрии позволили охарактеризовать рецепторы лимфоцитов на геномном и протеомном уровнях. Эти инструменты обеспечивают возможность глубокого

понимания функционирования адаптивного звена иммунной системы в различных состояниях.

2.1.4.1. Комбинаторные подходы изучения репертуаров иммуноглобулинов

Потребность быстрого синтеза большого числа химических соединений в конце XX века привела к развитию нового направления – комбинаторной химии. Данное направление определялось как вычислительное моделирование для создания структурно-родственных соединений и широко использовалось в фармакологии для поиска новых лекарственных соединений. В дальнейшем область применения данного раздела химии расширилась и стала применяться для создания комбинаторных библиотек пептидов и олигонуклеотидов, а в дальнейшем и более крупных биомолекул. С того момента, как Сидней Бреннер и Ричард Лернер в 1992 году представили концепцию использования технологии ДНК-кодируемых библиотек [52], данная технология дала начало многим методам современной биологии. В рамках данной работы особый интерес представляет использование комбинаторных библиотек для поиска высокоспецифичных и высокоаффинных взаимодействий антиген-антитело. Основные подходы, используемые для поиска таких взаимодействий, включают в себя: фаговый дисплей [53], дрожжевой дисплей [54], лентивирусный дисплей на клетках млекопитающих [55], рибосомный дисплей [56].

2.1.4.2. Комбинаторные фаговые библиотеки

Фаговый дисплей представляет собой *in vitro* метод, основывающийся на особенностях строения бактериофагов, которые способны экспонировать рекомбинантные белки и пептиды в составе белков своей оболочки. В системах фагового дисплея репертуары нуклеотидных последовательностей, такие как мРНК, кДНК, фрагменты геномной ДНК и синтетические олигонуклеотиды, клонируются в геномы бактериофагов. При этом сохраняется связь генотип-фенотип, так как каждый бактериофаг содержит генетическую информацию чужеродного белка, экспонированного на его оболочке. Экспонированные белки

взаимодействуют с молекулами-мишенями. Наиболее специфически связывающиеся варианты обогащаются после нескольких (обычно 3-5) раундов аффинного отбора – биоэ́ннинга. Метод фагового дисплея может использоваться для отбора на множество самых различных мишеней – от биологических объектов (белков, вирусов, бактерий, опухолевых клеток) [57,58] до различных неорганических соединений [59]. Наиболее часто используются филаментные фаги (в том числе M13)[60,61], T4 [62], T7 [63] и фаги лямбда [64].

2.1.4.3. Комбинаторные библиотеки антител

Технология получения высокоаффинных антител к известному антигену постоянно совершенствуется. Изначально большинство моноклональных антител, используемых в клинической практике, было получено путем иммунизации животных с последующим получением гибридом или при использовании комбинаторных библиотек антител [65]. Комбинаторные библиотеки антител представляют собой мощный инструмент для создания и отбора антител с определенными свойствами. Такие библиотеки часто создаются на основе фагового, дрожжевого или мРНК дисплея. Этапы создания комбинаторных библиотек антител включают в себя выделение тотальной РНК или мРНК из В-клеток доноров, постановку реакции обратной транскрипции для получения кДНК, амплификацию переменных фрагментов лёгких и тяжёлых цепей иммуноглобулинов при помощи специфического набора праймеров. Полученные ампликоны затем клонируются в генетические векторы для последующей экспрессии. При таком подходе тяжёлые цепи антител комбинируются с лёгкими цепями случайным образом, что потенциально может привести к появлению высокоаффинного антитела к целевому антигену. Чаще всего библиотеки конструируют таким образом, чтобы на поверхности бактериофага экспонировались одноцепочечные антитела scFv (англ. Single-chain variable fragment – одноцепочечный переменный фрагмент), однако возможны варианты с использованием Fab фрагментов антител (англ. Fragment antigen-binding – антигенсвязывающий фрагмент) [66]. Существует несколько препаратов на основе

моноклональных антител, отобранных при помощи фаговых комбинаторных библиотек антител, одобренных для терапии онкологических [67–69] и аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит [70], системная красная волчанка [71], псориаз [72]).

2.1.4.4. PhIP-Seq – иммунопреципитация фагов с дальнейшим секвенированием

Технология PhIP-Seq (англ. phage immunoprecipitation sequencing – фаговая иммунопреципитация-секвенирование) [73] объединяет в себе методики синтеза олигонуклеотидных библиотек антигенов и фагового дисплея. Основная область применения PhIP-Seq – идентификация иммуногенных эпитопов антител. Данная методика состоит из трёх основных этапов (**Рисунок 4**). На первом этапе создаются синтетические олигонуклеотидные библиотеки, кодирующие перекрывающиеся пептидные фрагменты, покрывающие интересующие белковые молекулы. Синтезированную олигонуклеотидную библиотеку амплифицируют с использованием адаптеров, добавленных на каждый олигонуклеотид, и клонируют в фаговый вектор. Второй этап заключается в скрининге панели сывороток крови для определения иммуногенных эпитопов, на которые наблюдается повышенный титр антител. Антитела из сыворотки связываются со своей мишенью, экспонированной на поверхности бактериофага; и такие бактериофаги, несущие иммуногенные пептиды, преципитируются за счет связавшихся антител при помощи смолы Protein A/G. ДНК иммунопреципитированных бактериофагов амплифицируют и секвенируют. Третий этап включает в себя обработку первичных данных секвенирования и статистический анализ. К основным преимуществам данной методики можно отнести высокую производительность, относительно низкую стоимость, хорошую воспроизводимость. Технология PhIP-Seq позволяет в сжатые сроки получить информацию о специфичности иммунного ответа. Основные ограничения метода относятся к длине экспонированных на бактериофагах пептидов, что может приводить к отсутствию пространственной структуры. При этом известно, что многие антитела распознают именно пространственные эпитопы [74]. Также из-за особенности фагового дисплея

экспонированные антигены лишены пост-трансляционных модификаций. Несмотря на данные ограничения, PhIP-Seq активно используется для поиска антиген-специфичных антител при различных заболеваниях [75–77]. Модификацией метода PhIP-Seq является VirScan [78]. Технология VirScan адаптирована для поиска антигенных мишеней вирусной природы и успешно использовалась для изучения иммунных профилей у пациентов с вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ) [79] и вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) [80]. Недавнее успешное применение данной технологии позволило детальнее изучить явление “публичных эпитопов” и выдвинуть концепцию существования в антителах человека общих аминокислотных мотивов связывания, заложенных в генах зародышевых линий (GRAB – англ. germline-encoded amino acid-binding motifs) [81]. Феномен “публичных эпитопов” заключается в том, что несмотря на всё разнообразие репертуаров антител, у многих доноров, серопозитивных к изучаемому вирусу, вырабатываются антитела к одному и тому же эпитопу данного вируса. При помощи высокоточного картирования антигенных вирусных эпитопов авторы предположили, что такие публичные эпитопы возникли отчасти благодаря существованию GRAB мотивов и благодаря наличию таких мотивов у человека с одной стороны уже существует репертуар антител, связывающих вирус, с которым человек еще не контактировал; но с другой стороны вирусы способны смещать фокус иммунной системы хозяина на “безопасные” для них эпитопы, замедляя образование высокоэффективных нейтрализующих антител.

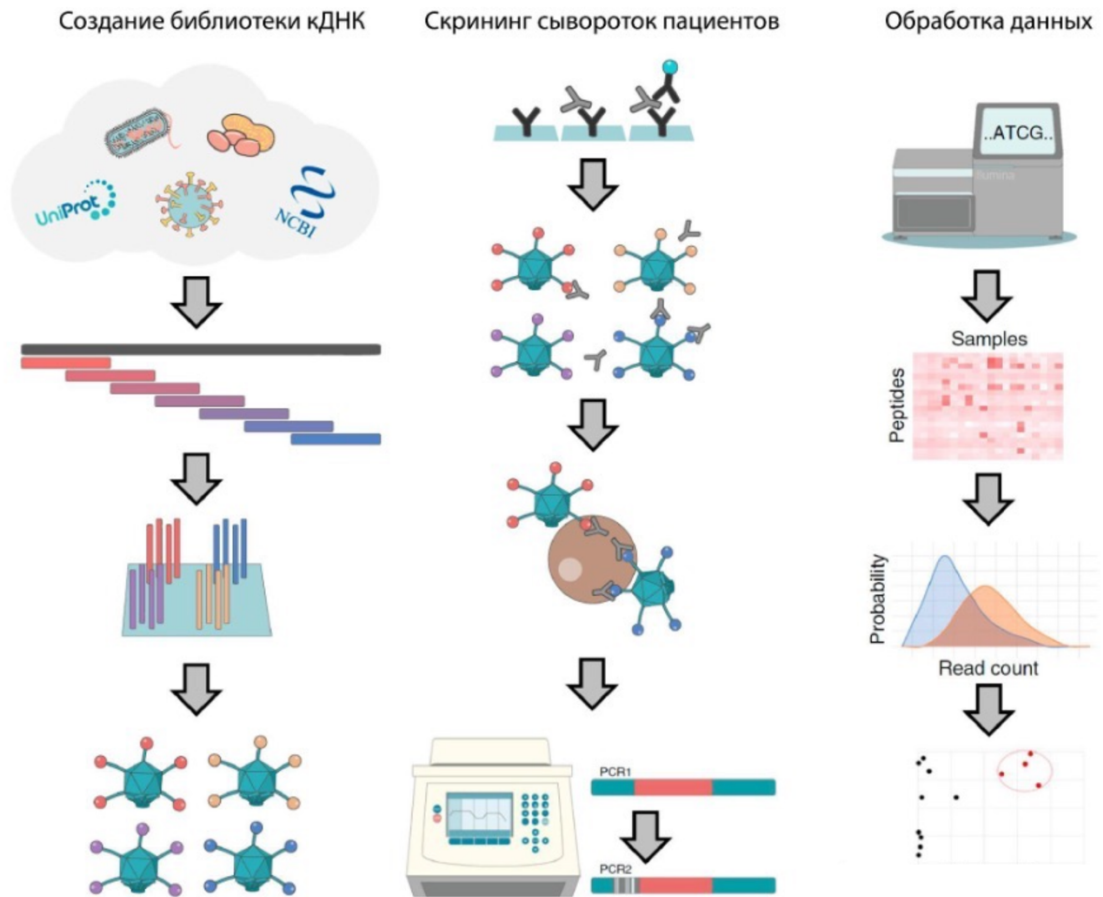


Рисунок 4. Основные этапы PhIP-Seq. Адаптировано из [73]. На этапе “создание библиотеки кДНК” производится поиск целевых белковых последовательностей (например, вирусные белки, клеточные рецепторы, аллергены) в различных базах данных. Кодированные последовательности отобранных белков затем разбиваются на перекрывающиеся последовательности олигонуклеотидов и синтезируются при помощи ДНК-чипов. Далее полученная библиотека олигонуклеотидов клонируется в выбранную систему для фагового отбора. На втором этапе производят скрининг сывороток крови доноров для определения иммунодоминантных эпитопов. Антитела из сыворотки крови инкубируют с фаговой библиотекой. Фаги, несущие специфичные пептиды, которые связались антителами из сыворотки обогащаются при помощи смолы Protein A/G. Последовательности ДНК связавшихся бактериофагов амплифицируют непосредственно из иммунопреципитатов. На третьем этапе производят широкомасштабное секвенирование ампликонов и производят биоинформатический анализ полученных данных.

2.1.4.5. PLATO

Ограничения, накладываемые на выявление антител, распознающих пространственные или прерывистые эпитопы, частично обходятся при использовании методики PLATO [82,83]. В данной технологии кодирующая

библиотека представляет собой набор полноразмерных открытых рамок считывания (ORF), экспрессирующихся при помощи рибосомного дисплея. PLATO может использоваться для выявления взаимодействий между белками, кодирующимися открытыми рамками считывания и любыми молекулами-приманками, иммобилизованными на подложке. Молекулами-приманками чаще всего выступают белки, в том числе антитела, и лекарственные соединения. Данная технология также может быть адаптирована для использования с мРНК дисплеем. Важным преимуществом PLATO является то, что в данной технологии используется трансляция белков *in vitro*, что позволяет производить белки, которые могут быть токсичны для клеток. Основные ограничения связаны с отсутствием пост-трансляционных модификаций белков. Описанные методы могут комбинироваться друг с другом, однако наиболее привлекательным является их использование совместно с протеомными подходами [84].

2.1.4.6. Микрофлюидные подходы для изучения репертуаров единичных клеток

Высокопроизводительное секвенирование геномов, транскриптомов и эпигеномов постепенно становится стандартом для изучения иммунных профилей [85]. Несмотря на это, многие молекулярные механизмы, лежащие в основе тех или иных иммунологических реакций и патологий, являются плохо изученными. Большинство методов упускает из внимания изменения, происходящие в единичной клетке, при этом именно с одной клетки может начаться каскад патологических реакций в организме, способный привести к серьезным аутоиммунным изменениям или к онкологии. Изучение иммунной системы на уровне единичных клеток дает начало новой серологии XXI века [86]. На первый план выходят микрофлюидные технологии, позволяющие заключать отдельные клетки в нанокompартменты. Анализ отдельных клеток позволяет объяснить гетерогенное поведение иммунных клеток, которое часто остается в тени при использовании традиционных методов. С использованием микрофлюидных подходов были впервые идентифицированы многие субпопуляции иммунных клеток, разработаны новые методы лечения и диагностики [87]. Таким образом,

микрофлюидика постепенно становится золотым стандартом для иммунологических, генетических исследований, лекарственного скрининга и многих других приложений современной биологии [88].

2.1.4.7. Технология правильного сочетания переменных фрагментов тяжёлых и лёгких цепей иммуноглобулинов

Имуноглобулины играют решающую роль в адаптивном иммунитете и способны многое рассказать о состоянии иммунной системы человека. Развитие микрофлюидных технологий позволило изучать репертуары иммуноглобулинов с правильным сочетанием тяжёлых и лёгких цепей на уровне единичных клеток. В течение жизни В-клетки, её BCR подвергается перестройке зародышевых генов иммуноглобулинов и аффинному созреванию путём соматических гипермутаций и клеточного отбора в герминальных центрах [89]. Так как тяжёлая и лёгкая цепи иммуноглобулина кодируются двумя разными мРНК, возникает необходимость получения двух разных ампликонов от одной В-клетки. Использование комбинаторных подходов предполагает случайное комбинирование ампликонов тяжёлых (VH) и лёгких (VL) цепей, принадлежащих разным клеткам. В данном случае подавляющее большинство образованных комбинаций VH-VL является искусственными, не встречающимися в организме. Многие из таких антител являются нефункциональными, однако, в некоторых случаях, направленная эволюция их последовательностей способна привести к получению антител с заданной специфичностью [90]. При этом использование технологии правильного сочетания VH-VL позволяет получить природную реплику репертуаров иммуноглобулинов. Данная технология основана на применении микрофлюидных подходов для создания капель эмульсии, каждая из которых содержит по одной В-клетке. После лизиса В-клеток мРНК каждой клетки оказывается в отдельном компартменте, что позволяет амплифицировать гены VH и VL от одной отдельной клетки изолировано от генов VH/VL других клеток. Далее с использованием специфичного набора праймеров переменные фрагменты тяжёлых и лёгких цепей объединяются друг с другом в один ампликон с образованием набора правильных сочетаний VH-VL [91]. Полученные ампликоны могут использоваться для

широкомасштабного секвенирования или для дальнейшего клонирования, создания библиотек антител и функционального анализа репертуаров В-клеток [92]. Методика правильного сочетания VH-VL особенно актуальна для поиска терапевтических антител, изучения иммунного ответа при вакцинации, вирусных инфекций и аутоиммунных заболеваниях [93].

2.1.4.8. Секвенирование репертуаров единичных В-клеток

Секвенирование BCR является важным подходом для изучения иммунных реакции организма. При этом особый интерес представляет не только тотальный репертуар В-клеток организма, но и особенно антиген-специфичные В-клетки. Для поиска антиген-специфичных BCR используют различные методы, в том числе, культивирование В-клеток [94,95], скрининг иммортализованных В-клеток [96] и клеточный сортинг клеток с использованием флуоресцентных мишеней [97]. Однако все они обладают низкой пропускной способностью, что подчеркивает высокую потребность в разработке новых технологий для изучения репертуаров антиген-специфичных В-клеток. Эти технологии должны быть основаны на микрофлюидных подходах, которые позволяют увеличить пропускную способность анализа и одновременно проводить исследования на уровне единичных клеток. Наиболее часто используемые коммерческие платформы для секвенирования единичных клеток – BD Rhapsody и 10x Genomics Chromium. Их функционирование основано на одинаковых принципах: сначала отдельные клетки помещают в индивидуальные компартменты и подвергают лизису, после чего выполняется обратная транскрипция для выделения мРНК и синтеза кДНК. Далее, амплифицированную кДНК используют для подготовки библиотек для секвенирования. Обе технологии используют штрих-кодирование транскриптов каждой клетки для дальнейшего связывания прочитанной последовательности с индивидуальной клеткой. Описанные платформы легли в основу различных технологий для изучения единичных В-клеток. Одна из таких технологий, LIBRA-Seq, связывает последовательность BCR с его антигенной специфичностью при помощи секвенирования следующего поколения [98]. Отдельные В-клетки

смешивают с набором ДНК-штрих-кодированных антигенов, которые используются для сортировки антиген-специфичных В-клеток. Затем отсортированные В-клетки инкапсулируют с частицами, меченными олигонуклеотидами, для индексации как транскриптов BCR, так и штрих-кодов антигена. Это позволяет секвенировать, какие антигены были инкапсулированы в каждую каплю, и таким образом сопоставить последовательность каждого BCR с отобранным антигеном. При помощи данной технологии были проанализированы анти-SARS-CoV-2 В-клетки памяти у пациентов, перенесших COVID-19 [99]. Другая технология, использующая подходы транскриптомики единичных клеток, RAGE-Seq, позволяет отслеживать клонально родственные Т- или В-клетки в тканях и получать информацию об эволюции иммунного ответа на системном уровне [100]. Анализ отдельных В-клеточных субпопуляций активно используется для изучения ответа организма на вакцинацию. Так был охарактеризован профиль транскрипции для В-клеток, которые были активированы вакциной против гриппа и подверглись клональной экспансии. Отслеживая изменение иммунного репертуара с течением времени, удалось идентифицировать пять клонов, чувствительных к вакцинации. Менее половины антител, продуцируемых этими клонами, были специфичны к гриппу, что позволяет предположить, что вакцинация может вызывать клональную экспансию сторонних антител [101].

2.2. Роль В-клеток в развитии рассеянного склероза

Рассеянный склероз (РС) – хроническое воспалительное заболевание ЦНС, проявляющееся в потере толерантности к аутоантигенам, демиелинизации нервных волокон и приводящее к постепенной инвалидизации. Когнитивные нарушения могут развиваться незаметно и прогрессировать постепенно [102]. Течение рассеянного склероза широко варьируется. У некоторых пациентов наблюдается единичный эпизод или приступ, называемый клинически изолированным синдромом или рентгенологически изолированным синдромом, в зависимости от того, проявляется ли заболевание клинически или на МРТ. У пациентов с множественными поражениями ЦНС или неврологическими

признаками, разнесенными во времени, диагностируют рецидивирующе-ремиттирующий рассеянный склероз (РРС). У большинства пациентов РС дебютирует как РРС, и затем трансформируется во вторично-прогрессирующий (ВПРС) [103]. При этом, эпизоды обострения заболевания сменяются длительными (до нескольких лет) ремиссиями. Наиболее агрессивным типом течения РС является первично-прогрессирующий РС (ППРС), характеризующийся непрерывным ухудшением состояния пациента с момента появления первых симптомов заболевания. Несмотря на существенный прогресс в области понимания молекулярных механизмов развития данного заболевания, многие аспекты до сих пор остаются невыясненными. Общепринятым является мнение, что РС является мультифакторным заболеванием, в развитии которого важную роль играют многие агенты.

Исследование на нескольких миллионах доноров законченное в 2022 году подтвердило прямую связь вирусной инвазии ВЭБ и развития РС [104]. В дополнение к вирусной инвазии, генетическая предрасположенность, гормональный статус и даже климатические условия могут оказать влияние на развитие и прогрессирование РС. Несмотря на то, что этиология данного заболевания не изучена до конца [105,106], известен вклад множества компонентов врожденного и адаптивного иммунитета, а также состояния ЦНС в развитие данного заболевания [107,108]. На сегодняшний день общепризнано, что участие вирусов в развитии РС реализуется через механизмы молекулярной мимикрии и перекрестной реактивности. Было продемонстрировано, что ядерный антиген 1 вируса Эпштейна-Барр (EBNA1) и аутоантиген нервного волокна основной белок миелина (МВР) могут перекрестно распознаваться одним и тем же моноклональным Т-клеточным рецептором от пациента с РС. [109]. Аналогично, ранее было показано, что воздействие другого антигена ВЭБ – латентного мембранного белка (LMP1), индуцирует выработку аутореактивных антител против МВР у мышей [110]. Было также показано, что пациенты с прогрессирующим течением РС сообщали о клиническом улучшении после аутологичной специфической Т-клеточной терапии, нацеленной на EBNA1, LMP1

и LMP2A. [111]. Наряду с презентацией антигена и продукцией аутореактивных антител регуляторные свойства В-клеток могут в значительной степени способствовать воспалительному процессу при РС [51,112].

Долгое время РС был ассоциирован преимущественно с Т-клеточным звеном иммунитета, однако, на текущий момент, влияние В-клеток на его прогрессирование неоспоримо (**Рисунок 5**) [113,114]. Становлению роли В-клеток в РС способствовали множество открытий. Так, например, исследования тканей человека продемонстрировали инфильтрацию В-клеток в третичных лимфоидных структурах мозговых оболочек. Используя парные образцы тканей ЦНС и вторичных лимфоидных органов и высокопроизводительное секвенирование, Стерн и соавторы обнаружили, что В-клетки, подвергнутые клональной экспансии, обнаруживаются как в ЦНС, так и во вторичных лимфоидных органах [115]. Провоспалительные В-клетки, подвергнутые клональной экспансии, продуцируют характерные для РС олигоклональные иммуноглобулины (ОСВ – oligoclonal bands), перемещаются между кровотоком и ЦНС и могут активироваться в любом компартменте [42]. Также существуют данные, свидетельствующие о том, что аутоагрессивные антитела способны вызывать демиелинизацию и повреждение аксонов *in vitro* [116]. Кроме того, В-клетки играют важную роль в патогенной презентации антигенов аутореактивным Т-клеткам [117,118]. Успехи терапии РС при помощи моноклональных антител против CD20 привели к обновленной концепции иммунопатофизиологии РС [119]. Данная терапия направлена на истощение пула В-клеток, большинство из которых несут CD20. При этом данный клеточный маркер отсутствует на терминально-дифференцированных плазматических клетках и плазмобластах [120] – основных продуцентах антител, а также на про-В-клетках (**Рисунок 1**). Такие моноклональные антитела против CD20, как окрелизумаб (англ. ocrelizumab) и офатумумаб (англ. ofatumumab) показали свою эффективность для терапии РРРС, при этом окрелизумаб также может использоваться для терапии прогрессирующего РС (оба препарата зарегистрированы для использования в России). Эффективность анти-CD20 терапии была также показана для таких аутоиммунных заболеваний, как системная

красная волчанка и ревматоидный артрит [121]. Помимо анти-CD20 терапии для истощения пула В-клеток при РС также могут использоваться моноклональные антитела к CD19 [122], ингибиторы BAFF [121] и ВТК [123].

При развитии РС изменяются количественные показатели различных В-клеточных субпопуляций. Данные изменения в основном затрагивают ЦСЖ – в ней начинают выявлять В-клетки памяти, плазмобласты, плазматические клетки [124]. Однако, действие некоторых препаратов для терапии РС приводит к существенным изменениям в пуле периферических В-клеток, в основном снижая абсолютное количество В-клеток [125]. При этом, для субпопуляции В-клеток памяти было показано увеличение численности в периферической крови при терапии интерфероном бета, незначительное увеличение численности при терапии глатирамера ацетатом и уменьшение данной субпопуляции при терапии финглимодом, либо диметилфумаратом [126]. Доля В-регуляторных клеток при терапии РС увеличивалась в общем пуле В-клеток при терапии финголимодом [127] и сипонимодом [128].

В контексте высокой значимости участия В-клеточного звена в развитии РС важным открытием стало то, что у пациентов с РС наблюдаются богатые В-клетками скопления менингеальных иммунных клеток. Данные скопления лимфоидных клеток, названные третичными лимфоидными органами могут повторять характеристики лимфоидных фолликулов и обеспечивать среду для взаимодействия В- и Т-клеток [129]. Их отличительной особенностью является отсутствие капсулы и способность распадаться после удаления антигена из организма [130]. Третичные лимфоидные органы содержат такие клетки, как Т-, В-лимфоциты, различные АПК, в том числе ФДК и ДК, стромальные клетки и располагаются вблизи лимфатических сосудов и венул с высоким эндотелием [131]. Образование третичных лимфоидных органов было также показано при развитии ЭАЭ [130].

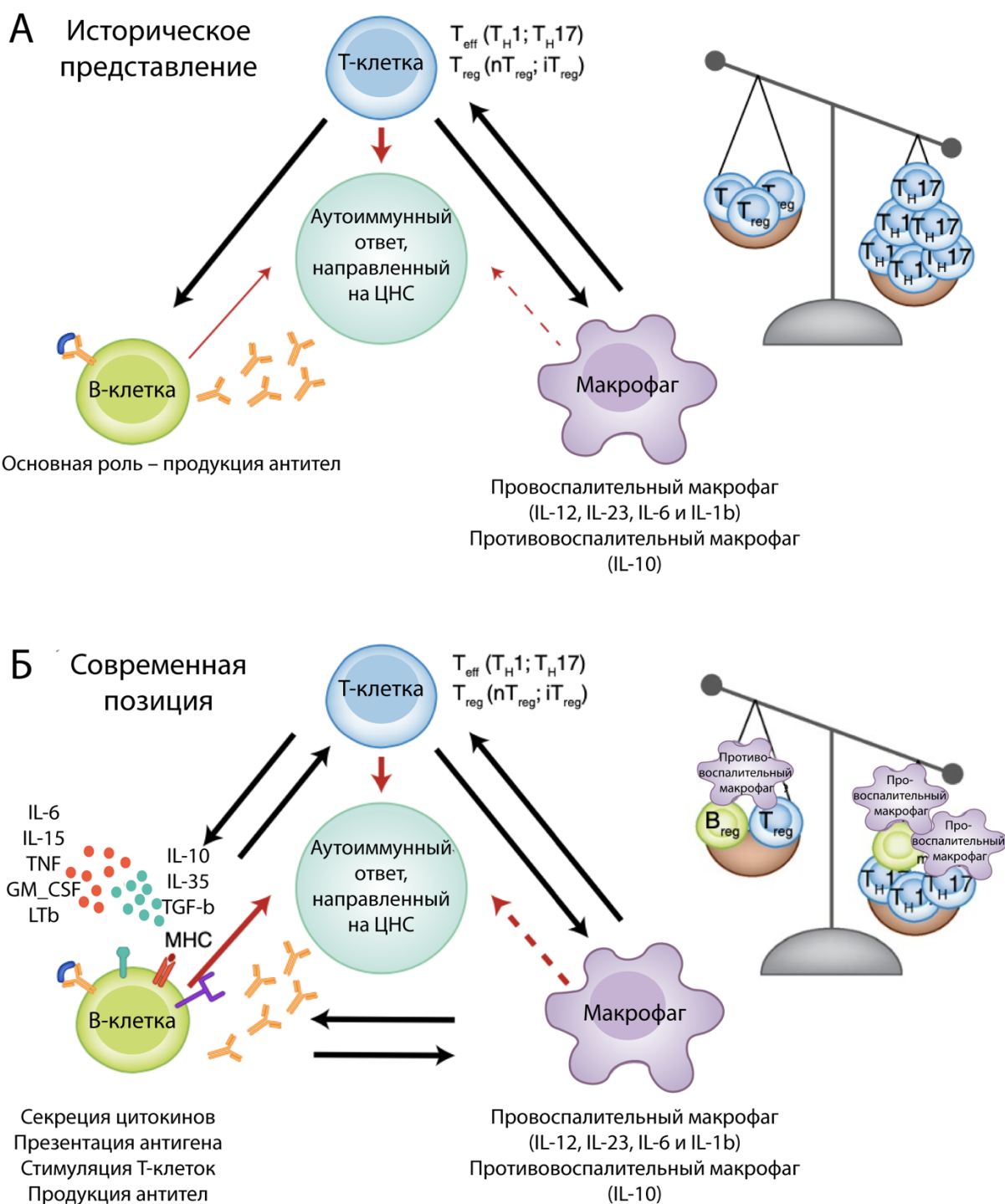


Рисунок 5. Вклад В-клеток в иммунопатофизиологию рассеянного склероза – смещение фокуса с Т-клеточного ответа на роль В-клеток. (А) Историческое представление. Ранее Т-клеткам приписывали центральную роль в иммунологической патофизиологии рассеянного склероза и регуляции аутоиммунного ответа, направленного на ЦНС. Дисбаланс между провоспалительными Т-хелперами 1 типа (ТН1) и эффекторными Т-клетками ТН17 (Teff) и Treg-клетками лежит в основе новых эпизодов рассеянного склероза. Миелоидные клетки (макрофаги), как основные АПК, участвуют в формировании Т-клеточных ответов. В свою очередь, дифференцированные Т-клетки могут формировать реакции миелоидных клеток. В-клетки считались однородной популяцией, которая при помощи Т-клеток, способна дифференцироваться в

плазмобласты и плазматические клетки, секретирующие антитела. Основным вкладом В-клеток в патофизиологию рассеянного склероза считали их способность вырабатывать аутореактивные антитела к антигенам ЦНС. (Б) Современное представление. Результаты анти CD20 терапии при рассеянном склерозе способствовали открытию более важной роли В-клеток, в новых эпизодах рассеянного склероза. Независимая от антител роль В-клеток, частично опосредованная выработкой отдельных цитокинов, может осуществляться провоспалительными эффекторными В-клетками (Beff), либо противовоспалительных регуляторными В-клетками (Breg). Эти клетки могут активировать (Beff) или подавлять (Breg) провоспалительные реакции как Т-клеток, так и миелоидных клеток. Двухнаправленные взаимодействия между функционально различными В-клетками, Т-клетками и миелоидными клетками, а также последствия таких взаимодействий лежат в основе развития новых приступов рассеянного склероза. nTreg – природная Т-регуляторная клетка; iTreg – индуцированная Т-регуляторная клетка. Адаптировано из [113].

2.2.1. Патологические аутоантитела при рассеянном склерозе

РС – заболевание с чрезвычайно гетерогенными иммунологическими ответом, которое крайне трудно диагностировать на ранней стадии. Поэтому определение целевых аутоантигенов, вызывающих аутоиммунное воспаление, имеет решающее значение как для фундаментальной науки, так и для клинической диагностики. Потенциальные биомаркёры РС на основе характерных белков [132] и аутоантител [133] уже были обнаружены, но универсальность этих маркеров до сих пор вызывает большие споры. Даже антимиелиновые антитела, такие как анти-MBP, анти-MOG (миелиновый олигодендроцитный гликопротеин) и анти-PLP (миелиновый протеолипидный белок) не присутствуют у всех пациентов с РС постоянно и могут быть обнаружены в здоровой иммунной системе [134]. В настоящее время антимиелиновые антитела, которые были в центре внимания исследований антител, связанных с РС, как правило, не играют такой большой роли, что еще больше усложняет понимание течения данного заболевания и методов его ранней диагностики. Куле и соавторы показали, что присутствие анти-MBP и анти-MOG антител в сыворотке пациентов не было связано с повышенным риском прогрессирования РС [135]. Оуэнс и соавторы обнаружили, что плазматические клетки из спинномозговой жидкости на различных стадиях РС не были нацелены на основные миелиновые антигены: MBP, MOG и PLP1 [136]. Более

того, сейчас большинство ученых сходится во мнении, что антитела против MOG вызывают заболевания, отличные от РС, и их присутствие в основном связано с другими приобретенными демиелинизирующими синдромами, такими как ЗСОНМ (заболевания из спектра оптиконевромиелит-ассоциированных расстройств) и АДЕМ (острый диссеминированный энцефаломиелит) [137]. При этом, многие антитела к немиелиновым антигенам, таким как нейрофилламенты, нейрофасцины, РНК-связывающие белки и калиевые каналы, могут быть связаны с РС [138]. Ранее была показана прямая связь между инфицированием ВЭБ и развитием РС [104]. Показано, что четверть пациентов с РС имеют перекрестно-реактивные антитела к вирусному антигену EBNA-1 и аутоантигену GlialCAM (молекула адгезии глиальных клеток) [133], либо к EBNA1 и альфа кристаллину В (CRYAB) [139]. При этом иммунизация мышей EBNA1 способствует воспалению ЦНС в экспериментальных животных моделях РС. Также было показано, что иммунизация мышей вирусным антигеном LMP1 индуцирует образование антител перекрестно-узнающих МВР [110].

Существующая концепция предполагает патогенное действие сывороточных антител на ЦНС, при этом повышенный уровень IgG1 и IgG3 может приводить к повышенной цитотоксичности по отношению к клеткам ЦНС и вызывать опосредованное антителами повреждение в патогенезе РС (**Рисунок 6**) [140].

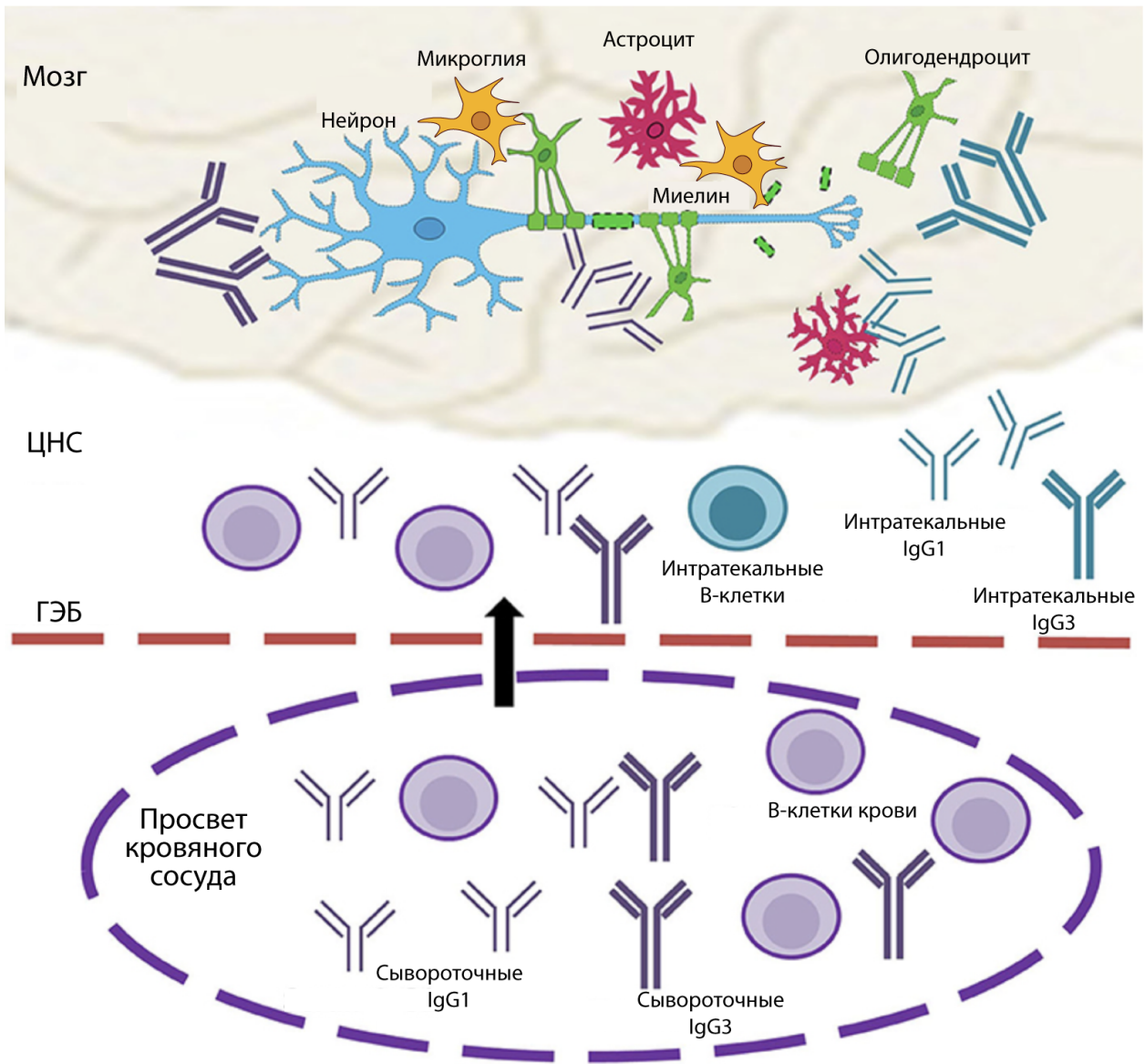


Рисунок 6. Предполагаемая роль сывороточных антител в РС. При развитии РС, сывороточные антитела и В-клетки (обозначены фиолетовым цветом) мигрируют через поврежденный гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). В ЦНС совместно с инtrateкальными антителами (синий) распознают антигены на поверхности нейронов и глиальных клеток и образуют иммунные комплексы. Адаптировано из [140].

Идентификация гетерогенного набора аутоиммунных мишеней при РС остается сложной задачей, для решения которой применяются различные методы изучения аутоиммунного ответа, такие как классические иммуноферментные анализы (ИФА), вестерн-блоттинг или высокоспецифичные клеточные анализы, как ELISPOT и цитофлуориметрия [141].

2.2.2. Презентация антигена и активация Т-клеточного звена В-клетками при рассеянном склерозе

В отличие от профессиональных АПК, таких как дендритные клетки и тканеспецифичные макрофаги, В-клетки обладают некоторыми преимуществами, которые позволяют им эффективнее презентировать антигены. Существует три механизма, способствующих интернализации антигена внутрь АПК: фагоцитоз, жидкофазный пиноцитоз и рецептор-опосредованный эндоцитоз. В В-клетках последний процесс осуществляется BCR – мембранно-связанным иммуноглобулином, обладающим высокой аффинностью к данному антигену. Эта особенность позволяет В-клеткам концентрировать очень малые количества своего специфического антигена и эффективно презентировать его [142]. Кроме того, в В-клетках обнаружена экспрессия HLA-DO, неклассического МНС II. Его функция заключается в ингибировании действия HLA-DM, другой неклассической молекулы МНС II, которая опосредует загрузку молекул МНС II пептидами во всех АПК [143]. Благодаря HLA-DO в В-клетках осуществляется более эффективная презентация антигенов, интернализированных через BCR. Также, в отличие от остальных АПК, именно В-клетки способны эффективно распознавать пространственные эпитопы [113].

В контексте РС потенциальная функция В-клеток как АПК подтверждается результатами экспериментов с мышинной моделью РС – ЭАЭ, в которых было обнаружено, что мыши с нокаутом МНС II в В-клетках были устойчивы к MOG-индуцированному заболеванию. Нокаут МНС II только в В-клетках приводил к полному прекращению продукции анти-MOG антител в этой модели ЭАЭ, при этом введение мышам анти-MOG антител лишь частично воспроизводило тяжесть ЭАЭ. В совокупности эти данные свидетельствуют о МНС-II-зависимой, но независимой от антител роли В-клеток в ЭАЭ [144].

Для эффективной презентации антигена целевым клеткам необходимым фактором является наличие костимуляторных взаимодействий между В- и Т-клетками. Одна из наиболее изученных пар костимуляторных молекул – CD80/86 (на поверхности АПК) и CD28 (на поверхности Т-клеток). При РС изменение

экспрессии CD80 и CD86 влияет на иммунную регуляцию, при этом было обнаружено, что количество циркулирующих CD80⁺ лимфоцитов значительно увеличивается во время обострений РС, но остается нормальным при стабильном течении данного заболевания [145]. В-клетки также могут оказывать ингибирующее воздействие на Т-клетки, подавляя их эффекторные функции. Например, лиганд PD-L1, экспрессируемый В-клетками, защищает от ЭАЭ, подавляя ответы Т-клеток через свой рецептор PD-1 [146].

2.2.3. Дисбаланс цитокинов, продуцируемых В-клетками при РС.

Одним из проявлений нарушения правильного функционирования иммунной системы при развитии РС является изменение экспрессии цитокиновых профилей В-лимфоцитами у пациентов [147]. У В-клеток от доноров без предшествующей терапии наблюдается дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов. В частности у пациентов с РС обнаруживают повышенные уровни TNF, IL-6 и GM-CSF [148,149].

В-клеточный IL-6 вовлечен в регуляцию ответа Th17 и ингибирование Treg. Одновременно с этим данный цитокин способен индуцировать IL-10⁺ Breg и миелоидные клетки [150]. В экспериментах на модельных животных было показано, что блокада IL-6 моноклональными антителами подавляет развитие ЭАЭ и ингибирует индукцию MOG-специфических CD4⁺, CD8⁺ и Th17 Т-клеток [151]. GM-CSF является важным фактором роста и развития и клеток миелоидного происхождения и может секретироваться как иммунными, так и не иммунными клетками. Было обнаружено, что В-клетки человека, экспрессирующие GM-CSF, совместно с данным цитокином экспрессируют высокие уровни TNF и IL-6 и эффективно усиливают провоспалительные реакции миелоидных клеток [149]. Количество таких клеток, аномально увеличено у пациентов с РС, при этом анти-CD20-опосредованное истощение В-клеток приводит к снижению провоспалительных миелоидных клеточных ответов, что подчеркивает их потенциальную патогенную роль *in vivo* [150].

Фактор некроза опухоли (TNF) представляет собой плейотропный цитокин, участвующий в патогенезе ряда физиологических процессов, которые

контролируют воспаление, противоопухолевые реакции и гомеостаз иммунной системы [152]. TNF играет комплексную роль в развитии РС. У пациентов с РС была показана значимая корреляция между уровнем TNF в сыворотке/крови и тяжестью двигательных нарушений [153]. Повышенный уровень TNF в ЦСЖ пациентов с прогрессирующим РС был связан с гибелью нейронов, вызванной чрезмерным воздействием нейромедиаторов, что напрямую доказывает нейротоксичность данного цитокина [154]. Кроме прямого воздействия на ЦНС TNF также способствует активации и привлечению иммунных клеток в ЦНС, усугубляя демиелинизацию и повреждение нейронов [152]. Однако, клинические испытания блокады TNF у пациентов с РС были прекращены из-за обострения заболевания [155]. Роль TNF в развитии РС была также изучена на ЭАЭ. Было показано, что истощение неактивированных В-клеток вызывает усиление продукции TNF моноцитами, что приводило к обострению ЭАЭ [156]. С использованием панели мышей, нокаутных по различным клеточным источникам TNF, была изучена роль клеточных источников TNF в развитии ЭАЭ. Были идентифицированы три различные стадии TNF-опосредованного контроля накопления лимфоцитов в ЦНС. На ранних стадиях TNF из миелоидных клеток способствовал инфильтрации иммунных клеток в ЦНС. Далее, TNF из эффекторных Т-клеток способствовал обострению заболевания, стимулируя накопление миелоидных клеток в ЦНС. На поздних стадиях накопление иммунных клеток в ЦНС снижалось за счёт уровня продукции TNF миелоидными и Т-клетками [157].

В-клетки также способны влиять на иммунный ответ организма путём секреции противовоспалительных цитокинов – IL-10, TGF- β и IL-35, и таким образом ограничивать воспалительные реакции в ЦНС. Было показано, что продукция TGF- β 1 В-клетками ограничивает фазу индукции воспаления ЦНС при ЭАЭ путём подавления функции АПК и снижения активации энцефалитогенных Th1/17 [158]. В свою очередь, роль противовоспалительных IL-35-продуцирующих В-клеток была установлена в фазе восстановления у мышей с ЭАЭ [159]. Мыши, В-клетки которых не экспрессировали IL-35, теряли способность выздоравливать

от ЭАЭ. При этом у таких мышей наблюдался повышенный иммунитет к внутриклеточным бактериальным патогенам, связанный с активацией макрофагов и воспалительных Т-клеток, а также усиленной функцией В-клеток как АПК [159].

IL-10 представляет собой цитокин, продуцируемый практически всеми типами иммунных клеток и обладающий иммуносупрессивными свойствами. IL-10 ингибирует широкий спектр функций моноцитов, макрофагов и Т-клеток, включая синтез цитокинов, дифференцировку эффекторных субпопуляций и экспрессию костимулирующих молекул, таких как CD80/CD86 [160]. Данный цитокин способствует пролиферации В-клеток, продукции антител и экспрессии МНС II [161]. Регуляторные В-клетки, секретирующие IL-10 выделяют в отдельную субпопуляцию B10 клеток [162], была показана способность данных клеток ингибировать экспрессию TNF моноцитами посредством IL-10-зависимого пути [163]. Особая значимость данного цитокина была продемонстрирована на модели ЭАЭ в работе по изучению плазматических клеток. Было показано, что некоторые плазматические клетки животных с ЭАЭ происходят из кишечника и продуцируют IgA. Данные клетки обладали иммуносупрессирующим действием за счёт выработки IL-10. Мыши с повышенным количеством IgA⁺ плазматических клеток в ЦНС проявляли устойчивость к эффекторной фазе ЭАЭ. И наоборот, истощение этих клеток усугубляло заболевание, которое можно было нормализовать путем повторного введения плазматических клеток IgA⁺, полученных из кишечника [164].

2.2.4. Роль регуляторных В-клеток в развитии рассеянного склероза

Ещё в 1974 году было выдвинуто предположение о том, что В-клетки могут ингибировать воспаление во время реакций гиперчувствительности замедленного типа [165]. В дальнейшем регуляторные свойства В-клеток были подтверждены на ЭАЭ [166]. Субпопуляция В-клеток, выполняющих регуляторные функции, была названа Breg. У мышей популяция Breg составляет до 5% от общего числа В-клеток в селезенке и лимфатических узлах, и их количество значительно увеличивается при развитии воспаления [167,168]. У человека Breg составляют менее 5% В-клеток

крови [169]. Нарушения количества Breg или их функции наблюдались у пациентов с аутоиммунными заболеваниями [163,170,171] и аллергией [172].

На данный момент описаны различные фенотипы Breg. Транзиентные Breg (tBreg) $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ [169,173–175] и Breg памяти $CD19^+CD24^{high}CD27^+$ являются наиболее изученными субпопуляциями. Наравне с ними также выделяют и другие фенотипы Breg: $CD19^+CD25^+CD71^+CD73^-$ [176], $CD19^+CD27^{int}CD38^+IgM^+$ [177], $CD19^+CD24^{high}CD27^+CD39^{high}IgD^-IgM^+CD1c^+$ [178], $CD19^+CD5^+Foxp3^+$ [179] и $CD19^+CD38^+CD1d^+IgM^+CD147^+$ [180]. Транзиентные $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ Breg могут быть обнаружены в периферической крови здоровых взрослых и составляют приблизительно 4% от всех циркулирующих В-клеток [181]. Было показано, что эта субпопуляция tBreg продуцирует IL-10, регулирует пролиферацию/дифференцировку $CD4^+$ Т-клеток в сторону Т-хелперных эффекторных клеток [49] и способствует дисбалансу цитокинов при аутоиммунных заболеваниях [50].

У мышей с В-клетками, нокаутированными по IL-10, наблюдается более тяжелое течение ЭАЭ [182]. При этом, перенос В-клеток, продуцирующих IL-10, подавлял воспаление и уменьшал тяжесть заболевания [183]. Breg, подсаженные мышам с ЭАЭ, накапливались в селезенке и мезентериальных лимфатических узлах, что приводило к экспансии Т-регуляторных клеток и их обогащению в ЦНС [184]. В модели ЭАЭ лечение белком MOG, слитым с белком $\sigma 1$ реовируса (MOG- $\sigma 1$), привело к увеличению количества $B220^+CD5^+$ Breg, продуцирующих IL-10, что и способствовало быстрому улучшению течения ЭАЭ [185].

Литературные данные о количестве Breg, продуцирующих IL-10, у пациентов с РС разнятся. Также ранее не выявили связи между снижением уровня Breg в периферической крови и показателем расширенной шкалы статуса инвалидности (EDSS) при РС [186]. Данные несоответствия, скорее всего, возникают из-за сосуществования нескольких популяций Breg [187,188], включающие В-клетки на разных стадиях развития. Специфичность BCR В-регуляторных клеток описана недостаточно подробно, неизвестно, изменяется ли специфичность BCR при аутоиммунных заболеваниях. Однако, независимо от их количества, функция Breg

нарушается у пациентов с РС, поскольку снижается продукция IL-10 и супрессорная функция В-клеток [189–191]. Приведенные в данной работе исследования проливают свет на развитие РС и роль tBreg в этом процессе, созданная библиотека аутоиммунных мишеней человека позволяет идентифицировать новые аутоантигенные мишени аутоиммунной агрессии при РС, а разработанная методика скрининга широкого репертуара антиген-специфичных иммуноглобулинов позволит в будущем исследовать патогенные антитела при РС.

3. Материалы и методы

3.1. Пациенты и здоровые доноры.

Забор периферической крови у пациентов с РС и здоровых доноров для исследования иммунного ответа на потенциальные аутоантигены (*Приложение 1. Таблица 1, Приложение 2. Таблица 2*) и В-клеточного репертуара (*Приложение 3. Таблица 3*) был произведен в ФГБНУ Научный центр неврологии. Забор периферической крови вакцинированных и невакцинированных доноров для изучения функциональности фаговой библиотеки RBD (*Приложение 4. Таблица 4*) был произведен в Центральной клинической больнице Российской академии наук (ЦКБ РАН). Периферическую кровь отбирали в пробирки с К2-ЭДТА, несколько раз переворачивали и транспортировали на льду. Выделение периферических мононуклеарных клеток производили не позднее трех часов после взятия образца.

Возраст пациентов с РС составлял от 22 до 70 лет, баллы по шкале EDSS от 1.5 до 8.5. Значения EDSS (по шкале от 0 до 10) рассчитывались на основе расширенной шкалы нарушений жизнедеятельности Куртцке [192]. Диагноз стабильный РС ставили, если балл по шкале EDSS был менее 4.0 в течение не менее 10 лет после начала заболевания при отсутствии лечения. Активный РС диагностировали при EDSS > 4.0 в течение пяти лет после начала заболевания, плохом ответе на болезнь-модифицирующую терапию, и наличии двух или более рецидивов с неполным выздоровлением в течение одного года. Ни один из пациентов не получал лечение глюкокортикоидами или иммуномодулирующее лечение в течение по крайней мере шести месяцев до взятия крови. У здоровых доноров (22–68 лет) не было аутоиммунных или онкологических заболеваний, либо недавно перенесенных острых инфекций. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Научного центра неврологии, Москва, Россия, и проводилось в полном соответствии с Декларацией WMA Хельсинки, ICH GCP и местным законодательством.

3.2. Методы работы с нуклеиновыми кислотами

3.2.1. Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводили на приборе T100 (BioRad, США). Готовили смесь реагентов (Таблица 5).

Таблица 5. Смесь реагентов для постановки ПЦР.

Реагент	Финальная концентрация
5X Буфер для Q5 полимеразы (NEB, Великобритания)	1X
Прямой праймер	0.5 мкМ
Обратный праймер	0.5 мкМ
Матрица ДНК	0.02–0.4 нг/мкл
Смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (10 мкМ каждого) (Евроген, Россия)	200 мкМ
Q5 полимеразы (NEB, Великобритания)	0.02 ед./мкл
5X Буфер Q5 High GC Enhancer (NEB, Великобритания)	1X
Вода без нуклеаз	

Аmplификацию проводили по следующей схеме (Таблица 6) (температура отжига рассчитывалась исходя из нуклеотидного состава праймеров):

Таблица 6. Схема циклов ПЦР.

Шаг	Температура	Время
Начальная денатурация	98 °С	30 секунд
10–35 циклов	98 °С	15–30 секунд
	50–72 °С	15–30 секунд
	72 °С	20–60 секунд
Финальная элонгация	72 °С	2 минуты

3.2.2. Эмульсионная ПЦР

Накануне готовили смесь масло-ПАВ путем добавления следующих компонентов в 50-мл центрифужную пробирку при 25°C: Abil EM 180 0.9 мл

(финальная концентрация 3 % (об./об.)), минеральное масло до 30 мл – масло А. Для приготовления масла Т в минеральное масло добавляли 4.5 % Span 80, 0.4 % Tween 80, 0.05 % Triton X-100. Масло тщательно перемешивали с использованием вортексирования и вращения в течение не менее 3 часов. Диэтиловый эфир и этилацетат заранее насыщали водой путем добавления равного объема воды, свободной от нуклеаз, и перемешивания в течение часа. Все реагенты для эмульсионного ПЦР охлаждали до +4°C.

Для генерации капле эмульсии добавляли 450 мкл смеси масло-ПАВ в 2 мл пробирки и охлаждали на +4°C. Затем готовили водную фазу для эмПЦР (Таблица 5), добавляя 10 мг/мл БСА. Водную фазу хорошо перемешивали. В каждую пробирку, содержащую 450 мкл смеси масло-ПАВ, медленно по каплям добавляли 75 мкл водной фазы (соотношение 1:6). Затем эмульсию перемешивали вортексированием в течение 5 мин при 1400 об/мин при 4°C, либо перемешивали при помощи магнитной мешалки на максимальных оборотах при тех же условиях. После получения эмульсии, её аликвотили по 100 мкл в пробирки объемом 0.2 мл и ставили ПЦР.

3.2.3. Разрушение эмульсии

Эмульсию из пробирок, в которых прошла эмПЦР объединяли в микроцентрифужную пробирку объемом 1.7 мл и центрифугировали при 13000 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Верхнюю (масляную) фазу удаляли. Для удаления поверхностно-активных веществ в каждую пробирку добавляли минеральное масло, интенсивно встряхивали в течение 2 мин, центрифугировали при 13000 g в течение 2 мин при комнатной температуре и удаляли верхнюю (растворяющую) фазу. В каждую пробирку добавляли насыщенный водой диэтиловый эфир, интенсивно встряхивали в течение 2 мин, центрифугировали при 13000 g в течение 2 мин при комнатной температуре и удаляли верхнюю (растворяющую) фазу. Данную процедуру повторяли трижды. Для А-масла проводили дополнительную стадию промывки этилацетатом. Нижнюю фазу

центрифугировали при 13000 g в течение 10 мин при 4°C и переносили надосадочную жидкость в новую пробирку. Для полного удаления растворителя из разрушенной эмульсии пробирку инкубировали 10–15 мин с открытыми крышками при комнатной температуре. Очищенную водную фазу помещали в агарозный гель и полосу нужного размера очищали с помощью коммерческого набора QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, США).

3.2.4. Олигонуклеотидные реагенты

Библиотека олигонуклеотидов «А» размером 12004 олигонуклеотидов была синтезирована компанией Custom Array (<http://customarrayinc.com/>, США), библиотека олигонуклеотидов «В» размером 11973 олигонуклеотидов была синтезирована компанией Twist Bioscience (<https://twistbioscience.com/>, США). Библиотеки были сконструированы в виде одноцепочечных 169-мерных олигонуклеотидов со следующей последовательностью: 5'-CCCAGCCGGCCATGGCC-(N)132-GCTAGCAGTGGTGGAGGCGG-3', где N 132 – перекрывающаяся последовательность библиотеки, состоящая из 132 нуклеотидов и фланкированная 5' и 3' адаптерами для амплификации. Содержание GC устанавливали в диапазоне от 40% до 60%, не допускали наличие непрерывной цепочки идентичных нуклеотидов длиннее шести нуклеотидов. Для амплификации использовали олигонуклеотиды: прямой праймер (5'-CCCAGCCGGCCATGGCC-3') и обратный праймер (5'-CCGCCTCCACCACTGCTAGC-3').

3.2.5. Подготовка библиотеки NGS и секвенирование библиотеки

Продукт ПЦР нужного размера экстрагировали из ПААГ. Около 5 нг продукта ПЦР лигировали с адаптерами от NEBNext Multiplex Oligos (NEB) с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК NEBNext Ultra II для Illumina (NEB). Для контроля качества библиотек ДНК использовали набор High Sensitivity DNA Kit на Bioanalyzer 2100 (Agilent). Библиотеки ДНК количественно определяли с помощью набора KAPA Library Quantification Kit (Roche) на CFX96

Touch (Bio-Rad), объединяли в эквимолярных количествах и секвенировали на Miseq с использованием набора для секвенирования парных концов 2x300 п.н. (Illumina) в Центре геномики СО РАН (ICBFM СО РАН), Новосибирск, Россия). Все процедуры амплификации библиотеки с последующей подготовкой библиотеки NGS проводились в трех повторах.

3.2.6. Рестрикция

Рестрикцию ПЦР-продуктов проводили в течение 3–16 часов, плазмидной ДНК 2-4 часа при температуре, указанной в протоколе производителя.

3.2.7. Лигирование

Для лигирования генетических конструкций готовили лигазную смесь объемом 10 мкл в соответствии с **Таблицей 7**.

Таблица 7. Лигазная смесь.

Реагент	На 1 реакцию объёмом 10 мкл
T4 буфер (NEB, Великобритания)	1 мкл
ДНК вектор	25 нг
ДНК вставка	$X \text{ нг} = \frac{5 \cdot \text{длина вставки (п.о.)} \cdot 25 \text{ нг}}{\text{длина вектора (п.о.)}}$
Вода без нуклеаз	До 10 мкл
T4 ДНК лигаза (NEB, Великобритания)	0.5 мкл

Реакцию проводили в течение 16 часов при 4°C.

3.2.8. Выделение плазмидной ДНК

Ночную культуру клеток осаждали при 3000g в течение 10 минут. Бактериальный осадок использовали для выделения плазмидной ДНК с использованием набора Plasmid miniprep по протоколу производителя (Евроген, Россия).

3.2.9. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для электрофореза использовали 0.8-2% агарозный гель. Для его приготовления необходимое количество агарозы растапливали в однократном буфере TBE (89 мМ Трис, 89 мМ борная кислота и 2 мМ ЭДТА, рН 8.3) с добавлением бромистого этидия до 0.5 мкг/мл. Пробы смешивали в соотношении 3:1 с буфером нанесения (Евроген, Россия) и вносили в застывший гель. Электрофоретическое разделение ДНК проводили при напряжении 100-120 В. По окончании, ДНК визуализировали при длине волны 254 нм.

3.2.10. Электрофорез ДНК в полиакриламидном геле

Для электрофореза использовали 5-10% полиакриламидный гель. Перед внесением образца ДНК, через гель пропускали ток под напряжением 90 В, в течение 40 минут. Затем вносили образец ДНК, смешанный с буфером нанесения в соотношении 3:1. Электрофоретическое разделение проводили при 100-120 В. ДНК в геле визуализировали при длине волны 254 нм.

3.2.11. Очистка ДНК из агарозного геля

После завершения электрофореза, полосу ДНК нужной массы вырезали из геля (визуализировали при длине волны 254 нм, ориентировались на маркер длин ДНК (Евроген, Россия)), перемещали в пробирку типа эппендорф и взвешивали. Далее выделение ДНК проводили при помощи набора CleanUp Standard (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

3.2.12. Очистка ДНК на магнитных частицах

К раствору, содержащему ДНК добавляли 2 объема магнитных частиц CleanMag (Евроген, Россия). Далее очистку ДНК проводили в соответствии с протоколом производителя.

3.3. Методы работы с бактериями *E.coli*

3.3.1. Получение электрокомпетентных клеток

Клетки из музея высевали на чашки Петри с агаром LB без антибиотика и инкубировали в течение 14–18 часов в термостате при 37°C. На следующий день колонии с чашек инокулировали в жидкую среду 2YT без антибиотика и инкубировали в течение 14–18 часов при постоянной аэрации при 37°C. Далее 2 мл ночной культуры пересевали в колбу объемом 750 мл, содержащую 200 мл среды SOB. Культуру растили до оптической плотности $OD_{600} = 0.4$ при постоянной аэрации при 37°C в течение 1.5–2 часов. При достижении культурой клеток указанной плотности, колбу с клетками инкубировали 10 минут на льду. Далее клетки осаждали в течение 7 минут при 3000 g при 4°C. Осадок ресуспендировали в 2.5 мл охлажденного 0.1M $CaCl_2$, затем доводили объем до 40 мл и центрифугировали 7 минут при 3000 g при 4°C. Осадок ресуспендировали в 2 мл буфера (15 mM $CaCl$, 250 mM KCl , 55 mM $MnCl_2$, 10 mM HEPES, 15 % глицерин), инкубировали 20 минут на льду и аликвотили по 100 мкл в стерильные охлажденные пробирки, замораживали в жидком азоте, после чего хранили на -80°C.

3.3.2. Трансформация *E.coli* методом электропорации

К размороженной на льду культуре электрокомпетентных клеток добавляли обессоленный раствор плазмидной ДНК или лигазной смеси, затем клетки переносили в охлажденные стерильные кюветы BioRad и проводили электропорацию на приборе Electro cell manipulator 600 (ВТХ, США) согласно инструкции производителя. Далее к клеткам добавляли 700 мкл теплой (37°C) среды SOC и инкубировали при постоянной аэрации при 37°C в течение часа. Далее клетки высевали на чашки, содержащие LB-агар и соответствующий селективный антибиотик и инкубировали 14–18 часов при 37°C.

3.3.3. Ночная культура

Бактериальную колонию инокулировали в 5–10 мл среды 2YT с добавлением селективного антибиотика. Культуру инкубировали при постоянной аэрации при 37°C в 14–18 часов.

3.3.4. Бактериальная экспрессия белков

Для бактериальной экспрессии белков использовали клетки *E.coli* BL21(DE3). Аликвоту таких клеток трансформировали экспрессионным вектором и растили на чашках Петри с LB-агаром с добавлением селективного антибиотика 14–18 часов при 37°C. На следующий день сеяли ночную культуру с добавлением 1 % глюкозы. Далее 2 мл ночной культуры пересевали в колбу объемом 750 мл, содержащую 200 мл среды 2YT и селективный антибиотик. Культуру растили до оптической плотности $OD_{600} = 0.4$ при постоянной аэрации при 37°C в течение 1.5–2 часов. При достижении культурой клеток указанной плотности, в колбу добавляли индуктор изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0.1–1 мМ. Белок экспрессировали при интенсивной аэрации в течение 4–18 часов, при температуре от 18 до 37°C.

3.3.5. Выделение белков из растворимой фракции

Культуру клеток после экспрессии белка осаждали 7 минут при 3000 g при 4°C. Супернатант сливали, клетки ресуспендировали в PBS с добавлением ингибиторов протеаз. Далее клетки лизировали добавлением лизоцима до 0,5 мг/мл и инкубировали 5-10 минут на комнатной температуре. Далее к клеточному лизату добавляли 0.5 % TRITON X-100 и инкубировали еще 5–10 минут при перемешивании. Далее добавляли 10 мкг/мл ДНКазы и 10 мМ $MgCl_2$ инкубировали при комнатной температуре при постоянном перемешивании до исчезновения вязкости (не больше 20 минут). Полученный раствор центрифугировали при 20000 g 20 минут при 4°C. Супернатант содержал растворимую фракцию белка, осадок – нерастворимую фракцию (тельца включения).

3.4. Методы работы с бактериофагами

3.4.1. Экспрессия рекомбинантных бактериофагов

E. Coli TG-1 трансформировали векторами fADL и высевали на чашки Петри (LB-агар, 50 мкг/мл канамицина, 2 % глюкозы). Колонии инокулировали в 5 мл среды 2xYT, содержащей 50 мкг/мл канамицина, 2 % глюкозы, и инкубировали ночь при 37°C. Ночную культуру разводили 1:100 в среде 2xYT, содержащей 50 мкг/мл канамицина и инкубировали при 30°C в течение 16-24 часов. Векторы на основе pHEN2 трансформировали в *E. coli* TG-1, высевали на чашки Петри (LB-агар, 100 мкг/мл ампициллина, 2% глюкозы). Колонии инокулировали в 5 мл среды 2xYT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, 2 % глюкозы, и инкубировали при 37 °C ночь. Ночную культуру разводили 1:100 в среде 2xYT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, 2 % глюкозы и выращивали при 37°C до плотности OD600 = 0.5, после чего 10 мл культуры заражали гиперфагом M13K07DpIII (Progen, Германия) в соотношении бактериальных клеток к фагу-помощнику 1:20 и затем инкубировали 30 мин при 37°C без встряхивания. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин, осадок ресуспендировали в 200 мл среды 2xYT с 100 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл канамицина и растили в течение 16–24 ч при интенсивной аэрации 30°C.

3.4.2. Очистка фаговых частиц

Ночную культуру осаждали при 3000 g в течение 10 мин. К супернатанту добавляли 1:5 объёма 20% ПЭГ-6000, 2.5 М NaCl и инкубировали 1 час на 4°C. Суспензию бактериофагов осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 30 мин при 4°C. Осажденные фаги ресуспендировали в 2 мл PBS с добавлением 400 мкл 20% ПЭГ-6000, 2.5 М NaCl, инкубировали на льду в течение 40 мин, затем центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин при 4°C. Супернатант удаляли, осадок, содержащий бактериофаги, ресуспендировали в 2 мл PBS.

3.5. Методы работы с эукариотическими линиями клеток

3.5.1. Культивирование клеточных линий

Клеточные линии *Raji*, *Raji-FL* и *Jurkat* культивировали в среде Advanced RPMI 1640 (Gibco, США) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Cytiva, США), 1 % GlutaMAX (Gibco, США) и антибиотика-антимикотика (Gibco, США) в инкубаторе при 37°C и 5 % CO₂. Клетки культивировали в диапазоне плотности от 200 тыс до 2 млн клеток на 1 мл среды в стерильных флаконах T-25, T-75, T-225 или в 6-луночных культуральных планшетах (SPL, Республика Корея). При достижении культурой клеток плотности 2 млн/мл, её пересевали в новый флакон, либо разводили теплой средой до плотности 200 тыс/мл.

Клеточную линию *HEK293T* культивировали в среде Advanced DMEM (Gibco, США) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Cytiva, США), 1 % GlutaMAX (Gibco, США) и антибиотика-антимикотика (Gibco, США) в инкубаторе при 37°C и 5 % CO₂. Клетки культивировали в стерильных флаконах T-25, T-75, T-225 или в 6-луночных культуральных планшетах (SPL, Республика Корея) до достижения нужного уровня конфлюентности. При конфлюентности стремящейся к 100 % клетки диссоциировали при помощи 0.05% раствора трипсина 5 минут при 37°C (Gibco, США). Открепившиеся клетки разводили теплой средой и переносили в новые флаконы.

Клеточную линию *HEK293F* культивировали в среде FreeStyle (Gibco, США) с добавлением антибиотика-антимикотика (Gibco, США) в инкубаторе при 37°C, 5 % CO₂ при 125 rpm. Клетки культивировали в диапазоне плотности от 200 тыс до 2 млн клеток на 1 мл среды в стерильных колбах Эрленмейера (SPL, Республика Корея).

3.5.2. Проточная цитометрия антиген-специфичных клеток, с окрашиванием бактериофагами

500000 клеток осаждали центрифугированием (300 g, 10 мин) и клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл буфера (PBS, 0.5 % BSA, 2 mM ЭДТА), содержащего бактериофаги, экспонирующие на своей поверхности пептиды со специфической меткой (3xFLAG). Концентрацию бактериофагов варьировали от 2×10^{11} до 10^{13} фаговых частиц на 1 мл буфера. Клетки инкубировали с бактериофагами в течение 1 часа при 4°C при постоянном вращении. Затем клетки трижды отмывали от бактериофагов в буфере PBS, 0.5 % BSA, 2 mM ЭДТА и окрашивали флуоресцентными антителами к FLAG-эпитопу, конъюгированными с фикоэритрином (анти-FLAG-PE) (Biolegend, США) в темноте при 4°C в течение 30 мин. Не связавшиеся антитела отмывались дважды в буфере PBS, 2 mM ЭДТА. Клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии на приборе NovoCyte 2060 (ACEA Biosciences, США).

3.5.3. Экспрессия полноразмерных антител человека

Для получения рекомбинантных моноклонов человеческих IgG ставили транзientную трансфекцию в клетках *HEK293F*. Для этого 25 млн клеток *HEK293F* с процентным содержанием живых клеток более 95% осаждали центрифугированием при 180 g в течение 10 минут. Клеточный осадок ресуспендировали в 23 мл теплой среды FreeStyle (Gibco, США) с добавлением антибиотика-антимикотика (Gibco, США) и ставили в инкубатор на 37°C, 5 % CO₂ при 125 rpm. Затем готовили трансфецирующую смесь. Для этого в первой пробирке к 1 мл Opti-MEM (Gibco, США) добавляли 75 мкл PEI (Invitrogen, США), во второй пробирке к 1 мл Opti-MEM добавляли 12.5 мкг плазмидной ДНК pFUSE тяжёлой цепи и 12.5 мкг плазмидной ДНК pFUSE лёгкой цепи. Смеси тщательно перемешивали и объединяли в одну пробирку, затем инкубировали 30 минут на комнатной температуре. По окончании инкубации трансфецирующую смесь добавляли к клеткам. Нарботка белка длилась 5 суток. По истечении этого

времени клетки осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 10 минут. Супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм и приступали к выделению белка.

3.5.4. Лентивирусный дисплей на клетках Jurkat

Тотальную РНК выделяли из отсортированных В-клеток при помощи коммерческого набора RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Германия). Тотальная комплементарная ДНК была синтезирована методом обратной транскрипции (ОТ) с использованием MMLV RT в соответствии с протоколом производителя (Евроген, Российская Федерация). Гены переменных областей цепей Ig были амплифицированы в отдельных реакциях для тяжёлых, каппа и лямбда цепей. Продукты ПЦР для генов VH, Vk и Vλ, сконцентрированные с помощью магнитных шаров AMPure XP (Beckman Coulter, США) были вырезаны 1.5 % агарозного геля и очищены с помощью набора Monarch Gel Extraction Kit (New England Biolabs, США). Для получения ампликона VH-VL продукты ПЦР VH добавляли к продуктам ПЦР Vk или Vλ в эквимольном соотношении и проводили перекрывающуюся ПЦР. Ампликоны VH-VL с каппа- и лямбда-цепями объединяли в эквимольном соотношении. Полученные библиотеки переменных ампликонов VH-VL в формате scFv клонировали в лентивирусный вектор pLV2-Fc.

Для наработки лентивирусных частиц ставили транзientную трансфекцию клеток линии *HEK293T*. Накануне трансфекции клетки рассеивали во флакон Т-25 в концентрации 400 тыс клеток в мл, чтобы в день трансфекции конfluence клеток во флаконе приближалась к 90–95 %. Далее ставили трансфекцию, для этого в первой пробирке к 250 мкл Opti-MEM добавляли 21 мкл PEI (Invitrogen, США), во второй пробирке к 250 мкл Opti-MEM добавляли 5.2 мкг библиотеки в векторе pLV2-Fc, и плазмидные ДНК 2го поколения, кодирующие структурные гены лентивирусных частиц: 1.08 мкг ДНК VSV-G, 5.2 мкг ДНК GAG, 2.6 мкг ДНК REV. Смеси тщательно перемешивали и объединяли в одну пробирку, затем инкубировали 30 минут на комнатной температуре. По окончании инкубации трансфецирующую смесь добавляли к клеткам. Через 5 часов меняли среду. Через

48 часов отбирали супернатант, содержащий лентивирусные частицы и фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм. Далее лентивирусные частицы хранили на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для трансдукции клеточной линии *Jurkat* библиотекой VH-VL scFv, клетки разбавляли теплой средой RPMI до концентрации 500 тыс клеток в мл. Трансдукцию ставили в 6-луночных плашках. На одну лунку брали 1,5 млн клеток *Jurkat*, к ним добавляли полибрен (Millipore, США) до итоговой концентрации 5 мкг/мл и необходимый объем среды с лентивирусными частицами (подбирали заранее). Далее планшет с клетками центрифугировали при 1200 g и $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 90 минут. По окончании центрифугирования, клетки в каждой лунке ресуспендировали и инкубировали при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 5 % CO_2 48 часов. Эффективность трансдукции проверяли при помощи окрашивания антителами анти-Fc-PE на клеточном цитометре (Novocyte, ACEA Biosciences, США).

Для обогащения на рекомбинантный антиген заранее готовили конъюгат стрептавидин-флуоресцентная метка с биотинилированным антигеном. Трансдуцированные клетки *Jurkat* окрашивали одновременно двумя конъюгатами с разными флуорофорами в буфере (PBS, 0.5 % BSA, 2 mM EDTA) при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и качании в течение 1 часа. Далее клетки окрашивали антителами на человеческий IgG1-Fc-PE (SouthernBiotech, США) и красителем на мёртвые клетки SYTOX Green (Invitrogen, США) при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение получаса. Для обогащения на фаговую библиотеку антигенов брали 4×10^{13} частиц/мл библиотеки бактериофагов fd (PhAgL) в 1 мл конъюгатного буфера (PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA) и инкубировали с клетками *Jurkat* при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и качании в течении 1 часа. Далее клетки окрашивали антителами на человеческий IgG1-Fc-PE (SouthernBiotech, США), α -FLAG-APC (Bio-legend, США) и красителем на мёртвые клетки SYTOX Green (Invitrogen, США) при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение получаса. Обогащение антиген-положительных клонов проводили на проточном цитофлуориметре SH800 Cell Sorter (Sony, Япония).

3.6. Методы работы с В-клетками человека

3.6.1. Выделение В-клеток из периферической крови

Мононуклеарные клетки из периферической крови пациентов с РС и здоровых доноров были получены путем седиментационного обогащения в градиенте фиколла. Остаточную эритроцитарную фракцию удаляли с помощью лизирующего буфера АСК. Полученные мононуклеарные клетки фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 40 мкм. В-клетки из выделенных периферических мононуклеаров обогащали с использованием магнитных частиц Dynabeads (отрицательная селекция – Invitrogen, США) в соответствии с инструкциями производителя.

3.6.2. Окрашивание В-клеток для определения различных субпопуляций

В-клетки окрашивали флуоресцентными антителами: α -CD19-PE-Cy7, α -CD24-PE, α -CD38-APC, α -CD45-APC-Cy7 (Bio-legend, США) и красителем мёртвых клеток SYTOX Green (Invitrogen, США) в течение 60 минут при +4°C в темноте. Популяции регуляторных транзистентных клеток ($CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$) и общего пула В-клеток ($CD19^+$) отбирали непосредственно в микроцентрифужные пробирки с лизирующим буфером Qiazol (Qiagen, Германия). Сортинг клеток проводили с помощью проточного флуориметра BD FACSAria III. Субпопуляции В-клеток идентифицировали по следующим поверхностным маркерам: транзистентные Breg ($CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$), переходные клетки T1 ($CD19^+CD24^{+++}CD38^{+++}$), переходные клетки T2 ($CD19^+CD24^{++}CD38^{++}$), Breg памяти ($CD19^+CD24^{high}CD27^+$), В-клетки памяти ($CD19^+CD24^+CD38^{+/low}CD27^+$) или наивные периферические В-клетки ($CD19^+CD24^+CD38^{+/low}CD27^-$). После инкубации клетки промывали и затем ресуспендировали в PBS. Чтобы различать клетки T1 и T2 по экспрессии CD24 и CD38, выставляли ворота для такого анализа по клеткам здоровых доноров так, чтобы соотношение T2:T1 составляло 1:3. Количество лейкоцитов и общее количество лимфоцитов на мм³ определяли с помощью гематологического анализатора (Nihon Kohden MEK-7222, Nihon Kohden, Япония). Во всех образцах определяли количество В-клеток и

транзиентных Breg с помощью проточной цитофлуориметрии. Клеточный сортинг проводили с помощью BD FACSAria III, данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo 9.7.5 (TreeStar, Ashland, OR, USA).

3.6.3. Подготовка библиотек для секвенирования последовательностей иммуноглобулинов (RT-PCR)

Выделение РНК проводили 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, Российская Федерация). Олигонуклеотиды для амплификации переменных фрагментов иммуноглобулинов человека VH и VL содержали 15 прямых праймеров для VH и 4 обратных праймера для J-фрагмента тяжелой цепи человека, 13 прямых праймеров V_κ и 2 обратных праймера J_κ для легкой каппа цепи, и 16 прямых праймеров V_λ и 3 обратных праймера J_λ для легкой лямбда цепи. Полный список использованных олигонуклеотидов и их последовательности представлены в ***Приложении 5. Таблица 5***. Пятнадцать прямых праймеров VH использовали индивидуально в каждом образце в 50 мкл реакционной смеси с эквимолярной смесью четырех обратных праймеров JH. Тринадцать праймеров V_κ и шестнадцать праймеров V_λ использовали в индивидуальном виде для амплификации генов VL с соответствующей смесью двух обратных праймеров V_κ или трех обратных праймеров V_λ в 50 мкл реакционной смеси для каждого образца. В качестве матрицы в каждой реакции ПЦР использовали 0.02 мкг кДНК, полученной с использованием набора Hot Start Taq Master Mix (Евроген, Россия). 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 секунд, 52°C - 25 секунд, 72°C - 25 секунд); и финальная элонгация (72°C - 4 мин). Смеси ПЦР 15 образцов для генов VH, 13 образцов для генов V_κ и 16 образцов для генов V_λ были индивидуально

объединены и сконцентрированы до 50-80 мкл с использованием Amicon 30 кДа (Merck, Millipore, Германия). Продукты ПЦР (около 400 п.н.) VH, V_κ и V_λ наносили на 1.5% агарозные гели и чистили с помощью набора для очистки ДНК из агарозного геля (Monarch, NEB, США).

3.6.4. Широкомасштабное секвенирование переменных фрагментов VH, V_κ и V_λ иммуноглобулинов

1 мкг очищенного ПЦР-продукта VH, V_κ и V_λ 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 2x300 п.н. (Illumina) в ЦКП "Геномика" СО РАН (ИХБиФМ СО РАН, Новосибирск, Россия).

3.6.5. Анализ данных широкомасштабного секвенирования

Анализ данных широкомасштабного секвенирования проводили с использованием программы MiXCR в два этапа. Сначала исходные данные секвенирования обрабатывали с помощью алгоритма MiXCR по умолчанию (выравнивание, сборка, экспорт) с использованием библиотеки IMGT в качестве референса на гены зародышевых линий. Полученные прочтения, успешно выровненные с генами зародышевой линии и содержащие полную целевую последовательность иммуноглобулина (CDR1 + FR2 + CDR2 + FR3 + CDR3), далее подвергали повторной выборке для нормировки различных количеств прочтений. При анализе частоты встречаемости генов зародышевой линии не учитывались мутации в переменных фрагментах VH, V_κ и V_λ. Анализ репертуаров B-клеточных рецепторов выполнен с использованием языка программирования R (R Core Team (2017) (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия. URL <https://www.R-project.org/>). Непродуктивные последовательности IGH/IGL отфильтровывали перед анализом. Чтобы охарактеризовать идентичность зародышевой линии для каждого клонотипа, использовали нуклеотидную

последовательность, покрывающую часть CDR1-FR3, для расчета процента идентичности с соответствующей эталонной последовательностью V-сегмента. Программное обеспечение VDJ tools с подпрограммой CalcCdrAaStats использовалось для получения статистики по составу и физико-химическим свойствам аминокислот в области CDR3. Для анализа длины CDR3 определяли его длину как количество аминокислот от консервативного цистеина в конце части, закодированной V-сегментом, до консервативного фенилаланина или триптофана, закодированного J-сегментом.

3.6.6. Анализ секреции IL-10 В-клетками

Обогащенные В-клетки инкубировали в полной среде RPMI-1640, обогащенной глутамином, с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 10 mM HEPES, при плотности клеток $0.5 \cdot 10^6$ клеток/мл в 6-луночных культуральных планшетах при 37 °C и 5 % CO₂. Продукцию IL-10 индуцировали инкубацией с 10 мкг/мл CpG-B ODN 2006 в течение 20 часов. CpG-стимулированные В-клетки повторно стимулировали добавлением 50 нг/мл PMA (Форбол-12-миристан-13-ацетат) (Sigma-Aldrich, США) и 0.5 мкг/мл иономицина (Sigma-Aldrich, США) в течение 4 часов.

Стимулированные В-клетки дважды промывали PBS и окрашивали для оценки жизнеспособности клеток с помощью набора Zombie Violet Fixable Viability Kit (Biolegend, США) согласно инструкции производителя. Затем В-клетки промывали холодным буфером, (PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA). Затем 10^6 В-клеток ресуспендировали в 90 мкл холодной среды RPMI-1640 с добавлением 10% FBS и инкубировали с 10 мкл улавливающего реагента IL-10 (анализ секреции IL-10, Miltenyi Biotec, Германия) в течение 5 минут на льду. Затем добавляли 1 мл теплой среды RPMI-1640 с добавлением 10% FBS, и выдерживали в течение 45 минут при 37 °C при медленном непрерывном вращении. В-клетки дважды промывали холодным буфером (PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA), ресуспендировали в 80 мкл холодного буфера (PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA) с добавлением 10 мкл IL-10 детектирующего антитела (APC) (анализ секреции IL-10, Miltenyi Biotec, Германия) и 10 мкл смеси антител (α -CD19-PE-Cy7, α -CD24-PE, α -CD38-

AlexaFluor700). После 20-минутной инкубации на льду В-клетки промывали холодным буфером и ресуспендировали в PBS. В-клетки IL-10⁺ и IL-10⁻ анализировали с использованием FACS Aria III (BD Biosciences, США).

3.7. Методы работы с белками

3.7.1. Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле

Белковый электрофорез проводили по Лэммли. Для этого использовали гель, состоящий из двух частей: концентрирующей и разделяющей. Нижний гель (разделяющий) готовили из 8-15 % акриламида:бисакриламида (в соотношении 29:1), 0.375 М Трис-НСl (рН=8.9), 0.1 % SDS. Для полимеризации добавляли 7 мкл N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина и затем 15 мкл 33 % персульфата аммония на 5 мл геля. Верхний (концентрирующий) гель готовили из 5% акриламида:бисакриламида (в соотношении 29:1), 0.125 М Трис-НСl (рН=6.8). Для нанесения образцов использовали четырехкратный буфер Bio-Rad (США), в который заранее добавляли 2-меркаптоэтанол в соотношении 1:10. Образцы в буфере нанесения прогревали 5 минут при 95°C и затем вносили в гель. Электрофорез в концентрирующем геле вели при силе тока 20 мА на 1 гель, выставляя ограничение по напряжению (до 90 В). При входе образцов в разделяющий гель, электрофорез продолжали при 25 мА на гель, выставляя ограничение по напряжению (до 200 В). После окончания электрофореза, гель окрашивали Кумасси синим R-250.

3.7.2. Иммуноферментный анализ

В лунки 96-лучночного планшета высокой сорбции добавляли по 50 мкл раствора, содержащего антитела или антигены в концентрации 3–4 нг/мкл в карбонатном буфере (рН = 9). Планшет заклеивался пленкой и инкубировался в течение 14 часов при 4 °С. Далее лунки блокировали 250 мкл раствора 5 % обезжиренного молока или БСА в карбонатном буфере. Далее лунки промывали 3 раза раствором PBS-Tween 0.1 %. Затем добавляли изучаемые образцы антител в

различных разведениях в конъюгатном буфере (PBS-Tween 0.05 %, 0.5 % обезжиренного молока) и инкубировали 1 час при 37 °С и помешивании. Далее лунки промывали 3 раза раствором PBS-Tween 0.1 % и вносили вторичные антитела, конъюгированные с HRP, в конъюгатном буфере и инкубировали 1 час при 37 °С и помешивании. Далее лунки промывали 5 раз раствором PBS-Tween 0.1 %. Взаимодействие детектировали при помощи раствора тетраметилбензидина. Реакцию останавливали 10 % раствором серной кислоты и измеряли поглощение при 450 нм на планшетном ридере Varioskan LUX (Thermo Scientific, США).

3.7.3. Металл-аффинная хроматография

Металл-аффинную хроматографию белков, несущих гистидиновую метку проводили с использованием Ni-NTA сефарозы (Qiagen) на хроматографе NGC (Bio-Rad, США). Образец наносили на предварительно уравновешенную буфером нанесения колонку, содержащую сорбент, при скорости потока 0.5–1 мл/мин. Колонку затем промывали буфером нанесения до тех пор, пока оптическое поглощение не выйдет на плато. Элюировали белок буфером, содержащим 350 мМ имидазола на скорости потока 0.5-1 мл/мин.

3.7.4. Аффинная хроматография Protein G

Аффинную хроматографию антител проводили с использованием колонок HiTrap Protein G (Cytiva, Швеция) в соответствии с протоколом производителя на хроматографе NGC (Bio-Rad, США).

3.7.5. Гель-фильтрация

Для гель-фильтрации использовали колонки Superdex 75 10/300 GL или Superdex 200 10/300 GL в зависимости от молекулярной массы белка в соответствии с протоколом производителя на хроматографе NGC (Bio-Rad, США).

3.8. Измерения констант связывания антител методом поверхностного плазмонного резонанса

Количественные характеристики взаимодействий антиген-антитело были получены с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса на биосенсоре Biacore T200 (GE Healthcare, США). Измерения выполнялись при 20°C с использованием чипов CM5 и коммерческого буфера HBS. Антиген иммобилизовали на чипе с использованием amino-сшивающего набора по инструкции производителя. Очищенные антитела добавляли в различных концентрациях. Получаемые сенсограммы анализировали при помощи программы Biacore T200 Evaluation Software с использованием кинетической модели Langmuir 1:1.

3.9. Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с помощью GraphPad Prism 8.0 (GraphPad).

4. Результаты и обсуждения

4.1. Поиск новых мишеней аутоиммунной агрессии при рассеянном склерозе

Исследования последних десяти лет окончательно продемонстрировали наличие прямой связи между вирусной инвазией и развитием РС [104]. При этом, РС – крайне гетерогенное заболевание, этиология которого до конца не изучена, и все ещё существует потребность в более качественной своевременной диагностике. Появляются все новые биомаркёры РС [132], [133], однако, их универсальность остается под вопросом. При этом даже классические антимиелиновые антитела, такие как анти-MBP, анти-MOG, анти-PLP, характерны не для всех пациентов с РС, и могут присутствовать и в здоровой иммунной системе [134]. Поэтому идентификация и расширение панели аутоиммунных мишеней, для которых характерен повышенный титр антител при РС, остается актуальной проблемой. Одна из задач данного исследования направлена на поиск новых потенциальных маркёров, вызывающих аутоиммунный ответ при РС. Для поиска аутоантигенных мишеней мы применили технологию PhIP-Seq с созданием фаговой библиотеки белков человека, ассоциированных с аутоиммунными патологиями (**Рисунок 7**).

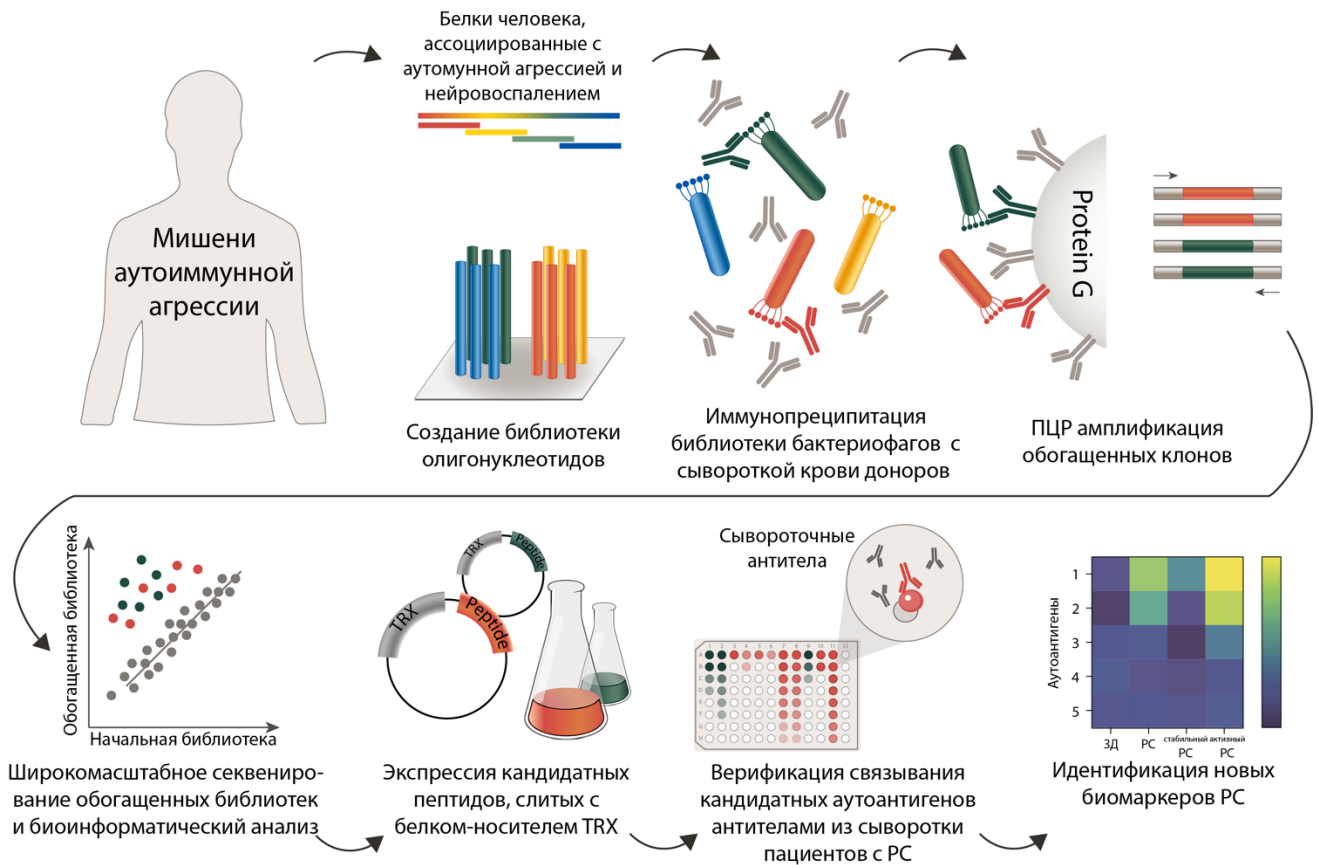


Рисунок 7. Схема эксперимента по поиску новых аутоантигенных мишеней у пациентов с рассеянным склерозом. Библиотека аутоантигенных мишеней человека состоит из перекрывающихся пептидов длиной 44 а.о., экспонированных на поверхности бактериофага fd. Очищенные образцы IgG из сыворотки крови пациентов с рассеянным склерозом и здоровых доноров инкубировали с библиотекой бактериофагов. Бактериофаги, связанные антителами сыворотки, обогащали при помощи аффинной смолы Protein G, узнающей Fc-фрагмент антител человека. Фаговая ДНК, кодирующая отобранные пептиды, амплифицировалась для последующего широкомасштабного секвенирования (NGS). На основании данных NGS, идентифицированные последовательности, соответствующие целевым аутоиммунным антигенам-кандидатам, экспрессировали в прокариотической системе, слитыми с белком-носителем TRX для последующей верификации связывания при помощи ИФА. ЗД – здоровые доноры; РС – рассеянный склероз.

4.1.1. Создание ДНК-библиотек, кодирующих перекрывающиеся фрагменты белков, ассоциированных с аутоиммунной агрессией

В своей работе мы применили модифицированную технологию PhIP-Seq [193] для получения данных об иммунном ответе пациентов с РС. Ранее Ларман и коллеги создали фаг-дисплейную ДНК-кодирующую библиотеку полного протеома человека для поиска антигенных мишеней. Однако PhIP-Seq с

представленной библиотекой не позволил обнаружить общего аутоантигенного маркера для РС [194]. С целью повышения вероятности идентификации аутоиммунных В-клеточных мишеней при РС нами была создана ДНК-кодирующая библиотека белков человека, ассоциированных с различными аутоиммунными патологиями, охватывающих как В-клеточные, так и Т-клеточные мишени; также библиотека обогащена белками, участвующими в регуляции клеточного цикла, деградации и фолдинге белков. В итоге мы отобрали кодирующие ДНК-последовательности 302 белков человека (6424 пептида), связанных с различными аутоиммунными патологиями, из базы данных аутоантигенов человека (AAgAtlas project – <http://biokb.ncpsb.org/aagatlas>) [195] и 642 белков (5536 пептидов), участвующих в деградации клеточных белков и клеточном цикле. Полученные последовательности ДНК были разделены на фрагменты длиной 132 нуклеотида с перекрытием между соседними последовательностями в 42 нуклеотида. Для дальнейшей ПЦР-амплификации синтезированной библиотеки к 5'- и 3'-концу каждой последовательности были добавлены адаптеры длиной 17 и 20 нуклеотидов соответственно. Библиотека была синтезирована при помощи программируемого ДНК-микрочипа компанией Twist Bioscience. Полученная библиотека, состояла из ~12000 уникальных ДНК-последовательностей, кодирующих пептиды, ассоциированные с аутоиммунной агрессией (Рисунок 8).



Рисунок 8. Схематическое изображение синтезированной одноцепочечной ДНК-кодируемой библиотеки перекрывающихся олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды длиной 132 нуклеотида фланкированы адаптерами и имеют перекрывающиеся участки по 42 нуклеотида.

Для создания библиотеки аутоантигенов человека в фаговом векторе необходимо амплифицировать пул синтезированных олигонуклеотидов, представляющих из себя сложную ДНК-матрицу. При работе с такими матрицами

ДНК существуют трудности, касающиеся неравномерной амплификации отдельных последовательностей. Так, при постановке традиционной ПЦР на выходе образуется смесь, в которой каждая отдельная последовательность ДНК представлена неравномерно. Данные сложности при амплификации обусловлены различной скоростью амплификации матриц и неконтролируемым образованием химерных последовательностей, вызванным повторами ДНК или гомологичными последовательностями, обычно встречающимися во время подготовки геномных библиотек или библиотек антител. Для того, чтобы избежать неравномерной амплификации и образования химерных последовательностей, нами был оптимизирован метод амплификации сложных матриц в эмульсиях (эмПЦР).

Для оптимизации протокола эмПЦР сравнивали две наиболее распространенные стратегии эмульгирования: перемешивание с использованием магнитной мешалки (m) и перемешивание с использованием вихревого смесителя – вортекса (v). Важнейшие критерии для оценки получаемых эмульсий включали: полидисперсность капель, выход продукта ПЦР, качество амплифицированной ДНК и однородность амплификации. Амплифицируемые нами библиотеки содержали частично перекрывающиеся последовательности ДНК и за счёт этого были особенно склонны к образованию химер и потере продукта во время традиционной ПЦР-амплификации.

Эмульсия, полученная вихревым перемешиванием (вортексированием), имела более равномерное распределение капель по размерам, чем полученная при магнитном перемешивании – 5.5 ± 1.5 мкм против 3.0 ± 2.2 мкм соответственно (**Рисунок 9**). Последняя имела значительную популяцию мелких капель размером меньше 2 мкм, что уменьшило средний диаметр капель и увеличило полидисперсность.

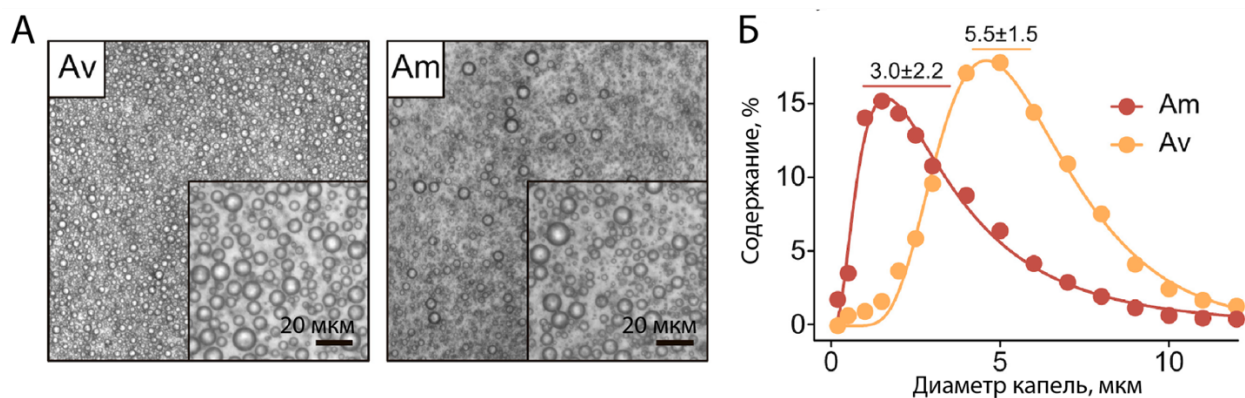


Рисунок 9. Сравнение различных методов постановки эмПЦР, используемых для амплификации сложной библиотеки ДНК. (А) Световая микроскопия эмульсий, полученных вихревым перемешиванием (вортексированием) (Av) или с использованием магнитной мешалки (Am) с использованием эмульгатора Abil EM 180. (Б) Распределение размера капель в эмульсиях Am (красный) и Av (оранжевый).

Эффективность амплификации во время эмПЦР зависит от среднего количества молекул матрицы на каплю (λ). Распределение Пуассона в данном случае позволяет оценить процент капель с n молекул матрицы ДНК для данного значения λ . Мы сравнили две разные концентрации матрицы – 6 и 60 пМ, соответствующие расчетным $\lambda = 0.3$ и $\lambda = 3$. $\lambda = 0.3$ соответствует 26 % заполненных капель, из которых 86 % должны содержать одиночные молекулы ДНК. $\lambda = 3$ приводит к заполнению 95 % капель, из которых только 16 % имеют единственную копию молекулы ДНК. Таким образом, тестируемые условия позволили сравнить два радикально разных распределения: одно с высоким процентом пустых капель, с занятыми каплями, содержащими преимущественно одиночные ДНК-матрицы, и второе, где почти все капли заняты минимум одной молекулой ДНК матрицы, и большинство капель содержат смесь ДНК-матриц.

На сегодняшний день для постановки эмПЦР используются два основных состава реакционной смеси: на основе эмульгатора Abil EM или смеси Span/Tween/Triton. Смесь из минерального масла с добавлением 3 % Abil EM 180 (масло А) или смесь из минерального масла с добавлением 4.5 % Span 80, 0.4 % Tween 80, 0.05 % Triton X-100 (масло Т) использовали для сравнения стабильности получаемых эмульсий и качества амплифицированной библиотеки ДНК.

Результаты эмПЦР с маслом А были более воспроизводимыми независимо от метода эмульгирования. Тридцати пяти циклов эмПЦР в масле А было достаточно для достижения насыщения в большинстве капель (**Рисунок 10**). Постановка реакции в масле Т приводила к образованию высокомолекулярных побочных продуктов и к потере качества амплифицированной ДНК после 25 циклов, что может быть вызвано слиянием капель эмульсии вследствие нестабильности масла Т (**Рисунок 10**).

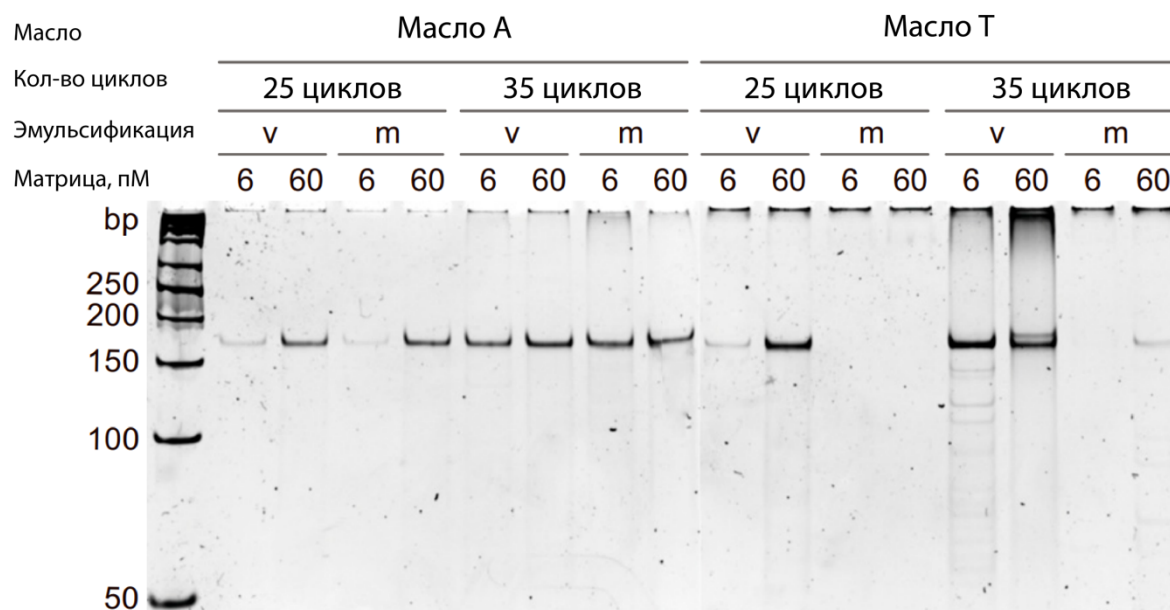


Рисунок 10. Первичный подбор условий постановки реакции эмПЦР. Продукты эмПЦР, полученные с использованием различных эмульгаторов: масло А – Abil EM 180 или масло Т – смесь Span/Tween/Triton. Подбор количества циклов ПЦР: 25 или 35 циклов. Подбор различных условий эмульгирования: **v** – вихревое перемешивание (вортексирование) или **m** – перемешивание с использованием магнитной мешалки. Варьирование концентрации матрицы (6 и 60 пМ). Визуализация в полиакриламидном геле с окрашиванием бромистым этидием, bp – пары оснований.

Для более глубокого анализа качества амплифицируемой ДНК и получения данных о частоте и распределении ошибок, возникающих во время амплификации библиотек, мы провели высокопроизводительное секвенирование полученных библиотек (NGS). Независимо от использованной стратегии эмульгирования, большинство обнаруженных ошибок представляли собой делеции (60–68 %); замены и инсерции составляли соответственно 20–22 % и 12–18 % (**Рисунок 11А**). Вероятность делеции/вставки составляла около 0.5 % в любом положении

нуклеотида и, вероятно, отражала начальное распределение неточностей синтеза олигонуклеотидов одноцепочечной ДНК. «Грубые ошибки» (англ. gross errors), приводящие к изменению длины продуктов ПЦР более чем на 3 нуклеотида, наблюдались примерно в 20 % прочтений. Несмотря на хорошее качество продукта ПЦР, наблюдаемое после эмульгирования с помощью магнитной мешалки (Am), фактическое распределение прочтений, оцененное с помощью NGS, было менее равномерным по сравнению с эмульгированием, полученным при вихревом перемешивании (Av) (**Рисунок 11Б**). Образец эмПЦР, полученный с использованием масла T и демонстрирующий интенсивную полосу высокомолекулярного побочного продукта, продемонстрировал более узкое распределение прочтений по сравнению с образцом Am (**Рисунок 11Б**). Более высокая дисперсия прочтений в образцах, полученных путем эмульгирования с помощью магнитной мешалки, привела к чрезмерной представленности отдельных последовательностей. Слияние капель эмульсии во время циклов эмПЦР, вызванное более низкой стабильностью масла T, привело к меньшему покрытию последовательностей исходной библиотеки в образце Tv по сравнению с образцом Av (**Рисунок 11Б**). Таким образом, появление четких полос ДНК нужного размера на электрофореграмме не коррелирует с равномерностью амплификации отдельных олигонуклеотидов при эмПЦР.

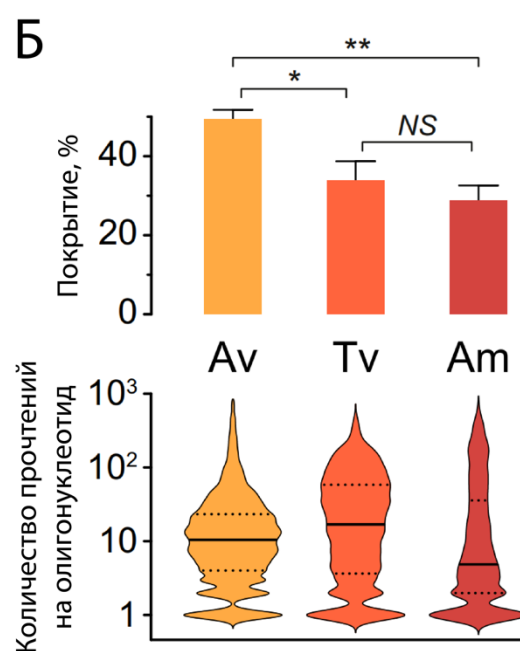
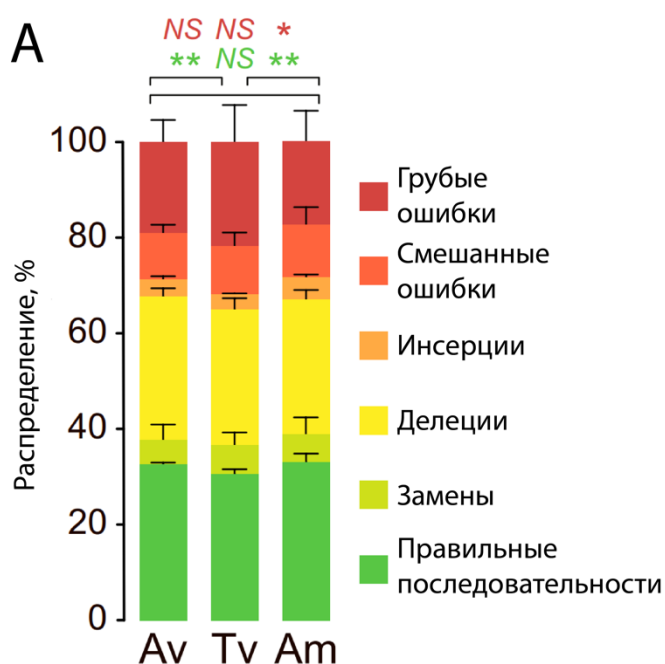


Рисунок 11. Сравнение качества библиотек ДНК, полученных в реакции эмПЦР при помощи различных стратегий эмульгирования. (А) Распределения различных типов ошибок, наблюдаемых при широкомасштабном секвенировании образцов Av, Tv и Am, проанализированные с помощью t-критерия Стьюдента. Данные представляют собой среднее значение трех биологических повторов. (Б) Распределение прочтений NGS образцов Av, Tv и Am. Покрытие представляет собой процент наблюдаемых последовательностей из исходной библиотеки, оцениваемый как среднее из трех значений, рассчитанных для 3.3×10^5 прочтений, случайно выбранных из данных NGS, проанализированных с помощью t-критерия Стьюдента. Скрипичные диаграммы представляют распределение прочтений NGS для образцов Av, Tv и Am. Скрипичные диаграммы были получены с использованием 2.5×10^5 случайно выбранных прочтений, сопоставленных с исходной теоретической библиотекой. Указаны медиана (сплошная линия) и межквартильный размах (штриховая линия). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; NS – не значимо. Av – масло A, вихревое перемешивание, Tv – масло T, вихревое перемешивание, Am – масло A, перемешивание с использованием магнитной мешалки.

Далее мы сравнили качество ДНК, полученной методами эмПЦР и традиционной ПЦР (**Рисунок 12**). Постановка эмПЦР с подобранными нами условиями (масло A, вихревое перемешивание) позволяет сократить количество «грубых ошибок», а также достоверно увеличивает выход последовательностей, для которых удалось добиться идеальных прочтений (**Рисунок 12А**). Более того, эмПЦР привела к более равномерному распределению амплифицированных последовательностей (**Рисунок 12Б**). Данные результаты повторялись для двух различных концентраций матрицы ДНК (6 и 60 пМ, что соответствует $\lambda \approx 0.3$ и 3). Постановка традиционной ПЦР привела к значительно менее равномерному распределению последовательностей и к увеличению количества сверхпредставленных последовательностей (**Рисунок 12Б**). Чрезмерная представленность отдельных клонов способна привести к более низкому покрытию исходной библиотеки и потере наименее представленных последовательностей. Данный эффект особенно заметен при амплификации библиотек с низкой исходной концентрацией матрицы (**Рисунок 12Б**) и способен привести к неравномерному распределению, а также к отклонениям в разнообразии последовательностей после ПЦР-амплификации.

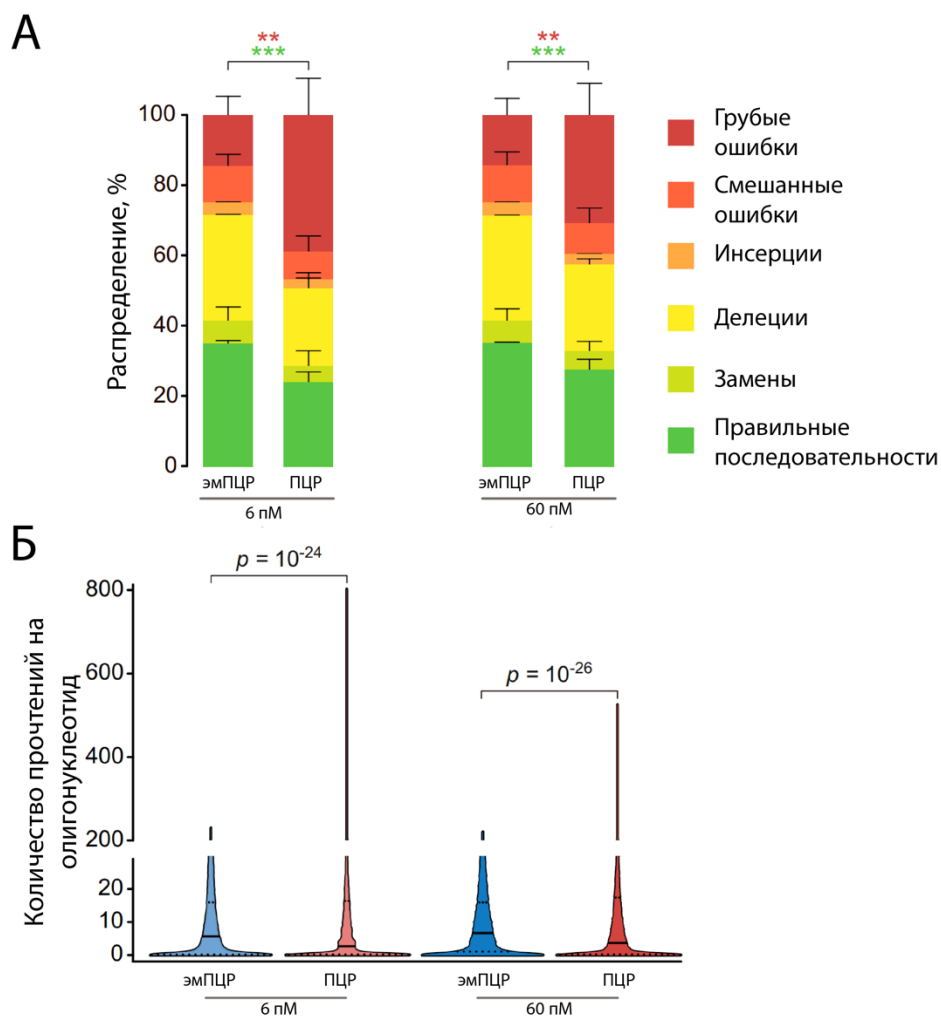


Рисунок 12. Сравнение качества библиотек ДНК, полученных в реакции эмПЦР или традиционной ПЦР. (А) Распределения различных типов ошибок, наблюдаемых с помощью широкомасштабного секвенирования образцов, полученных в реакции традиционной ПЦР или эмПЦР по подобранным условиям (масло А, вихревое перемешивание) для различных концентраций матриц (6 и 60 пМ). Распределение ошибок анализировалось с помощью t-критерия Стьюдента; приведены р-значения для идеальных прочтений и грубых ошибок. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. (Б) Распределение прочтений NGS образцов, представленное в виде скрипичных диаграмм. Для амплификации использовали различные концентрации матрицы (6 и 60 пМ) и методы амплификации (традиционная ПЦР или эмПЦР). Графики были получены с использованием 1.5×10^5 случайно выбранных прочтений, сопоставленных с исходной теоретической библиотекой. Указаны медиана (сплошная линия) и межквартильный размах (штриховая линия). Приведены р-значения критерия суммы рангов Вилкоксона между традиционной ПЦР и эмПЦР.

Таким образом, нами были подобраны оптимальные условия для проведения амплификации сложных матриц ДНК в каплях эмульсии [196]. Для постановки эмПЦР капли эмульсии не должны сливаться во время амплификации.

Использование стабильной эмульсии для эмПЦР позволяет выполнять большое количество циклов амплификации и достигать насыщения амплификации в каждой капле, содержащей матрицу. Сам метод эмульгирования должен удовлетворять критериям совместимости с ПЦР (не ингибировать реакцию), быть высокопроизводительным и позволять генерировать монодисперсную эмульсию мелких (~5 мкм) капель. Заполняемость капель матрицей ДНК должна быть оптимизирована для достижения максимального выхода эмПЦР. Эмульгирование на основе вихревого смесителя (вортекса) с использованием поверхностно-активного вещества Abil EM 180 при концентрации матрицы ~60 пМ удовлетворяет этим критериям и было выбрано нами для дальнейших манипуляций с библиотеками ДНК и амплификации итоговой библиотеки аутоантигенов человека (Рисунок 13) [196].

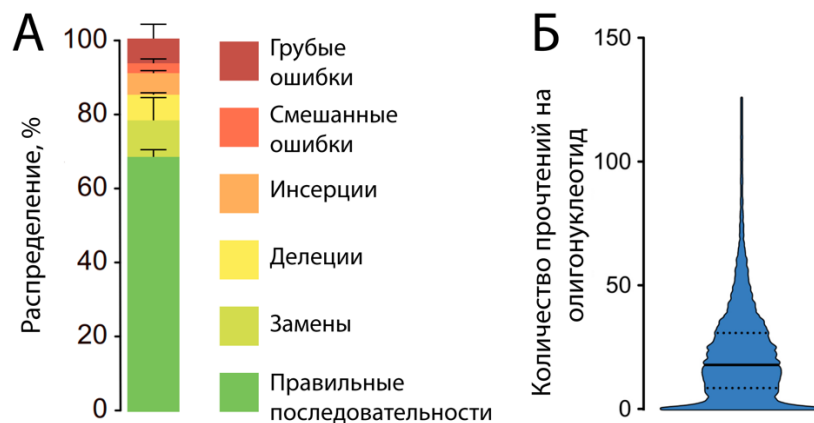


Рисунок 13. Характеристика полученной библиотеки аутоантигенов человека. (А) Распределение различных типов ошибок, наблюдаемых при широкомасштабном секвенировании образца, полученного в реакции эмПЦР по подобранным условиям (масло А, вихревое перемешивание) при концентрации матрицы 60 пМ. (Б) Распределение прочтений NGS полученной библиотеки, представленное в виде скрипичной диаграммы. Диаграмма получена с использованием 2.5×10^5 случайно выбранных прочтений, сопоставленных с исходной библиотекой. Указаны медиана (сплошная линия) и межквартильный размах (штриховая линия).

4.1.2. Создание фаг-дисплейной библиотеки перекрывающихся фрагментов аутоантигенов на основе вектора *fADL*

Для поиска потенциальных мишеней аутоиммунной агрессии при РС мы сконструировали фаг-дисплейную библиотеку потенциальных аутоантигенов. В

качестве фага-носителя нами был выбран нитчатый бактериофаг fd. Данный бактериофаг способен экспонировать белки и белковые фрагменты (длиной до 350 а.о.) на своей поверхности в составе белков оболочки pIII. Добавив в генетическую конструкцию fADL перед геном pIII последовательность, кодирующую необходимый пептид, можно добиться получения бактериофагов, экспонирующих на своей поверхности пептиды из библиотеки (**Рисунок 14**). Для наработки фаговых частиц использовали клетки *E. Coli* штамма TG1. При этом, использование конструкции fADL, содержащей весь геном бактериофага целиком, позволило нам нарабатывать фаговые частицы без использования фага-помощника. К тому же использование вектора fADL обеспечивает наличие экспонируемого пептида на каждой фаговой частице.

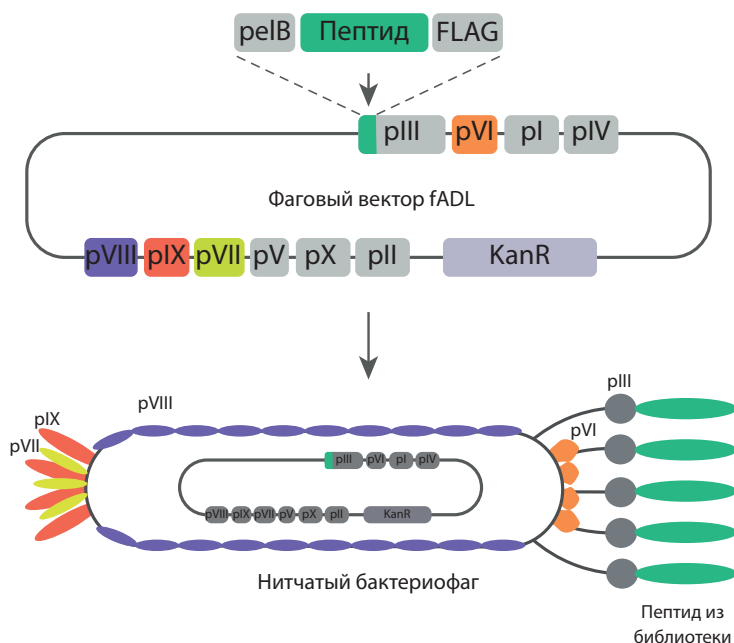


Рисунок 14. Схематическое изображение фаговой частицы и векторной карты fADL, содержащей геном бактериофага fd. При добавлении последовательности, кодирующей пептид библиотеки перед геном pIII, образуются фаговые частицы, экспонирующие на своей поверхности данный пептид. KanR – ген устойчивости к канамицину, pelB – прокариотическая лидерная последовательность, FLAG – метка для специфичной детекции бактериофагов. pII, pX и pV – репликативные белки; pI, pIV и pXI – морфогенетические белки; pVIII, pIII, pVI, pVII и pIX – структурные белки (участвуют в сборке фаговой частицы).

Для того, чтобы обеспечить наибольший выход фаговых частиц, позволяющий производить манипуляции с библиотекой, содержащей 12000 уникальных последовательностей, нами были подобраны условия наработки

наибольшего количества фаговых частиц в клетках *E. coli*. Сравнивали различное время культивирования клеток-продуцентов (16 и 24 часа) и температурные условия (+30°C и +37°C). Инкубация культуры клеток-продуцентов при температуре +30°C в течение 16–24 часов позволила добиться максимального выхода фаговых частиц (более 10^{10} частиц на 1 мл культуральной среды).

Далее мы проверили функциональность полученных бактериофагов на модельных клетках линии *Raji* с рекомбинантным BCR известной специфичности (*Raji-FL*) [197]. Мы наработали фаговые частицы, несущие на своей поверхности лиганд данного BCR (пептид H7), и верифицировали специфичность узнавания данного пептида в составе фаговых частиц при помощи цитофлуориметрии (**Рисунок 15**). В качестве отрицательного контроля использовали иррелевантный бактериофаг, не обладающий сродством к рецептору клеток *Raji-FL*. Для специфичной детекции все бактериофаги несли на своей поверхности метку FLAG (**Рисунок 14**). В начале мы проверили, как влияет различное соотношение иррелевантного бактериофага к целевому (H7) на способность детектировать специфическое взаимодействие бактериофагов с клетками *Raji-FL* (**Рисунок 15А**). Для этого клетки *Raji-FL* проинкубировали с раствором бактериофагов в концентрации 10^{13} фаговых частиц на 1 мл среды, содержащим различное соотношение двух фагов. Сигнал флуоресценции, при котором детектировалось 0.2 % клеток, проинкубированных с отрицательным контролем, считался пороговым сигналом, по которому выставляли ворота для положительного флуоресцентного сигнала. Используемая нами система позволила детектировать специфический сигнал с использованием бактериофагов H7, взятыми в соотношении 1:100 с иррелевантными бактериофагами для 92.8 % антиген-специфичных клеток. Соотношение целевых фагов к иррелевантным 1:500 обеспечивало детекцию 28.2 % антиген-специфичных клеток, соотношение 1:1000 – 3.2 %. Несмотря на значительное падение сигнала при разведении фагов H7 до 10^{11} частиц в мл, субпопуляция антиген-специфических клеток, окрашенных такими фагами, достоверно детектируется с использованием цитофлуориметра (**Рисунок 15А**). Далее мы проверили, как повлияет на уровень сигнала уменьшение концентрации

фаговых частиц в растворе (**Рисунок 15Б**). Мы сравнили 3 концентрации фаговых частиц (10^{13} , 10^{12} и $2 \cdot 10^{11}$ частиц в 1 мл среды). Уменьшение концентрации бактериофагов в 100 раз позволило детектировать сигнал на уровне 95.8 %. Однако при такой концентрации частиц, разведение целевых фагов irrelevantными (1:100) снижает сигнал до уровня 2.9 % (**Рисунок 15В**). Данные результаты были получены в соавторстве с Ишиной ИА [198].

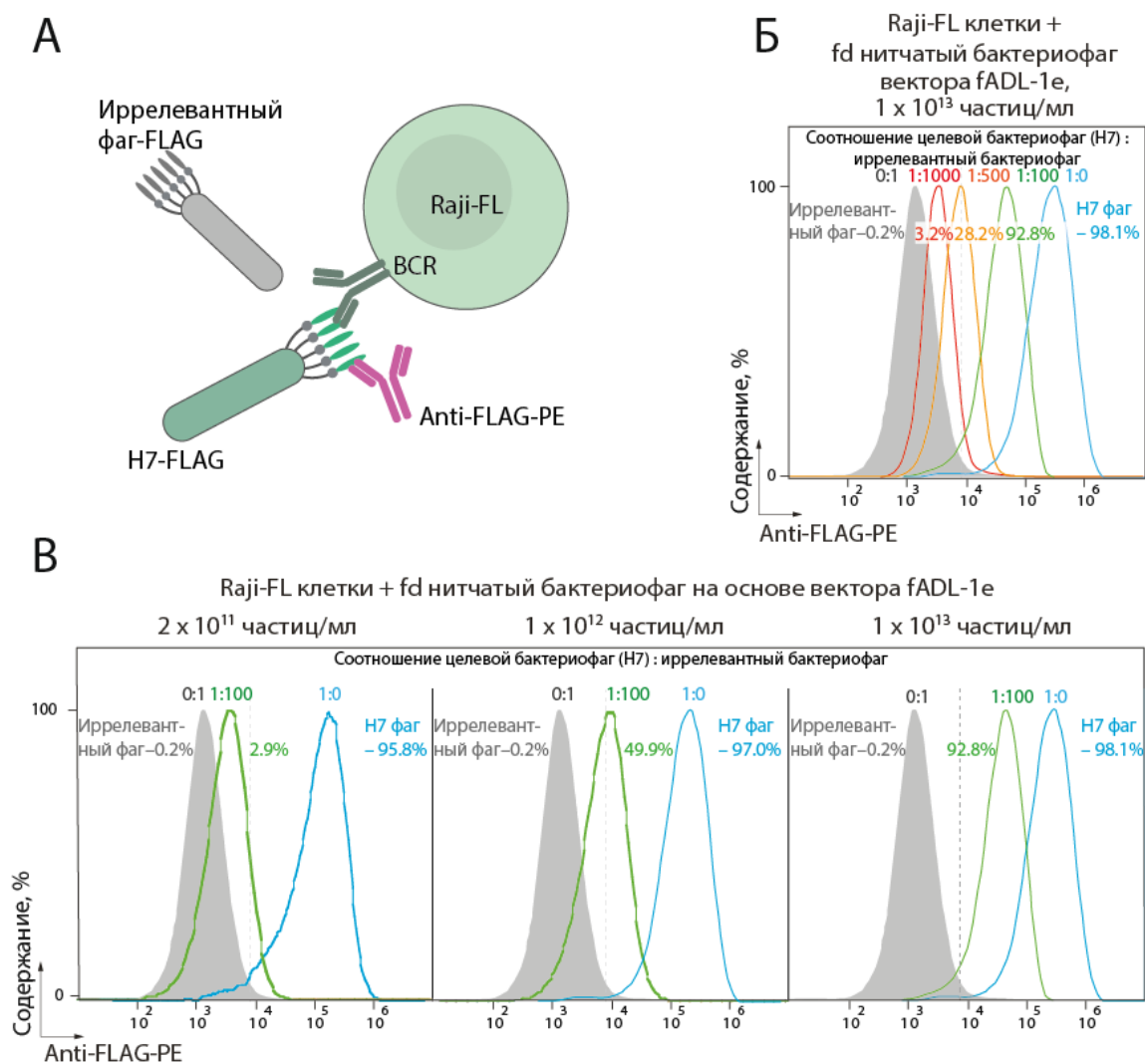


Рисунок 15. Верификация сборки фаговых частиц и их функциональности на примере бактериофага с пептидом H7-FLAG и клеточной линии *Raji-FL*. (А) Клетки *Raji-FL* экспонируют на поверхности BCR, специфично распознающий пептид H7-FLAG. Клетки *Raji-FL*, с которыми связались бактериофаги H7-FLAG, окрашиваются при помощи антитела с флуоресцентной меткой anti-FLAG-PE. В качестве отрицательного контроля использовались бактериофаги, несущие irrelevantный пептид с меткой FLAG. (Б) Подбор различных соотношений бактериофагов H7 к irrelevantным бактериофагам, где соотношение 0:1 (серый цвет) соответствует связыванию только с irrelevantным бактериофагом, а 1:0 (голубой) – только с бактериофагом H7. (В) Подбор различных концентраций фаговых частиц, инкубируемых с клетками.

Таким образом, функциональность собираемых фаговых частиц была подтверждена на модельном фаге, несущем пептид Н7 и линии клеток *Raji-FL* с BCR, специфичным к данному пептиду.

4.1.3. Разработка платформы для высокопроизводительного скрининга антиген-специфичных иммуноглобулинов на основе модельной библиотеки вирусных иммуногенов

Для дальнейшей верификации функциональности получаемых фаговых библиотек для отборов антиген-специфичных иммуноглобулинов нами была создана модельная библиотека пептидов S-белка вируса SARS-CoV-2. Известно, что данный белок, а так же его домены, в особенности – RBD (англ. receptor-binding domain), могут успешно применяться для отбора и последующей характеристики вирус-нейтрализующих антител доноров, переболевших COVID-19 [199,200]. Однако “традиционный” метод отбора антиген-специфичных антител предполагает идентификацию конкретного иммуногена, экспрессию и очистку полноразмерного белка для проведения дальнейших раундов отборов. Так как часто конкретный антиген не известен, только его идентификация и подготовка может занимать значительно больше четырех недель. Предложенная нами платформа для поиска антиген-специфичных иммуноглобулинов не требует идентификации конкретной антигенной мишени и позволяет сократить подготовительный этап до двух недель (**Рисунок 16**).

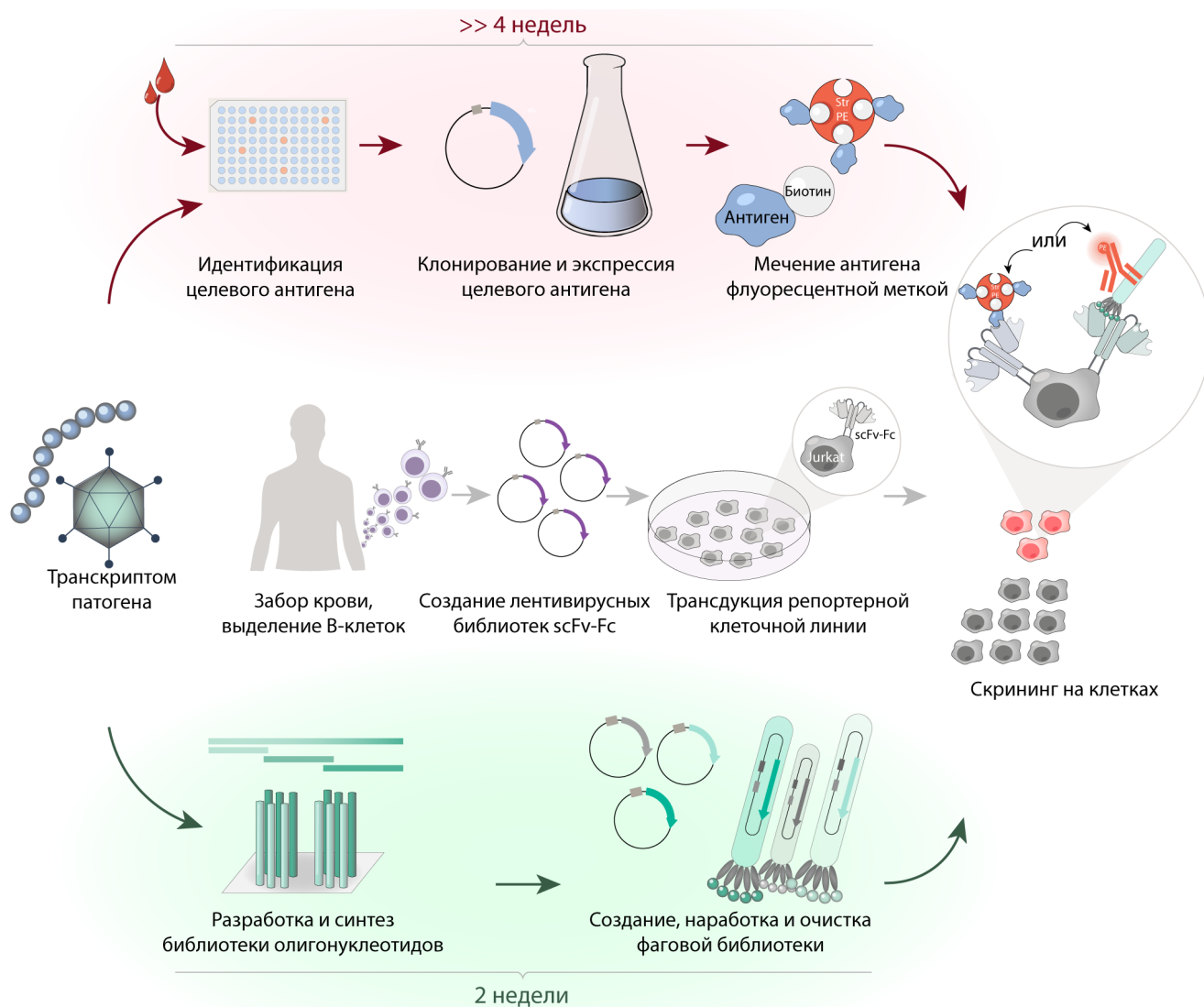


Рисунок 16. Схема выделения антиген-специфичных иммуноглобулинов с использованием библиотеки фаговых антигенов (PhAgL) и проточной цитометрии. Библиотека антител доноров, представляет собой трансгенную линию клеток *Jurkat*, экспрессирующую на своей поверхности мембраносвязанные scFv-Fc. “Традиционный” метод выделения антиген-специфичных моноклональных антител предполагает предварительную идентификацию целевого антигена, его наработку и очистку (верхняя панель, выделенная красным), при этом для скрининга антиген-специфичных антител при помощи библиотеки PhAgL требуется только создание библиотеки антигенов на основе транскрипта патогена (нижняя панель, выделенная зеленым).

Мы сравнили два подхода для отбора антиген-специфичных антител – при помощи рекомбинантного RBD и созданной библиотеки перекрывающихся фрагментов S-белка, названной PhAgL (англ. Phage antigen library – фаговая антигенная библиотека). Для создания библиотеки мы использовали следующие последовательности: полноразмерный RBD (Spike₃₃₁₋₅₃₀) и иммунодоминантные

фрагменты S-белка: Spike₃₅₄₋₅₁₉, Spike₃₅₈₋₄₁₀, Spike₅₃₉₋₅₈₃, Spike₇₉₅₋₈₃₉ (**Рисунок 17**). Все перечисленные фрагменты были клонированы в конструкцию fADL перед геном белка оболочки фага рIII.

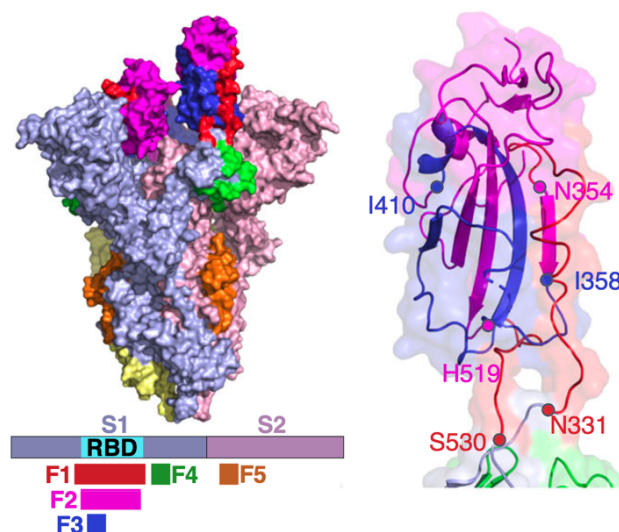


Рисунок 17. Создание фаговой библиотеки антигенов. Структура тримера S-белка (использована структура 7fcd). Соответствующие антигенные фрагменты, использованные при создании фаговой библиотеки, представлены внизу: F1 (красный, N331-S530), F2 (розовый, N354-H519), F3 (синий, I358-I410), F4 (зеленый, V539-E583), F5 (оранжевый, K795-D839).

Далее (после подтверждения вируснейтрализующей активности сывороток крови доноров) нами были созданы лентивирусные библиотеки антител. Для этого мы изолировали В-клетки из периферической крови доноров и предварительно обогатили их на RBD-связывающие клоны при помощи клеточного сортирования. Отобранные В-клетки были использованы для создания библиотек случайных комбинаций VH-VL. Нами было получено 93 ± 63 вариантов VH и 174 ± 111 вариантов VL для каждой библиотеки (5 доноров, **Приложение 4. Таблица 4**). Таким образом, при условии, что любая тяжёлая цепь может сочетаться с любой лёгкой цепью, теоретически возможное разнообразие полученных библиотек составляло от $3,5 \times 10^3$ до $5,1 \times 10^4$ отдельных клонов VH-VL. Все полученные библиотеки VH-VL были клонированы в лентивирусный вектор pLV2 в формате одноцепочечного переменного фрагмента (scFv). В данных конструкциях scFv, слитый с константным доменом антитела (Fc), связан с трансмембранным доменом PDGFR (рецептор фактора роста тромбоцитарного происхождения) с помощью

гибкого серин-глицинового линкера. Данная конструкция обеспечивает экспрессию scFv в виде димеров на плазматической мембране клетки.

Лентивирусные библиотеки антител, полученные на основе В-клеток 5 доноров, были независимо проверены на связывание с фрагментами SARS-CoV-2 при помощи цитофлуориметрии. Для проведения отборов с помощью рекомбинантного RBD мы сконструировали тетрамеры RBD-стрептавидин, конъюгированные с двумя различными флуорофорами, и отбирали субпопуляцию клеток, связавших оба тетрамера RBD (**Рисунок 18**). Так как бактериофаги fd, экспонирующие фрагменты S-белка, были слиты с эпитопом 3xFLAG, то для отборов с использованием фаговой библиотеки мы выделяли субпопуляцию клеток, положительно окрашивающих FLAG-эпитоп. Независимо от протокола обогащения, каждую библиотеку антител подвергали одинаковому количеству раундов отборов с рекомбинантным RBD или фаговой библиотекой S-белка (PhAgL) для получения 95–99 % положительных антиген-специфичных клонов (**Рисунок 18**). Далее мы сравнили связывание пулов клеток, обогащенных по обоим протоколам: с рекомбинантной молекулой RBD или фаговой библиотекой S-белка (PhAgL). Использование каждого из протоколов обеспечивало одинаковую эффективность обогащения. В качестве контроля нами были проведены три раунда отборов с библиотекой scFv от здорового донора. Функциональность отобранных библиотек, оценивалась также в конкурентных тестах с человеческим ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2 – участвует в процессе внедрения вируса SARS-CoV-2 в клетку-мишень при развитии инфекции). Для этого мы отсортировали четыре фракции RBD-положительных клонов из каждой библиотеки в зависимости от их конкуренции с рекомбинантным ACE2 при связывании RBD: “ACE++” – RBD не вытесняется ACE2; “ACE+” – RBD частично вытесняется ACE2; “ACE-” – RBD вытесняется ACE2; “ACE--” – RBD полностью вытесняется ACE2. (**Рисунок 19**).

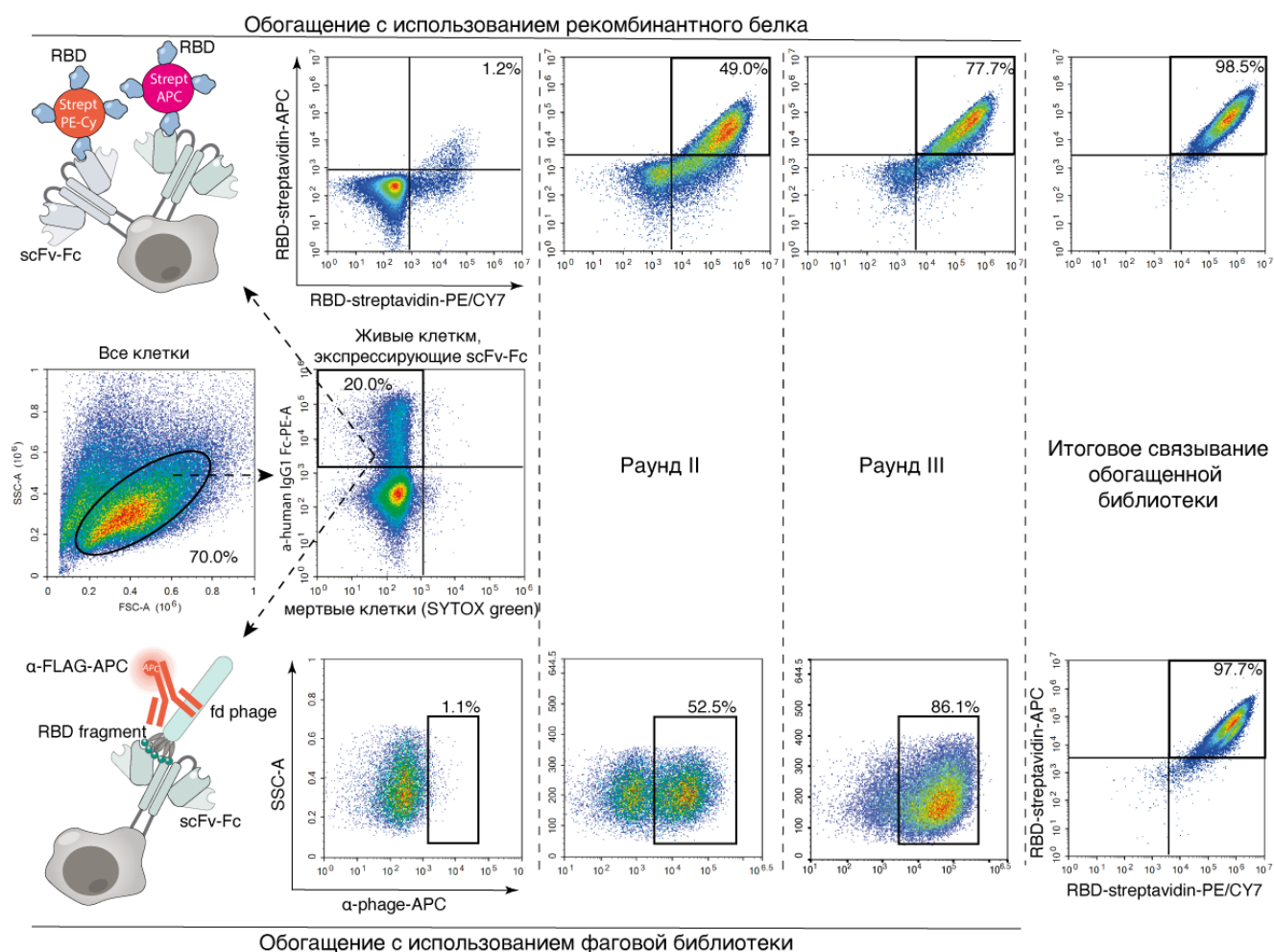


Рисунок 18. Стратегия отбора клеток, несущих RBD-специфичные иммуноглобулины. Диаграммы построены на основе связывания RBD клетками *Jurkat*, трансдуцированными библиотекой scFv. RBD-специфичные клетки были отсортированы по следующей схеме: разделение живых и мертвых клеток производили при окрашивании SYTOX Green, окрашивание на человеческий Fc-фрагмент производили для выделения клеток, продуцирующих заякоренный за мембрану scFv-Fc. RBD-специфичные клетки обогащали и сортировали отдельно на основе связывания с рекомбинантной молекулой RBD (верхняя панель) и фаговой библиотекой S-белка PhAgL (нижняя панель). Крайние правые диаграммы представляют собой контрольное связывание с рекомбинантным RBD в окончательных библиотеках scFv, которые были обогащены с использованием двух разных методов.

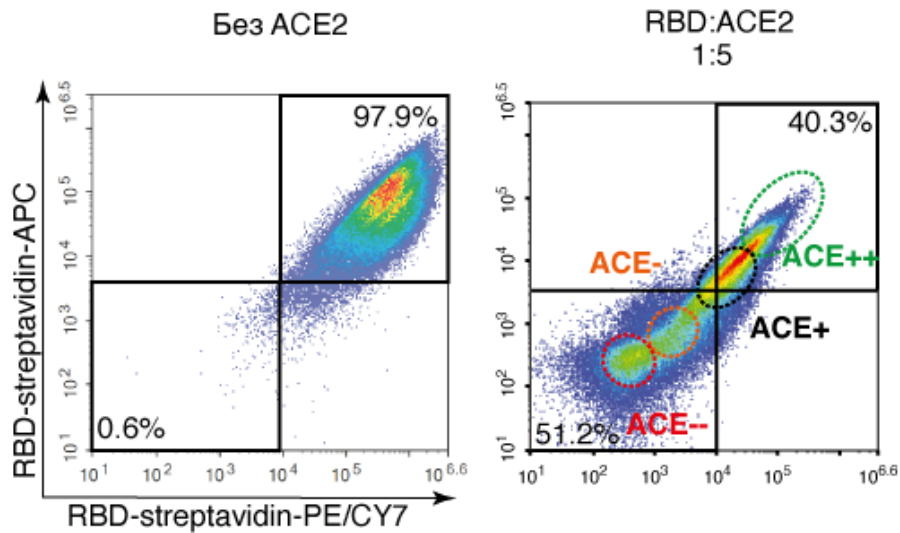


Рисунок 19. Стратегия клеточного сортирования RBD-связывающих клонов в зависимости от их конкуренции с рекомбинантным ACE2. Обозначены области, из которых отбирали популяции ACE--, ACE-, ACE+, ACE++.

Последовательности VH-VL из обогащенных и исходных библиотек анализировали с использованием NGS. Было получено более 10000 парных прочтений на каждую обогащенную и >200000 парных прочтений на каждую исходную библиотеку последовательностей VH и VL. В анализ были включены только последовательности как минимум с двумя прочтениями NGS. Как и ожидалось, тяжёлые и лёгкие цепи были случайным образом объединены во всех исходных библиотеках scFv до проведения отборов (Рисунок 20). Каждая тяжёлая цепь сочеталась как минимум с 5–10 взаимозаменяемыми лёгкими цепями. Все варианты отборов привели к идентификации 1–3 доминантных комбинаций VH-VL с каждой тяжёлой цепью из обогащенных пулов. Этапы обогащения привели к уменьшению разнообразия антигенсвязывающих клонов и количества парных комбинаций VH-VL.

Обогащение

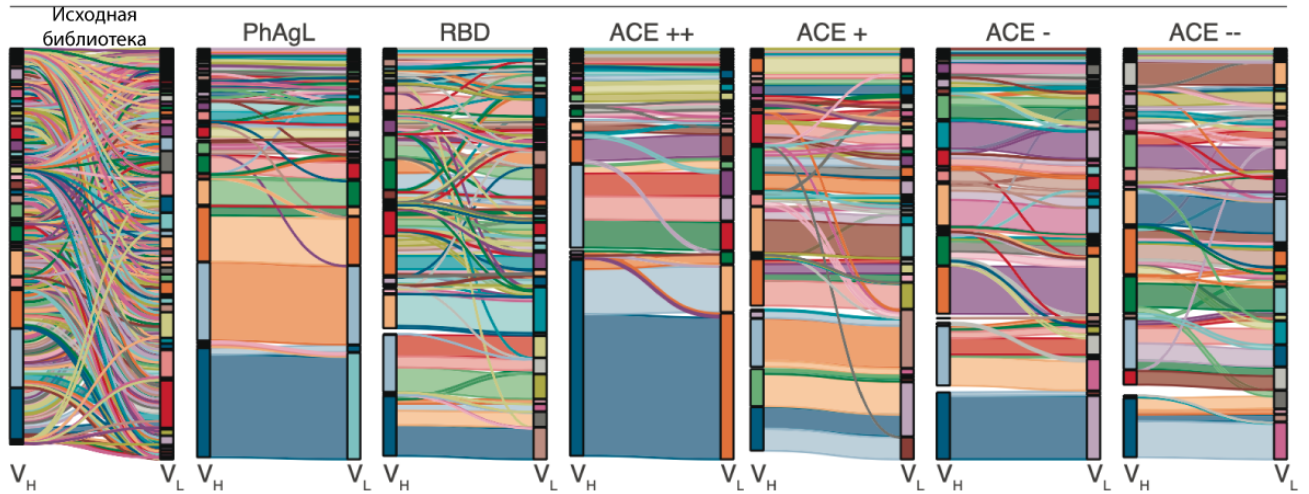


Рисунок 20. Анализ обогащения отдельных клонов антител. Представлены диаграммы Санкей. Правая часть столбца соответствует клонам тяжёлых цепей, левая – клонам лёгких цепей иммуноглобулинов.

Для дальнейшего анализа были выбраны наиболее представленные комбинации VH-VL из всех обогащенных библиотек. Выбранные комбинации VH-VL проэкспрессировали в виде полноразмерных IgG человека в клетках *HEK293F*. Далее оценивали связывание полученных моноклональных антител с рекомбинантным RBD с помощью ИФА. Результаты показали, что функциональность отобранных антител сохраняется и в полноразмерном формате IgG, и следовательно предложенный подход эффективен для идентификации антиген-специфичных антител (**Таблица 8**).

Таблица 8. Функциональные характеристики отобранных антител.

Донор	Моно-клональное антитело	IGHV	IGLV/IGKV*	RBD EC ₅₀ , нг/мл	Вирус-нейтрализация IC ₅₀ , нМ		
					Wuhan	Delta	Omicron
Vac-1	Vac-1.1	IGHV1-46-01	IGKV3-15-01	1300	30	30	NA
	Vac-1.2	IGHV3-30-18	IGLV6-57-01	3500	3.8	40	NA
	Vac-1.3	IGHV1-46-01	IGLV3-21-02	1000	6.5	30	NA
Vac-2	Vac-2.1	IGHV4-59-01	IGKV3-11-01	30	0.3	30	NA
Vac-3	Vac-3.1	IGHV1-69-09	IGLV3-21-02	15	0.6	100	3.4
Vir-1	Vir-1.1	IGHV3-53-01	IGKV1-9-01	5	0.1	0.2	>>100
	Vir-1.2	IGHV3-30-18	IGKV1-33-01	550	12	30	>>100
	Vir-1.3	IGHV4-61-01	IGLV3-25-03	250	70	>>100	6.6
	Vir-1.4	IGHV3-53-01	IGLV3-21-02	600	14	NA	NA
	Vir-1.5	IGHV2-5-01	IGKV1-39-01	1200	>>100	NA	NA
	Vir-1.6	IGHV3-66-01	IGKV1-9-01	700	>>100	NA	NA
	Vir-1.7	IGHV4-39-01	IGKV2-28-01	6	3	>>100	>>100
Vir-2	Vir-2.1	IGHV3-53-02	IGKV3-11-01	>20000	>>100	NA	NA
	Vir-2.2	IGHV3-13-01	IGKV1-39-01	>20000	>>100	NA	NA
	Vir-2.3	IGHV3-9-01	IGKV1-39-01	1350	>>100	NA	NA

*Для каждого VH отобран VL, который образует моноклональное антитело с наиболее сильным связыванием с RBD. EC₅₀ – эффективность связывания RBD, IC₅₀ – вирус-нейтрализующая активность с различными штаммами SARS-CoV-2.

Для дальнейшей оценки полученных антител также измеряли их вирус-нейтрализующую активность (**Рисунок 21**). Между значениями EC₅₀ (эффективность связывания RBD) и значениями IC₅₀ (вируснейтрализующая активность) наблюдалась слабая корреляция, что может указывать на то, что специфичность эпитопа, а не аффинность самого антитела, оказывает более выраженное влияние на эффективность нейтрализующих антител. Для наиболее универсальных нейтрализующих антител Vac-3.1 и Vir-1.7 были измерены константы связывания с RBD методом поверхностного плазмонного резонанса (**Таблица 9**). Исходя из функциональных свойств отобранных антител, можно сделать вывод, что обогащение с использованием фаговой библиотеки PhAgL не уступает “традиционному” обогащению рекомбинантными белками, а также позволяет сохранить разнообразие связывающих антител и отобрать лучшие нейтрализующие антитела с сопоставимой эффективностью.

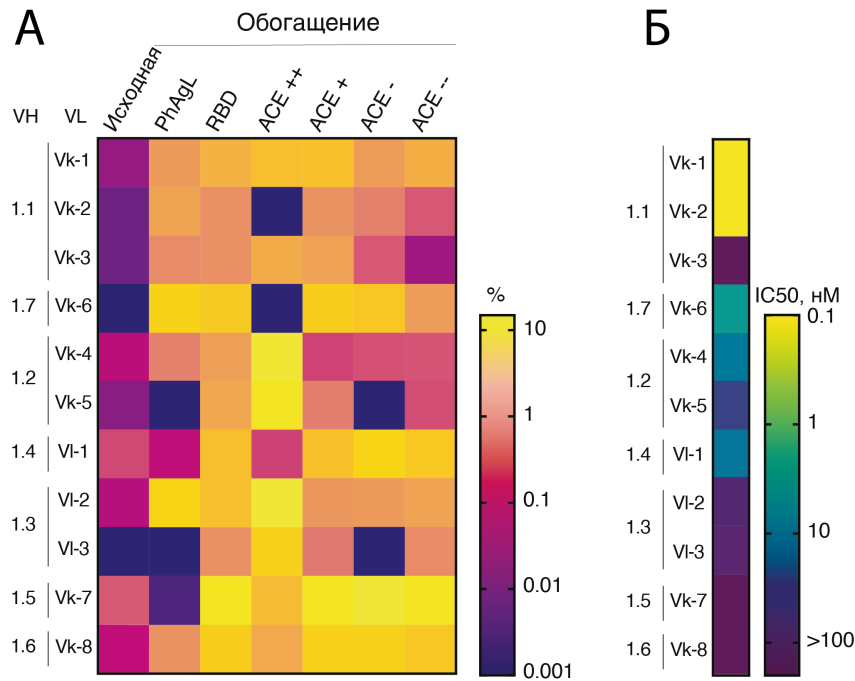


Рисунок 21. Характеристика RBD-специфических моноклональных антител и эффективность их обогащения с помощью различных стратегий. (А) Процентное соотношение отобранных комбинаций VH-VL, обогащенных в различных условиях: “PhAgL” – с использованием фаговой библиотеки S-белка, “RBD” – с использованием рекомбинантного фрагмента RBD S-белка; или в условиях конкурентного связывания RBD в присутствии ACE2: “ACE++” – RBD не вытесняется ACE2; “ACE+” – RBD частично вытесняется ACE2; “ACE-” – RBD вытесняется ACE2; “ACE--” – RBD полностью вытесняется ACE2. **(Б)** Тепловая карта нейтрализующей активности отобранных антител. Представлены наиболее эффективные клоны антител для донора Vir-1.

Таблица 9. Константы связывания антител Vac-3.1 и Vir-1.7 полученные с разными вариантами RBD при помощи метода поверхностного плазмонного резонанса.

Моноклональное антитело	Штамм SARS-CoV-2	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
Vac-3.1	Wuhan RBD	3.1×10^5	1.3×10^{-6}	4.2×10^{-12}
	Alpha RBD	3.0×10^5	1.4×10^{-6}	4.7×10^{-12}
	Gamma RBD	3.0×10^5	1.4×10^{-6}	4.7×10^{-12}
	Delta RBD	1.2×10^3	1.00	8.3×10^{-4}
	Omicron RBD	2.7×10^5	1.3×10^{-6}	4.8×10^{-12}
Vir-1.7	Wuhan RBD	1.0×10^6	2.5×10^{-5}	2.5×10^{-11}
	Alpha RBD	0.9×10^6	6.0×10^{-5}	6.7×10^{-11}
	Gamma RBD	0.7×10^6	2.4×10^{-4}	3.4×10^{-10}
	Delta RBD	1.2×10^6	1.3×10^{-3}	1.2×10^{-9}
	Omicron RBD	2.0×10^4	1.2×10^{-2}	6.0×10^{-7}

Таким образом, нами разработана платформа для высокопроизводительного поиска высокоэффективных терапевтических антител, которая потенциально не требует информации о структуре целевого антигена [201]. Данная платформа сочетает в себе технологию отбора при помощи библиотеки антигенов, экспонированных на поверхности бактериофагов, лентивирусный дисплей антител, секвенирование нового поколения и биоинформатический анализ. Наша платформа позволяет проводить скрининг терапевтических антител с желаемой, но заранее неизвестной специфичностью. Дополнительно мы подтвердили функциональность полученной фаговой библиотеки антигенов для отборов антиген-специфичных антител.

4.1.4. Идентификация кандидатных маркеров РС на основе данных PhIP-Seq

Для идентификации новых потенциальных мишеней при РС мы получили описанную ранее библиотеку белков человека, ассоциированных с аутоиммунными патологиями в формате фаговой библиотеки (п.4.1.1.), в которой рекомбинантные пептиды экспонируются на поверхности нитчатого бактериофага fd в составе белка рIII, и воспользовались методикой фаговой иммунопреципитации-секвенирования (PhIP-Seq) (**Рисунок 7**). Для отбора пептидов, специфически узнаваемых антителами пациентов с РС, мы проинкубировали полученную фаговую библиотеку с антителами из сывороток крови пациентов с разными вариантами течения РС (стабильный РС или высокоактивный РС) и здоровых доноров. Бактериофаги, экспонирующие на своей поверхности пептиды, с которыми связались антитела сыворотки крови, выделяли из раствора при помощи смолы Protein G. Далее с выделенными бактериофагами ставили ПЦР для амплификации целевой последовательности, кодирующей пептидный фрагмент из библиотеки, и постановки широкомасштабного секвенирования. По полученным данным NGS сравнивали уровень обогащения для каждого отдельного пептида с параметром z-score (относительное обогащение эпитопа в иммунопреципитации) [202] (**Рисунок 22А**). Для дальнейшей работы

отбирали пептиды, для которых обогащение ≥ 2 и z-score ≥ 3 . В качестве контроля применяли обогащение в растворе без антител, т. е. неспецифичное связывание бактериофагов смолой protein G. Количество отобранных пептидов, соответствующих либо только параметру обогащение (**Рисунок 22Б**), либо обоим параметрам (**Рисунок 22В**) не отличалось среди групп РС и здоровых доноров.

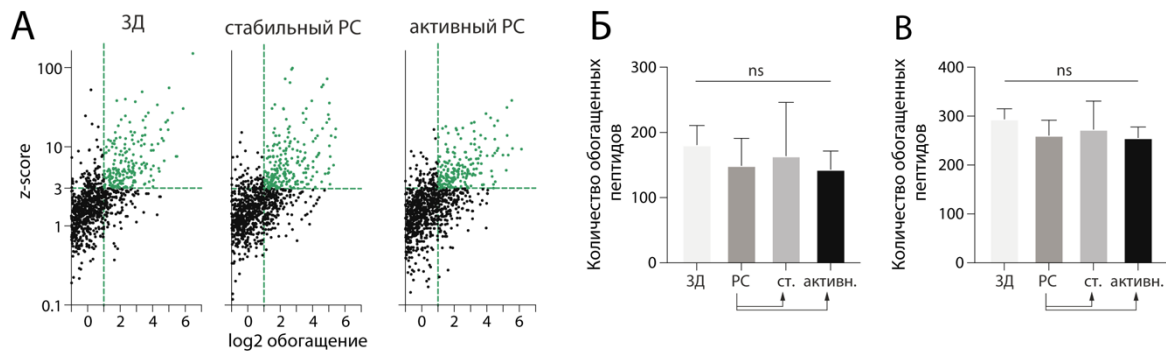


Рисунок 22. Аутоантигенные пептиды выделенные из фаговой библиотеки при помощи PhIP-Seq по данным NGS. (А) Анализ обогащения пептидов из библиотеки аутоантигенов для здоровых доноров, пациентов со стабильным вариантом течения рассеянного склероза и высокоактивным рассеянным склерозом. **(Б)** Количество отобранных пептидов, проанализированных только по параметру “обогащение” или **(В)** по “обогащению” и z-score. ЗД – здоровые доноры, РС – пациенты с рассеянным склерозом, ст. РС – пациенты со стабильным вариантом течения рассеянного склероза, активн. РС – пациенты с высокоактивным рассеянным склерозом.

Мы проанализировали количество выявленных эпитопов для каждого отдельного белка. Наибольшее количество различных эпитопов, для всех протестированных пациентов с РС, было обнаружено для нинеина (NIN) (**Рисунок 23**). Мы также обнаружили связывание с несколькими эпитопами маннозилолигосахаридглюкозидазы (MOGS) антител пациентов с РС, но не здоровых доноров. Для большинства белков мы наблюдали связывание антител только с одним 44-членным пептидом из библиотеки, при этом, для NIN и MOGS удалось обнаружить несколько участков узнавания антител, что может указывать на поликлональный характер антиген-зависимого иммунного ответа на данные белки. Однако, в случае с нинеином стоит учитывать большую молекулярную массу данного белка. На **Рисунке 23** также отмечены и другие белки, для которых была обнаружена реактивность сывороток пациентов с РС.

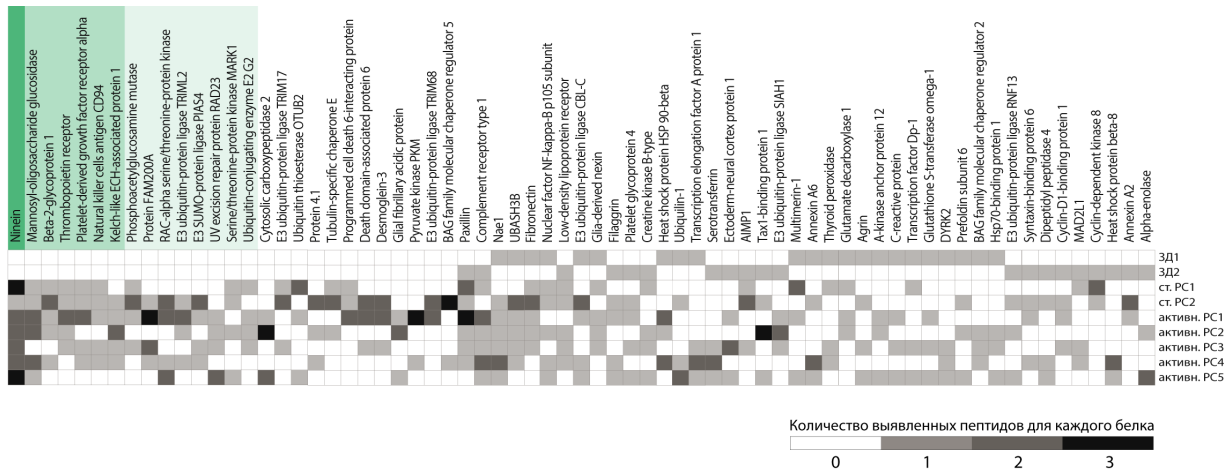


Рисунок 23. Тепловая карта белков, идентифицированных в этом исследовании как специфичные для здоровых доноров и/или пациентов с РС. Столбцы соответствуют идентифицированным белкам из созданной нами библиотеки аутоантигенов. Каждая строка показывает количество пептидов одного конкретного белка из библиотеки, на которые есть антительный ответ у данного донора. Белки отсортированы в порядке возрастания реактивности IgG у здоровых доноров. ЗД – здоровые доноры, ст. РС – стабильный РС, активн. РС – активная форма РС.

4.1.5. Исследование реактивности сывороточных антител у пациентов с РС к антигенам ВЭБ, классическим миелиновым антигенам и пептидам, отобранным по результатам PhIP-Seq

Большинство антигенов, идентифицированных с помощью PhIP-Seq, были специфичны для каждого конкретного донора. Однако, нам удалось выделить несколько антигенов, в значительной степени обогащенных у группы пациентов с РС по сравнению со здоровыми донорами. Мы ранжировали идентифицированные мишени в соответствии с их обогащением в каждом образце и отобрали две группы потенциальных аутоантигенных пептидов. Первая из них (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄, DPP4₄₈₁₋₅₂₄, GPI₃₁₋₇₄, NAVCR1₃₁₋₇₄, POU4F1₉₁₋₁₃₄) содержала пептиды, для которых z-score > 3 для трёх любых пациентов с РС, но < 3 для всех здоровых доноров. Во вторую группу добавлены пептиды с более низким обогащением у пациентов с РС, но не представленные в группе здоровых доноров (PRX₄₅₁₋₄₉₄, PTK6₃₀₁₋₃₄₄, KRT1₃₀₁₋₃₄₄). Дополнительно в анализ был включен пептид INSR₃₀₁₋₃₄₄, обогащённый как в группе с РС, так и у здоровых доноров. Названия пептидам даны в соответствии с названием гена в базе данных Uniprot для полноразмерных белков и расшифрованы

в **Таблице 10**. Перечисленные белки ранее не ассоциировались с аутоиммунной агрессией при РС. Для проверки кандидатных пептидов мы проэкспрессировали их в прокариотической системе в виде рекомбинантных белков, слитых с белком носителем тиоредоксином (TRX).

Таблица 10. Отобранные потенциальные мишени аутоиммунного ответа при РС.

Аминокислотная последовательность	Номер в базе данных Uniprot	Название гена	Полное название белка
LQAKLDNLQQEIDFLT ALYQAELSQMQTQISE TNVILSMDNNRS	P04264	<i>KRT1</i>	Keratin, type II cytoskeletal 1
YKDPSNLQGKVVQKHQ AFEAEELSANQSRIDAL EKAGQKLIDVNHV	Q13813-3	<i>SPTAN1</i>	Spectrin alpha chain non-erythrocytic 1, Isoform 3
TLHSSVNDKGLRVLE DNSALDKMLQNVQM PSKKLDFIILNETKF	P27487	<i>DPP4</i>	Dipeptidyl peptidase 4
KLPKVPEAALPEVRLP EVELPKVSEMKLPKVP EMAVPEVRLPEV	Q9BXM0	<i>PRX</i>	Periaxin
DANKDRFNHFSLLTNT NHGHILVDYSKNLVTE DVMRMLVDLAKS	P06744	<i>GPI</i>	Glucose-6-phosphate isomerase
SVTLPCHYSGAVTSM CWNRGSCSLFTCQNGI VWTNGTHVTYRKD	Q96D42	<i>HAVCRI</i>	Hepatitis A virus cellular receptor 1
CHQYVIHNNKCIPECP SGYTMNSSNLLCTPCL GPCPKVCHLLEG	P06213	<i>INSR</i>	Insulin receptor
TSTSTVPLAHHHHHH HHHQALEPGDLLDHS SPSLALMAGAGGA	Q01851	<i>POU4F1</i>	POU domain, class 4, transcription factor 1
CYLESQNYIHRDLAAR NILVGENTLCKVGDG LARLIKEDVYLS	Q13882	<i>PTK6</i>	Protein-tyrosine kinase 6

При помощи ИФА мы верифицировали специфическое узнавание антителами из крови пациентов с РС отобранных рекомбинантных антигенов (**Рисунок 24 А, В**). Образцы, отобранные для первичной верификации кандидатных маркёров, включали IgG, выделенные из сывороток крови 16 пациентов с РС и 11 здоровых доноров (**Приложение 1. Таблица 1**). Для большинства отобранных пептидов, за исключением INSR₃₀₁₋₃₄₄ и POU4F1₉₁₋₁₃₄, у части пациентов с РС

детектировался повышенный титр антиген-специфичных антител, однако статистически значимая разница была показана только для пептида SPTAN₁₆₀₁₋₆₄₄ (**Рисунок 24В**). Для пептидов KRT₁₃₀₁₋₃₄₄ и SPTAN₁₆₀₁₋₆₄₄ мы обнаружили усиление антительного ответа в обеих группах РС (со стабильным течением РС и активным РС) по сравнению со здоровыми донорами, тогда как антитела к DPP₄₄₈₁₋₅₂₄, PRX₄₅₁₋₄₉₄, NAVCR₁₃₁₋₇₄, РТК₆₃₀₁₋₃₄₄, и GPI₃₁₋₇₄ были обнаружены преимущественно у части пациентов с активной формой РС. Мы также проанализировали связывание сывороточных антител с антигенами миелиновой оболочки – МВР (основной белок миелина) и MOG (миелиновый олигодендроцитный гликопротеин). Повышенный уровень связывания удалось идентифицировать только с иммунодоминантным фрагментом МВР₁₄₇₋₁₇₀ у одного пациента с активным РС (**Рисунок 24 Б и В**). Несмотря на то, что исторически аутоантитела к миелиновым антигенам считаются классическими для РС, на данный момент их значение переосмысливается. Появляются работы, в которых не удалось обнаружить у пациентов с РС такие антитела [136] или наличие данных антител не коррелирует с риском прогрессирования РС [135]. И наоборот, у здоровых доноров также выявляются антитела к компонентам миелиновой оболочки [134]. Все это в совокупности с нашими наблюдениями ещё раз указывает на крайнюю степень гетерогенности иммунного ответа при РС.

Ранее, была показана прямая ассоциация между ВЭБ и развитием РС [104]. Также была показана возможность кросс-реактивного узнавания моноклональным Т-клеточным рецептором пациента с РС вирусного антигена EBNA1 и миелинового аутоантигена МВР. В нашей лаборатории у пациентов с РС ранее были обнаружены кросс-реактивные антитела к МВР и LMP1 [203]. Кроме того, было показано, что введение мышам белка ВЭБ (LMP1) индуцирует выработку аутореактивных антител против МВР [110]. В связи с этим измерение титра антител к LMP1 ВЭБ у пациентов с РС также было включено в анализ. Мы обнаружили статистически значимое различие в связывании полноразмерной молекулы LMP1 антителами из крови пациентов с РС по сравнению со здоровыми донорами (**Рисунок 24 Б и В**). При этом повышенный уровень связывания с

полноразмерным белком LMP1 был показан для обеих групп РС. У некоторых доноров с РС наблюдалось связывание сывороточных антител с С-концевыми фрагментами LMP1 – LMP1₁₈₈₋₂₆₃, LMP1₂₅₇₋₃₃₀, LMP1₃₂₅₋₃₈₆.

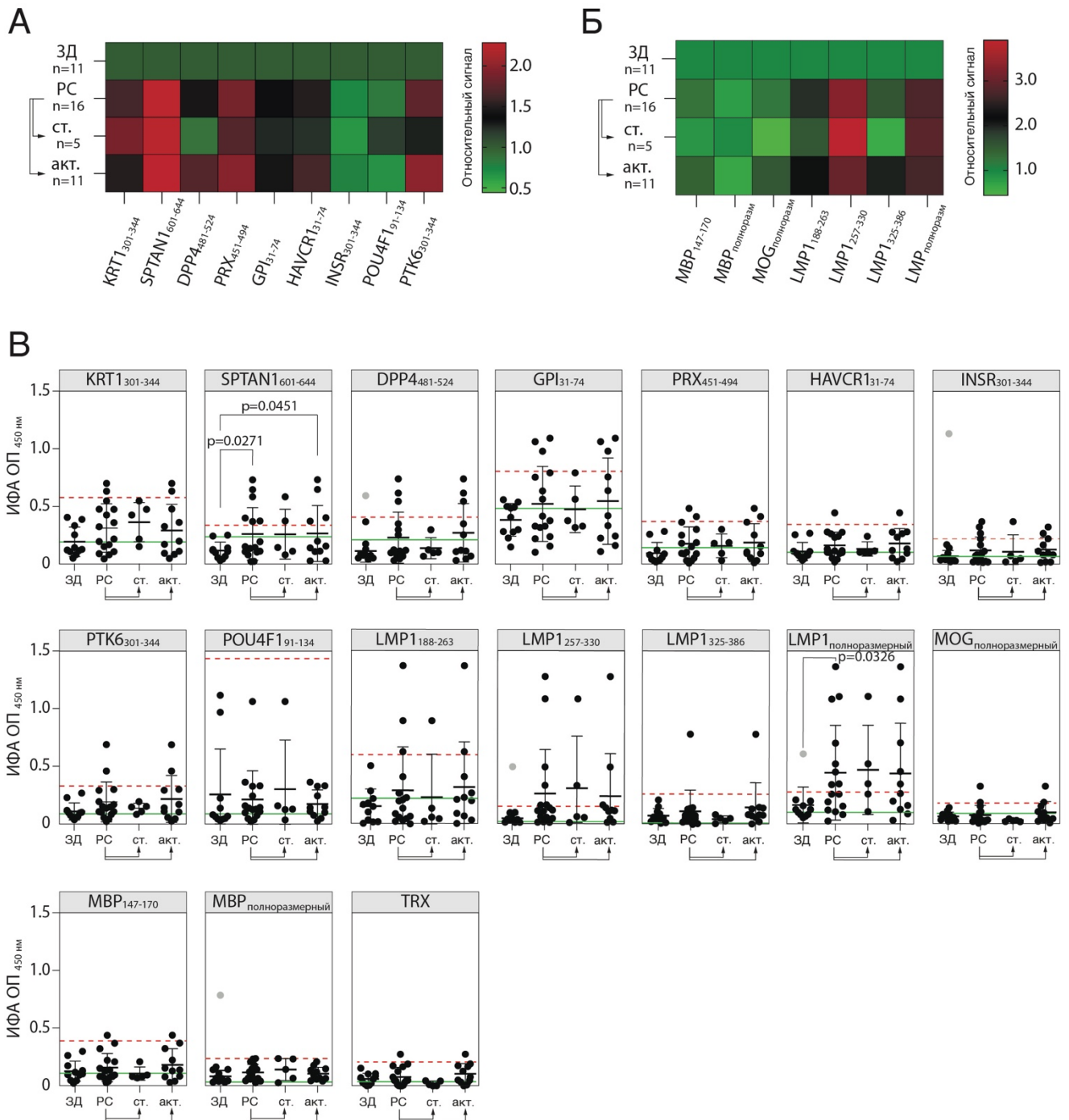


Рисунок 24. Иммунный ответ пациентов с РС на потенциальные мишени аутоагрессии. Тепловая карта, характеризующая титр антител на (А) потенциальные мишени аутоиммунной агрессии, впервые выявленные в данном исследовании, (Б) классические миелиновые антигены (MBP и фрагмент MBP₁₄₇₋₁₇₀, MOG) и антигены ВЭБ – полноразмерный LMP1 и его С-концевые фрагменты 188-263, 257-330, 325-386 а.а. (В) ИФА связывания антигенов антителами из сывороток крови пациентов со стабильным рассеянным склерозом (ст.),

высокоактивным рассеянным склерозом (акт.), и здоровых доноров (ЗД). Каждая точка соответствует отдельному донору. Показаны средние значения \pm SD. Красной пунктирной линией обозначено среднее значение контрольного сигнала здоровых доноров + 3 стандартных отклонения. Зелёная линия обозначает дополнительное контрольное отрицательное связывание препаратом IVIG (объединенные IgG от 1000 здоровых доноров). Точный тест Фишера использовался для определения статистической значимости различий в количестве совпадений, превышающих три пороговых значения стандартного отклонения между группами доноров. Указаны только значения $p < 0.05$.

4.1.6. Изучение кросс-реактивности антиген-специфичных аутоантител, отобранных на кандидатные маркеры у пациентов с РС

На следующем этапе, для оценки возможной кросс-реактивности аутоантител, распознающих KRT1₃₀₁₋₃₄₄, SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ и GPI₃₁₋₇₄, мы обогатили сывороточные аутоантитела на анализируемые антигены (**Рисунок 25**). Для обогащения использовали суспензию магнитных шаров, на поверхности которых находились ковалентно-связанные пептиды-TRX. Образцы для обогащения антигеном включали фракции IgG как от доноров с повышенными титрами к анализируемому антигену (антиген-положительные), так и от доноров без реактивности к этому же антигену (антиген-негативные). Для уменьшения неспецифического связывания мы проводили предварительный раунд истощения – инкубировали все антитела с магнитными шарами, на которых был сорбирован белок-носитель TRX не слитый с пептидом; связавшиеся TRX-специфичные антитела удаляли из раствора, а не связавшуюся фракцию затем обогащали на один из антигенов: SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄, KRT1₃₀₁₋₃₄₄ или GPI₃₁₋₇₄.

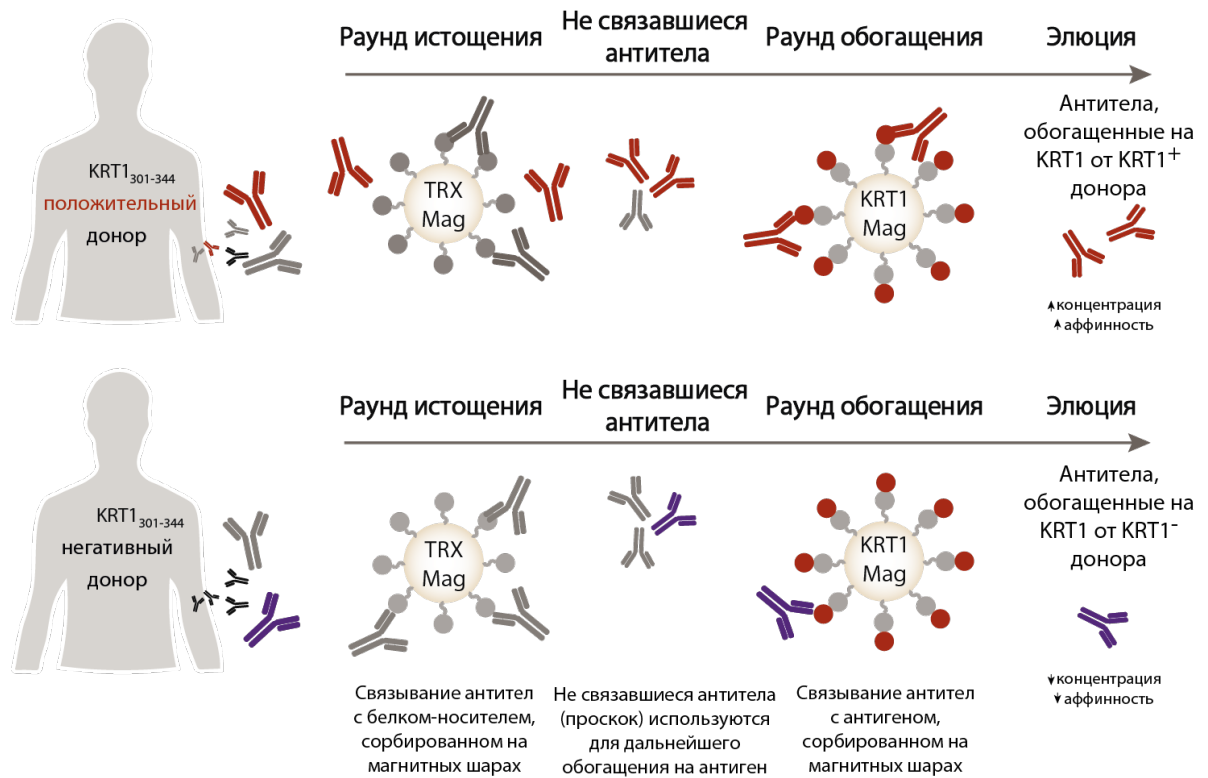


Рисунок 25. Схема выделения антиген-специфичных аутоантител, распознающих KRT1₃₀₁₋₃₄₄, SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ и GPI₃₁₋₇₄. На первом этапе истощали антитела, обладающие реактивностью к белку-носителю TRX; не связавшиеся антитела затем обогащали на один из анализируемых антигенов (KRT1₃₀₁₋₃₄₄, SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ и GPI₃₁₋₇₄). Использовали суспензию магнитных шаров, на поверхности которых находились ковалентно-связанные пептиды-TRX.

Для того, чтобы оценить возможную кросс-реактивность, мы протестировали связывание полученных антител с исследуемыми антигенами методом ИФА (**Рисунок 26**). Образцы антител, полученные от доноров, серо-положительных к антигенам (KRT1₃₀₁₋₃₄₄, SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ или GPI₃₁₋₇₄) и обогащенные на соответствующие антигены обладали высокой аффинностью к данным антигенам и были получены в относительно высоких концентрациях (5-30 мкг/мл). При этом, антитела, полученные от антиген-отрицательных доноров и обогащенные на те же антигены, показали слабое связывание с исследуемыми антигенами (**Рисунок 26**) и были выделены в относительно низких концентрациях (< 1 мкг/мл). В качестве дополнительного контроля в данном исследовании мы использовали препарат, представляющий собой IgG, полученные из сывороток крови 1000 здоровых доноров. Данный препарат и антитела, полученные нами из сывороток крови

здоровых доноров, не обладали связывающей активностью с исследуемыми антигенами (Рисунок 26). Антиген-положительные антитела от доноров со стабильным РС не проявляли кросс-реактивности к анализируемым антигенам, тогда как у большинства доноров с активным РС такие антитела перекрестно реагировали по крайней мере с двумя анализируемыми антигенами (Рисунок 26). Данное наблюдение может являться следствием того, что при развитии более агрессивного типа РС образуется большое количество кросс-реактивных аутоантител.

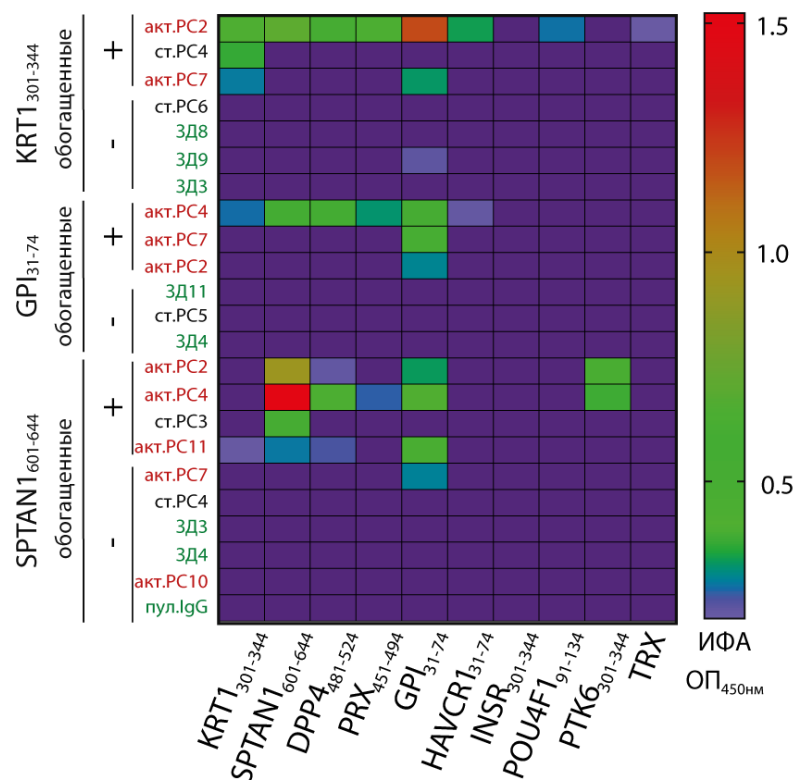


Рисунок 26. Тепловая карта, характеризующая связывающую активность антител, обогащенных на KRT1₃₀₁₋₃₄₄, SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ или GPI₃₁₋₇₄. Для ИФА использовали антитела, полученные от антиген-позитивных доноров (+) и от антиген-негативных доноров (-). Каждая строка соответствует антительному ответу одного донора. Столбцы соответствуют различным антигенам. ЗД – здоровые доноры, ст. PC – стабильный РС, акт. PC – активный РС, пул. IgG – пулированные IgG здоровых доноров.

Для идентификации общего эпитопа аутореактивных антител мы сравнили аминокислотные последовательности обнаруженных аутоантигенных пептидных мишеней. Изученные нами пептиды не показали высокий уровень идентичности и

не обладали консервативными мотивами. Однако, путем попарного сравнения данных последовательностей, нам удалось выявить некоторые сходства (**Рисунок 27**). Мы обнаружили схожие мотивы в парах антигенов: KRT1 и SPTAN1, GPI и SPTAN1, DPP4 и SPTAN1, KRT1 и GPI. Среди отобранных антигенов SPTAN1 показал самый высокий уровень сродства эпитопов с другими антигенами, исследованными нами в данной работе. Таким образом, выявить общий отчетливый линейный эпитоп в рамках данной работы нам не удалось, что говорит о полиреактивном профиле аутоантител у исследованных доноров, либо о существовании множества аутореактивных В-клеточных популяций с различной специфичностью.

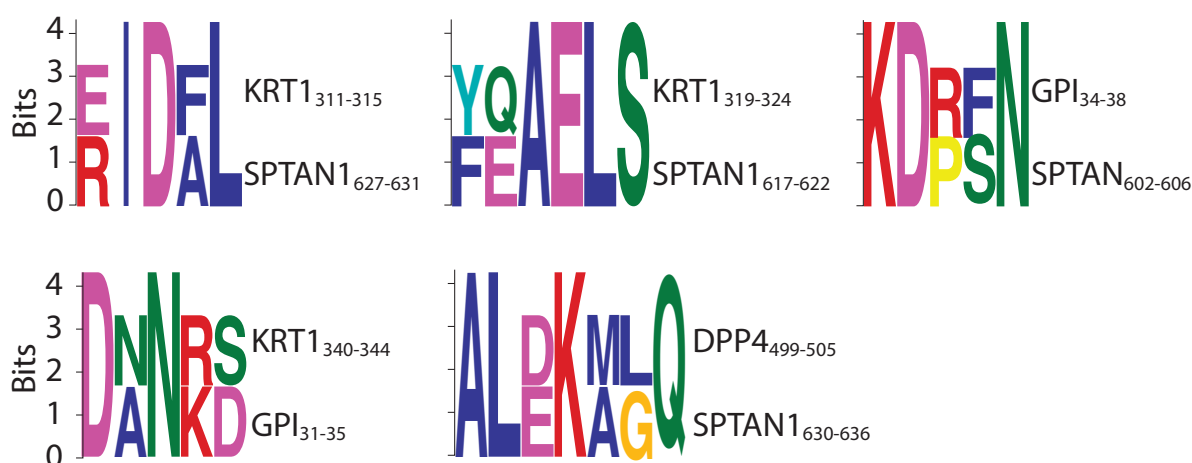


Рисунок 27. Сравнение аминокислотных последовательностей аутоантигенов, распознаваемых сывороточными IgG пациентов с РС. Попарное сравнение идентифицированных аутопептидов (созданы с помощью Two-Sample-Logos по алгоритму MEME). Высота символов указывает на относительную частоту каждой аминокислоты в этом положении.

4.1.7. Независимая валидация выявленных антигенов методом ИФА и их значение в качестве клинических биомаркёров

Для оценки прогностической ценности идентифицированных антигенов в качестве диагностических биомаркёров РС мы провели дополнительную валидацию на независимой выборке. В новую выборку были включены здоровые доноры, пациенты с РС, боковым амиотрофическим склерозом (БАС) и заболеваниями спектра оптиконевромиелита (ЗСОНМ) (**Приложение 2. Таблица**

2). Мы обнаружили повышенный антителый ответ против пептида SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ у пациентов с РС, по сравнению со здоровыми донорами (**Рисунок 28А**). Воспроизводимая и статистически значимая разница в количестве серопозитивных пациентов по SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ в обеих выборках доноров доказывает высокий потенциал для использования антител против SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ в качестве диагностического маркера РС. Также был показан высокий уровень сигнала для пептида HAVCR1₃₁₋₇₄ у пациентов РС. Далее мы исследовали уровень противовирусных антител у пациентов с РС, БАС и ЗСОНМ (**Рисунок 28Б**, **Рисунок 29**). Мы показали, что для группы пациентов с РС характерен повышенный уровень сывороточных IgG, связывающих EBNA1, при этом количество пациентов с повышенным уровнем EBNA1-специфических антител статистически значимо не различается между группами с противоположным течением РС (**Рисунок 29**) [204].

Для дальнейшей оценки диагностической ценности выявленных антигенов мы провели ROC-анализ (**Рисунок 28Г**). Мы оценили, как влияет комбинирование нескольких биомаркёров на прогностическую способность. Комбинация РТК₆₃₀₁₋₃₄₄ и PRX₄₅₁₋₄₉₄ продемонстрировала самую высокую чувствительность (SE) и значение AUC для панели из двух пептидов. Антитела к фрагменту вирусного белка LMP1₂₅₇₋₃₃₀ также могут быть использованы в качестве потенциального биомаркёра РС – добавление в анализ антител против LMP1 улучшило прогностическую ценность кривых ROC. Одновременное использование четырёх биомаркёров (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄, PRX₄₅₁₋₄₉₄, РТК₆₃₀₁₋₃₄₄ и LMP1₂₅₇₋₃₃₀) показало наибольшую прогностическую ценность при чувствительности 78.6% и специфичности 86.4% (AUC = 0.818) (**Рисунок 28Г**).

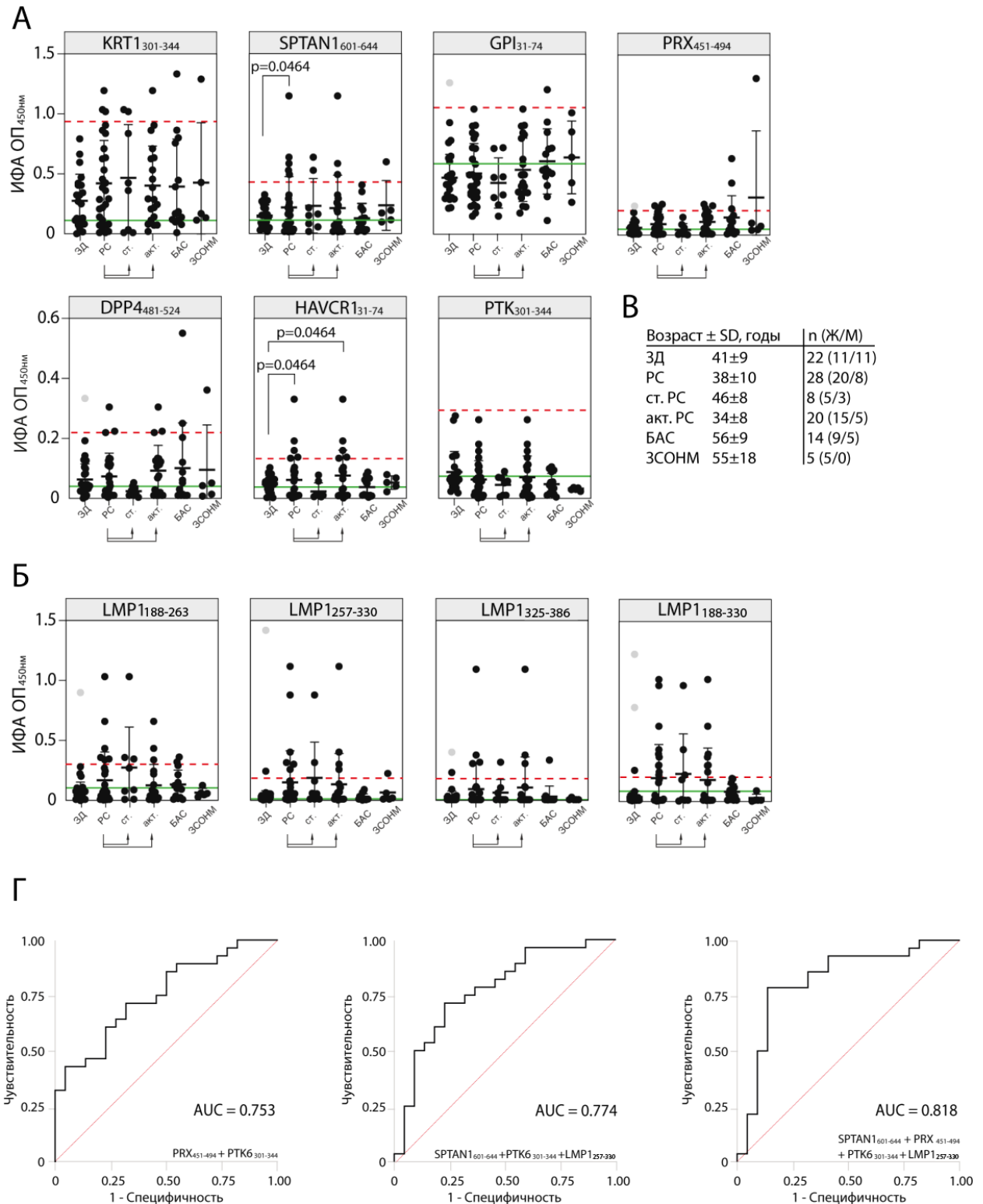


Рисунок 28. Независимая валидация выявленных антигенов. (А) ИФА связывающей активности сывороточных антител пациентов с РС, БАС, ЭОИМ и здоровых доноров с обнаруженными аутоантигенами. (Б) ИФА связывающей активности сывороточных антител пациентов с рассеянным склерозом, БАС, ЭОИМ и здоровых доноров с С-концевыми фрагментами LMP1 ВЭБ. Каждая точка соответствует отдельному донору. Показаны средние значения ± SD. Красной пунктирной линией обозначено среднее значение контрольного сигнала здоровых доноров + 3 стандартных отклонения. Зелёная линия обозначает

дополнительное контрольное отрицательное связывание препаратом IVIG (объединенные IgG от 1000 здоровых доноров). Точный тест Фишера использовался для определения статистической значимости различий в количестве совпадений, превышающих три пороговых значения стандартного отклонения между группами доноров. Указаны только значения $p < 0.05$. (В) Сравнение возраста и пола пациентов с РС, БАС, ЗСОНМ и здоровых доноров, взятых для данной независимой валидации. (Г) ROC-кривые, полученные для лучших комбинаций обнаруженных маркеров. AUC (англ. Area Under the Curve) – площадь под ROC-кривой. РС – рассеянный склероз; БАС – боковой амиотрофический склероз; ЗСОНМ – заболевания спектра оптиконевромиелита.

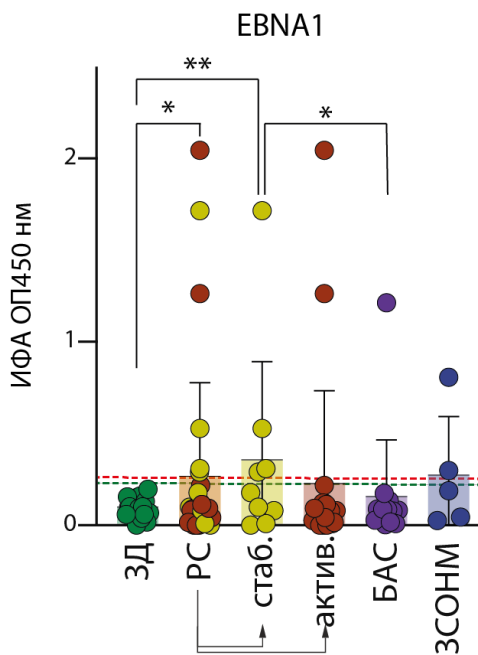


Рисунок 29. Уровень антиген-специфических IgG к фрагментам вируса Эпштейна-Барр в сыворотке человека. Связывание химически синтезированного пептида EBNA1 (386–405 а.о.). ЗД – здоровые доноры, РС – рассеянный склероз; БАС – боковой амиотрофический склероз; ЗСОНМ – заболевания спектра оптиконевромиелита. Красной пунктирной линией обозначено пороговое значение оптической плотности, выше которого сыворотка считается серопозитивной на исследуемый антиген. Пунктирной зеленой линией обозначено контрольный сигнал связывания исследуемого антигена препаратом IVIG (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, Хи-квадрат Пирсона).

Таким образом, используя метод PhIP-Seq, мы охарактеризовали профиль иммунного ответа В-клеток периферической крови пациентов с РС и здоровых доноров. Несмотря на высокую гетерогенность иммунного ответа, некоторые аутоантигены были общими для части пациентов с РС. Хотя об иммунореактивности к отдельным антигенам в периферической крови и спинномозговой жидкости пациентов с РС сообщалось ранее, полученные нами данные расширяют и дополняют имеющиеся результаты, подчеркивая высокую степень гетерогенности антител у пациентов с РС, позволяя нам идентифицировать новые антигены и потенциальные биомаркёры. Насколько нам известно, новые аутоантигены, идентифицированные в этой работе, ранее не считались ассоциированными с РС. Один из наиболее ценных потенциальных аутоантигенов

при РС – фрагмент SPTAN1, мембранного белка, распространенного в нейронах ЦНС и периферической нервной системы (ПНС) [205]. Являясь структурным белком, SPTAN1 располагается во внутреннем пространстве аксонов и в норме не подвергается воздействию иммунной системы, однако возможно, при развитии воспалительных процессов при РС становится доступной мишенью аутоантител. Мы также обнаружили аутоантитела к PRX, нейрональному белку ПНС, который необходим для нормальной ремиелинизации после повреждения нервного волокна. Антитела к PRX ранее были обнаружены в сыворотках пациентов с сахарным диабетом и моноклональной гаммапатией неустановленной значимости [206]. Таким образом, аутоантитела против фрагментов SPTAN1 и PRX могут указывать на повреждение нервной ткани в ЦНС и ПНС. Наше исследование также выявило аутоантитела к РТК6 в сыворотке пациентов с РС. РТК6 в основном связывают с онкологическими заболеваниями [207], но он также экспрессируется в В-клетках, трансформированных ВЭБ, что указывает на возможную косвенную связь между этим антигеном и заболеванием РС. Несмотря на эти результаты, важные вопросы относительно происхождения, роли и гетерогенности аутоиммунного ответа на эти антигенные эпитопы при нормальном функционировании и при патологии нервной системы остаются нерешенными.

В последнее время считается, что одним из триггеров рассеянного склероза является молекулярная мимикрия между белком ВЭБ EBNA1 и аутоантигенами ЦНС человека: Glial-CAM [133,208] или CRYAB [139] для В-клеток и MBP для Т-клеток [209]. Поскольку только около 20% пациентов с РС имеют перекрестно-реактивные антитела EBNA1-GlialCAM или EBNA1-CRYAB, другие перекрестно-реактивные антигены еще предстоит идентифицировать. На сегодняшний день множество исследований посвящено изучению иммуногенности EBNA1 и его роли в прогрессировании РС, игнорируя при этом некоторые другие белки ВЭБ. Здесь мы исследовали ассоциацию РС с другим белком ВЭБ – LMP1, необходимым для эффективной иммортализации В-клеток. Детальный анализ экспрессии EBNA1, LMP1 и других белков ВЭБ во время латентной или литической инфекции может выявить их корреляцию с прогрессированием РС. Другим типом вирусного

воздействия является перепрограммирование В-клеток. Трансформация клеток ВЭБ позволяет обойти нормальную элиминацию аутореактивных В-клеток. Это объясняет повышенный уровень аутореактивных В-клеток и наличие антител различной специфичности и согласуется с высокой гетерогенностью иммунного ответа при РС. Гипотетическая схема участия ВЭБ в развитии РС представлена нами на **Рисунке 30**.

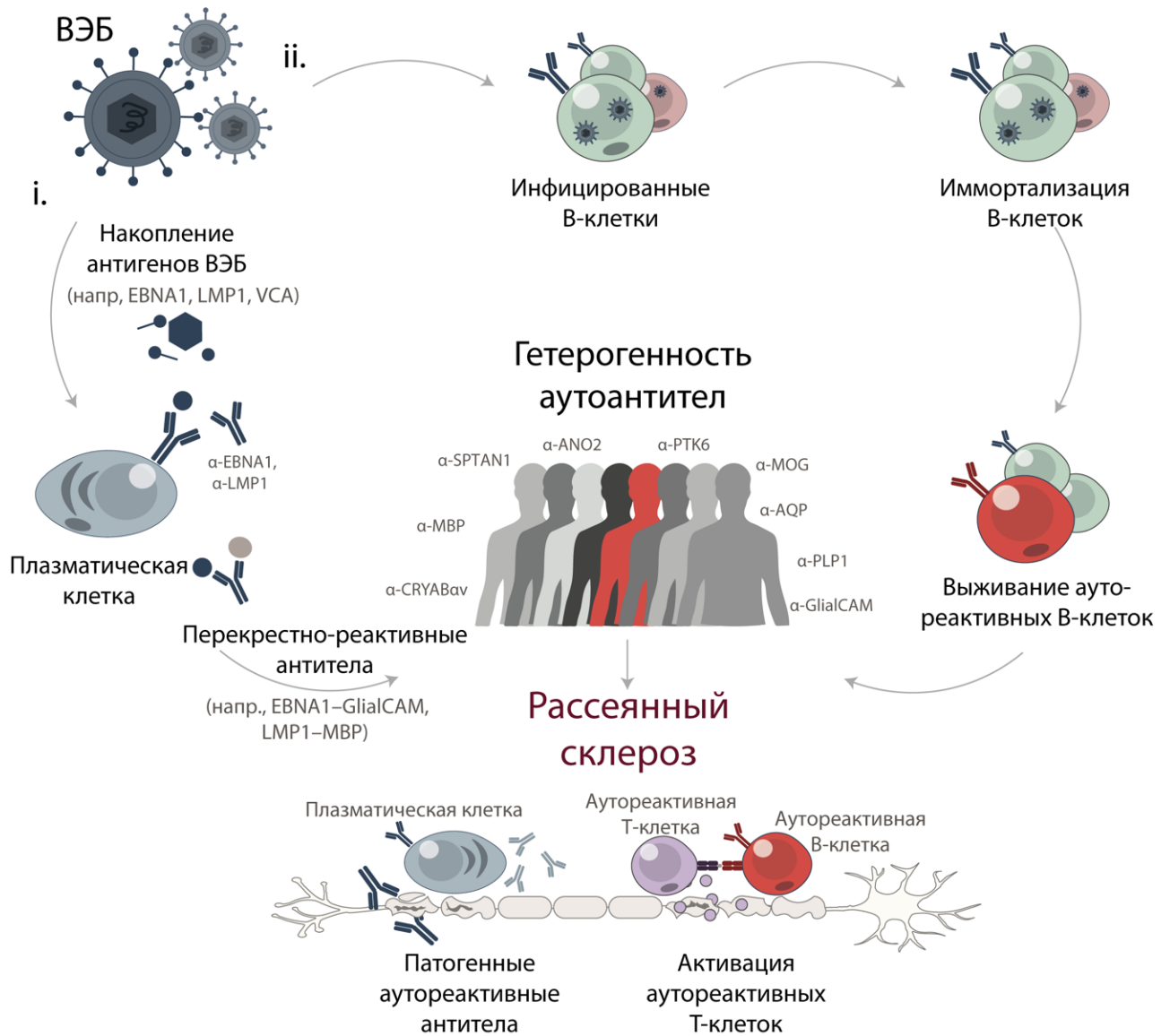


Рисунок 30. Предполагаемые механизмы участия ВЭБ в развитии РС через реакцию В-клеток. Предполагается, что высокая вирусная нагрузка ВЭБ и длительное воздействие вызывают или стимулируют развитие рассеянного склероза посредством двух основных механизмов: (i) перекрестная реактивность и молекулярная мимикрия и/или (ii) перепрограммирование и immortalization патогенных аутореактивных В-клеток. Механизм перекрестной реактивности и молекулярной мимикрии включает накопление антигенов ВЭБ, таких как EBNA1, LMP1 и VCA, что приводит к повышению титров антител против ВЭБ. Некоторые

из этих антител перекрестно реагируют с аутоантигенами центральной нервной системы, способствуя прогрессированию рассеянного склероза. Альтернативно, ВЭБ действует как хронический источник иммортализованных В-клеток с различной специфичностью, включая аутореактивные В-клетки. Эти аутореактивные В-клетки могут способствовать патогенезу рассеянного склероза, продуцируя аутореактивные антитела и презентировав аутоантигены аутореактивным Т-клеткам. Стохастический характер развития иммунного ответа при обоих механизмах приводит к высокой степени гетерогенности аутореактивных антител у больных РС.

4.2. Анализ репертуаров иммуноглобулинов транзистентных В-регуляторных клеток пациентов с рассеянным склерозом и здоровых доноров

К функциям В-клеток в организме человека, помимо продукции антител, относят также регуляторную функцию. Особый интерес в связи с этим представляет регуляторная субпопуляция В-клеток (Breg). Ранее было продемонстрировано участие Breg в развитии аутоиммунных и лимфопротиферативных патологий. При этом известно, что они могут играть как протективную роль, так и патологическую. В последние годы появляется все больше свидетельств, доказывающих значимость В-клеток в регуляции аутоиммунных процессов, включая РС [112], [210]. Тем не менее, субпопуляции Breg у пациентов с РС все еще плохо охарактеризованы. До сих пор опубликовано чрезвычайно мало информации об их специфичности и последовательностях В-клеточных рецепторов. Чтобы лучше понять природу развития и охарактеризовать процесс созревания Breg, мы проанализировали субпопуляцию $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ – один из наиболее подтвержденных фенотипических портретов транзистентных Breg (tBreg) [211].

4.2.1. Характеризация субпопуляции транзистентных В-регуляторных клеток

Мы проанализировали пациентов с уже описанными ранее в данной работе различными вариантами течения РРРС – стабильным РС и активным РС. Образцы периферической крови были получены от 19 пациентов с РС и 16 здоровых доноров (**Приложение 3. Таблица 3**).

Мононуклеарные клетки окрашивали на поверхностные маркеры CD45, CD19, CD24 и CD38, стратегия выделения субпопуляций при таком окрашивании показана на **Рисунке 31**. Мы обнаружили, что количество клеток $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ среди тотальных В-клеток было значительно увеличено у пациентов с РС (4.5 ± 2.4 %) по сравнению со здоровыми донорами (2.6 ± 1.8 %) (**Рисунок 32**). Увеличение представленности данной субпопуляции было наиболее выражено у пациентов с активным РС (5.5 ± 2.7 %) (**Рисунок 32**). При этом мы не

наблюдали различий в абсолютном количестве В-клеток между здоровыми донорами и пациентами с различным течением РС (Таблица 11).

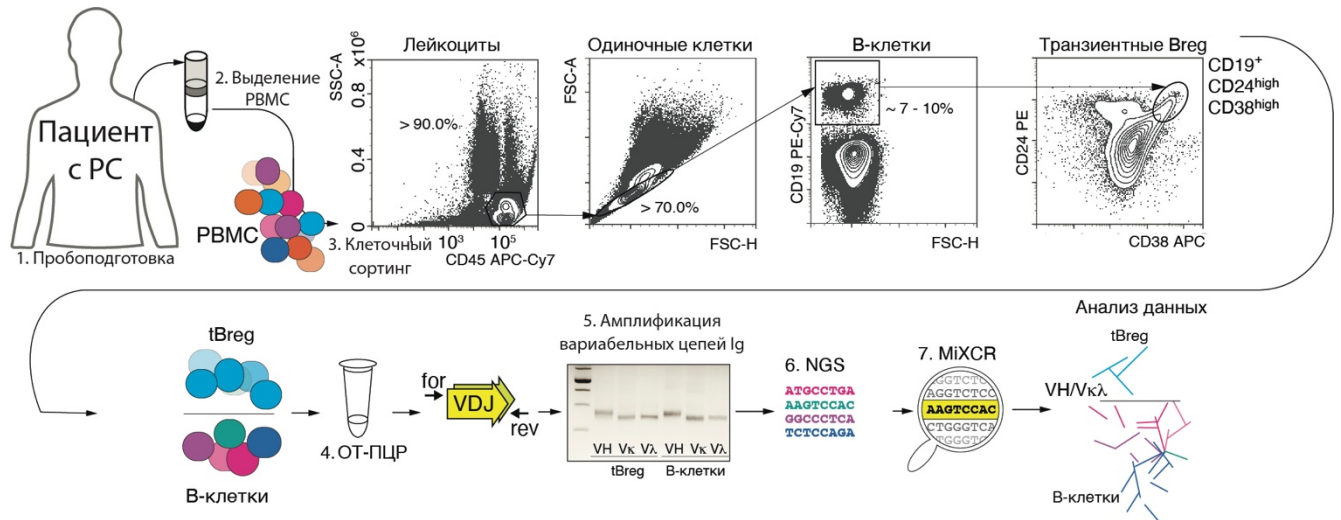


Рисунок 31. Схема эксперимента по изучению tBreg. Общий пул В-клеток $CD19^+$ и субпопуляция $tBreg\ CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ из периферической крови были отсортированы по отдельности при помощи метода проточной цитофлуориметрии. Из отсортированных клеток выделяли РНК и затем ставили реакцию ОТ-ПЦР. Далее гены переменных фрагментов тяжёлых (IGHV) и лёгких (IGVK и IGLV) цепей иммуноглобулинов амплифицировали и подвергали широкомасштабному секвенированию.

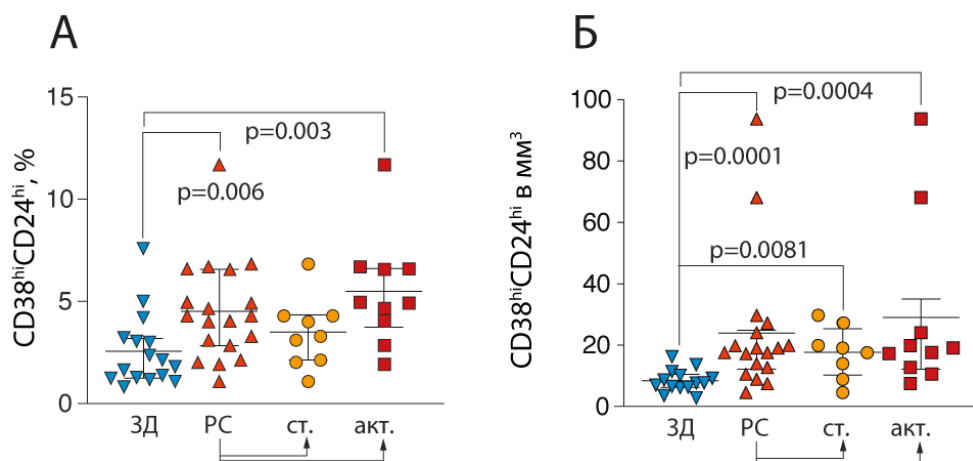


Рисунок 32. Анализ частоты встречаемости субпопуляции $CD24^{high}CD38^{high}$ среди общего пула В-клеток. Процентное содержание (А) и абсолютное количество в $мм^3$ крови (Б) клеток $CD24^{high}CD38^{high}$ у здоровых доноров (ЗД) и пациентов с различными вариантами течения рассеянного склероза (РС) — стабильный рассеянный склероз (ст.), активный рассеянным склерозом (акт.).

Таблица 11. Общее количество и частота субпопуляций T1/T2 tBreg в периферической крови больных РС и здоровых доноров.

Параметр	Клиническая группа			
	Здоровые	РС	Стабильный РС	Активный РС
Абсолютное количество В-клеток в мкл	455±52	508±74	508±98	508±112
Абсолютное количество tBreg в мкл	8.4±1.0	24.0±5.2	17.7±3.0	29.1±9.0
T1/T2 соотношение	2.8±0.2	3.9±0.7	3.2±0.3	4.4±1.1
Абсолютное количество T1 клеток в мкл	2.3±0.3	6.6±2.1	3.5±0.8	8.1±3.1
Абсолютное количество T2 клеток в мкл	6.1±0.7	16.3±3.6	9.9±2.2	19.4±5.1

РС – пациенты с рассеянным склерозом.

Ранее было показано, что активность регуляторных В-клеток изменяется в зависимости от состава субпопуляции tBreg [212]. Снижение отношения более зрелых tBreg (T2) к менее зрелым (T1) – $T2(CD24^{high}CD38^{high}IgD^+)/T1(CD24^{high}CD38^{high}IgD^{low/-})$ – коррелировало с повышенной продукцией IL-10 и наиболее эффективным подавлением Т-клеток [213]. Мы изучили относительное соотношение между переходными субпопуляциями T1 и T2, отличающимися уровнем экспрессии CD24 и CD38, стратегия выбора субпопуляций показана на **Рисунке 33А**. Так как в литературе описывается также способ разделения клеток T1 и T2 по уровню экспрессии IgD, являющегося важным маркером созревания В-клеток, мы сравнили соотношение T1/T2 для субпопуляции выделенных на основе уровня экспрессии IgD и CD24, CD38 (**Рисунок 33**).

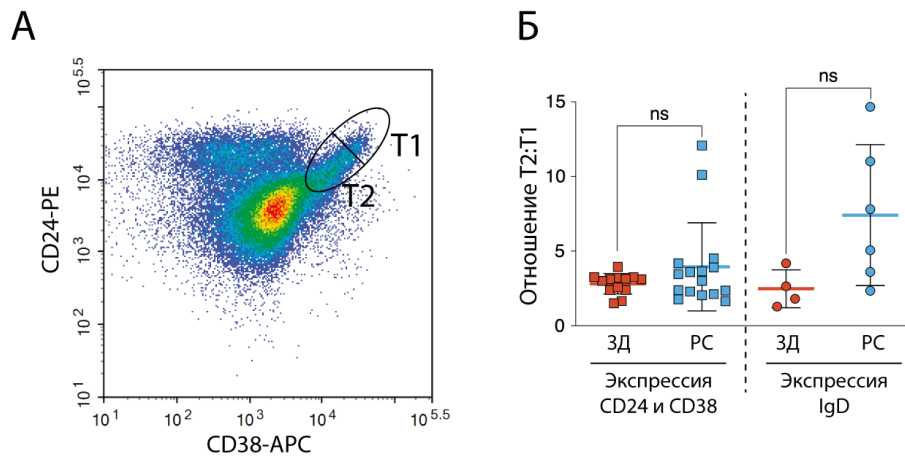


Рисунок 33. Анализ субпопуляций T1 и T2. (А) Стратегия выбора субпопуляций T1 и T2 на основе уровня экспрессии поверхностных маркёров CD24 и CD38. (Б) Относительная доля T1 и T2 Vreg, выделенных на основе (слева) уровня экспрессии CD24 и CD38 (стратегия выбора субпопуляции или (справа) экспрессии IgD – T2(CD24^{high}CD38^{high}IgD⁺) / T1(CD24^{high}CD38^{high}IgD^{low/-}). Статистическую значимость различий между группами доноров оценивали с помощью критерия Манна-Уитни.

Хотя среднее значение отношения T2/T1 повышается при прогрессировании РС, существенной разницы между этими субпопуляциями не наблюдалось (Рисунок 33). При этом абсолютное количество T2 в периферической крови было значительно повышено у пациентов с РС по сравнению со здоровыми донорами, особенно у пациентов с активным РС. В то же время, абсолютный показатель T1 достоверно повышен только у пациентов с РС.

4.2.2. Анализ репертуаров BCR транзистентных В-регуляторных клеток

Для более глубокого понимания особенностей развития tVreg при РС мы проанализировали последовательности BCR данной субпопуляции клеток. Для этого методом проточной цитофлуориметрии выделяли две субпопуляции: тотальные В-клетки (CD19⁺) и tVreg (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}). Для анализа репертуара иммуноглобулинов переменные фрагменты тяжёлых и лёгких цепей антител подвергались широкомасштабному секвенированию. Клонотипы тяжёлых и лёгких цепей были собраны с помощью программного обеспечения MiXCR. Чтобы уменьшить погрешность секвенирования, мы использовали одинаковую глубину анализа репертуара для всех образцов – из каждого набора данных

случайным образом выбирали равные количества пар прочтений (13 000 для IGVH или IGVK и 7000 для IGVL), охватывающих всю целевую последовательность (CDR1+FR2+CDR2+FR3+CDR3).

tBreg представляют собой популяцию незрелых клеток и, следовательно, несут меньше соматических гипермутаций, чем общий пул CD19⁺ В-клеток из периферической крови. Кроме того, нам удалось показать, что гены V_H и V_K CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} tBreg, полученных из периферической крови пациентов с РС, менее мутированы по сравнению со здоровыми донорами. Однако статистически значимая разница была выявлена между здоровыми донорами и пациентами с активным РС, но не между здоровыми донорами и пациентами со стабильным РС (**Рисунок 34А**). Эти данные соответствуют повышенному уровню tBreg в периферической крови пациентов с активным РС. Нами было выявлено примерно одинаковое количество клонотипов IGVH в tBreg и в общем пуле CD19⁺ В-клеток у пациентов с РС и здоровых доноров (**Рисунок 34Б**). Однако анализ разнообразия репертуаров лёгких цепей показал, что соотношение между числом клонотипов IGVK и IGVL в общем пуле CD19⁺ клеток было выше, чем у tBreg, и повышено у здоровых доноров, оставаясь неизменным у пациентов с РС. Наименьшее разнообразие наблюдалось для IGVL. Таким образом, нами были выявлены различия между tBreg и общим пулом В-клеток по соотношению клонотипов. Это различие было значительным только для лямбда-цепи как у пациентов с РС, так и у здоровых доноров (**Рисунок 34В**). В случае тяжёлых цепей и каппа-цепей соотношение tBreg / тотальные В-клетки у пациентов с РС и здоровых доноров было одинаковым.

также не обнаружили каких-либо существенных различий в длине CDR3 лёгких цепей между субпопуляцией tBreg и общим пулом В-клеток (Рисунок 35В, Г). Далее мы сравнили физико-химические свойства аминокислот, входящих в последовательность CDR3, для клонотипов tBreg и тотальных В-клеток. Мы не обнаружили существенных различий в заряде, гидрофобности или частоте использования аминокислот в областях CDR3 между субпопуляциями В-клеток пациентов с РС и здоровых доноров.

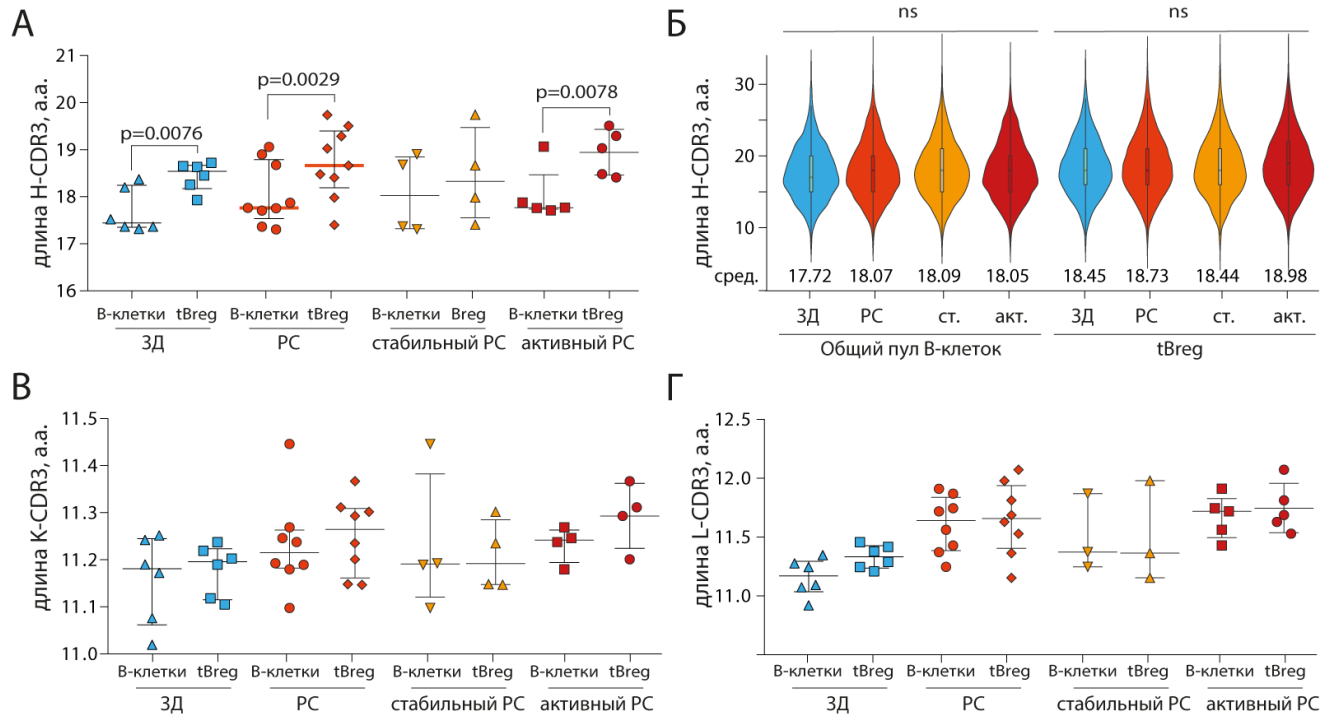


Рисунок 35. Различия в длине гипервариабельной области иммуноглобулинов. Распределение длин CDR3 в субпопуляциях В-клеток для тяжёлых (А), каппа (В) и лямбда (Г) лёгких цепей. (Б) Распределение длин аминокислотных последовательностей CDR3 для клонотипов IGVH в различных субпопуляциях В-клеток. Чтобы сбалансировать размер выборки, из репертуара каждого донора случайным образом было отобрано равное количество клонотипов ($n = 1000$). Редкие клонотипы с длиной CDR3 <6 а.о. или >35 а.о. были исключены. Средние значения обозначены на графике. Разницу в длине CDR3 между tBreg и общим пулом В-клеток анализировали с помощью парного Т-критерия. Разницу в длине CDR3 между группами доноров оценивали с помощью теста Манна-Уитни. Указаны только значения $p < 0.05$.

4.2.3. Анализ частоты встречаемости генов зародышевой линии V_H , V_K , V_λ .

Далее мы проанализировали частоту встречаемости генов зародышевых линий (V_H , V_K , V_λ) у пациентов с РС и здоровых доноров [215]. Сравнение встречаемости IGHV тяжёлых цепей антител представлено на **Рисунке 36**. В обеих группах (РС и здоровые доноры) наиболее часто встречались гены IGHV3. Гены зародышевых линий IGHV2-26, IGHV2-5, IGHV2-70 встречаются в основном у здоровых доноров и практически исчезают при развитии РС, однако небольшая доля данных последовательностей остается среди tBreg. Для зародышевой линии IGHV3-72 также характерно сохранение при развитии РС в пуле tBreg клеток, но не в общем пуле В-клеток. Развитие активного РС ассоциируется с увеличением смещения репертуаров генов иммуноглобулинов. Так, IGHV3-66 практически полностью исчезает у пациентов с активным РС по сравнению со стабильным РС и здоровыми донорами. Особенно эта разница заметна для пула tBreg. IGHV5-51 является одной из самых распространенных зародышевых линий и наблюдается и у здоровых доноров, и у пациентов с РС, однако среди последних частота её встречаемости значительно снижается. При этом единственный ген IGHV4-31, наоборот, встречается чаще в случае развития РС как в общем пуле В-клеток, так и в субпопуляции tBreg. Это коррелирует с ранее опубликованными данными о повышенном содержании семейства IGHV4 в репертуаре В-клеток из периферической крови и цереброспинальной жидкости пациентов с РС [216,217].

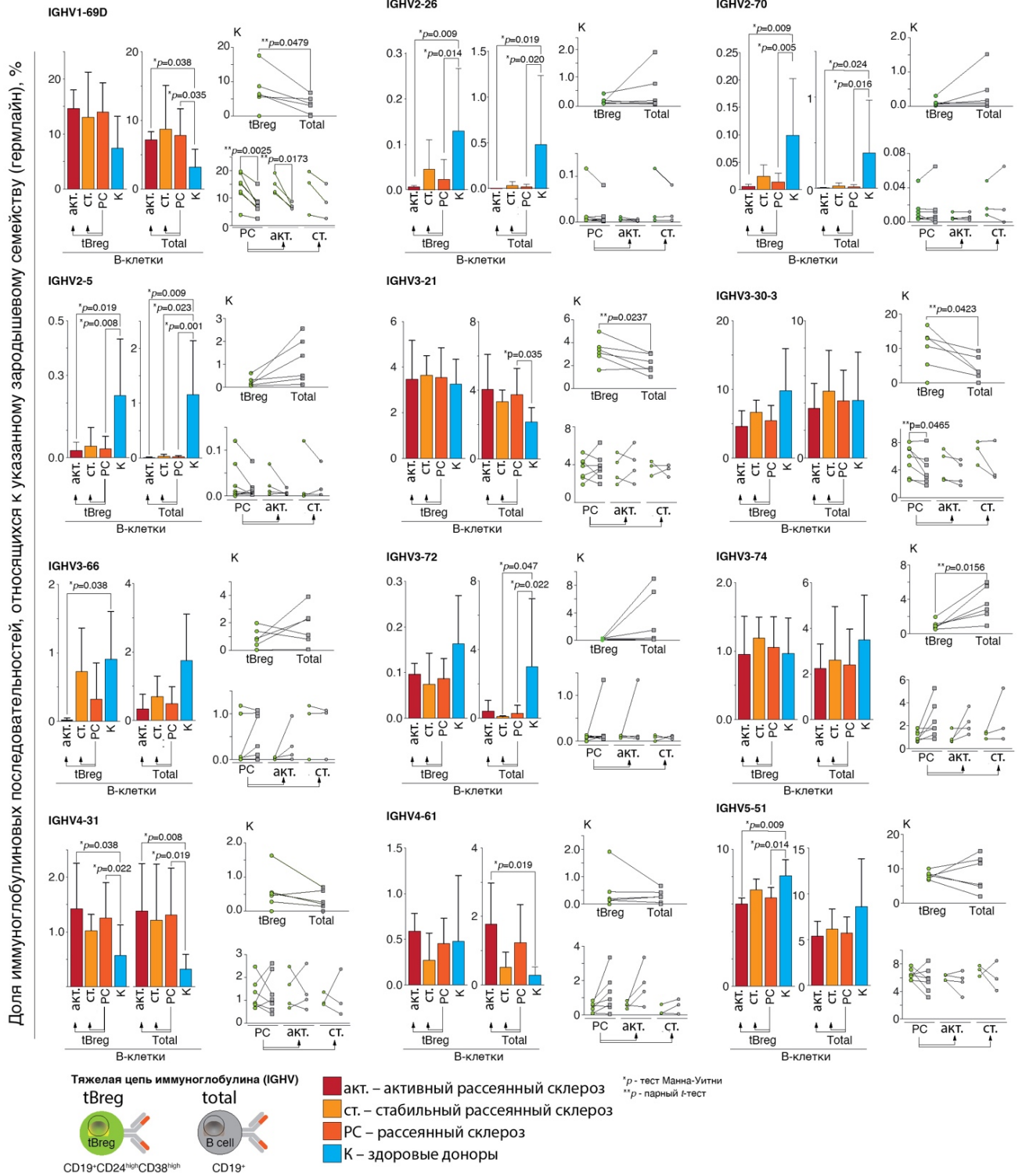


Рисунок 36. Частота встречаемости генов зародышевой линии переменного фрагмента тяжелой цепи (VH) иммуноглобулинов у пациентов с РС и здоровых доноров. Приведены данные только для тех генов зародышевой линии, для которых показана статистически достоверная разница хотя бы в одном анализируемом параметре (сравнение разных типов течения РС против условно доноров – тест Манн-Уитни; сравнение общего пула В-клеток с субпопуляцией tBreg – парный t-тест).

Для генов лёгких цепей иммуноглобулинов нам также удалось обнаружить некоторые различия в группах РС и здоровых доноров. Так, встречаемость IGKV1-12 в В-клетках доноров с активным РС значительно снижалась по сравнению со здоровыми, особенно в субпопуляции tBreg. Зародышевая линия IGKV1-33 также реже встречалась при развитии РС. Рост частоты встречаемости в В-клетках доноров с активным РС был характерен для генов IGKV6-21, IGKV6D-21, IGKV3D-20, IGKV2D-29 и IGKV2D-24 (**Рисунок 37**). Для изоформа лямбда лёгкой цепи иммуноглобулинов также наблюдаются различия в распределении генов зародышевой линии (**Рисунок 38**). По результатам NGS, IGLV1-36 практически не встречается у здоровых доноров при развитии стабильного РС, однако доля резко увеличивается среди пациентов с активным РС. Частота встречаемости генов зародышевой линии IGLV1-44 и IGLV3-21 повышена при любом варианте течения РС, однако статистически достоверная разница наблюдается только между пациентами с активным РС и условно здоровыми донорами. Распределение IGLV2-8, IGLV2-14 и IGLV2-23 не отличается между пациентами со стабильным РС и здоровыми донорами, но их частота резко падает при развитии активного РС. Представленность гена зародышевой линии IGLV7-43, наоборот, находится примерно на одинаковом уровне у пациентов с активным РС и у здоровых доноров, но резко уменьшается у пациентов со стабильным РС. В рамках данной работы выявленные различия в представленности генов зародышевой линии чаще всего относились к группе пациентов с более агрессивным РС – активным РС и выявлялись в tBreg, что указывает на то, что данная форма РС может быть связана с иммунологическими нарушениями на самых ранних стадиях развития В-клеток.

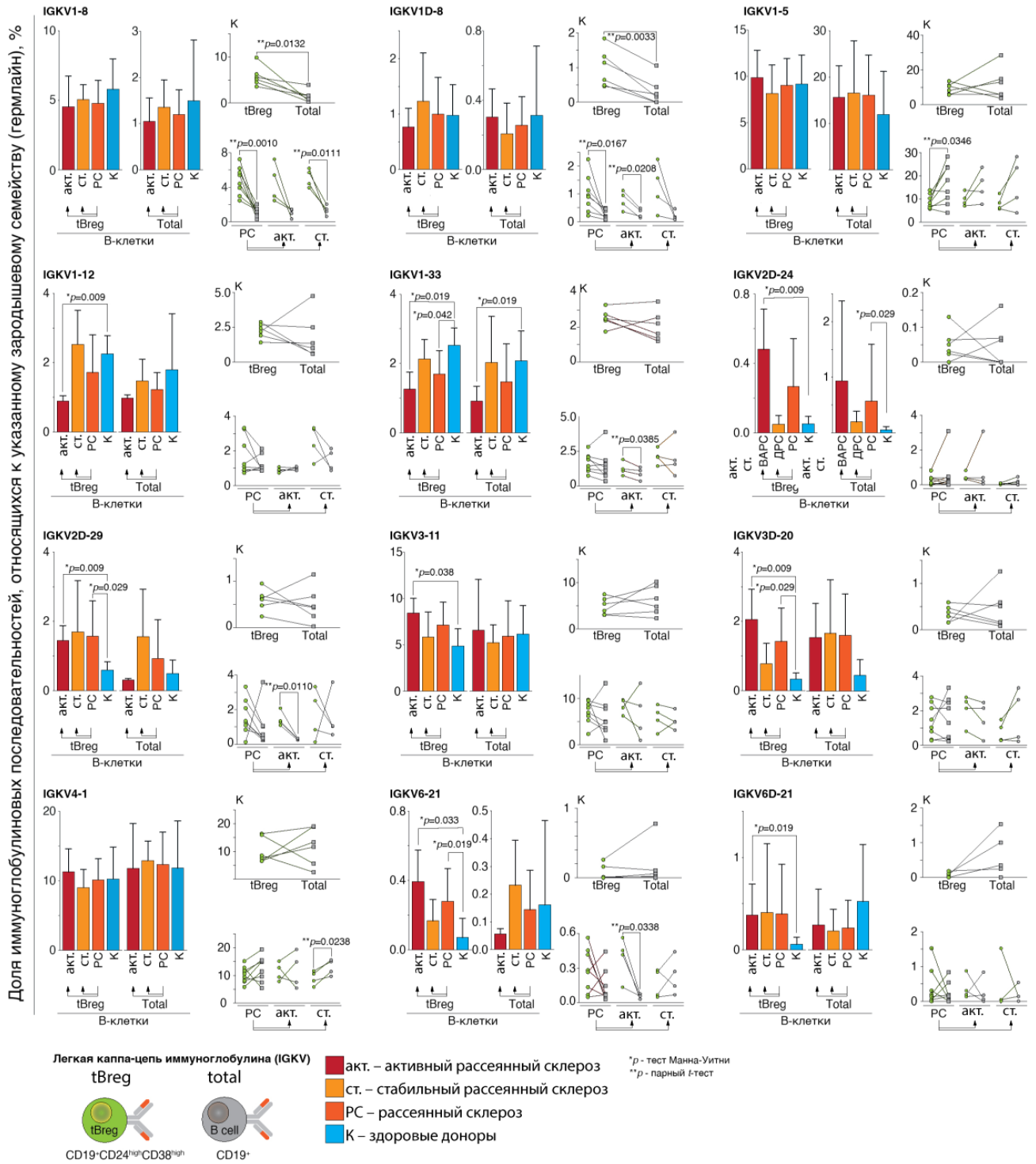


Рисунок 37. Частота встречаемости генов зародышевой линии переменного фрагмента лёгкой каппа цепи (Vk) иммуноглобулинов у пациентов с РС и здоровых доноров. Приведены данные только для тех генов зародышевой линии, для которых показана статистически достоверная разница хотя бы в одном анализируемом параметре (сравнение разных типов течения РС против здоровых доноров – тест Манн-Уитни; сравнение общего пула В-клеток с tBreg – парный t-тест).

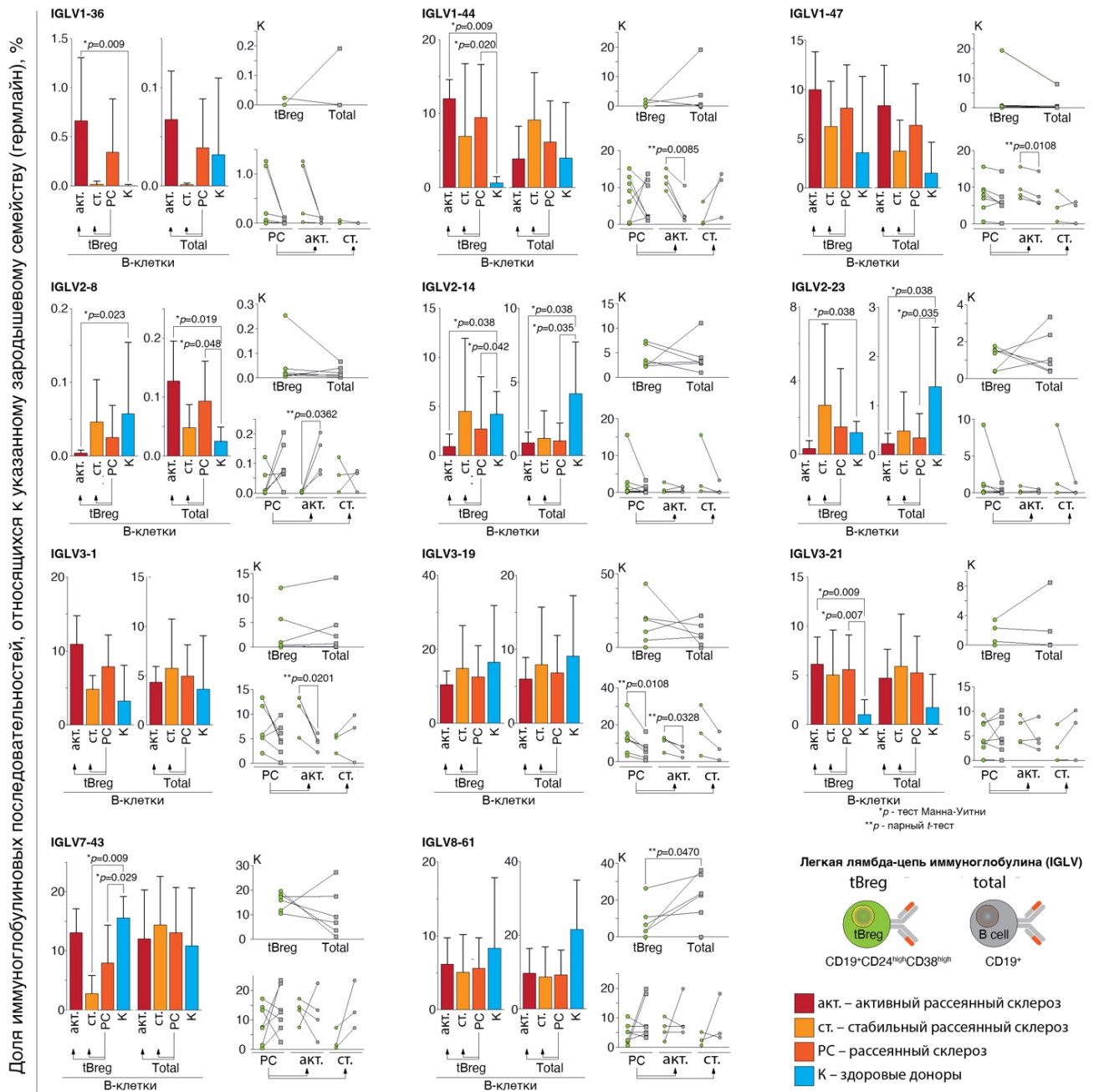


Рисунок 38. Частота встречаемости генов зародышевой линии варибельного фрагмента лёгкой лямбда цепи (VL) иммуноглобулинов у пациентов с РС и здоровых доноров. Приведены данные только для тех генов зародышевой линии, для которых показана статистически достоверная разница хотя бы в одном анализируемом параметре (сравнение разных типов течения РС против здоровых доноров – тест Манн-Уитни; сравнение общего пула В-клеток с субпопуляцией tBreg – парный t-тест).

4.2.4. Анализ зрелости субпопуляции транзитных В-регуляторных клеток у пациентов с РС и здоровых доноров

Один из способов оценки зрелости субпопуляции В-клеток – по уровню экспрессии поверхностного маркера CD27. Ранее сообщалось, что количество

зрелых CD27⁺ периферических В-клеток памяти [218] у больных РС имеет тенденцию к снижению по сравнению со здоровыми донорами [219]. Важно отметить, что соотношение различных популяций В-клеток и особенно В-клеток памяти меняется с возрастом [220]. Чтобы избежать какой-либо возрастной предвзятости, в наше исследование были включены образцы пациентов с РС (44 ± 14 лет) и соответствующие по полу и возрасту образцы от здоровых доноров (43 ± 13 лет). Чтобы изучить фенотипическую стадию созревания tBreg, мы проанализировали вклад CD27-положительных клеток в эту субпопуляцию (**Рисунок 39А**). Мы обнаружили, что содержание клеток CD27⁺ в субпопуляции CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} у пациентов с РС достоверно снижено (1.0 ± 0.5 %) по сравнению со здоровыми донорами (2.2 ± 1.4 %). Мы не обнаружили корреляции между возрастом и частотой клеток CD27⁺ в субпопуляции CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}. Наши результаты хорошо соотносятся с ранее опубликованными данными, предполагающими, что Breg (CD19⁺IL10⁺) в основном имели фенотип CD27⁻ у пациентов с РС в стадии ремиссии и у здоровых доноров [171]. При этом, процентное содержание и абсолютное количество Breg памяти (CD24^{high}CD27⁺), наивных В-клеток и В-клеток памяти были одинаковыми у здоровых доноров и пациентов с РС (**Рисунок 39Б, Таблица 12**).

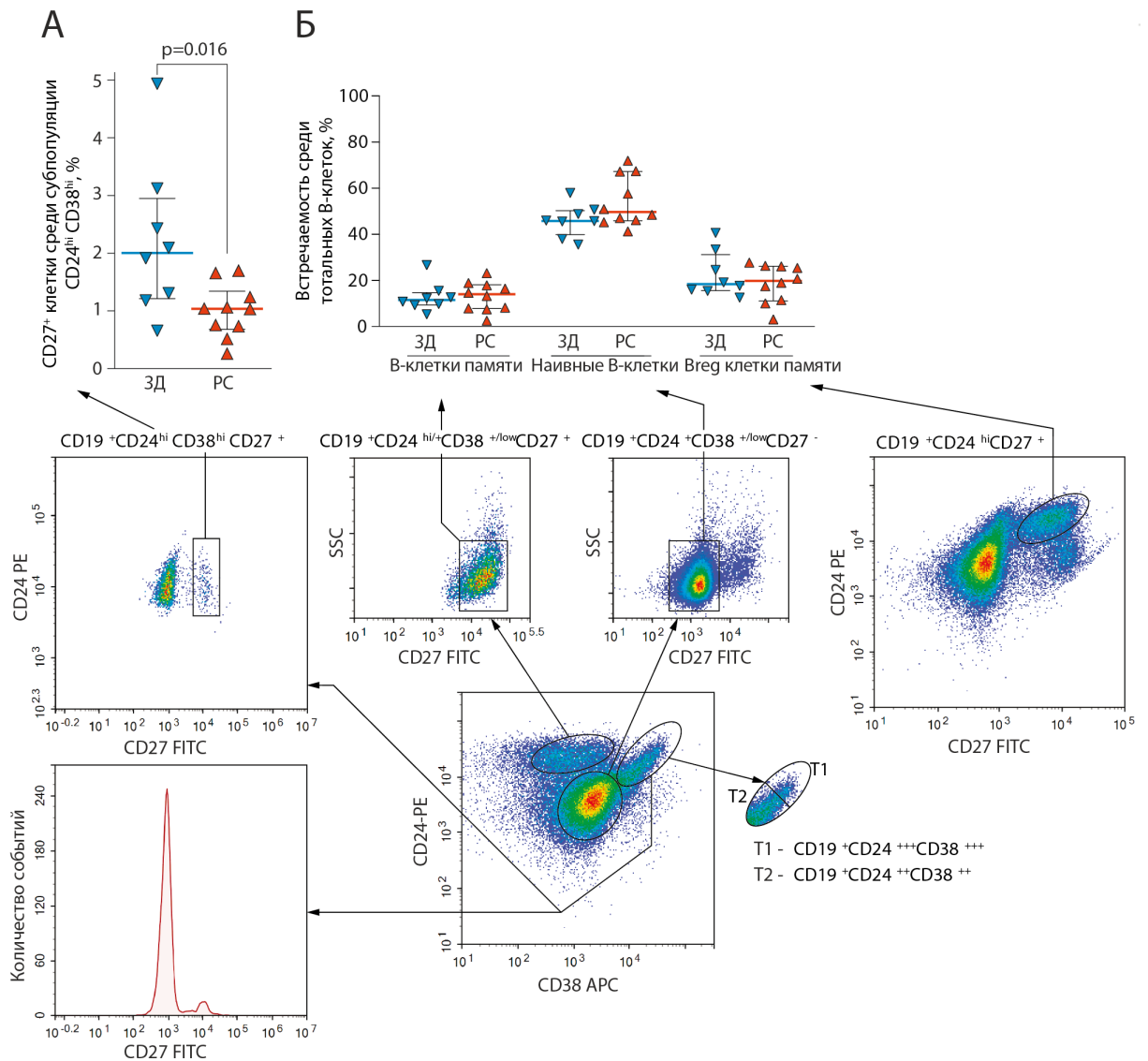


Рисунок 39. Анализ субпопуляций В-клеток в периферической крови больных РС и здоровых лиц. (А) Процент CD27-позитивных активированных клеток в субпопуляции CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} tBreg. (Б) Количество клеток памяти (CD19⁺CD24^{+/high}CD38^{+/low}CD27⁺), наивных (CD19⁺CD24⁺CD38^{+/low}CD27⁻) или клеток памяти Врег (CD24^{high}CD27⁺) среди периферических В-клеток у пациентов с рассеянным склерозом (РС) и здоровых доноров (ЗД). На нижней панели показана стратегия выбора субпопуляций при цитометрическом анализе.

Таблица 12. Общее количество В-клеток из различных субпопуляций в периферической крови больных РС и здоровых доноров.

	Клиническая группа			
	Здоровые	РС	Стабильный РС	Активный РС
В-клетки памяти	51±9	41±6	34±5	46±9
Наивные В-клетки	192±40	216±47	172±42	246±75
Регуляторные В-клетки памяти	89±17	77±22	44±6	100±34

4.2.5. Повышение продукции IL-10 в субпопуляции $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ клеток

Поскольку регуляторные свойства В-клеток не ограничиваются исключительно субпопуляцией $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$, мы проанализировали частоту встречаемости IL-10-секретирующих клеток среди общего пула В-клеток после кратковременной стимуляции CpG (менее 24 часов), которая позволяет оценить продукцию IL-10 только в tBreg, но не в В-клетках, предрасположенных к экспрессии IL-10. Статистически значимых различий в продукции IL-10 В-клетками пациентов с РС и В-клетками здоровых доноров обнаружено не было. При этом в субпопуляции $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ наблюдалось больше IL-10-положительных В-клеток, чем в пуле тотальных В-клеток как для образцов клеток пациентов с РС, так и для здоровых доноров (Рисунок 40А). И наоборот, IL-10-положительные В-клетки у пациентов с РС и здоровых доноров были обогащены клетками субпопуляции $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ (Рисунок 40Б).

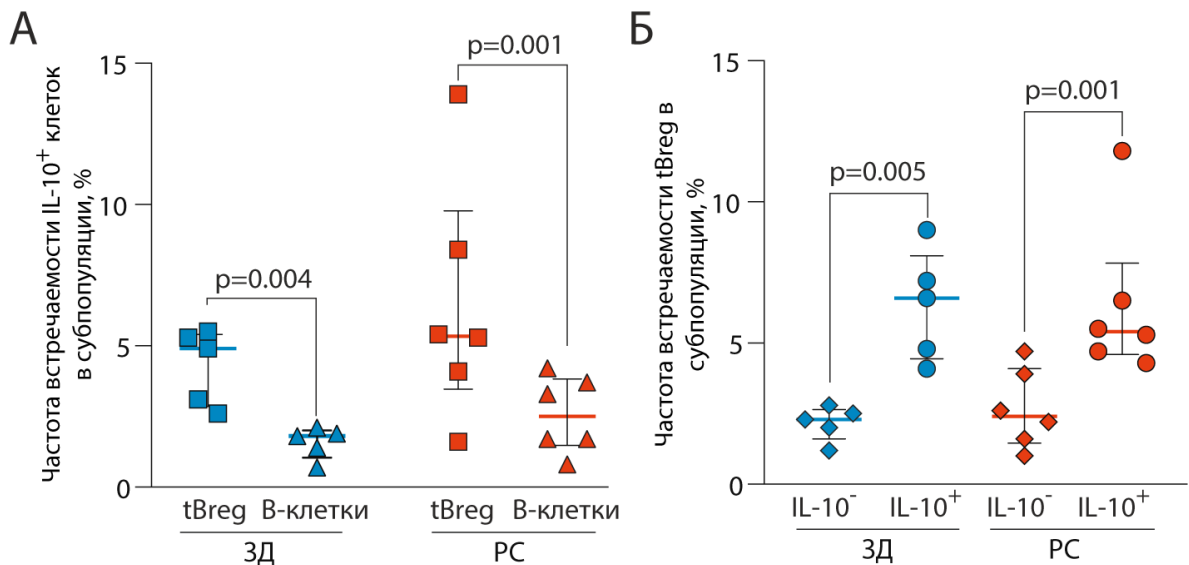


Рисунок 40. Анализ продукции IL-10 tBreg и общим пулом В-клеток. (А) Процент IL-10-положительных клеток в субпопуляции $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ (tBreg) и общем пуле В-клеток. (Б) Процент $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ tBreg в IL-10-положительных и IL-10-отрицательных В-клетках. Статистическую значимость различий между группами доноров оценивали с помощью критерия Манна-Уитни, а значимость различий между субпопуляциями В-клеток – с помощью парного Т-критерия. ЗД – здоровые доноры, РС – пациенты с рассеянным склерозом.

Существование нескольких альтернативных методов дифференцировки Breg может привести к сосуществованию различных субпопуляций В-клеток с регуляторными функциями. Популяция Breg может брать начало либо от нескольких, либо от ограниченного набора независимых предшественников Breg. Это может приводить либо к разнообразному, либо к ограниченному клональному репертуару. При этом, почти любая В-клетка может стать регуляторной В-клеткой на определенной стадии своего развития при воздействии разрешающих стимулов окружающей среды. В данной работе мы сфокусировались на репертуаре tBreg с фенотипом $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$. Полученные нами данные позволяют заключить, что повышенное абсолютное число и частота $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ tBreg, наблюдаемые у больных РС, характеризуются большей идентичностью генов зародышевой линии по сравнению со здоровыми донорами. В то же время абсолютное количество недавно иммигрировавших из костного мозга T1 и более зрелых T2 клеток увеличивается, таким образом более или менее сохраняя общее соотношение T1/T2 у здоровых доноров.

Мы охарактеризовали репертуары В-клеточных рецепторов tBreg методом NGS и показали, что в генах зародышевых линий тяжёлых и лёгких каппа цепей в области переменных фрагментов у пациентов с РС содержится меньше мутаций по сравнению со здоровыми донорами. На основании полученных нами данных можно предложить 3 возможных варианта нарушения развития tBreg: (1) нарушенное созревание tBreg – меньшее количество В-клеток становится зрелыми; (2) задержка созревания tBreg – процесс созревания растягивается во времени; (3) повышение количества tBreg, которое компенсирует нарушения созревания (**Рисунок 41**) [221]. Компенсация нарушений при созревании кажется нам наиболее вероятным сценарием, так как соотношение T1/T2 и особенно процентное и абсолютное количество tBreg повышены у пациентов с РС, тогда как количество клеток памяти и наивных В-клеток остается неизменным.

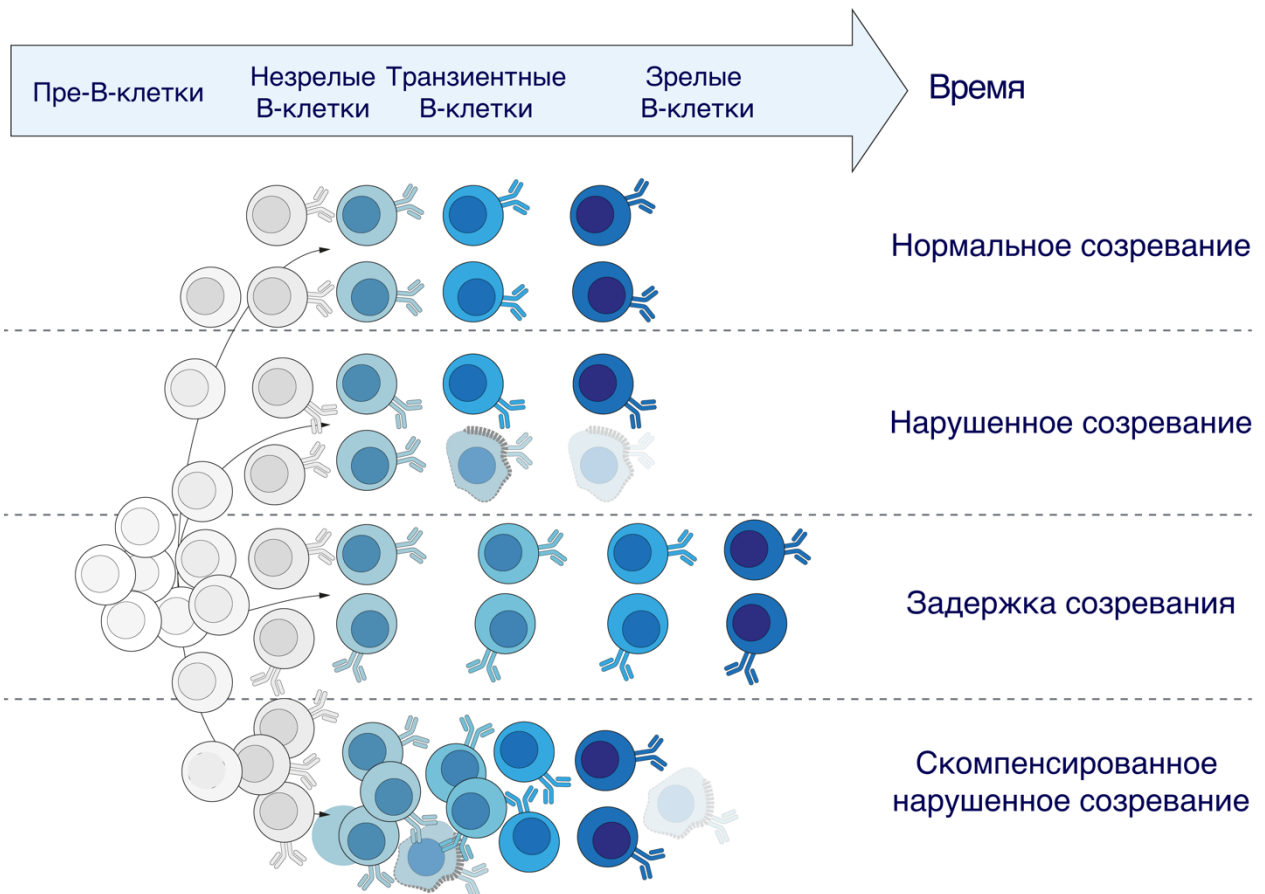


Рисунок 41. Нарушения созревания tBreg при РС. У пациентов с РС повышен сывороточный титр tBreg с фенотипом $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$, а также наблюдается меньший уровень соматических гипермутаций в данной субпопуляции по сравнению со здоровыми донорами. Мы предполагаем, как минимум три возможных сосуществующих или независимых сценария, объясняющих данные наблюдения: (1) нарушенное созревание tBreg; (2) задержка созревания tBreg; (3) повышение количества tBreg, которое компенсирует нарушения созревания.

5. Выводы

- 1 Оптимизирован метод амплификации сложных ДНК-матриц в каплях эмульсии, позволяющий сохранить разнообразие библиотеки, уменьшить количество ПЦР-ошибок и увеличить выход продукта. С использованием данного метода создана пептидная фаг-дисплейная библиотека потенциальных аутоиммунных мишеней человека, размером 11973 уникальных последовательностей.
- 2 Разработана платформа для высокопроизводительного скрининга антиген-специфичных иммуноглобулинов.
- 3 С использованием полученной библиотеки человеческих аутоантигенов методом фаговой иммунопреципитации (PhIP-Seq) впервые выявлены 3 кандидатных биомаркёра РС (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄, PRX₄₅₁₋₄₉₄, РТК₆₃₀₁₋₃₄₄). Предложена панель антигенов (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + РТК₆₃₀₁₋₃₄₄ + PRX₄₅₁₋₄₉₄ + LMP1₂₅₇₋₃₃₀), позволяющая с высокой чувствительностью идентифицировать РС (AUC=0.818, SE=0.786, SP=0.864).
- 4 При анализе транзистентных регуляторных В-клеток (tBreg) с фенотипом CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} впервые показано их повышенное содержание в периферической крови пациентов с активной формой РС.
- 5 Выдвинуто предположение о том, что развитие РС сопряжено с замедленным созреванием субпопуляции tBreg, что подтверждено пониженным содержанием гипермутаций в варибельных фрагментах тяжёлой цепи репертуара иммуноглобулинов данной субпопуляции.

6. Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность и признательность своему научному руководителю Ломакину Якову Анатольевичу за внимательное руководство, непрерывное обучение и формирование высоких стандартов работы в лаборатории. Особую благодарность автор выражает Габибову Александру Габибовичу за предоставленную возможность работать в одной из лучших лабораторий и заниматься интересными исследованиями. Отдельную признательность автор выражает своим коллегам и соавторам Терехову Станиславу Сергеевичу и Елисееву Игорю Евгеньевичу. Автор искренне благодарит коллектив лаборатории биокатализа за неоценимую помощь и поддержку в повседневной лабораторной жизни. Автор также благодарит сотрудников Центра неврологии за помощь в подборе доноров для данного исследования.

Работа выполнена при поддержке ФГБУ РЦНИ (РФФИ) (проект 20-315-90115).

7. Список сокращений

- АПК – антигенпрезентирующие клетки;
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека;
- ВЭБ – Вирус Эпштейна-Барр (герпесвирус человека тип 4);
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер;
- ДК – дендритные клетки;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ЗД – здоровый донор;
- ИФА – иммуноферментный анализ;
- кДа – килодальтон;
- КМ – костный мозг;
- ОТ-ПЦР – Обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- РНК – рибонуклеиновая кислота;
- РС – рассеянный склероз;
- ФДК – фолликулярные дендритные клетки;
- ЦНС – центральная нервная система;
- ЦСЖ – цереброспинальная жидкость;
- ЭАЭ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит;
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;
- АСЕ2 (англ. angiotensin-converting enzyme 2) – ангиотензинпревращающий фермент 2;
- APRIL (англ. a proliferation-inducing ligand) – индуцирующий пролиферацию лиганд;
- AUC (англ. area under curve) – площадь под кривой;
- BAFF (англ. B-cell activating factor) – фактор, активирующий В-клетки;
- BCR (англ. B-cell receptor) – В-клеточный рецептор;
- Breg (англ. regulatory B cell) – регуляторная В-клетка;
- CD (англ. cluster of differentiation) – кластер дифференцировки;
- CDR (англ. complementarity determining) – гипервариабельный регион антитела;

CLP (англ. common lymphoid progenitor) – общий предшественник лимфоидных клеток;

DPP4 (англ. Dipeptidyl peptidase 4) – дипептидилпептидаза 4;

E2A – фактор транскрипции, специфичный к В-клеточной линии;

EBF (англ. early B cell factor) – ранний В-клеточный фактор;

EBNA (англ. Epstein Barr virus nuclear antigen) – ядерный антиген вируса Эпштейна-Барр;

Fab (англ. fragment antigen binding) – антигенсвязывающий фрагмент;

GPI (англ. Glucose-6-phosphate isomerase) – глюкозо-6-фосфат-изомераза;

HAVCR1 (англ. Hepatitis A virus cellular receptor 1) – клеточный рецептор 1 вируса гепатита А;

HSC (англ. hematopoietic stem cells) – стволовые кроветворные клетки;

IgA – иммуноглобулин класса А;

IgD – иммуноглобулин класса D;

IgE – иммуноглобулин класса E;

IgG – иммуноглобулин класса G;

IGHV (англ. immunoglobulin heavy chain variable) – гены зародышевой линии вариабельного фрагмента тяжелой цепи иммуноглобулинов;

IGKV (англ. immunoglobulin kappa chain variable) – гены зародышевой линии вариабельного фрагмента каппа цепи иммуноглобулинов;

IGLV (англ. immunoglobulin lambda chain variable) – гены зародышевой линии вариабельного фрагмента лямбда цепи иммуноглобулинов;

IgM – иммуноглобулин класса M;

IL (англ. Interleukin) – интерлейкин;

INSR (англ. Insulin receptor) – рецептор инсулина;

KRT1 (англ. Keratin, type II cytoskeletal 1) – кератин 2го типа, цитоскелетный;

LMP (англ. latent membrane protein) – латентный мембранный белок;

MBP (англ. myelin basic protein) – основной белок миелина;

MHC (англ. major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости;

MOG (англ. myelin oligodendrocyte glycoprotein) – миелин-олигодендроцитарный гликопротеин;

MPP (англ. multipotent progenitor) – мультипотентные клетки-предшественники;

ORF (англ. open reading frame) – открытая рамка считывания;

PBS (англ. phosphate-buffered saline) – фосфатно-солевой буфер;

PhIP-Seq (англ. phage immunoprecipitation sequencing) – фаговая иммунопреципитация-секвенирование;

PLP (англ. proteolipid protein) – протеолипидный протеин;

POU4F1 (англ. POU domain, class 4, transcription factor 1) – POU-домен, класс 4, фактор транскрипции 1;

PRX (англ. Periaxin) – Периаксин;

PTK6 (англ. Protein-tyrosine kinase 6) – тирозинкиназа-6;

RBD (англ. receptor-binding domain) – рецептор-связывающий домен S-белка вируса SARS-CoV-2;

SCF (англ. stem cell factor) – фактор стволовых клеток;

scFv (англ. single-chain variable fragment) – одноцепочечный вариабельный фрагмент;

SPTAN1 (англ. Spectrin alpha chain non-erythrocytic 1, Isoform 3) – неэритроцитарная альфа цепь спектрина 1 изоформа 3;

tBreg (англ. transient regulatory B cell) – транзистентная регуляторная В-клетка;

TCR (англ. T-cell receptor) – Т-клеточный рецептор;

TGF- β (англ. Transforming growth factor) – трансформирующий фактор роста бета;

Th (англ. T helper cell) – Т-хелпер;

TNF (англ. Tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли;

V κ (англ. variable kappa) – вариабельный домен лёгкой каппа цепи иммуноглобулина;

V λ (англ. variable lambda) – вариабельный домен лёгкой лямбда цепи иммуноглобулина;

VH (англ. variable heavy) – вариабельный домен тяжёлой цепи иммуноглобулина;

VL (англ. variable light) – вариабельный домен лёгкой цепи иммуноглобулина.

8. Список цитированной литературы

1. Walton C. et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. // *Mult. Scler.* 2020. Vol. 26, № 14. P. 1816–1821.
2. Gasperi C. et al. Systematic assessment of medical diagnoses preceding the first diagnosis of multiple sclerosis. // *Neurology.* 2021.
3. Wattjes M.P. et al. 2021 MAGNIMS-CMSC-NAIMS consensus recommendations on the use of MRI in patients with multiple sclerosis. // *Lancet Neurol.* 2021. Vol. 20, № 8. P. 653–670.
4. Cooper M.D., Peterson R.D., Good R.A. Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken. // *Nature.* 1965. Vol. 205. P. 143–146.
5. Sagaert X., De Wolf-Peeters C. Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localisation and their developmental lineage. // *Immunol. Lett.* 2003. Vol. 90, № 2–3. P. 179–186.
6. B cells in immunity and tolerance / ed. Wang J.-Y. Singapore: Springer Singapore, 2020. Vol. 1254.
7. Appelgren D. et al. Marginal-Zone B-Cells Are Main Producers of IgM in Humans, and Are Reduced in Patients With Autoimmune Vasculitis. // *Front. Immunol.* 2018. Vol. 9. P. 2242.
8. Rodriguez-Zhurbenko N. et al. Human B-1 Cells and B-1 Cell Antibodies Change With Advancing Age. // *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. P. 483.
9. Zhang X. Regulatory functions of innate-like B cells. // *Cell. Mol. Immunol.* 2013. Vol. 10, № 2. P. 113–121.
10. Tornberg U.C., Holmberg D. B-1a, B-1b and B-2 B cells display unique VHDJH repertoires formed at different stages of ontogeny and under different selection pressures. // *EMBO J.* 1995. Vol. 14, № 8. P. 1680–1689.
11. Crickx E. et al. Anti-CD20-mediated B-cell depletion in autoimmune diseases: successes, failures and future perspectives. // *Kidney Int.* 2020. Vol. 97, № 5. P. 885–893.
12. Oleinika K., Mauri C., Salama A.D. Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease. // *Nat. Rev. Nephrol.* 2019. Vol. 15, № 1. P. 11–26.

13. Zhang Z., Xu Q., Huang L. B cell depletion therapies in autoimmune diseases: Monoclonal antibodies or chimeric antigen receptor-based therapy? // *Front. Immunol.* 2023. Vol. 14. P. 1126421.
14. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. // *Nat. Rev. Immunol.* 2006. Vol. 6, № 2. P. 107–116.
15. Vivier E. The discovery of innate lymphoid cells. // *Nat. Rev. Immunol.* 2021. Vol. 21, № 10. P. 616.
16. Mead A.J. et al. FLT3-ITDs instruct a myeloid differentiation and transformation bias in lymphomyeloid multipotent progenitors. // *Cell Rep.* 2013. Vol. 3, № 6. P. 1766–1776.
17. Moll N.M., Ransohoff R.M. CXCL12 and CXCR4 in bone marrow physiology. // *Expert Rev. Hematol.* 2010. Vol. 3, № 3. P. 315–322.
18. Cordeiro Gomes A. et al. Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation. // *Immunity.* 2016. Vol. 45, № 6. P. 1219–1231.
19. von Muenchow L. et al. Pro-B cells propagated in stromal cell-free cultures reconstitute functional B-cell compartments in immunodeficient mice. // *Eur. J. Immunol.* 2017. Vol. 47, № 2. P. 394–405.
20. Sigvardsson M. et al. Early B-cell factor, E2A, and Pax-5 cooperate to activate the early B cell-specific mb-1 promoter. // *Mol. Cell. Biol.* 2002. Vol. 22, № 24. P. 8539–8551.
21. Heesters B.A., Myers R.C., Carroll M.C. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. // *Nat. Rev. Immunol.* 2014. Vol. 14, № 7. P. 495–504.
22. Batista F.D., Harwood N.E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. // *Nat. Rev. Immunol.* 2009. Vol. 9, № 1. P. 15–27.
23. Mackay F. et al. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. // *Annu. Rev. Immunol.* 2003. Vol. 21. P. 231–264.
24. Vincent F.B. et al. The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013. Vol. 24, № 3. P. 203–215.
25. Bossen C., Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. // *Semin. Immunol.* 2006. Vol. 18, № 5. P. 263–275.

26. Cyster J.G., Allen C.D.C. B cell responses: cell interaction dynamics and decisions. // *Cell*. 2019. Vol. 177, № 3. P. 524–540.
27. Kurosaki T., Shinohara H., Baba Y. B cell signaling and fate decision. // *Annu. Rev. Immunol.* 2010. Vol. 28. P. 21–55.
28. Daly C.A. et al. B Cell Subsets Differentially Contribute to the T Cell-Independent Memory Pool. // *J. Immunol.* 2020. Vol. 205, № 9. P. 2362–2374.
29. Horns F. et al. Lineage tracing of human B cells reveals the in vivo landscape of human antibody class switching. // *eLife*. 2016. Vol. 5.
30. Wienands J., Engels N. The memory function of the B cell antigen receptor. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2016. Vol. 393. P. 107–121.
31. Akkaya M., Kwak K., Pierce S.K. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. // *Nat. Rev. Immunol.* 2020. Vol. 20, № 4. P. 229–238.
32. Abbott R.K. et al. Precursor Frequency and Affinity Determine B Cell Competitive Fitness in Germinal Centers, Tested with Germline-Targeting HIV Vaccine Immunogens. // *Immunity*. 2018. Vol. 48, № 1. P. 133-146.e6.
33. Wong R., Bhattacharya D. Basics of memory B-cell responses: lessons from and for the real world. // *Immunology*. 2019. Vol. 156, № 2. P. 120–129.
34. Crotty S. et al. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. // *J. Immunol.* 2003. Vol. 171, № 10. P. 4969–4973.
35. Weller S. et al. CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001. Vol. 98, № 3. P. 1166–1170.
36. Diamond M.S. et al. B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. // *J. Virol.* 2003. Vol. 77, № 4. P. 2578–2586.
37. Gozzetti A. et al. Anti CD38 monoclonal antibodies for multiple myeloma treatment. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2022. Vol. 18, № 5. P. 2052658.
38. Graf J. et al. Monoclonal antibodies for multiple sclerosis: an update. // *BioDrugs*. 2019. Vol. 33, № 1. P. 61–78.
39. Gruell H. et al. Antibody-mediated neutralization of SARS-CoV-2. // *Immunity*. 2022. Vol. 55, № 6. P. 925–944.

40. Li D. et al. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies for COVID-19 Prevention and Treatment. // *Annu. Rev. Med.* 2022. Vol. 73. P. 1–16.
41. Adler L.N. et al. The Other Function: Class II-Restricted Antigen Presentation by B Cells. // *Front. Immunol.* 2017. Vol. 8. P. 319.
42. Zamvil S.S., Hauser S.L. Antigen presentation by B cells in multiple sclerosis. // *N. Engl. J. Med.* 2021. Vol. 384, № 4. P. 378–381.
43. Schriek P. et al. Marginal zone B cells acquire dendritic cell functions by trogocytosis. // *Science.* 2022. Vol. 375, № 6581. P. eabf7470.
44. Upasani V., Rodenhuis-Zybert I., Cantaert T. Antibody-independent functions of B cells during viral infections. // *PLoS Pathog.* 2021. Vol. 17, № 7. P. e1009708.
45. Myers R.C. et al. Lymphotoxin $\alpha 1\beta 2$ expression on B cells is required for follicular dendritic cell activation during the germinal center response. // *Eur. J. Immunol.* 2013. Vol. 43, № 2. P. 348–359.
46. Hagn M., Jahrsdörfer B. Why do human B cells secrete granzyme B? Insights into a novel B-cell differentiation pathway. // *Oncoimmunology.* 2012. Vol. 1, № 8. P. 1368–1375.
47. Hagn M. et al. Human B cells differentiate into granzyme B-secreting cytotoxic B lymphocytes upon incomplete T-cell help. // *Immunol. Cell Biol.* 2012. Vol. 90, № 4. P. 457–467.
48. Gommerman J.L., Browning J.L., Ware C.F. The Lymphotoxin Network: orchestrating a type I interferon response to optimize adaptive immunity. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014. Vol. 25, № 2. P. 139–145.
49. Simon Q. et al. In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016. Vol. 137, № 5. P. 1577-1584.e10.
50. Guerrier T. et al. Proinflammatory B-cell profile in the early phases of MS predicts an active disease. // *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2018. Vol. 5, № 2. P. e431.
51. Sokolov A.V., Shmidt A.A., Lomakin Y.A. B cell regulation in autoimmune diseases. // *Acta Naturae.* 2018. Vol. 10, № 3. P. 11–22.
52. Brenner S., Lerner R.A. Encoded combinatorial chemistry. // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992. Vol. 89, № 12. P. 5381–5383.

53. Liang C.T., Roscow O.M.A., Zhang W. Recent developments in engineering protein-protein interactions using phage display. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2021. Vol. 34.
54. Cherf G.M., Cochran J.R. Applications of yeast surface display for protein engineering. // *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1319. P. 155–175.
55. Taube R. et al. Lentivirus display: stable expression of human antibodies on the surface of human cells and virus particles. // *PLoS ONE.* 2008. Vol. 3, № 9. P. e3181.
56. Zahnd C., Amstutz P., Plückthun A. Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. // *Nat. Methods.* 2007. Vol. 4, № 3. P. 269–279.
57. Bernedo-Navarro R.A., Yano T. Phage display and Shiga toxin neutralizers. // *Toxicon.* 2016. Vol. 113. P. 60–69.
58. Wang Y. et al. Phage display technology and its applications in cancer immunotherapy. // *Anticancer Agents Med Chem.* 2019. Vol. 19, № 2. P. 229–235.
59. Vodnik M. et al. Phage display: selecting straws instead of a needle from a haystack. // *Molecules.* 2011. Vol. 16, № 1. P. 790–817.
60. Hertveldt K., Beliën T., Volckaert G. General M13 phage display: M13 phage display in identification and characterization of protein-protein interactions. // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 502. P. 321–339.
61. Kehoe J.W., Kay B.K. Filamentous phage display in the new millennium. // *Chem. Rev.* 2005. Vol. 105, № 11. P. 4056–4072.
62. Gamkrelidze M., Dąbrowska K. T4 bacteriophage as a phage display platform. // *Arch. Microbiol.* 2014. Vol. 196, № 7. P. 473–479.
63. Deng X. et al. Advances in the T7 phage display system (Review). // *Mol. Med. Report.* 2018. Vol. 17, № 1. P. 714–720.
64. Beghetto E., Gargano N. Lambda-display: a powerful tool for antigen discovery. // *Molecules.* 2011. Vol. 16, № 4. P. 3089–3105.
65. Lin C.-W., Lerner R.A. Antibody libraries as tools to discover functional antibodies and receptor pleiotropism. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 8.

66. Anand T. et al. Phage display technique as a tool for diagnosis and antibody selection for coronaviruses. // *Curr. Microbiol.* 2021. Vol. 78, № 4. P. 1124–1134.
67. de Haard H.J. et al. A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 26. P. 18218–18230.
68. Lu D. et al. Selection of high affinity human neutralizing antibodies to VEGFR2 from a large antibody phage display library for antiangiogenesis therapy. // *Int. J. Cancer.* 2002. Vol. 97, № 3. P. 393–399.
69. McDermott D.F. et al. Atezolizumab, an Anti-Programmed Death-Ligand 1 Antibody, in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Long-Term Safety, Clinical Activity, and Immune Correlates From a Phase Ia Study. // *J. Clin. Oncol.* 2016. Vol. 34, № 8. P. 833–842.
70. Jespers L.S. et al. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. // *Biotechnology (NY)*. 1994. Vol. 12, № 9. P. 899–903.
71. Edwards B.M. et al. The remarkable flexibility of the human antibody repertoire; isolation of over one thousand different antibodies to a single protein, BLYS. // *J. Mol. Biol.* 2003. Vol. 334, № 1. P. 103–118.
72. Markham A. Guselkumab: first global approval. // *Drugs.* 2017. Vol. 77, № 13. P. 1487–1492.
73. Mohan D. et al. PhIP-Seq characterization of serum antibodies using oligonucleotide-encoded peptidomes. // *Nat. Protoc.* 2018. Vol. 13, № 9. P. 1958–1978.
74. Najar T.A. et al. Mapping protein binding sites and conformational epitopes using cysteine labeling and yeast surface display. // *Structure.* 2017. Vol. 25, № 3. P. 395–406.
75. Angkeow J.W. et al. Phage display of environmental protein toxins and virulence factors reveals the prevalence, persistence, and genetics of antibody responses. // *Immunity.* 2022. Vol. 55, № 6. P. 1051-1066.e4.
76. Abolhassani H. et al. Inherited IFNAR1 Deficiency in a Child with Both Critical COVID-19 Pneumonia and Multisystem Inflammatory Syndrome. // *J. Clin. Immunol.* 2022. Vol. 42, № 3. P. 471–483.

77. Guennoun A. et al. A Novel STK4 Mutation Impairs T Cell Immunity Through Dysregulation of Cytokine-Induced Adhesion and Chemotaxis Genes. // *J. Clin. Immunol.* 2021. Vol. 41, № 8. P. 1839–1852.
78. Shrock E.L., Shrock C.L., Elledge S.J. VirScan: High-throughput Profiling of Antiviral Antibody Epitopes. // *Bio Protoc.* 2022. Vol. 12, № 13.
79. Venkataraman T. et al. Analysis of antibody binding specificities in twin and SNP-genotyped cohorts reveals that antiviral antibody epitope selection is a heritable trait. // *Immunity.* 2022. Vol. 55, № 1. P. 174-184.e5.
80. Kammers K. et al. HIV Antibody Profiles in HIV Controllers and Persons With Treatment-Induced Viral Suppression. // *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 740395.
81. Shrock E.L. et al. Germline-encoded amino acid-binding motifs drive immunodominant public antibody responses. // *Science.* 2023. Vol. 380, № 6640. P. eadc9498.
82. Zhu J. et al. Protein interaction discovery using parallel analysis of translated ORFs (PLATO). // *Nat. Biotechnol.* 2013. Vol. 31, № 4. P. 331–334.
83. Larman H.B. et al. Discovery of protein interactions using parallel analysis of translated ORFs (PLATO). // *Nat. Protoc.* 2014. Vol. 9, № 1. P. 90–103.
84. Xu G.J. et al. Systematic autoantigen analysis identifies a distinct subtype of scleroderma with coincident cancer. // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016. Vol. 113, № 47. P. E7526–E7534.
85. Yaari G., Kleinstein S.H. Practical guidelines for B-cell receptor repertoire sequencing analysis. // *Genome Med.* 2015. Vol. 7. P. 121.
86. Wine Y. et al. Serology in the 21st century: the molecular-level analysis of the serum antibody repertoire. // *Curr. Opin. Immunol.* 2015. Vol. 35. P. 89–97.
87. Sinha N., Subedi N., Tel J. Integrating immunology and microfluidics for single immune cell analysis. // *Front. Immunol.* 2018. Vol. 9. P. 2373.
88. Jammes F.C., Maerkl S.J. How single-cell immunology is benefiting from microfluidic technologies. // *Microsyst. Nanoeng.* 2020. Vol. 6. P. 45.
89. Chen H. et al. BCR selection and affinity maturation in Peyer's patch germinal centres. // *Nature.* 2020. Vol. 582, № 7812. P. 421–425.

90. Banach B.B. et al. Paired heavy- and light-chain signatures contribute to potent SARS-CoV-2 neutralization in public antibody responses. // *Cell Rep.* 2021. Vol. 37, № 1. P. 109771.
91. McDaniel J.R. et al. Ultra-high-throughput sequencing of the immune receptor repertoire from millions of lymphocytes. // *Nat. Protoc.* 2016. Vol. 11, № 3. P. 429–442.
92. Wang B. et al. Functional interrogation and mining of natively paired human VH:VL antibody repertoires. // *Nat. Biotechnol.* 2018. Vol. 36, № 2. P. 152–155.
93. Zhou X. et al. Molecular deconvolution of the neutralizing antibodies induced by an inactivated SARS-CoV-2 virus vaccine. // *Protein Cell.* 2021. Vol. 12, № 10. P. 818–823.
94. Huang J. et al. Broad and potent HIV-1 neutralization by a human antibody that binds the gp41-gp120 interface. // *Nature.* 2014. Vol. 515, № 7525. P. 138–142.
95. Bonsignori M. et al. Inference of the HIV-1 VRC01 Antibody Lineage Unmutated Common Ancestor Reveals Alternative Pathways to Overcome a Key Glycan Barrier. // *Immunity.* 2018. Vol. 49, № 6. P. 1162-1174.e8.
96. Stiegler G. et al. A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2001. Vol. 17, № 18. P. 1757–1765.
97. Wu X. et al. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. // *Science.* 2010. Vol. 329, № 5993. P. 856–861.
98. Setliff I. et al. High-Throughput Mapping of B Cell Receptor Sequences to Antigen Specificity. // *Cell.* 2019. Vol. 179, № 7. P. 1636-1646.e15.
99. He B. et al. Rapid isolation and immune profiling of SARS-CoV-2 specific memory B cell in convalescent COVID-19 patients via LIBRA-seq. // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021. Vol. 6, № 1. P. 195.
100. Singh M. et al. High-throughput targeted long-read single cell sequencing reveals the clonal and transcriptional landscape of lymphocytes. // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. P. 3120.
101. Horns F., Dekker C.L., Quake S.R. Memory B Cell Activation, Broad Anti-influenza Antibodies, and Bystander Activation Revealed by Single-Cell Transcriptomics. // *Cell Rep.* 2020. Vol. 30, № 3. P. 905-913.e6.

102. Benedict R.H.B. et al. Cognitive impairment in multiple sclerosis: clinical management, MRI, and therapeutic avenues. // *Lancet Neurol.* 2020. Vol. 19, № 10. P. 860–871.
103. Yong H.Y.F., Yong V.W. Mechanism-based criteria to improve therapeutic outcomes in progressive multiple sclerosis. // *Nat. Rev. Neurol.* 2022. Vol. 18, № 1. P. 40–55.
104. Bjornevik K. et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. // *Science.* 2022. Vol. 375, № 6578. P. 296–301.
105. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. // *Nature.* 2011. Vol. 476, № 7359. P. 214–219.
106. Ghasemi N., Razavi S., Nikzad E. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. // *Cell J.* 2017. Vol. 19, № 1. P. 1–10.
107. Sospedra M., Martin R. Immunology of multiple sclerosis. // *Annu. Rev. Immunol.* 2005. Vol. 23. P. 683–747.
108. Absinta M. et al. A lymphocyte-microglia-astrocyte axis in chronic active multiple sclerosis. // *Nature.* 2021. Vol. 597, № 7878. P. 709–714.
109. Wekerle H., Hohlfeld R. Molecular mimicry in multiple sclerosis. // *N. Engl. J. Med.* 2003. Vol. 349, № 2. P. 185–186.
110. Lomakin Y. et al. Exposure to the Epstein-Barr Viral Antigen Latent Membrane Protein 1 Induces Myelin-Reactive Antibodies In Vivo. // *Front. Immunol.* 2017. Vol. 8. P. 777.
111. Ioannides Z.A. et al. Sustained Clinical Improvement in a Subset of Patients With Progressive Multiple Sclerosis Treated With Epstein-Barr Virus-Specific T Cell Therapy. // *Front. Neurol.* 2021. Vol. 12. P. 652811.
112. Radomir L. et al. The survival and function of IL-10-producing regulatory B cells are negatively controlled by SLAMF5. // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 1893.
113. Li R., Patterson K.R., Bar-Or A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. // *Nat. Immunol.* 2018. Vol. 19, № 7. P. 696–707.
114. Jelcic I. et al. Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis. // *Cell.* 2018. Vol. 175, № 1. P. 85-100.e23.

115. Stern J.N.H. et al. B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. // *Sci. Transl. Med.* 2014. Vol. 6, № 248. P. 248ra107.
116. Elliott C. et al. Functional identification of pathogenic autoantibody responses in patients with multiple sclerosis. // *Brain.* 2012. Vol. 135, № Pt 6. P. 1819–1833.
117. Mamedov A. et al. Protective Allele for Multiple Sclerosis HLA-DRB1*01:01 Provides Kinetic Discrimination of Myelin and Exogenous Antigenic Peptides. // *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. P. 3088.
118. Veroni C., Aloisi F. The CD8 T Cell-Epstein-Barr Virus-B Cell Triologue: A Central Issue in Multiple Sclerosis Pathogenesis. // *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 665718.
119. Margoni M. et al. Anti-CD20 therapies for multiple sclerosis: current status and future perspectives. // *J. Neurol.* 2022. Vol. 269, № 3. P. 1316–1334.
120. Pavlasova G., Mraz M. The regulation and function of CD20: an “enigma” of B-cell biology and targeted therapy. // *Haematologica.* 2020. Vol. 105, № 6. P. 1494–1506.
121. Lee D.S.W., Rojas O.L., Gommerman J.L. B cell depletion therapies in autoimmune disease: advances and mechanistic insights. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021. Vol. 20, № 3. P. 179–199.
122. Agius M.A. et al. Safety and tolerability of inebilizumab (MEDI-551), an anti-CD19 monoclonal antibody, in patients with relapsing forms of multiple sclerosis: Results from a phase 1 randomised, placebo-controlled, escalating intravenous and subcutaneous dose study. // *Mult. Scler.* 2019. Vol. 25, № 2. P. 235–245.
123. Owens T.D. et al. Phase 1 clinical trial evaluating safety, exposure and pharmacodynamics of BTK inhibitor tolebrutinib (PRN2246, SAR442168). // *Clin. Transl. Sci.* 2022. Vol. 15, № 2. P. 442–450.
124. Fraussen J. et al. B cell characterization and reactivity analysis in multiple sclerosis. // *Autoimmun. Rev.* 2009. Vol. 8, № 8. P. 654–658.
125. Tieck M.P. et al. Peripheral memory B cells in multiple sclerosis vs. double negative B cells in neuromyelitis optica spectrum disorder: disease driving B cell subsets during CNS inflammation. // *Front. Cell. Neurosci.* 2024. Vol. 18. P. 1337339.
126. Kemmerer C.L. et al. Differential effects of disease modifying drugs on peripheral blood B cell subsets: A cross sectional study in multiple sclerosis

patients treated with interferon- β , glatiramer acetate, dimethyl fumarate, fingolimod or natalizumab. // PLoS ONE. 2020. Vol. 15, № 7. P. e0235449.

127. Blumenfeld-Kan S., Staun-Ram E., Miller A. Fingolimod reduces CXCR4-mediated B cell migration and induces regulatory B cells-mediated anti-inflammatory immune repertoire. // *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2019. Vol. 34. P. 29–37.
128. Wu Q. et al. Siponimod enriches regulatory T and B lymphocytes in secondary progressive multiple sclerosis. // *JCI Insight.* 2020. Vol. 5, № 3.
129. Magliozzi R. et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. // *Brain.* 2007. Vol. 130, № Pt 4. P. 1089–1104.
130. Mitsdoerffer M., Peters A. Tertiary lymphoid organs in central nervous system autoimmunity. // *Front. Immunol.* 2016. Vol. 7. P. 451.
131. Lin L. et al. Tertiary lymphoid organs in cancer immunology: mechanisms and the new strategy for immunotherapy. // *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. P. 1398.
132. Bittner S. et al. The potential of serum neurofilament as biomarker for multiple sclerosis. // *Brain.* 2021. Vol. 144, № 10. P. 2954–2963.
133. Lanz T.V. et al. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. // *Nature.* 2022. Vol. 603, № 7900. P. 321–327.
134. Hohlfeld R. et al. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: autoreactive CD4⁺ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. // *Lancet Neurol.* 2016. Vol. 15, № 2. P. 198–209.
135. Kuhle J. et al. Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis. // *N. Engl. J. Med.* 2007. Vol. 356, № 4. P. 371–378.
136. Owens G.P. et al. Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. // *Ann. Neurol.* 2009. Vol. 65, № 6. P. 639–649.
137. Hegen H., Reindl M. Recent developments in MOG-IgG associated neurological disorders. // *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 2020. Vol. 13. P. 1756286420945135.
138. Levin M.C. et al. Autoantibodies to Non-myelin Antigens as Contributors to the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. // *J. Clin. Cell. Immunol.* 2013. Vol. 4.

139. Thomas O.G. et al. Cross-reactive EBNA1 immunity targets alpha-crystallin B and is associated with multiple sclerosis. // *Sci. Adv.* 2023. Vol. 9, № 20. P. eadg3032.
140. Yu X. et al. The role of antibodies in the pathogenesis of multiple sclerosis. // *Front. Neurol.* 2020. Vol. 11. P. 533388.
141. Höftberger R. et al. Pathogenic autoantibodies in multiple sclerosis - from a simple idea to a complex concept. // *Nat. Rev. Neurol.* 2022. Vol. 18, № 11. P. 681–688.
142. Rodríguez-Pinto D. B cells as antigen presenting cells. // *Cell. Immunol.* 2005. Vol. 238, № 2. P. 67–75.
143. Jiang W. et al. Synergy between B cell receptor/antigen uptake and MHCII peptide editing relies on HLA-DO tuning. // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 13877.
144. Molnarfi N. et al. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. // *J. Exp. Med.* 2013. Vol. 210, № 13. P. 2921–2937.
145. Genç K., Dona D.L., Reder A.T. Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy. // *J. Clin. Invest.* 1997. Vol. 99, № 11. P. 2664–2671.
146. Bodhankar S. et al. PD-1 Interaction with PD-L1 but not PD-L2 on B-cells Mediates Protective Effects of Estrogen against EAE. // *J. Clin. Cell. Immunol.* 2013. Vol. 4, № 3. P. 143.
147. Duddy M. et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. // *J. Immunol.* 2007. Vol. 178, № 10. P. 6092–6099.
148. Bar-Or A. et al. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? // *Ann. Neurol.* 2010. Vol. 67, № 4. P. 452–461.
149. Li R. et al. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. // *Sci. Transl. Med.* 2015. Vol. 7, № 310. P. 310ra166.
150. Li R., Bar-Or A. The multiple roles of B cells in multiple sclerosis and their implications in multiple sclerosis therapies. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2019. Vol. 9, № 4.

151. Serada S. et al. IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. Vol. 105, № 26. P. 9041–9046.
152. Mehta A.K., Gracias D.T., Croft M. TNF activity and T cells. // *Cytokine*. 2018. Vol. 101. P. 14–18.
153. El-Salem K. et al. Serum Tumor Necrosis Factor-Alpha Levels Correlate with Cognitive Function Scales Scores in Multiple Sclerosis Patients. // *Mult. Scler. Relat. Disord*. 2021. Vol. 47. P. 102621.
154. Rossi S. et al. Tumor necrosis factor is elevated in progressive multiple sclerosis and causes excitotoxic neurodegeneration. // *Mult. Scler*. 2014. Vol. 20, № 3. P. 304–312.
155. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. // *Neurology*. 1999. Vol. 53, № 3. P. 457–465.
156. Lehmann-Horn K. et al. Anti-CD20 B-cell depletion enhances monocyte reactivity in neuroimmunological disorders. // *J. Neuroinflammation*. 2011. Vol. 8. P. 146.
157. Kruglov A.A. et al. Pathogenic and protective functions of TNF in neuroinflammation are defined by its expression in T lymphocytes and myeloid cells. // *J. Immunol*. 2011. Vol. 187, № 11. P. 5660–5670.
158. Bjarnadóttir K. et al. B cell-derived transforming growth factor- β 1 expression limits the induction phase of autoimmune neuroinflammation. // *Sci. Rep*. 2016. Vol. 6. P. 34594.
159. Shen P. et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. // *Nature*. 2014. Vol. 507, № 7492. P. 366–370.
160. Michée-Cospolite M. et al. Molecular Mechanisms Driving IL-10- Producing B Cells Functions: STAT3 and c-MAF as Underestimated Central Key Regulators? // *Front. Immunol*. 2022. Vol. 13. P. 818814.
161. Levy Y., Brouet J.C. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. // *J. Clin. Invest*. 1994. Vol. 93, № 1. P. 424–428.
162. Tedder T.F. B10 cells: a functionally defined regulatory B cell subset. // *J. Immunol*. 2015. Vol. 194, № 4. P. 1395–1401.

163. Iwata Y. et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. // *Blood*. 2011. Vol. 117, № 2. P. 530–541.
164. Rojas O.L. et al. Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. // *Cell*. 2019. Vol. 176, № 3. P. 610-624.e18.
165. Katz S.I., Parker D., Turk J.L. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. // *Nature*. 1974. Vol. 251, № 5475. P. 550–551.
166. Wolf S.D. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. // *J. Exp. Med.* 1996. Vol. 184, № 6. P. 2271–2278.
167. Mauri C. et al. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. // *J. Exp. Med.* 2003. Vol. 197, № 4. P. 489–501.
168. Mangan N.E. et al. Helminth-modified pulmonary immune response protects mice from allergen-induced airway hyperresponsiveness. // *J. Immunol.* 2006. Vol. 176, № 1. P. 138–147.
169. Flores-Borja F. et al. CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. // *Sci. Transl. Med.* 2013. Vol. 5, № 173. P. 173ra23.
170. Sun F. et al. Interleukin-10 producing-B cells and their association with responsiveness to rituximab in myasthenia gravis. // *Muscle Nerve*. 2014. Vol. 49, № 4. P. 487–494.
171. Knippenberg S. et al. Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naïve/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. // *J. Neuroimmunol.* 2011. Vol. 239, № 1–2. P. 80–86.
172. Ma S. et al. B regulatory cells in allergy. // *Immunol. Rev.* 2021. Vol. 299, № 1. P. 10–30.
173. Blair P.A. et al. CD19⁽⁺⁾CD24^(hi)CD38^(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. // *Immunity*. 2010. Vol. 32, № 1. P. 129–140.
174. Cencioni M.T. et al. Defective CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} transitional B-cell function in patients with relapsing-remitting MS. // *Mult. Scler.* 2021. Vol. 27, № 8. P. 1187–1197.

175. Siewe B. et al. Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8⁺ T cell function in vitro. // *J. Leukoc. Biol.* 2013. Vol. 93, № 5. P. 811–818.
176. van de Veen W. et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013. Vol. 131, № 4. P. 1204–1212.
177. Matsumoto M. et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. // *Immunity.* 2014. Vol. 41, № 6. P. 1040–1051.
178. Hasan M.M. et al. Implication of TIGIT⁺ human memory B cells in immune regulation. // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 1534.
179. Noh J. et al. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) Regulatory B Cell (Breg). // *Immune Netw.* 2010. Vol. 10, № 6. P. 247–249.
180. Lindner S. et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. // *Cancer Res.* 2013. Vol. 73, № 8. P. 2468–2479.
181. Marie-Cardine A. et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. // *Clin. Immunol.* 2008. Vol. 127, № 1. P. 14–25.
182. Fillatreau S. et al. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. // *Nat. Immunol.* 2002. Vol. 3, № 10. P. 944–950.
183. Matsushita T. et al. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. // *J. Clin. Invest.* 2008. Vol. 118, № 10. P. 3420–3430.
184. Pennati A. et al. Regulatory B Cells Induce Formation of IL-10-Expressing T Cells in Mice with Autoimmune Neuroinflammation. // *J. Neurosci.* 2016. Vol. 36, № 50. P. 12598–12610.
185. Huarte E. et al. Regulatory T cell dysfunction acquiesces to BTLA⁺ regulatory B cells subsequent to oral intervention in experimental autoimmune encephalomyelitis. // *J. Immunol.* 2016. Vol. 196, № 12. P. 5036–5046.
186. Guo S. et al. Reduced peripheral blood regulatory B cell levels are not associated with the Expanded Disability Status Scale score in multiple sclerosis. // *J. Int. Med. Res.* 2018. Vol. 46, № 9. P. 3970–3978.

187. Schaefer L.M. et al. Impairment and restrictions in possibly benign multiple sclerosis. // *Brain Behav.* 2019. Vol. 9, № 4. P. e01259.
188. Glass M.C. et al. Human IL-10-producing B cells have diverse states that are induced from multiple B cell subsets. // *Cell Rep.* 2022. Vol. 39, № 3. P. 110728.
189. Staun-Ram E., Miller A. Effector and regulatory B cells in Multiple Sclerosis. // *Clin. Immunol.* 2017. Vol. 184. P. 11–25.
190. Kinnunen T. et al. Specific peripheral B cell tolerance defects in patients with multiple sclerosis. // *J. Clin. Invest.* 2013. Vol. 123, № 6. P. 2737–2741.
191. Okada Y. et al. Signaling via toll-like receptor 4 and CD40 in B cells plays a regulatory role in the pathogenesis of multiple sclerosis through interleukin-10 production. // *J. Autoimmun.* 2018. Vol. 88. P. 103–113.
192. Kurtzke J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). // *Neurology.* 1983. Vol. 33, № 11. P. 1444–1452.
193. Larman H.B. et al. Autoantigen discovery with a synthetic human peptidome. // *Nat. Biotechnol.* 2011. Vol. 29, № 6. P. 535–541.
194. Larman H.B. et al. PhIP-Seq characterization of autoantibodies from patients with multiple sclerosis, type 1 diabetes and rheumatoid arthritis. // *J. Autoimmun.* 2013. Vol. 43. P. 1–9.
195. Wang D. et al. AAgAtlas 1.0: a human autoantigen database. // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, № D1. P. D769–D776.
196. Terekhov S.S. et al. Liquid drop of DNA libraries reveals total genome information. // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020. Vol. 117, № 44. P. 27300–27306.
197. Stepanov A.V. et al. Autocrine-based selection of ligands for personalized CAR-T therapy of lymphoma. // *Sci. Adv.* 2018. Vol. 4, № 11. P. eaau4580.
198. Ishina I.A. et al. Exhaustive Search of the Receptor Ligands by the CyCLOPS (Cytometry Cell-Labeling Operable Phage Screening) Technique. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 17.
199. Teng I.-T. et al. Molecular probes of spike ectodomain and its subdomains for SARS-CoV-2 variants, Alpha through Omicron. // *PLoS ONE.* 2022. Vol. 17, № 5. P. e0268767.

200. Zhou T. et al. Structure-Based Design with Tag-Based Purification and In-Process Biotinylation Enable Streamlined Development of SARS-CoV-2 Spike Molecular Probes. // *Cell Rep.* 2020. Vol. 33, № 4. P. 108322.
201. Lomakin Y.A. et al. Two-dimensional high-throughput on-cell screening of immunoglobulins against broad antigen repertoires. // *Commun. Biol.* 2024. Vol. 7, № 1. P. 842.
202. Mina M.J. et al. Measles virus infection diminishes preexisting antibodies that offer protection from other pathogens. // *Science.* 2019. Vol. 366, № 6465. P. 599–606.
203. Gabibov A.G. et al. Combinatorial antibody library from multiple sclerosis patients reveals antibodies that cross-react with myelin basic protein and EBV antigen. // *FASEB J.* 2011. Vol. 25, № 12. P. 4211–4221.
204. Ovchinnikova L.A. et al. The Level of Anti-Viral Antigen-Specific Antibodies to EBNA-1 in the Serum of MS Patients Does not Depend on the Severity of the Disease. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2024. Vol. 515, № 1. P. 48–51.
205. Morsy H. et al. Expanding SPTAN1 monoallelic variant associated disorders: From epileptic encephalopathy to pure spastic paraplegia and ataxia. // *Genet. Med.* 2023. Vol. 25, № 1. P. 76–89.
206. Lawlor M.W. et al. Antibodies to L-periaxin in sera of patients with peripheral neuropathy produce experimental sensory nerve conduction deficits. // *J. Neurochem.* 2002. Vol. 83, № 3. P. 592–600.
207. Peng M. et al. Protein tyrosine kinase 6 regulates mammary gland tumorigenesis in mouse models. // *Oncogenesis.* 2013. Vol. 2. P. e81.
208. Vietzen H. et al. Ineffective control of Epstein-Barr-virus-induced autoimmunity increases the risk for multiple sclerosis. // *Cell.* 2023. Vol. 186, № 26. P. 5705-5718.e13.
209. Lünemann J.D. et al. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. // *J. Exp. Med.* 2008. Vol. 205, № 8. P. 1763–1773.
210. Choi J.K. et al. IL-27-producing B-1a cells suppress neuroinflammation and CNS autoimmune diseases. // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2021. Vol. 118, № 47.
211. Zhu H.Q. et al. Impaired function of CD19(+) CD24(hi) CD38(hi) regulatory B cells in patients with pemphigus. // *Br. J. Dermatol.* 2015. Vol. 172, № 1. P. 101–110.

212. Cherukuri A. et al. Reduced human transitional B cell T1/T2 ratio is associated with subsequent deterioration in renal allograft function. // *Kidney Int.* 2017. Vol. 91, № 1. P. 183–195.
213. Burton H., Dorling A. Transitional B cell subsets-a convincing predictive biomarker for allograft loss? // *Kidney Int.* 2017. Vol. 91, № 1. P. 18–20.
214. Mitsunaga E.M., Snyder M.P. Deep characterization of the human antibody response to natural infection using longitudinal immune repertoire sequencing. // *Mol. Cell. Proteomics.* 2020. Vol. 19, № 2. P. 278–293.
215. Lomakin Y.A. et al. Multiple Sclerosis Is Associated with Immunoglobulin Germline Gene Variation of Transitional B Cells. // *Acta Naturae.* 2022. Vol. 14, № 4. P. 84–93.
216. Owens G.P. et al. VH4 gene segments dominate the intrathecal humoral immune response in multiple sclerosis. // *J. Immunol.* 2007. Vol. 179, № 9. P. 6343–6351.
217. von Büdingen H.-C. et al. B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis. // *J. Clin. Invest.* 2012. Vol. 122, № 12. P. 4533–4543.
218. Klein U., Rajewsky K., Küppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. // *J. Exp. Med.* 1998. Vol. 188, № 9. P. 1679–1689.
219. Niino M. et al. Memory and naïve B-cell subsets in patients with multiple sclerosis. // *Neurosci. Lett.* 2009. Vol. 464, № 1. P. 74–78.
220. Ciocca M. et al. Evolution of human memory B cells from childhood to old age. // *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 690534.
221. Lomakin Y.A. et al. Deconvolution of B cell receptor repertoire in multiple sclerosis patients revealed a delay in tBreg maturation. // *Front. Immunol.* 2022. Vol. 13. P. 803229.

9. Приложения

Приложение 1. Таблица 1. Клинические характеристики пациентов с РС и здоровых доноров, принявших участие в исследовании иммунного ответа на потенциальные мишени аутоиммунитета.

Клиническая группа	Форма РС	Возраст, годы	Пол	EDSS	Лечение	Длительность заболевания, годы
РС	Стабильная	33	муж	6	IFN β 1b (1-2; 8-12)	12
РС	Стабильная	32	муж	6	IFN β 1b (1*; 9-11)	11
РС	Стабильная	39	жен	8.5	Без лечения	3
РС	Стабильная	29	жен	8	GA (3-5), IVIG (3), IFN β 1b (1-2)	12
РС	Стабильная	22	жен	4.5	Без лечения	1
РС	Стабильная	23	муж	5	Без лечения	3
РС	Стабильная	37	жен	5	IFN β 1b (2-4), GA (1-2)	5
РС	Стабильная	46	муж	6	IFN β 1b (1)	2
РС	Стабильная	44	жен	4.5	Без лечения	2
РС	Стабильная	24	муж	2.5	Без лечения	2
РС	Стабильная	44	муж	8.5	IFN β 1b (2-3)	13
РС	Активная	43	жен	1.5	Без лечения	12
РС	Активная	36	муж	2.5	Без лечения	14
РС	Активная	58	жен	3.5	Без лечения	30
РС	Активная	56	жен	2.5	Без лечения	11
РС	Активная	61	жен	3	Без лечения	26
Здоровый	-	27	жен	-	-	-
Здоровый	-	22	жен	-	-	-
Здоровый	-	25	жен	-	-	-
Здоровый	-	42	жен	-	-	-
Здоровый	-	24	жен	-	-	-
Здоровый	-	47	муж	-	-	-
Здоровый	-	51	жен	-	-	-
Здоровый	-	40	жен	-	-	-
Здоровый	-	24	жен	-	-	-
Здоровый	-	35	муж	-	-	-

Клиническая группа	Форма РС	Возраст, годы	Пол	EDSS	Лечение	Длительность заболевания, годы
Здоровый	-	36	муж	-	-	-

EDSS – Расширенная шкала нарушений жизнедеятельности Куртцке [192]; IFN β 1b – интерферон бета-1b; GA – глатирамер ацетат; IVIG – внутривенный иммуноглобулин.

Приложение 2. Таблица 2. Клинические характеристики пациентов с РС, боковым амиотрофическим склерозом, заболеванием спектра оптиконевромиелита и здоровых доноров, принявших участие в независимом исследовании иммунного ответа на потенциальные мишени аутоиммунитета.

Клиническая группа	Форма РС	Возраст, годы	Пол	EDSS	Лечение	Длительность заболевания, годы
РС	Стабильная	39	жен	2	ГКС (1*)	1
РС	Стабильная	23	жен	2	Без лечения	1
РС	Стабильная	30	жен	2	ГКС (1*)	4
РС	Стабильная	27	муж	3.5	IFN β 1a (1-2)	2
РС	Стабильная	38	муж	8	IFN β 1a (4-9), GA (9-10), Ocrelizumab (1-2)	11
РС	Стабильная	38	муж	6.5	IFN β 1b (1-4)	7
РС	Стабильная	40	жен	3.5	IFN β 1a (1-5)	9
РС	Стабильная	32	жен	6	Fingolimod (9-10), Natalizumab (4-6; 7-8), Alemtuzumab (2; 3)	13
РС	Стабильная	36	муж	3	Без лечения	5
РС	Стабильная	23	жен	2	IFN β 1b (1-2)	4
РС	Стабильная	46	жен	4.5	IFN β 1a (1-2)	8
РС	Стабильная	32	жен	6.5	Без лечения	2
РС	Стабильная	28	жен	6.5	IFN β 1b (1-2)	5
РС	Стабильная	34	жен	3.5	GA (1-10)	14
РС	Стабильная	36	жен	3.0	Без лечения	1
РС	Стабильная	32	жен	3.0	IFN β 1b (1-2)	3
РС	Стабильная	51	жен	4.0	Без лечения	3
РС	Стабильная	48	жен	2.5	Без лечения	2
РС	Стабильная	30	муж	6.0	IFN β 1b (3)	5
РС	Стабильная	20	жен	4.0	Без лечения	1
РС	Активная	33	муж	1.5	Без лечения	6
РС	Активная	40	жен	3.5	ГКС (1*)	17
РС	Активная	52	муж	4	ГКС (1*)	14
РС	Активная	41	жен	1.5	ГКС (1*)	10
РС	Активная	56	жен	3	Без лечения	27
РС	Активная	45	муж	4	GA (9-14)	17

Клиническая группа	Форма РС	Возраст, годы	Пол	EDSS	Лечение	Длительность заболевания, годы
РС	Активная	43	жен	2.5	Без лечения	19
РС	Активная	57	жен	4.5	Teriflunomide (1-3)	15
БАС	-	48	жен	N/A	антиоксидантная терапия	2
БАС	-	59	муж	N/A	антиоксидантная терапия	2
БАС	-	60	муж	-	антиоксидантная терапия	4
БАС	-	40	жен	-	антиоксидантная терапия	4
БАС	-	54	жен	-	антиоксидантная терапия	2
БАС	-	65	жен	-	антиоксидантная терапия	2
БАС	-	51	муж	-	антиоксидантная терапия	2
БАС	-	45	жен	-	антиоксидантная терапия	4
БАС	-	65	жен	-	антиоксидантная терапия	1
БАС	-	47	жен	-	антиоксидантная терапия	1
БАС	-	65	жен	-	антиоксидантная терапия	2
БАС	-	50	муж	-	антиоксидантная терапия	1
БАС	-	63	муж	-	антиоксидантная терапия	2
БАС	-	65	жен	-	антиоксидантная терапия	1
ЗСОИМ	-	70	жен	-	Azathioprine	18
ЗСОИМ	-	46	жен	-	Rituximab	2
ЗСОИМ	-	64	жен	-	Rituximab	1,5
ЗСОИМ	-	29	жен	-	Azathioprine	9
ЗСОИМ	-	68	жен	-	Azathioprine, Rituximab	5
Здоровый	-	41	жен	-	-	-
Здоровый	-	35	муж	-	-	-
Здоровый	-	45	жен	-	-	-
Здоровый	-	22	муж	-	-	-
Здоровый	-	42	жен	-	-	-
Здоровый	-	40	жен	-	-	-
Здоровый	-	39	жен	-	-	-
Здоровый	-	38	муж	-	-	-
Здоровый	-	29	жен	-	-	-

Клиническая группа	Форма РС	Возраст, годы	Пол	EDSS	Лечение	Длительность заболевания, годы
Здоровый	-	53	муж	-	-	-
Здоровый	-	37	муж	-	-	-
Здоровый	-	34	муж	-	-	-
Здоровый	-	41	муж	-	-	-
Здоровый	-	40	жен	-	-	-
Здоровый	-	37	жен	-	-	-
Здоровый	-	33	муж	-	-	-
Здоровый	-	35	жен	-	-	-
Здоровый	-	45	муж	-	-	-
Здоровый	-	58	жен	-	-	-
Здоровый	-	60	муж	-	-	-
Здоровый	-	55	жен	-	-	-
Здоровый	-	33	муж	-	-	-

БАС – боковой амиотрофический склероз; ЗСОНМ – заболевания спектра оптиконевромиелита. ГКС – глюкокортикостероиды; EDSS – Расширенная шкала нарушений жизнедеятельности Куртцке [192]; IFN β 1b – интерферон бета-1b; GA – глатирамер ацетат; IVIG – внутривенный иммуноглобулин.

Приложение 3. Таблица 3. Клинические характеристики пациентов с РС и здоровых доноров, принявших участие в исследовании В-клеточного репертуара и CD27 фенотипическом анализе.

Клиническая группа	Форма РС	Возраст, годы	Пол	EDSS	Лечение	Длительность заболевания, годы	Анализ репертуаров BCR	CD27 ⁺ фенотипический анализ
РС	Стабильная	56	жен	2.5	Без лечения	11	+	-
РС	Стабильная	61	жен	3	Без лечения	26	+	-
РС	Стабильная	43	жен	1.5	Без лечения	12	+	-
РС	Стабильная	36	муж	2.5	Без лечения	14	+	-
РС	Стабильная	46	жен	2	Без лечения	27	-	+
РС	Стабильная	43	жен	2.5	Без лечения	27	-	+
РС	Стабильная	43	муж	4.0	Без лечения	18	-	+
РС	Стабильная	58	жен	3.5	Без лечения	30	-	+
РС	Стабильная	70	жен	4.0	Без лечения	30	-	+
РС	Активная	33	муж	6	IFN β 1b (2006-2011; 2014-2017).	12	+	-
РС	Активная	23	муж	5	Без лечения	3	+	-
РС	Активная	37	жен	5	IFN β 1b (2014-2016). GA (2016-2017).	5	+	-
РС	Активная	29	жен	8	GA (2012-2014). IVIG (2014). IFN β 1b (2015-2016).	12	+	-
РС	Активная	39	жен	8.5	Без лечения	8	+	-
РС	Активная	22	жен	4.5	Без лечения	1	-	+
РС	Активная	46	муж	6	IFN β 1b (2019)	2	-	+
РС	Активная	44	муж	8.5	IFN β 1b (2014-2015)	13	-	+
РС	Активная	24	муж	4.0	Без лечения	2	-	+
РС	Активная	44	жен	4.5	Без лечения	2	-	+
Здоровый	-	24	жен	-	-	-	+	-
Здоровый	-	40	жен	-	-	-	+	-
Здоровый	-	36	муж	-	-	-	+	-
Здоровый	-	27	жен	-	-	-	+	-
Здоровый	-	42	жен	-	-	-	+	-
Здоровый	-	25	жен	-	-	-	+	-

Клиническая группа	Форма РС	Возраст, годы	Пол	EDSS	Лечение	Длительность заболевания, годы	Анализ репертуаров BCR	CD27 ⁺ фенотипический анализ
Здоровый	-	39	муж	-	-	-	-	+
Здоровый	-	42	жен	-	-	-	-	+
Здоровый	-	35	жен	-	-	-	-	+
Здоровый	-	51	жен	-	-	-	-	+
Здоровый	-	24	жен	-	-	-	-	+
Здоровый	-	35	муж	-	-	-	-	+
Здоровый	-	68	жен	-	-	-	-	+
Здоровый	-	47	муж	-	-	-	-	+
Здоровый	-	24	жен	-	-	-	-	+
Здоровый	-	34	муж	-	-	-	-	+

EDSS – Расширенная шкала нарушений жизнедеятельности Куртцке [192]; IFN β 1b – интерферон бета-1b; GA – глатирамер ацетат; IVIG – внутривенный иммуноглобулин.

Приложение 4. Таблица 4. Клинические характеристики вакцинированных и невакцинированных доноров для изучения функциональности фаговой библиотеки RBD.

Донор	Возраст, годы	Пол	Статус	Дни после появления симптомов / полной вакцинации	Титр антител (IgG) к RBD, единица связывания антител на мл (BAU / мл)
Vir-1	35	муж	Переболел COVID-19 (лёгкое течение)	28	422
Vir-2	30	муж	Переболел COVID-19 (лёгкое течение)	30	160
Vac-1	27	муж	Вакцинирован Гам-КОВИД-Вак	6	46
Vac-2	24	муж	Вакцинирован Гам-КОВИД-Вак	6	155
Vac-3	32	муж	Вакцинирован Гам-КОВИД-Вак	7	316
Здоровый	40	жен	Не болел, не вакцинировался	-	0

Приложение 5. Таблица 5. Список праймеров, использованных для секвенирования индивидуальных репертуаров VH, Vk и Vl генов иммуноглобулинов.

№	Название	Нуклеотидная последовательность	
1	VH1aSal	TAAGGCCCGAGCCGGCCCAGG TKCAGCTGGTGCAGTCTGG	for VH
2	VH1bSal	TAAGGCCCGAGCCGGCCCAGG TCCAGCTTGTGCAGTCTGG	for VH
3	VH1cSal	TAAGGCCCGAGCCGGCCSAGG TCCAGCTGGTACAGTCTGG	for VH
4	VH1dSal	TAAGGCCCGAGCCGGCCCARA TGCAGCTGGTGCAGTCTGG	for VH
5	VH2aSal	TAAGGCCCGAGCCGGCCCAGA TCACCTTGAAGGAGTCTGG	for VH
6	VH2bSal	TAAGGCCCGAGCCGGCCCAGG TCACCTTGARGGAGTCTGG	for VH
7	VH3aSal	TAAGGCCCGAGCCGGCCGARG TGCAGCTGGTGGAGTCTGG	for VH
8	VH3bSal	TAAGGCCCGAGCCGGCCCAGG TGCAGCTGGTGGAGTCTGG	for VH
9	VH3cSal	TAAGGCCCGAGCCGGCCGAGG TGCAGCTGTTGGAGTCTGG	for VH
10	VH3dSal	TAAGGCCCGAGCCGGCCGAGG TGCAGCTGGTGGAGTCTGG	for VH
11	VH4aSal	TAAGGCCCGAGCCGGCCCAGS TGCAGCTGCAGGAGTCSGG	for VH
12	VH4bSal	TAAGGCCCGAGCCGGCCCAGG TGCAGCTACAGCAGTGGGG	for VH
13	VH5aSal	TAAGGCCCGAGCCGGCCGARG TGCAGCTGGTGCAGTCTGG	for VH
14	VH6aSal	TAAGGCCCGAGCCGGCCCAGG TACAGCTGCAGCAGTCAGG	for VH
15	VH7aSal	TAAGGCCCGAGCCGGCCCAGG TSCAGCTGGTGCAATCTGG	for VH
16	JH1-2Bss	GCCACCGCCGCCGCCTGAGCTGA GGAGACRGTGACCAGGGTGCC	rev VH
17	JH3Bss	GCCACCGCCGCCGCCTGAGCTG ARGAGACGGTGACCATTGTCCC	rev VH
18	JH4-5Bss	GCCACCGCCGCCGCCTGAGCTG AGGAGACGGTGACCAGGGTTCC	rev VH
19	JH6Bss	GCCACCGCCGCCGCCTGAGCTG AGGAGACGGTGACCGTGGTCCC	rev VH
20	Vk1aXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCRA CATCCAGATGACCCAGTCTCC	for Vk

21	Vk1bXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCGM CATCCAGTTGACCCAGTCTCC	for Vk
22	Vk1cXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCGCC ATCCRGATGACCCAGTCTCC	for Vk
23	Vk1dXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCG TCATCTGGATGACCCAGTCTCC	for Vk
24	Vk2aXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCG ATATTGTGATGACCCAGACTCC	for Vk
25	Vk2bXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCG ATRTTGTGATGACTCAGTCTCC	for Vk
26	Vk3aXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCG AAATTGTGTTGACRCAGTCTCC	for Vk
27	Vk3bXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCG AAATAGTGATGACGCAGTCTCC	for Vk
28	Vk3cXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCG AAATTGTAATGACACAGTCTCC	for Vk
29	Vk4aXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCG ACATCGTGATGACCCAGTCTCC	for Vk
30	Vk5aXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCG AAACGACACTCACGCAGTCTCC	for Vk
31	Vk6aXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCG AAATTGTGCTGACTCAGTCTCC	for Vk
32	Vk6bXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCG ATGTTGTGATGACACAGTCTCC	for Vk
33	VL1aXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCC AGTCTGTGCTGACTCAGCCRCC	for Vl
34	VL1bXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCC AGTCTGTGYTGACGCAGCCRCC	for Vl
35	VL1cXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCC AGTCTGTGCTGACGCAGCCRCC	for Vl
36	VL2Xba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCC AGTCTGCCCTGACTCAGCCT	for Vl
37	VL3aXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCTCC TATGWGCTGACTCAGCCACC	for Vl
38	VL3bXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCTCC TATGAGCTGACACAGCYACC	for Vl
39	VL3cXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCTCT TCTGAGCTGACTCAGGACCC	for Vl
40	VL3dXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCTCC TATGAGCTGATGCAGCCACC	for Vl
41	VL4aXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCCAG CYTGTGCTGACTCAATCRYC	for Vl
42	VL4bXba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCCTG CCTGTGCTGACTCAGCCCCC	for Vl

43	VL5Xba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCCAG SCTGTGCTGACTCAGCCRBC	for VI
44	VL6Xba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCAAT TTTATGCTGACTCAGCCCCAC	for VI
45	VL7Xba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCCAG RCTGTGGTGACTCAGGAGCC	for VI
46	VL8Xba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCCAG ACTGTGGTGACCCAGGAGCC	for VI
47	VL4/9Xba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCCW GCCTGTGCTGACTCAGCCACC	for VI
48	VL10Xba	TCAGGCGGCGGCGGTGGCCAGG CAGGGCTGACTCAGCCACC	for VI
49	VK1-4Hind	GCCAGGCCCCCGAGGCCACG TTTGATHGCCASYTTGGTCCC	rev VK
50	VK5Hind	GCCAGGCCCCCGAGGCCACG TTAATCTCCAGTCGTGTCCC	rev VK
51	VL1Hind	GCCAGGCCCCCGAGGCCACC TAGGACGGTGACCTTGGTCCC	Rev VI
52	VL2-3Hind	GCCAGGCCCCCGAGGCCACC TAGGACGGTCAGCTTGGTCCC	Rev VI
53	VL7Hind	GCCAGGCCCCCGAGGCCACC GAGGACGGTCAGCTGGGTCCC	Rev VI