

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*

**Ишина Ирина Андреевна**

*Аллель-специфическая презентация антигенов на HLA-II при аутоиммунных  
ревматических заболеваниях*

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

**Научный руководитель:**  
кандидат биологических наук  
Захарова Мария Юрьевна

Москва 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

1	Введение.....	7
1.1	Актуальность темы исследования.....	7
1.2	Цель работы и основные задачи исследования.....	8
1.3	Научная новизна и научно-практическая значимость работы.....	9
1.4	Основные положения, выносимые на защиту.....	10
1.5	Степень достоверности и апробация работы.....	10
2	Обзор литературы.....	13
2.1	Роль молекул HLA-II в развитии аутоиммунитета.....	13
2.2	Процесс презентации антигенных пептидов молекулами HLA-II...	15
2.3	Роль неклассических молекул HLA в формировании антигенного репертуара HLA-II.....	17
2.4	Презентация низкоаффинных аутоантигенов на HLA-II.....	18
2.5	Особенности взаимодействия между аутореактивными TCR и аутоантигенными комплексами рМНС.....	22
2.6	Влияние посттрансляционных модификаций аутоантигенов на узнавание аутореактивными Т-клетками.....	24
2.7	Влияние провоспалительного окружения на возникновение аутореактивных CD4 <sup>+</sup> Т-клеток.....	27
2.8	Молекулярная мимикрия между аутоантигенными и экзогенными пептидами	29
2.9	Роль протективных аллелей в развитии аутоиммунитета.....	32
2.10	Иммунология РА.....	36
2.11	Антигены, участвующие в патогенезе РА.....	39
2.12	Иммунология СКВ.....	42

3	Материалы и методы .....	45
3.1	Пациенты и здоровые доноры .....	45
3.2	Химические реактивы, буферные растворы и сопутствующие материалы	46
3.3	Методы работы с клетками бактерий .....	48
3.3.1	Трансформация клеток <i>E.coli</i> методом теплового шока.....	48
3.3.2	Полимеразная цепная реакция для клональной селекции .....	49
3.3.3	Ночная культура.....	49
3.3.4	Экспрессия и очистка отдельных фаговых частиц и аутоантигенной фаговой библиотеки.....	50
3.3.5	Отбор антигенных пептидов, связывающих молекулы HLA-DR, методом фагового дисплея .....	51
3.3.6	Связывание антигенных пептидов, представленных на бактериофагах, с HLA-DR, экспрессированным на дендритных клетках .....	52
3.3.7	Оценка связывания аутоантигенных пептидов с HLA-DR с помощью NetMHCIIpan .....	52
3.4	Методы работы с нуклеиновыми кислотами .....	53
3.4.1	Аmplификация фрагментов ДНК методом ПЦР .....	53
3.4.2	Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции.....	53
3.4.3	Лигирование .....	54
3.4.4	Выделение плазмидной ДНК.....	54
3.4.5	Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	54
3.4.6	Электрофорез ДНК в полиакриламидном геле.....	55
3.4.7	HLA-типирование .....	55

3.4.8	Высокопроизводительное секвенирование ДНК бактериофагов и анализ данных.....	56
3.5	Хроматографические методы работы с белками.....	56
3.5.1	Выделение и очистка HLA-DR (клеточная линия S2) .....	57
3.5.2	Выделение и очистка HLA-DM/HLA-DR (клеточная линия НЕК293F) .....	57
3.5.3	Обработка тромбином для диссоциации CLIP .....	58
3.5.4	Выделение и очистка пептидов, слитых с тиоредоксином (Trx) .	58
3.6	Аналитические методы работы с белками .....	59
3.6.1	Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле .....	59
3.6.2	Иммуноферментный анализ.....	60
3.6.3	Оценка связывания слитого с тиоредоксином пептида с HLA-II	61
3.7	Работа с культурами эукариотических клеток.....	62
3.7.1	Клеточная культура адгезионных линий .....	62
3.7.2	Клеточная культура суспензионных линий .....	62
3.7.3	Трансфекция для получения лентивирусных частиц .....	63
3.7.4	Выделение PBMC, моноцитов и CD4 <sup>+</sup> Т-клеток .....	64
3.7.5	Трансдукция эукариотических клеток лентивирусами.....	64
3.7.6	Получение искусственных внеклеточных везикул.....	65
3.7.7	Проточная цитофлуорометрия.....	66
3.7.8	Идентификация аутоантигенных пептидов, представленных на молекулах HLA-DR дендритных клеток человека, с помощью метода жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии .....	67
3.7.9	Внутриклеточное окрашивание на провоспалительные цитокины IFN- $\gamma$ и IL-268	

3.7.10	Стимуляция CD4 <sup>+</sup> TCR <sup>+</sup> Jurkat 76 TPR везикулами .....	69
3.7.11	Антиген-специфическая экспансия CD4 <sup>+</sup> Т-клеток .....	69
3.7.12	Секвенирование Т-клеточных рецепторов .....	70
3.7.13	Конфокальная микроскопия.....	70
3.7.14	Статистический анализ.....	71
4	Результаты и их обсуждение.....	72
4.1	Сравнение систем фагового дисплея антигенных пептидов HLA-II72	
4.2	Аутоантигенная библиотека пептидов на основе генетической конструкции fADL-1e.....	76
4.3	Использование аутоантигенной библиотеки для поиска новых аутоантигенных пептидов, ассоциированных с РА .....	79
4.4	Предсказывание <i>in silico</i> связывания пептидов с HLA-DRB1*01:01 и HLA-DRB1*04:01и оценка точности фагового дисплея.....	82
4.5	Оценка связывания индивидуальных аутоантигенных пептидов с HLA-DRB1*01:01 и HLA-DRB1*04:01 .....	83
4.6	Ряд аутоантигенных пептидов HLA-DRB1*01:01 и HLA-DRB1*04:01 идентифицированы одновременно фаговым отбором и обнаружены на HLA-DR ДК у доноров с РА .....	91
4.7	Поиск аутоантигенных пептидов и аутореактивных TCR, ассоциированных с СКВ .....	98
4.8	Получение модифицированных клеточных линий HeLa и Jurkat 76 TPR для проверки антиген-специфичности TCR .....	102
4.9	EVs, несущие родственный комплекс рМНС, активируют CD4 <sup>+</sup> TCR <sup>+</sup> Jurkat 76 TPR антиген-специфическим образом.....	108
4.10	EVs индуцируют антиген-специфическую экспансию редких клонов CD4 <sup>+</sup> Т-клеток .....	113

4.11	Использование EVs для антиген-специфической экспансии CD4 <sup>+</sup> Т-клеток пациентов с СКВ для определения последовательностей TCR .....	115
5	Выводы.....	124
	Список сокращений.....	125
	Список литературы.....	128
	Приложения.....	144
	Приложение 1. Таблица 10. Клинические характеристики пациентов и здоровых доноров. ....	144
	Приложение 2 .....	146
	Приложение 3. Таблица 11. Антитела, использованные в работе .....	147

# 1 ВВЕДЕНИЕ

## 1.1 Актуальность темы исследования

Презентация антигенов молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса (МНС-II) или человеческого лейкоцитарного антигена (HLA-II) играет решающую роль в индуцировании эффективного иммунного ответа CD4<sup>+</sup> Т-клетками, а также в поддержании иммунной толерантности. Известно, что определенные аллели HLA-II могут как повышать, так и снижать риск развития аутоиммунных заболеваний (АЗ), таких как ревматоидный артрит (РА) и системная красная волчанка (СКВ), оба из которых характеризуются образованием аутореактивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Полиморфизм молекул HLA-II является важным фактором, который определяет разнообразие аутоантигенов, представляемых на этих молекулах.

Текущие методы лечения РА и СКВ в значительной степени основаны на широком подавлении иммунной активности, что может приводить к повышенной восприимчивости пациентов к инфекциям и другим иммунорегулируемым заболеваниям. В связи с этим, существует растущий интерес к персонифицированным подходам, которые зависят от точной идентификации аутоантигенных пептидов в контексте HLA-II и взаимодействующих с ними Т-клеточными рецепторами (TCR). Например, клинические испытания препаратов, таких как DEN-181, представляющий липосомы, инкапсулирующие фрагмент коллагена 2 типа (Col2), и Rheumavax, содержащий фрагменты Col2, фибриногена и виментина, продемонстрировали иммуномодулирующее действие у пациентов с РА, несущих аллели риска HLA-II [1,2]. Однако известные репертуары аутоантигенных пептидов и аутореактивных TCR, вовлеченных в патогенез РА и СКВ, остаются ограниченными.

Существует ряд методик для определения аутоантигенных пептидов в контексте HLA-II, включая широкомасштабные скрининги, такие как фаговый

дисплей, дрожжевой и эукариотический дисплеи, а также масс-спектрометрию и методы, основанные на машинном обучении. Тем не менее, каждый из этих методов имеет свои ограничения, что может приводить к систематическим ошибкам в процессе идентификации пептидов. Для поиска TCR, специфичных к аутоантигенным пептидам, применяются методы, включающие окрашивание мультимерами HLA-II и микрофлюидные платформы. Однако для точной идентификации TCR, экспрессируемых на аутореактивных Т-клетках в периферической крови, которые присутствуют в малых количествах, требуется предварительное обогащение клеток, например, с помощью их экспансии.

Таким образом, для успешного применения персонализированных методов лечения в клинической практике необходимо разработать более точные и эффективные технологии для идентификации как аутоантигенных пептидов, так и TCR, специфичных к этим пептидам. Это требует комбинации различных подходов, таких как фаговый дисплей, масс-спектрометрия, а также методы, основанные на машинном обучении, которые смогут минимизировать погрешности каждого из этих методов в отдельности. Подобный комбинированный подход может способствовать созданию новых терапевтических стратегий, направленных на избирательную модификацию иммунного ответа, что откроет новые возможности для лечения РА, СКВ и других АЗ.

## ***1.2 Цель работы и основные задачи исследования***

**Целью** исследования является поиск новых аутоантигенов, представленных на молекулах HLA-II, и исследование их роли в развитии аутоиммунного ответа при РА и СКВ.

Для достижения цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

1. Выявление новых аутоантигенов, связывающихся с продуктами аллелей риска HLA-II, включая HLA-DRB1\*01:01 (DR1) и HLA-DRB1\*04:01 (DR4) при РА,



а также HLA-DRB1\*15:01 (DR15) при СКВ, с использованием методов фагового дисплея (для РА и СКВ) и масс-спектрометрии (для РА).

2. Оценка характеристик связывания идентифицированных аутоантигенных пептидов с молекулами HLA-II *in vitro*.
3. Анализ провоспалительного CD4<sup>+</sup> Т-клеточного ответа при взаимодействии с выявленными комплексами пептид-МНС-II (pMHC) при РА.
4. Разработка оптимизированной методики антиген-специфической экспансии CD4<sup>+</sup> Т-клеток для определения последовательностей TCR, взаимодействующих с идентифицированными комплексами pMHC при СКВ.

### ***1.3 Научная новизна и научно-практическая значимость работы***

В ходе проведенного исследования с использованием фаговой библиотеки, включающей 11973 аутоантигенных пептида, методом фагового дисплея были выявлены новые аутоантигенные пептиды, представляемые на молекулах HLA-II аллелей риска при РА (HLA-DRB1\*01:01, HLA-DRB1\*04:01) и СКВ (HLA-DRB1\*15:01). Некоторые из идентифицированных пептидов обнаружены в иммунопептидоме HLA-II дендритных клеток (ДК), полученных из моноцитов пациентов с РА – носителей аллелей риска HLA-DRB1\*01:01 или HLA-DRB1\*04:01. Выявлен аутореактивный CD4<sup>+</sup> Т-клеточный ответ при взаимодействии с новым аутоантигенным пептидом ANX11<sub>387-401</sub> в комплексе с HLA-DRB1\*01:01. Разработана и оптимизирована система антиген-специфической экспансии CD4<sup>+</sup> Т-клеток на основе внеклеточных везикул (EVs), что позволило определить последовательности TCR, взаимодействующих с новым аутоантигеном INSR<sub>1297-1311</sub> в комплексе с HLA-DRB1\*15:01 при СКВ. Полученные данные о новых аутоантигенных пептидах, ассоциированных с РА и СКВ, могут быть использованы для разработки новых диагностических маркеров и углубленного изучения аутореактивных Т-клеточных клонов, взаимодействующих с этими антигенами. Дальнейшее исследование механизмов Т-клеточного ответа открывает

перспективы для создания таргетных терапевтических стратегий, направленных на модуляцию иммунного ответа при РА и СКВ.

#### ***1.4 Основные положения, выносимые на защиту***

1. Выявлена группа новых аутоантигенных пептидов, представляемых на HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01, ассоциированных с РА, а также на HLA-DRB1\*15:01, ассоциированном с СКВ.
2. Детектирован аутореактивный CD4<sup>+</sup> Т-клеточный ответ при РА на новый аутоантигенный пептид ANX11<sub>387-401</sub> в комплексе с HLA-DRB1\*01:01.
3. Разработана система антиген-специфической стимуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток с использованием искусственных EVs, несущих костимулирующие молекулы CD80 и комплексы рМНС.
4. Обнаружен новый аутоантигенный пептид инсулинового рецептора INSR<sub>1297-1311</sub> в комплексе с HLA-DRB1\*15:01, взаимодействующий с CD4<sup>+</sup> Т-клетками при СКВ; также идентифицированы последовательности соответствующих TCR.

#### ***1.5 Степень достоверности и апробация работы***

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием в работе ряда методических подходов: современных чувствительных молекулярно-биологических, биохимических и иммунологических методов исследования, подробной оценкой результатов с использованием адекватных методов статистической обработки данных.

Результаты диссертационной работы были представлены на зимней школе ИБХ РАН в 2021 г. и 2025 г., Москва; III объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов в 2021 г., Сочи; Всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» в 2022 г., Новосибирск; III Всероссийской конференции «Высокопроизводительное

секвенирование в геномике (HSG-2022)» в 2022 г., Новосибирск; Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 120-летию Ф. Ф. Талызина в 2023 г., Москва.

По теме диссертационной работы опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах:

1. **Ishina I.A.**, Zhiyanov A.P., Kurbatskaia I.N., Mamedov A.E., Nersisyan S.A., Ziganshin R.H., Eliseev I.E., Petrusenko Y.S., Nikonova A.V., Zhbanova E.S., Salnikova M.A., Ovchinnikova L.A., Mamedov I.Z., Davydov A.N., Nurbaeva K.S., Lisitsyna T.A., Reshetnyak T.M., Lila A.M., Nasonov E.L., Lomakin Y.A., Belogurov A.A., Zhang H., Tonevitskiy A.G., Rubtsov Y.P., Gabibov A.G., Zakharova M.Y. Autoantigenic peptide landscape of rheumatoid arthritis-associated HLA class II // *Genes & Diseases*. 2024. P. 101469. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2024.101469>.
2. **Ишина И.А.**, Захарова М.Ю., Курбацкая И.Н., Мамедов А.Э., Белогуров А.А., Рубцов Ю.П., Габибов А.Г. Гибридные белки, содержащие антигенный эпитоп и тиоредоксин для *in vitro* стимуляции CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat Т-клеток // Доклады Российской Академии Наук. Науки О Жизни. 2024. Т. 516., С. 64–68. <https://doi.org/10.31857/S2686738924030119>.
3. **Ishina I.A.**, Kurbatskaia I.N., Mamedov A.E., Shramova E.I., Deyev S.M., Nurbaeva K.S., Rubtsov Y.P., Belogurov A.A., Gabibov A.G., Zakharova M.Y. Genetically engineered CD80–pMHC-harboring extracellular vesicles for antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cell engagement // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2024. V. 11. P. 1341685. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1341685>.
4. **Ishina I.A.**, Zakharova M.Y., Kurbatskaia I.N., Mamedov A.E., Belogurov A.A., Gabibov A.G. MHC Class II Presentation in Autoimmunity // *Cells*. 2023. V. 12. № 2. P. 314. <https://doi.org/10.3390/cells12020314>.
5. **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 //

International Journal of Molecular Sciences. 2020. V. 21. № 17. P. 6258.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21176258>.

Диссертация выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2024-536).

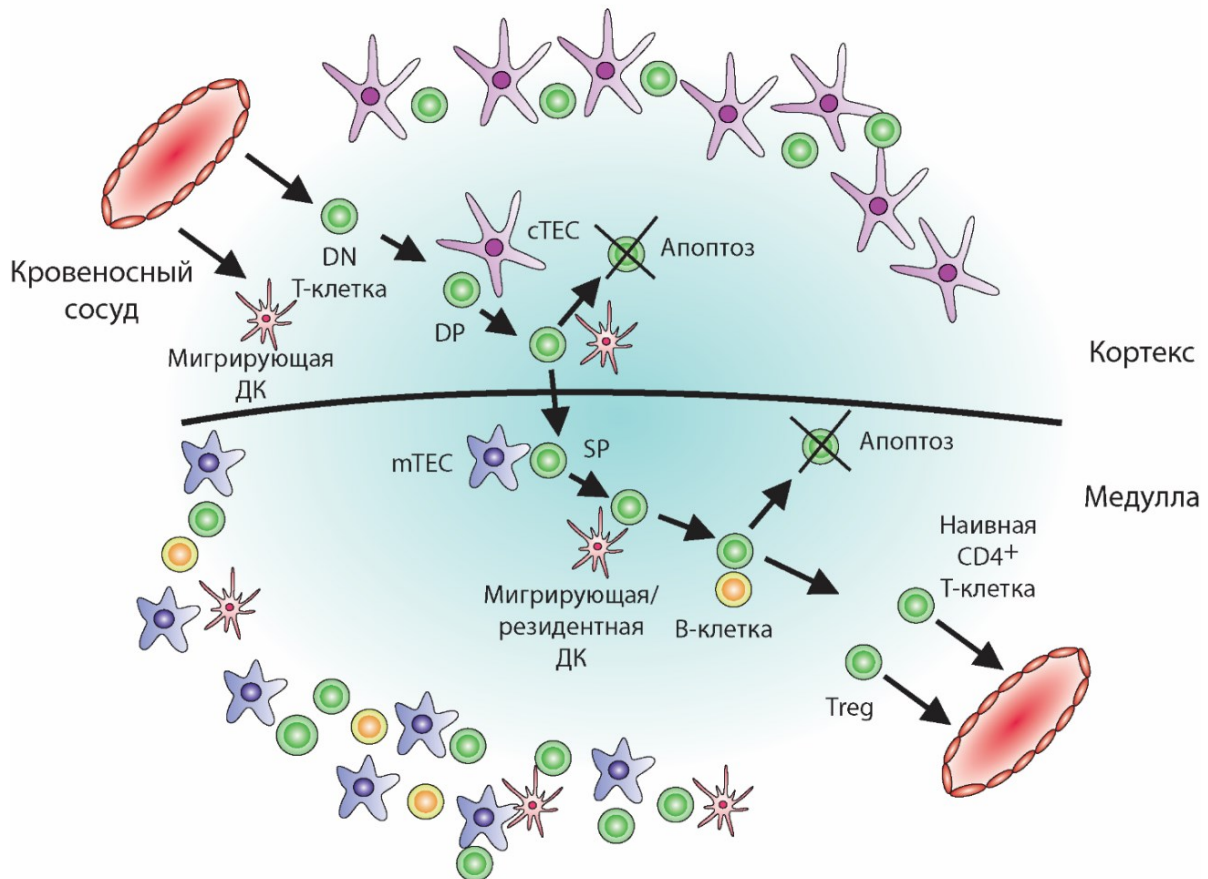
## 2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1 Роль молекул HLA-II в развитии аутоиммунитета

Локус HLA – важная генетическая детерминанта, играющая роль в предрасположенности к различным заболеваниям, включая вирусные инфекции, такие как SARS-CoV-2. Было показано, что носительство некоторых аллелей HLA-I и HLA-II определяют вероятность тяжелого течения заболевания при вирусных инфекциях [3,4]. Исследования продемонстрировали существование «контролеров» и «прогрессоров» ВИЧ при выявлении пациентов со специфической генетической устойчивостью к инфекции [5,6]. Таким образом, аллели HLA, кодируемые геномом, играют важную роль в формировании динамики и силы иммунного ответа, включая механизмы, лежащие в основе аутоиммунных заболеваний (АЗ).

Полиморфизм локуса HLA ассоциирован с широким спектром АЗ, характеризующихся наличием аутореактивных Т-клеточных клонов [7]. Антигенные пептиды, представленные молекулами HLA-II, в основном происходят из белков, захваченных вне клетки. Молекулы HLA-II представляют собой гетеродимеры, состоящие из двух цепей –  $\alpha$  и  $\beta$ . Представление собственных антигенов в периферических тканях молекулами HLA-II может запускать аутореактивный Т-клеточный ответ, особенно если эти антигены становятся доступными для антигенпрезентирующих клеток (АПК) в зоне воспаления. Репертуары TCR, взаимодействующих с молекулами HLA-II, формируются в результате процессов положительного и отрицательного отбора Т-клеток в тимусе (Рисунок 1). Предшественники Т-клеток – DN (double negative) Т-клетки попадают через кровеносный сосуд в кортекс тимуса, где происходит процесс позитивной селекции. Благодаря взаимодействию с АПК кортекса тимуса – эпителиальные клетки кортекса тимуса (сТЭС) и мигрирующими ДК, DP (double positive) Т-клетки дифференцируются в CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> SP (single positive) Т-клетки и переходят в

медуллу тимуса для прохождения негативной селекции. При взаимодействии с АПК – эпителиальными клетки медуллы тимуса (mTEC), мигрирующими или резидентными ДК, а также В-клетками SP (single positive) CD4<sup>+</sup> Т-клетки становятся CD4<sup>+</sup> наивными Т-клетками или Treg и покидают тимус [6].



**Рисунок 1. Этапы отбора Т-клеток при формировании центральной иммунологической толерантности [6].** Процесс негативной селекции схематично представлен только для SP CD4<sup>+</sup> Т-клеток. ДК – дендритные клетки, DN Т-клетки – double negative Т-клетки, DP Т-клетки – double positive Т-клетки, сTEC – эпителиальные клетки кортекса тимуса, mTEC – эпителиальные клетки медуллы тимуса, SP Т-клетки – single positive Т-клетки, Treg – Т-регуляторные клетки.

АПК кортекса и медуллы тимуса презентируют аутоантигенные пептиды в контексте HLA-II. В зависимости от аффинности или авидности TCR предшественников Т-клеток к комплексам рМНС, Т-клетки подвергаются апоптозу (высокая аффинность/авидность) или дифференцируются в Т-регуляторные (Treg) или наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки [8–10]. Однако существуют и другие факторы, которые влияют на дифференцировку Т-клеток во время установления центральной

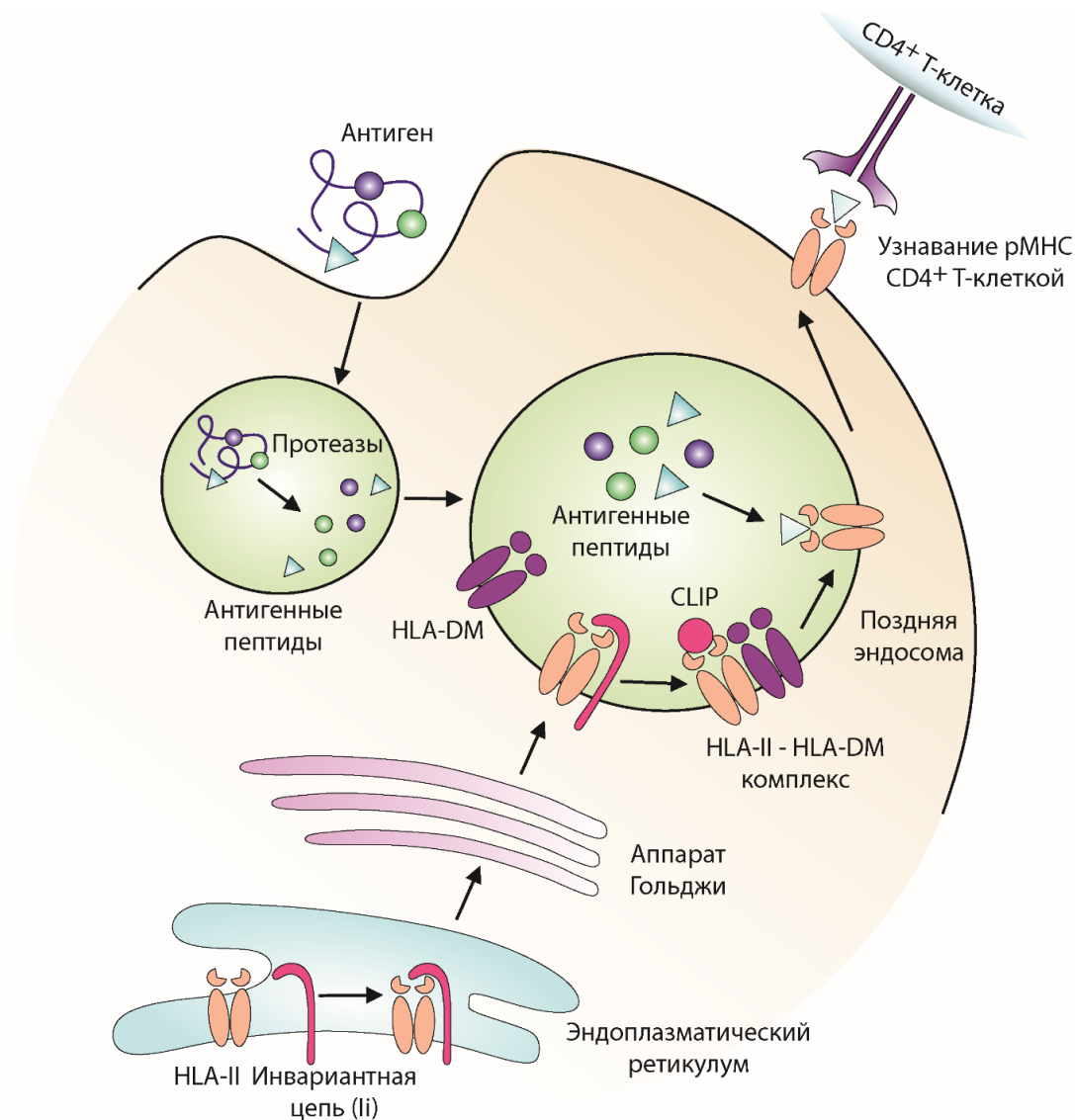
толерантности и могут способствовать развитию аутореактивных Т-клеток. Эти факторы включают топологию презентации аутоантигена [11], [9], частоту взаимодействий рМНС-TCR [12] и костимулирующие взаимодействия [13]. Кроме того, изменения в антигенной и цитокиновой среде могут влиять на представление фрагментов антигена на периферии, что приводит к дифференцированию Т-клеток в аутореактивные.

Множество генотипических данных указывает на то, что определенные аллели HLA-II положительно или отрицательно связаны с определенными АЗ. Например, аллели HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 положительно связаны с РА [14], тогда как HLA-DRB1\*15:01 является аллелем риска рассеянного склероза (РС) [15] и синдрома Гудпасчера [16]. И наоборот, HLA-DRB1\*01:01 является протективным аллелем при этих заболеваниях [17,18]. Аллели HLA-DQA1\*05:01/DQB1\*02:01 (DQ2.5) и HLA-DQA1\*03:01/DQB1\*03:02 (DQ8.1) положительно связаны с диабетом 1 типа (Д1Т). Аллель DQB1\*06:02 (DQ6.2) отрицательно ассоциирован с этим заболеванием [19,20]. Несмотря на значительное количество данных об ассоциации HLA-II с АЗ, связь между этими ассоциациями и развитием аутореактивных Т-клеточных ответов до конца не исследована.

## ***2.2 Процесс презентации антигенных пептидов молекулами HLA-II***

Молекулы HLA-II синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Пептид-связывающая борозда HLA-II первоначально занята инвариантной цепью Ii (фрагмент CD74) для предотвращения деградации и преждевременного связывания пептидов комплексом. Во время транспорта через аппарат Гольджи в поздний эндосомальный компартмент в кислой среде инвариантная цепь укорачивается протеолитическими ферментами с образованием более короткого пептида CLIP [21]. В то же время белковые антигены экзогенной природы подвергаются протеолитическому процессингу внутри эндосом. Неклассическая

молекула HLA-DM способствует обмену CLIP на антигенный пептид с оптимальным регистром связывания. Образовавшийся комплекс рМНС транспортируется на поверхность АПК для распознавания  $CD4^+$  Т-клетками. (Рисунок 2).



**Рисунок 2. Процесс загрузки молекул HLA-II антигенными пептидами [6].**

Борозда для связывания пептидов HLA-II состоит из девяти карманов, в которых могут размещаться характерные аминокислотные остатки (ак) пептидов, обычно стабилизированные нековалентными связями. Якорные остатки P1, P4, P6 и P9 антигенного пептида взаимодействуют с пептид-связывающей бороздой HLA-II, образуя регистр связывания, в то время как остальные пептидные остатки



ориентированы в противоположном направлении, чтобы связываться с TCR. При сдвиге в регистре связывания между антигенными пептидами и молекулами HLA, новообразующиеся комплексы рМНС могут взаимодействовать с совершенно другими TCR [6]. Таким образом структурное разнообразие кармана пептид-связывающей борозды молекул HLA-II позволяет презентировать широкий спектр пептидных лигандов CD4<sup>+</sup> Т-клеткам.

### ***2.3 Роль неклассических молекул HLA в формировании антигенного репертуара HLA-II***

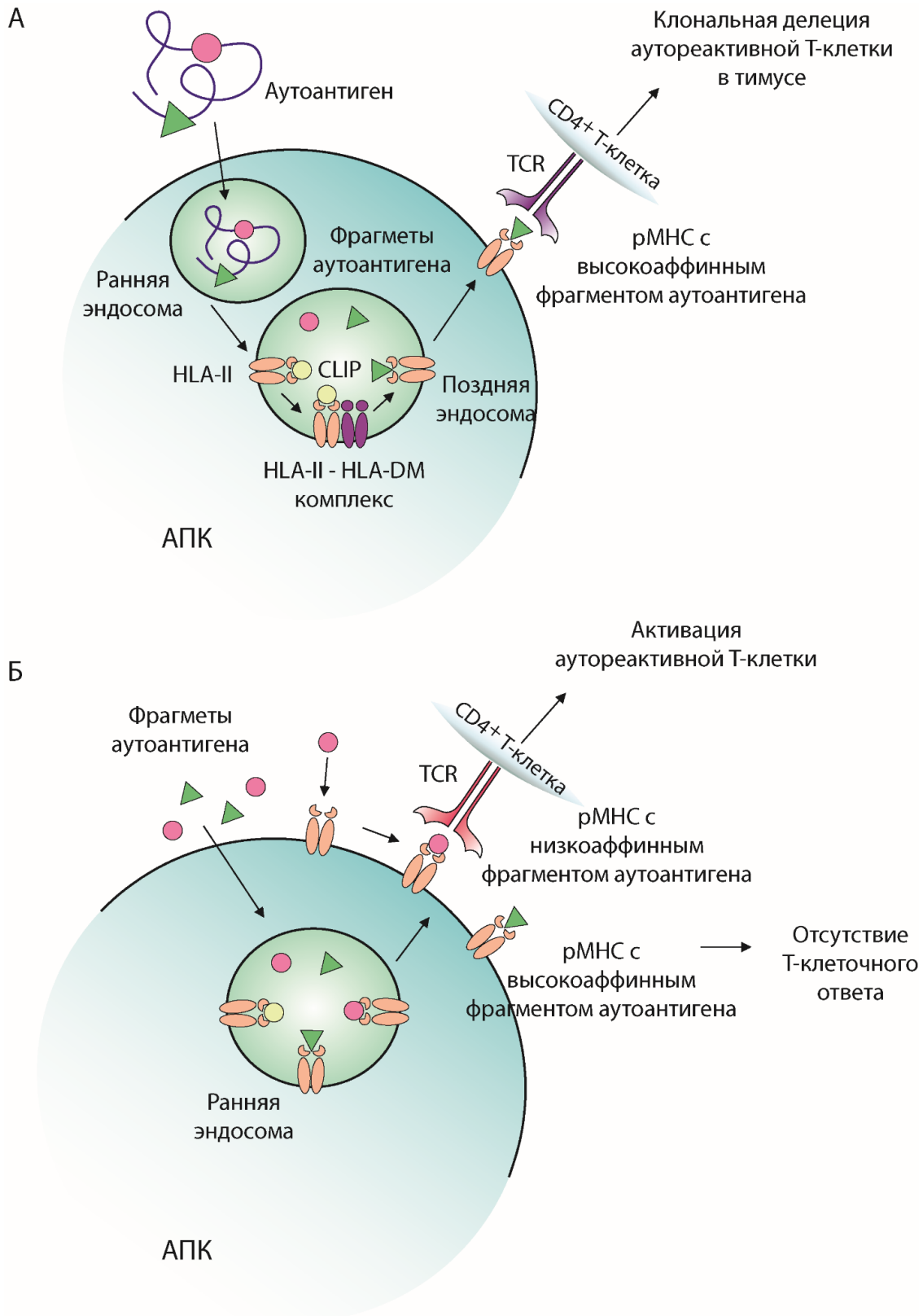
Неклассические молекулы HLA – HLA-DM и HLA-DO у человека и H2-DM и H2-DO у мыши играют важную роль в обмене CLIP на антигенные пептиды, присутствующие в эндосомальных компартментах [22]. Взаимодействуя с HLA-II, HLA-DM выполняет функцию «модификации» рМНС, что приводит к связыванию пептидов с большей аффинностью к молекулам HLA, чем CLIP. HLA-DM также изменяет скорость загрузки/диссоциации антигена, но не влияет на равновесную аффинность [23]. Считается, что HLA-DM способствует презентации антигенных эпитопов с оптимальными регистрами связывания на HLA-II [24]. HLA-DO, с другой стороны, взаимодействует с HLA-DM и модулирует его каталитическую функцию, препятствуя его связыванию с HLA-II [25]. При сравнении иммунопептидомов HLA-II в клеточных линиях, содержащих HLA-DO, и клетках, лишенных этой молекулы, было показано, что специфические антигены, представляемые на HLA-II, обнаруживались только в лимфобластоидных клеточных линиях, одновременно экспрессирующих HLA-DRB1\*01:01, HLA-DM и HLA-DO [6]. В клетках, дефицитных по HLA-DO, эти антигены не выявлялись [26]. Таким образом, HLA-DO способствует увеличению разнообразия антигенного репертуара, представленного на HLA-II. Эксперименты на мышах с нокаутом H2-DM показали, что в данном случае CLIP не может эффективно замещаться другими пептидами, ограничивая антигенное разнообразие МНС-II и нарушая негативную

селекцию в тимусе [27]. Таким образом внутриклеточное соотношение HLA-DM/HLA-DO может оказывать сильное влияние на репертуар антигенов, представляемых HLA-II. HLA-DM оказывает влияние путем снижения уровня презентации низкоаффинных антигенов HLA-II на поверхности АПК. Это наблюдалось с HLA-DQ1, HLA-DQ6 и HLA-DRB1\*03:01 [23,28]. Анализ иммунопептидома АПК тимуса показал, что большинство антигенов, обнаруженных на HLA-II, обладают высокой аффинностью к молекулам HLA-II [29,30]. Таким образом, наличие неклассических молекул HLA обеспечивает высокую степень конкуренции потенциальных лигандов за связывание HLA-II, что приводит к презентации антигенов с более высокой аффинностью.

#### ***2.4 Презентация низкоаффинных аутоантигенов на HLA-II***

В нормальном процессе презентации аутоантигенов на HLA-II в тимусе происходит редактирование репертуара пептидов с помощью HLA-DM, что преимущественно обеспечивает презентацию относительно высокоаффинных пептидов на АПК тимуса (Рисунок 3А). В результате Т-клетки, узнавшие комплекс рМНС подвергаются клональной делеции. Соответственно Т-клеточный репертуар индивидуума не содержит данного аутореактивного клона и при последующей презентации аутоантигенного комплекса рМНС на периферии подходящий TCR для запуска аутоиммунного ответа будет отсутствовать. Следует отметить, что презентация преимущественно высокоаффинных антигенов в тимусе может иметь негативные последствия. Исследования показали, что репертуар антигенов, представляемых на HLA-II в тканях, пораженных аутоиммунными процессами, в основном состоит из низкоаффинных пептидов [31,32]. В центральной нервной системе (ЦНС), где находится основной белок миелина (МВР), и в периферических тканях, таких как поджелудочная железа, где вырабатывается инсулин (INS), аутоантигены могут процессироваться вне АПК, зачастую вследствие воспалительных процессов [6]. Таким образом в периферических тканях при

избытке определенного аутоантигена, процессированного вне АПК, может происходить загрузка фрагментов аутоантигена на HLA-II в ранних эндосомах без участия HLA-DM или на поверхности клетки (Рисунок 3Б). В результате отсутствия HLA-DM возникают стабильные и нестабильные комплексы рМНС. Высокоаффинные комплексы не инициируют Т-клеточный ответ из-за предшествующей делеции соответствующих аутореактивных TCR в тимусе. Нестабильные же комплексы способны связывать аутореактивные Т-клетки, так как взаимодействующие TCR не были подвержены процессу клональной делеции в тимусе. Более того, некоторые аллели риска HLA-II обладают пониженной аффинностью к CLIP, что дополнительно способствует связыванию низкоаффинных антигенных пептидов [33]. Быстрая диссоциация CLIP позволяет генерировать пустые комплексы без участия HLA-DM, что потенциально делает возможным связывание низкоаффинных антигенных пептидов.



**Рисунок 3. Роль неклассической молекулы HLA-DM в редактировании репертуара аутоантигенов, представленных на HLA-II [6]. (А) Презентация высокоаффинных аутоантигенных пептидов на HLA-II при редактировании HLA-**

DM. (Б) Презентация аутоантигенных пептидов с различной аффинностью без редактирования HLA-DM.

Кроме того, один фрагмент антигена может иметь несколько регистров связывания с молекулами HLA-II. В случае Д1Т у мышей NOD (non-obese diabetic) аутореактивные Т-лимфоциты распознают фрагменты INS (INS В:9-23), представленные диабетогенным аллелем I-A<sup>g7</sup> [34,35]. Фрагменты INS В:9-23 могут связываться различными регистрами с I-A<sup>g7</sup>. Пептиды с некоторыми регистрами связывания имеют низкое сродство к MHC-II и подвержены редактированию H2-DM, тогда как другие образуют более стабильные комплексы, менее восприимчивые к H2-DM. Иммунизация мышей NOD пептидами с низкой аффинностью связывания с MHC-II может индуцировать аутореактивный Т-клеточный ответ, тогда как иммунизация пептидами со стабильными регистрами связывания не индуцирует [36]. Это говорит о том, что аутореактивные TCR, специфичные к рMHC с пептидами со стабильными регистрами связывания, вероятно подвергаются апоптозу в тимусе, тогда как TCR, взаимодействующие с низкоаффинными пептидами с альтернативными регистрами связывания, избегают негативной селекции, благодаря ограниченной представленности низкоаффинных рMHC на АПК медуллы в тимусе. Человеческий HLA-DQ8 обладает структурным сходством с I-A<sup>g7</sup>. Пептид INS В:11–23 связывает с HLA-DQ8 с низкой аффинностью и взаимодействует с аутореактивными CD4<sup>+</sup> Т-клетками у больных с Д1Т [37].

Подводя итог, классические пути внутриклеточного процессинга антигенов обеспечивают презентацию высокоаффинных антигенов с оптимальными регистрами связывания на молекулах HLA-II. Однако избыточное присутствие некоторых аутоантигенов в периферических тканях зачастую в процессе воспаления позволяет презентировать низкоаффинные аутоантигенные пептиды на молекулах HLA-II. Несмотря на свою нестабильность и недолговечность, такие комплексы рMHC способны активировать Т-клетки, если присутствуют в достаточном количестве на поверхности АПК.

## ***2.5 Особенности взаимодействия между аутореактивными TCR и аутоантигенными комплексами pMHC***

TCR CD4<sup>+</sup> Т-клеток обычно распознают чужеродные антигены, представленные молекулами HLA-II, а рецептор CD4 играет важную роль в инициации передачи сигналов активации [6,38,39]. Описание кристаллической структуры канонических тримолекулярных комплексов TCR-HLA-II-пептид выявило схожие черты в топологии связывания [40]. TCR ориентирован по диагонали к пептиду, расположенному в пептид-связывающей борозде HLA-II, а переменная область  $\alpha$  и  $\beta$  цепей TCR взаимодействует с  $\beta$  и  $\alpha$  цепями HLA-II, соответственно [41]. Фрагменты гипервариабельных участков (CDR3)  $\alpha$  и  $\beta$  цепей TCR, обладающие наибольшим структурным разнообразием расположены над остатком P5 связанного пептида, а фрагменты CDR1 и CDR2 взаимодействуют с  $\alpha$ -спиралями молекул HLA-II. Хорошо известным примером такого канонического взаимодействия является связывание TCR HA1.7 с пептидом гемагглютинаина в составе HLA-DRB1\*01:01 [42].

Напротив, аутореактивные TCR, которые распознают собственные антигены, часто демонстрируют другую топологию связывания, отличную от TCR, которые связывают бактериальные или вирусные антигены на HLA-II. Например, TCR пациентов с РС: Ob.1A12, Ob.2F3 и Ob.3D1, которые специфичны к фрагментам МВР, представленных на HLA-DR2b (HLA-DRB1\*15:01), взаимодействуют преимущественно с N-концом антигенного пептида, что значительно снижает аффинность TCR к pMHC [43]. Угол ориентации составляет 110°, в отличие от 70° HA1.7. Основное взаимодействие с комплексом pMHC осуществляется за счет связывания CDR3 молекулы TCR с P2 остатком пептидного фрагмента МВР. Другие TCR Ob.2F3 и Ob.3D1, полученные из того же донора с РС, также имеют альтернативную топологию связывания [44]. 3A6, другой TCR, принадлежащий аутореактивным Т-клеткам, связывает фрагменты МВР в комплексе с алломорфом

DR15 – DR2a, также связанным с риском развития РС, демонстрирует субоптимальную топологию связывания и низкую аффинность к комплексу рМНС [45]. Его CDR смещены к N-концу антигенного пептида, а CDR3 также расположен над P2 фрагмента МВР. Тем не менее, аналогично HA1.7, 3A6 связывается диагонально по отношению к рМНС.

Пептид МВР, презентруемый HLA-DQ1, узнается TCR Nu.1B11 с высокой аффинностью [46]. TCR имеет каноничную локализацию, но значительно сдвинут по отношению к  $\alpha$  цепи HLA-DQ1, таким образом, что взаимодействие с антигеном значительно ограничено. Только CDR3  $\alpha$  цепи Nu.1B11 контактирует с фрагментом МВР. Таким образом, Ob.1A12 и 3A6 имеют низкую аффинность к рМНС и альтернативную по отношению к вирусным и бактериальным TCR топологию связывания, что потенциально помогает избежать негативной селекции в тимусе, в особенности если соответствующие комплексы присутствуют на mTEC или других медуллярных АПК в низком количестве. CD4 рецептор является ключевым для запуска сигнальных каскадов T-клетки. Предполагается, что необычная топология связывания аутореактивных TCR с рМНС мешает активации, осуществляемой молекулой CD4 и, следовательно, клональной делеции T-клеток на этапе негативной селекции, что может объяснить существование на периферии T-клеток, несущих TCR, подобных Nu.1B11 [47]. Другим объяснением существования TCR, принадлежащим к аутореактивным T-клеткам, с высокой аффинностью к рМНС может служить наличие слабого связывания между пептидом и HLA-II. Как обсуждалось ранее, комплексы рМНС с низкоаффинными пептидами позволяют аутореактивным клеткам избежать негативной селекции. Тем не менее данные комплексы могут связываться с аутореактивными T-клетками в периферических сайтах. Например, слабое взаимодействие между фрагментом МВР и HLA-DRB1\*04:01 стабилизируется MS2-3C8 TCR [48]. Также взаимодействие между МВР и мышинным аллелем I-A<sup>u</sup> слабое, хотя взаимодействующие с ними TCR связываются с комплексом с высокой аффинностью при развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) [49–51].

Характеристика аффинностей аутоантигенных пептидов к МНС-II, а также взаимодействующих TCR представлена в Таблице 1.

**Таблица 1. Аутоантигены и аутоиммунные TCR при аутоиммунных заболеваниях [6]**

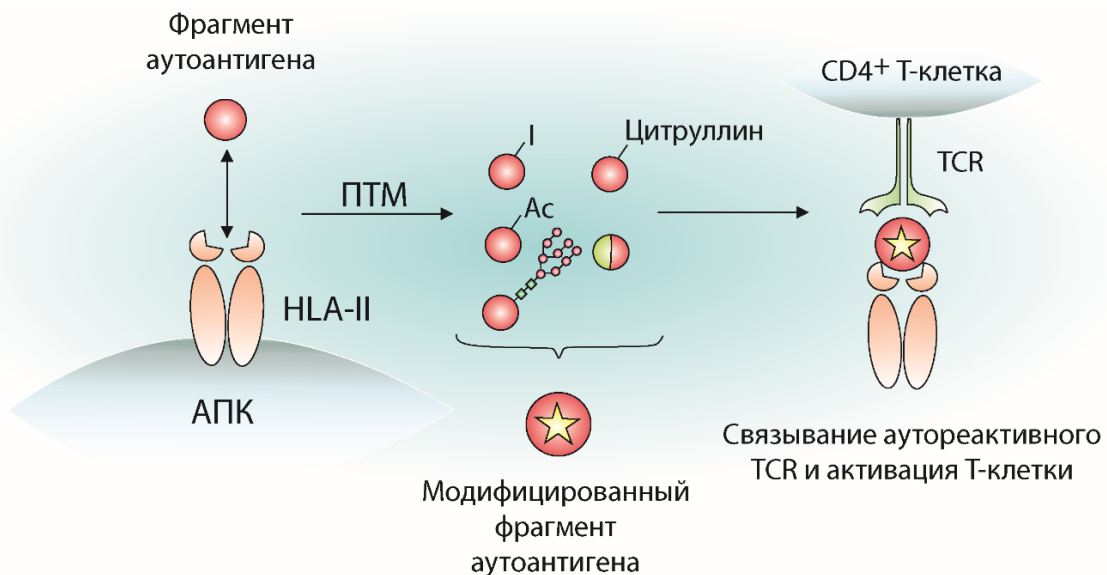
АЗ	Вид	МНС-II/HLA-II аллель	Антигенный пептид	Предложенный молекулярный механизм	Ссылка
<b>Низкоаффинные аутоантигенные пептиды</b>					
Д1Т	Мышь	I-A <sup>g7</sup>	INSB:12-20, INSB:13-21	Слабое связывание CLIP с МНС-II способствует загрузке пептидов с низкой аффинностью.	[52]
Д1Т	Мышь	I-A <sup>g7</sup>	INSB:12-20, INSB:14-22	Связывание низкоаффинного антигенного пептида МНС-II приводит к распознаванию аутореактивными TCR.	[35,36,53,54]
Д1Т	Человек	HLA-DQA1*03:01, HLA-DQB1*03:02	INSB:11-23	Связывание низкоаффинного антигенного пептида HLA-II приводит к распознаванию аутореактивными TCR	[55]
<b>Низкоаффинные аутореактивные TCR</b>					
РС	Человек	HLA-DRB1*15:01	MBP:85-99	Аутореактивные TCR связывают комплексы рМНС с низкой аффинностью и альтернативной топологией.	[43,44]
РС	Человек	HLA-DRB5*01:01	MBP:84-102		[45]
<b>Высокоаффинные аутореактивные TCR</b>					
РС	Человек	HLA-DQA1*01:02, HLA-DQB1*05:02	MBP:85-99	Необычная топология тримолекулярного комплекса препятствует активации Т-клеток рецептором CD4.	[46]
РС	Человек	HLA-DRB1*04:01	MBP:111-129	Аутореактивный TCR стабилизирует слабое взаимодействие между антигенным пептидом и HLA-II.	[48]
ЭАЭ	Мышь	I-A <sup>u</sup>	MBP:1-11 (ацетилированный)	Аутореактивные TCR связывают комплексы рМНС с ацетилированным аутоантигеном в необычном регистре связывания, где часть пептид-связывающей борозды пуста.	[49-51]

## **2.6 Влияние посттрансляционных модификаций аутоантигенов на узнавание аутореактивными Т-клетками**

Посттрансляционные модификации (ПТМ) могут встречаться в аутоантигенах и также вызывать возникновение аутореактивного Т-клеточного ответа, наблюдаемого при АЗ (Рисунок 4). Модификации, такие как гликозилирование, йодирование и цитруллинирование, могут происходить



спонтанно или индуцироваться ферментами. Определенные аутоантигенные пептиды не связываются, либо связываются с молекулами HLA-II с низкой аффинностью. При модификации аутоантигена в периферических тканях образуются фрагменты аутоантигена с высокой аффинностью к MHC-II. Полученные комплексы pMHC могут связываться с аутореактивными T-клетками. Считается, что модифицированные антигены (неоантигены) отсутствуют или присутствуют в очень малых количествах в тимусе. Предполагается, что ПТМ происходят в периферических тканях, что продемонстрировано в случае гликозилированного Col2 при РА [56]. ПТМ-pMHC комплексы могут быть представлены в тимусе за счет мигрирующих ДК, однако их количество зачастую недостаточно для осуществления негативной селекции взаимодействующих с ними аутореактивных T-клеток. Аналогично, при тиреоидите Хашимото, тиреоглобулин присутствует в немодифицированной форме в тимусе, но йодированная форма, которая вызывает аутореактивный T-клеточный ответ, представлена в недостаточном количестве для установления центральной толерантности [57].



**Рисунок 4. Влияние посттрансляционных модификаций аутоантигена на связывание с TCR [6].** ПТМ – посттрансляционные модификации, I – иодирование, Ас – ацетилирование.

Показано, что цитруллинирование, при котором происходит модификация положительно-заряженных остатков аргинина в цитруллин, влияет на аффинность

эпитопа к МНС-II, что также в результате влияет на аффинность TCR к pMHC [58]. Аллели HLA-II, ассоциированные с риском развития РА имеют общий эпитоп, содержащий, в частности, положительно заряженный карман P4, который связывает полярные ак антигенного пептида, такие как цитруллин [59,60]. В дополнении к связыванию цитруллинированных антигенов, общий эпитоп также служит основной контактной зоной для аутореактивных TCR [61]. У больных РА выявлены аутореактивные Т-клетки, специфичные к цитруллинированному антигенному пептиду тенаascin-C, представленному молекулой риска – HLA-DRB1\*04:01 [62]. Гликозилирование аутоантигенов также участвует в развитии АЗ путем презентации ПТМ пептидов на HLA-II. Анализ кристаллической структуры неоантигенного Col2, представленного на HLA-DRB1\*04:01, показал, что галактозилированные остатки лизина необходимы для распознавания TCR. Более того, галактозилирование лизина в положении 264 фрагмента Col2<sub>259-273</sub> играет роль в индуцировании аутореактивного Т-клеточного ответа [63]. Модифицированные аутоантигенные пептиды также принимают участие в развитии Д1Т. Аутореактивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки предпочтительно распознают цитруллинированные и трансглутаминированные эпитопы GAD65 по сравнению с их немодифицированными аналогами [64]. Аутореактивные Т-клетки, специфичные к эпитопам цитруллинированной глюкокиназы, также участвуют в патогенезе Д1Т. При Д1Т образование дисульфидных связей между соседними остатками цистеина внутри фрагмента инсулина, представленного на молекуле HLA-DRB1\*04:01, активирует аутореактивные Т-клетки [65].

В патогенезе Д1Т также участвуют гибридные INS пептиды, образованные путем образования пептидных связей между фрагментами INS и другими гранулярными секреторными пептидами. Гибридные INS пептиды, представленные молекулами риска МНС-II, были идентифицированы в поджелудочной железе человека и мыши. Химеры, образованные проинсулиновым С-пептидом и хромогранинном А или островковым амилоидным полипептидом 2 (IAPP2), присутствовали на молекулах I-A<sup>g7</sup> в поджелудочной железе NOD мышей

и распознавались патогенными Т-клетками [66]. Аутореактивные Т-клетки распознают гибридные инсулиновые пептиды, представленные на человеческих HLA-DQ2 и HLA-DQ8, и продуцируют провоспалительные цитокины во время развития Д1Т [67]. Слияния проинсулинового С-пептида и нейропептида Y, представленные В-клетками, несущими HLA-DQ8 и HLA-DRB1\*04:01, также вызывает активацию аутореактивных Т-клеток при Д1Т [68].

Неэффективная презентация ПТМ-модифицированных антигенов на АПК тимуса приводит к нарушению клональной делеции аутореактивных Т-клеток и может способствовать индукции аутореактивных Т-клеток и развитию аутоиммунитета в периферических тканях.

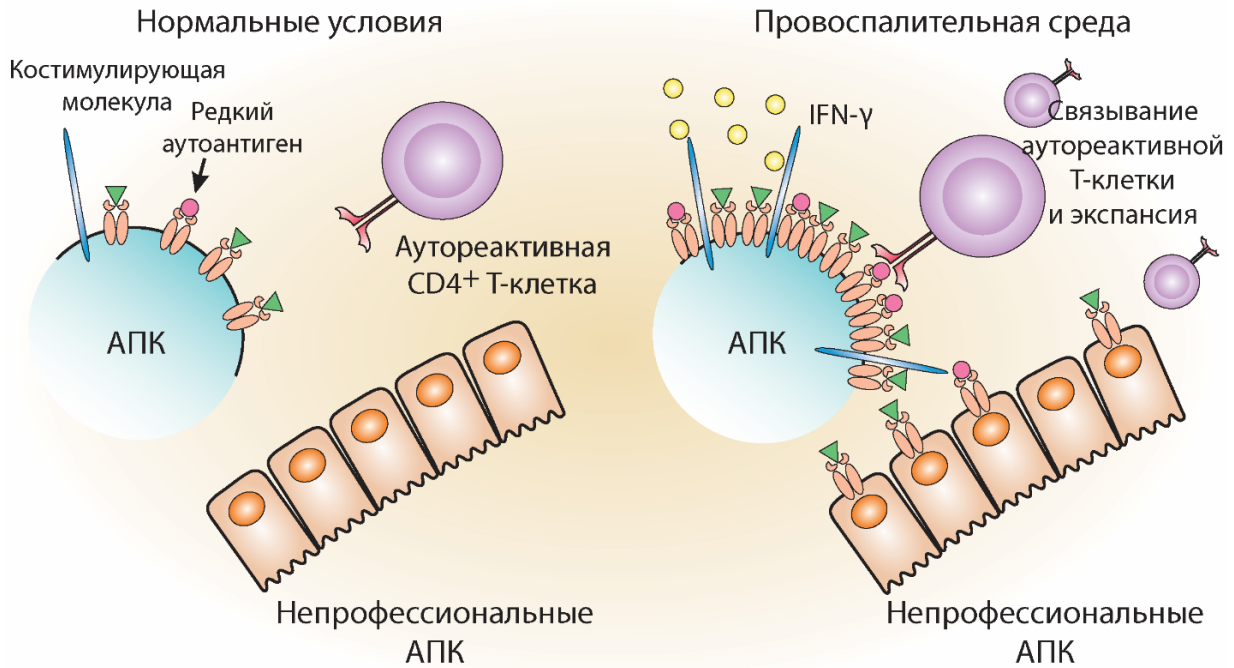
### ***2.7 Влияние провоспалительного окружения на возникновение аутореактивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток***

Наличие провоспалительной среды, часто вызываемой вирусными или бактериальными инфекциями, может привести к увеличению уровня экспрессии HLA-II. Считается, что повышенная экспрессия HLA-II способствует образованию и экспансии патологических Т-клеток, особенно при аутоиммунных заболеваниях, таких как РС и Д1Т [69–73].

Ранее было высказано предположение, что провоспалительная среда может приводить к TCR-независимой активации при различных АЗ [74,75]. Эта активация запускается высвобождением провоспалительных цитокинов и присутствием бактериальных антигенов, которые стимулируют повышенный синтез молекул HLA-II. Основная цель повышенной экспрессии HLA-II — усилить презентацию чужеродных антигенов, способствуя более эффективному ответу CD4<sup>+</sup> Т-клеток.

Повышенные уровни IFN- $\gamma$ , провоспалительного цитокина, приводят к увеличению количества молекул HLA-II как на профессиональных, так и на непрофессиональных АПК. Это влечет изменение состава пептидома МНС-II [76]. Более того, АПК, которые активируются в патогенных условиях, экспрессируют

большее количество костимулирующих молекул [77,78]. Следовательно, в провоспалительной среде редкие аутоантигены присутствуют в большом количестве и комплексы рМНС, которые обычно не вызывают аутореактивный Т-клеточный ответ при нормальных обстоятельствах, могут задействовать аутореактивные TCR (Рисунок 5).



**Рисунок 5. Развитие аутореактивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в провоспалительной среде [6].**

У больных Д1Т было показано, что провоспалительные цитокины активируют транскрипты HLA-II в бета-клетках [79,80]. IFN-γ индуцирует экспрессию молекул I-A<sup>g7</sup> на бета-клетках у NOD мышей, что приводит к появлению CD4<sup>+</sup> аутореактивных Т-клеток и стимулированию развития Д1Т [81]. Кроме того, IFN-γ способствует экспрессии МНС-II на островковых эндотелиальных клетках у мышей NOD [82].

В тканях головного мозга человека с поражениями РС повышается уровень экспрессии факторов транскрипции, ответственных за экспрессию HLA-II [83]. Аберрантная экспрессия МНС-II также была обнаружена на олигодендроцитах у мышей с ЭАЭ и пациентов с РС [84].

Экспрессия МНС-II в суставах мышц привела к развитию тяжелого эрозивного воспалительного полиартрита [85]. При аутоиммунном гепатите воспалительная среда способствует экспрессии молекул МНС-II на гепатоцитах. Это, в свою очередь, может привести к переносу комплексов рМНС посредством трофоцитоза взаимодействующим  $CD4^+$  Т-клеткам, что еще больше усиливает аутоиммунный ответ [86].

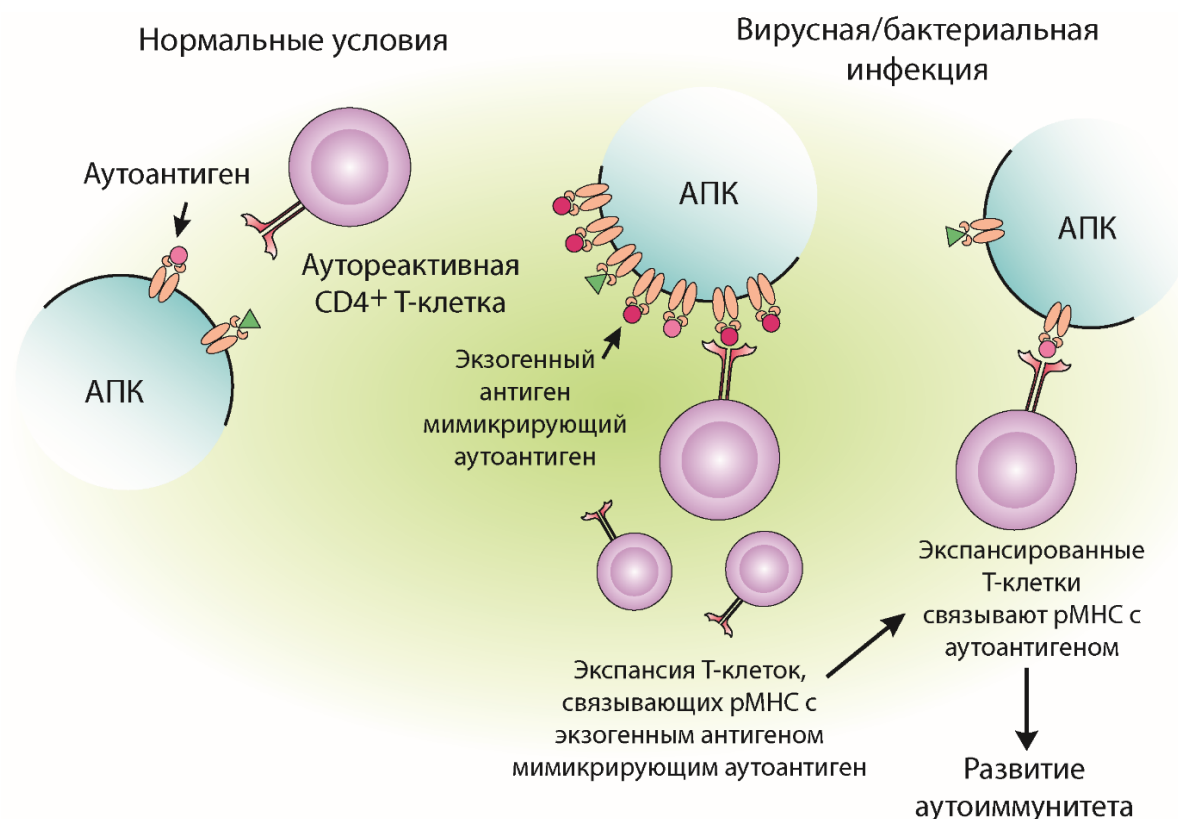
Аутоиммунные процессы часто сопутствуют вирусным и бактериальным инфекциям. Например, прогрессирование Д1Т потенциально связано с такими вирусами, как вирус Коксаки В и ротавирус [87–89]. Аналогичным образом, развитие РС коррелирует с такими инфекциями, как вирус Эпштейна-Барра и вирус герпеса-6 [90–92]. Эти инфекции могут индуцировать выработку провоспалительных цитокинов. Присутствие таких цитокинов может изменить репертуар антигенов, представленных на HLA-II в участках, пораженных воспалением.

Как обсуждалось ранее, некоторые аутореактивные Т-клеточные клоны избегают негативной селекции за счет нетипичного/слабого связывания с комплексами рМНС. Таким образом, возможно, что подобные аутореактивные Т-клетки, слабо взаимодействующие с рМНС при нормальных условиях, могут запустить аутоиммунный ответ в провоспалительном окружении за счет увеличения количества рМНС в участках воспаления.

## ***2.8 Молекулярная мимикрия между аутоантигенными и экзогенными пептидами***

Молекулярная мимикрия возникает при наличии структурного сходства между собственными и чужеродными антигенами, представленными на HLA-II, что может приводить к экспансии  $CD4^+$  Т-клеток, специфичных к экзогенному рМНС. Экспансированные  $CD4^+$  Т-клетки, специфичные к чужеродным пептидам,

могут связывать аутоантигенные комплексы рМНС, что приводит к развитию аутоиммунитета. (Рисунок 6).



**Рисунок 6. Экспансия аутореактивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток за счет молекулярной мимикрии между чужеродными антигенами и аутоантигенами [6].**

Например, при РС аутореактивные Т-клетки, специфичные к МВР, могут перекрестно реагировать с ядерным антигеном вируса Эпштейн-Барра (EBVNA1) [93]. Вирус-специфические TCR могут связывать структурно сходные аутоантигенные пептиды, представленные на HLA-II, тем самым активируя аутореактивные Т-клетки. Например, вероятность развития РС значительно повышается при носительстве аллеля HLA-DRB1\*15:01 и инфицированием вирусом Эпштейн-Барра. Показано, TCR специфичные к антигенам вируса Эпштейн-Барра в составе HLA-DRB1\*15:01 могут взаимодействовать также с фрагментами МВР [94].

Нарколепсия, положительно ассоциированная с аллелем HLA-DQB1\*06:02, характеризуется перекрестной реактивностью гипокретиновых нейронов и Т-

клеток, специфичных к антигенам вируса гриппа штамма H1N1 2009 [95]. Перекрестная реактивность Т-клеток между эпитопами вирусной нейраминидазы и эпитопами белка О-маннозилтрансферазы 1 также замечена в развитии нарколепсии [96].

При васкулите, ассоциированном с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), специфичными к фрагменту миелопероксидазы (MPO<sub>409-428</sub>), аутореактивные Т-клетки перекрестно реагируют с эпитопами *Staphylococcus aureus* (6PGD<sub>391-410</sub>) [97]. Молекулярная мимикрия между стрептококковым М-белком и сердечным миозином человека способствует развитию ревматической болезни сердца [98]. При РА фрагменты бактериального антигена L-аспарагиназы (L-ASNase<sub>67-81</sub>), презентированные на HLA-DRB1\*04:01 имитируют эпитопы Col2 и активируют CD4<sup>+</sup> Т-клетки [99].

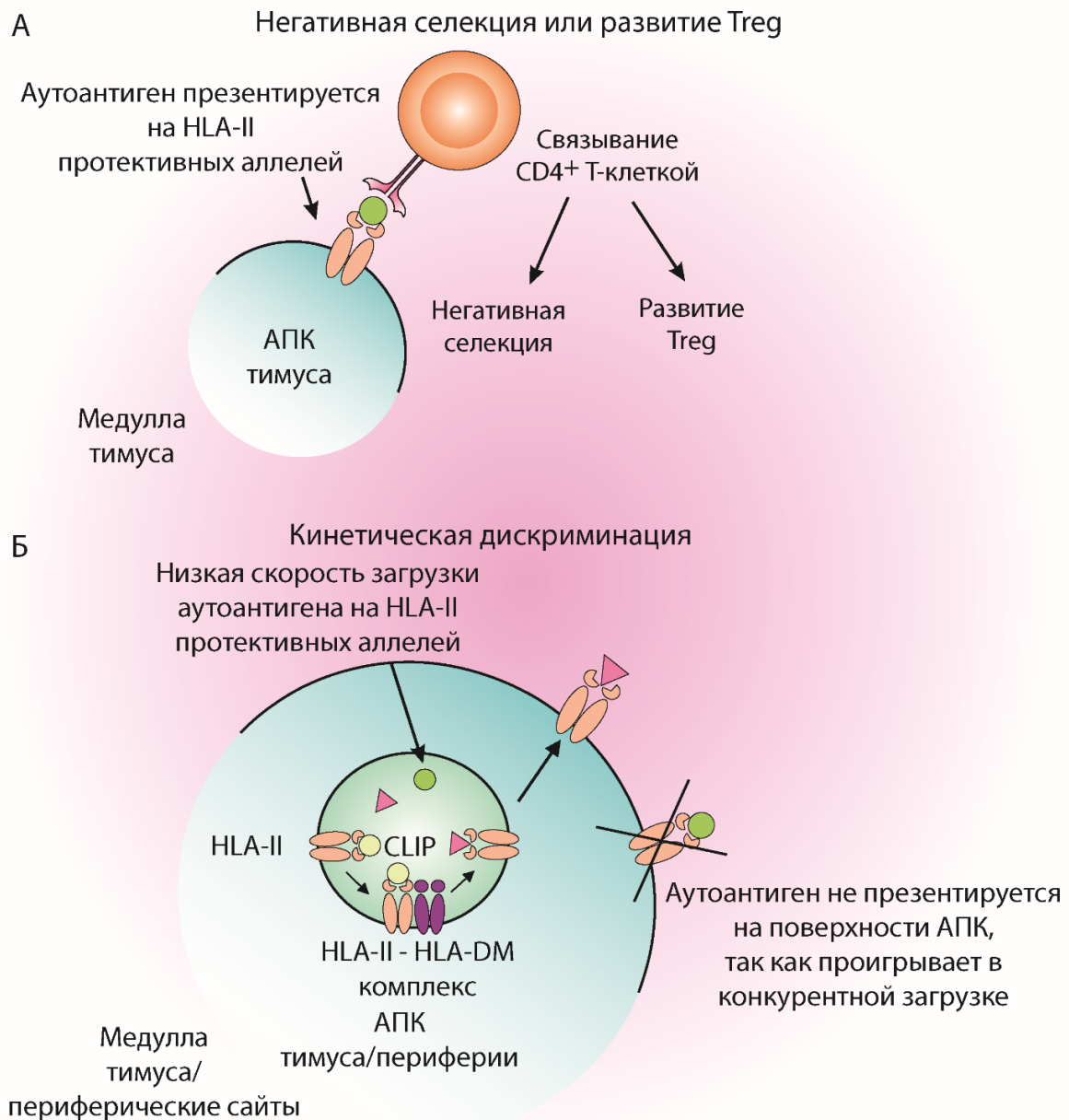
Состав микробиоты кишечника может влиять на развитие АЗ. Чужеродные антигенные пептиды, структурно сходные с собственными эпитопами, могут перекрестно взаимодействовать с патогенными Т-клетками. Например, пептид, полученный из *Lactobacillus reuteri*, имитирует антигенный фрагмент миелинового олигодендроцитарного гликопротеина (MOG) и индуцирует аутореактивный Т-клеточный ответ при ЭАЭ [100]. Комплекс HLA-DRB4\*01:03, презентующий эпитоп *Roseburia intestinalis*, связывается с антигенным пептидом β-2 гликопротеина I (b2GPI – beta-2 glycoprotein 1) и активирует аутореактивные Т-клетки при антифосфолипидном синдроме (АФС) [101]. Антигенные пептиды кишечной бактерии *Parabacteroides distasonis* (hpvt4-18) структурно сходны с фрагментами инсулина INS B:9-23 и активируют инсулин-специфические Т-клетки [102].

Бактериальные и вирусные инфекции, а также состав кишечной микробиоты могут опосредовать развитие АЗ через механизм молекулярной мимикрии, путем распознавания чужеродных пептидов и структурно сходных аутоантигенов, представленных Т-клеткам на молекулах HLA-II.

## ***2.9 Роль протективных аллелей в развитии аутоиммунитета***

Некоторые аллели HLA-II называют «протективными» при развитии АЗ, что означает статистически значимую меньшую вероятность носительства этой аллели пациентами с АЗ по сравнению со здоровыми донорами (HDs). Ввиду особенностей презентации аутоантигенных пептидов на подобных продуктах аллелей происходит изменение во взаимодействии с CD4<sup>+</sup> Т-клетками. Интересно, что часто белковые продукты протективных аллелей отличаются от продуктов аллелей риска всего несколькими аа, локализованными в участках контакта с TCR или вблизи от ключевых позиций пептид-связывающей борозды HLA-II. Предполагается, что протективный эффект может осуществляться за счет делеции аутореактивных Т-клеток в тимусе и/или индукции развития Treg (Рисунок 7А).





**Рисунок 7. Роль протективных молекул HLA-II в подавлении активации аутореактивных Т-клеток [6]. (А) Распознавание аутоантигена, представленного на продукте протективного аллеля, CD4<sup>+</sup> Т-клетками, приводит к негативной селекции или развитию Treg в тимусе. (Б) Медленная скорость загрузки аутоантигена на молекулу HLA-II протективного аллеля приводит к отсутствию презентации комплекса рМНС на поверхности АПК тимуса или периферии. Treg – Т-регуляторные клетки.**

Экспрессия протективного аллеля I-E у мышей NOD, в норме имеющих гаплотип H-2<sup>g7</sup>, помогала предотвратить развитие Д1Т [103]. Показано, что протективное действие I-E осуществляется благодаря делеции аутореактивных Т-

клеток [104]. Аутореактивный TCR (4.1 TCR), экспрессированный у трансгенных мышей NOD, подвергается негативной селекции у мышей с гаплотипом H-2<sup>g7/b</sup>, H-2<sup>g7/k</sup>, H-2<sup>g7/q</sup> и H-2<sup>g7/nb1</sup> за счет взаимодействия с продуктами протективных аллелей MHC-II [105]. Однако, некоторые исследования ставят под сомнение теорию делеции аутореактивных T-клеточных клонов как единственное объяснение эффекта протективности определённых аллелей MHC-II при развитии АЗ [106]. Часто АЗ характеризуются присутствием расширенного репертуара аутореактивных T-клеток, следовательно, негативная селекция одного или нескольких клонов не может в полной мере объяснить защиту от развития аутоиммунной патологии.

Treg играют важную роль в поддержании периферической толерантности, предотвращении развития АЗ и повреждения тканей за счет контроля CD4<sup>+</sup> T-клеточного ответа. При сравнении связывания аутоантигенного пептида  $\alpha 3$  цепи коллагена 4 типа Col4  $\alpha 3_{135-145}$  продуктом аллеля риска HLA-DRB1\*15:01 и протективного аллеля HLA-DRB1\*01:01 при синдроме Гудпасчера выявлено, что оба аллеля связывают данный пептид, однако в разном регистре [16]. Так, аутореактивные T-клетки HLA-DRB1\*15:01<sup>+</sup> больных синдромом Гудпасчера взаимодействовали с pMHC, несущими данный аутоантиген, а HLA-DRB1\*15:01<sup>+</sup> гуманизированные мыши развивали синдром Гудпасчера при иммунизации этим антигеном.  $\alpha 3_{135-145}$ , представленный на HLA-DRB1\*01:01, взаимодействовал с Treg HDs, а у HLA-DRB1\*01:01<sup>+</sup> мышей также наблюдалась дифференциация Treg и резистентность к развитию заболевания. Можно предположить, что изменение регистра связывания антигена с молекулой HLA-II влечет за собой изменение ак паттерна связывания антигена с TCR, что в конечном счете определяет фенотип связывающихся T-клеток. HDs с протективным при Д1Т гаплотипом HLA-DRB1\*15:01-DQB1\*06:02 имели более высокий уровень аутоантиген-специфичных Treg по сравнению с донорами, несущими нейтральные аллели HLA-II или аллели риска [20].

Что касается структуры, то тримолекулярный комплекс Treg с комплексом проинсулина, представленным на молекулах HLA-DRB1\*04:01, характеризуется докинггом TCR, развернутым на 180°, по сравнению с каноничным связыванием [107]. Так  $\alpha$  цепь TCR взаимодействует с  $\alpha$  цепью HLA-II, а  $\beta$  цепь TCR с  $\beta$  цепью HLA-II, в то время как при каноничном связывании взаимодействие происходит наоборот. Количество разрешенных кристаллических структур тримолекулярных комплексов Treg ограничено, что не дает возможности точно установить, присуща ли данная топология связывания большинству Treg. Тем не менее, анализ структуры TCR неонатальных Treg, связывающих комплекс I-A<sup>b</sup> с Padi4, выявил каноничное связывание [108]. Опубликованные структуры тримолекулярных комплексов TCR с аутоантигенами, представленными на продуктах протективных аллелей, которые могли бы прояснить молекулярный механизм протективности, на настоящий момент отсутствуют.

Протективный эффект, осуществляемый молекулами HLA-II, может быть связан также с низкой скоростью загрузки аутоантигена на молекулу HLA-II (Рисунок 7Б). Связывание антигенного пептида молекулой HLA-II является время-ограниченным и конкурентным процессом и, как обсуждалось ранее, контролируется неклассическими молекулами HLA. Так, показано, что фрагмент аутоантигена MBP<sub>151-164</sub> презентруется на протективном при РС аллеле HLA-DRB1\*01:01, однако имеет медленную скорость загрузки, тогда как вирусный пептид белка гемагглютинаина гриппа HA<sub>306-318</sub> загружается быстро [17]. Структурно подобная кинетическая дискриминация определяется замедленным докинггом фрагмента MBP в карманы P1 и P4. Учитывая дополнительное редактирование HLA-DM и присутствие других антигенов экзогенной природы, конкурирующих за связывание с HLA-DRB1\*01:01 в поздних эндосомах, данный пептид, вероятно, проигрывает в конкуренции и не может быть представлен на поверхности АПК. Таким образом, аутоантигенный пептид оказывается не представленным на протективном аллеле HLA-II и не вызывает запуска патологического Т-клеточного ответа.

Рассмотренные механизмы презентации аутоантигенов на молекулах HLA-II играют ключевую роль в развитии АЗ, определяя спектр антигенов, представляемых Т-клеткам, и их последующую иммунную реактивность. Особенности этого процесса могут способствовать либо толерантности, либо, напротив, запуску патологического иммунного ответа. Далее рассматривается иммунология РА и СКВ, где нарушение антигенной презентации играет центральную роль в их патогенезе.

### ***2.10 Иммунология РА***

РА – заболевание, характеризующееся воспалительными изменениями синовиальной ткани, суставов и костей с редким поражением внесуставных участков [109]. В развитие патогенеза РА подчеркивается вклад генетических и эпигенетических факторов. Также большую роль играет влияние окружающей среды, что подтверждается наблюдением о развитии заболевания у обоих однояйцевых близнецов только в 15% случаев [110]. Установленным маркером РА является наличие аутоантител к ревматоидному фактору (RF), антител к ПТМ белку (АМРА – anti-modified protein antibodies), которые включают такие модификации как цитруллинирование (АСРА), карбамилирование (aCarP) и ацетилирование (ААРА), существование которых объясняется нарушениями клеточного и гуморального иммунных ответов. Однако, также выделяют серонегативный РА, характеризующийся отсутствием аутоантител к RF и АСРА [111,112]. Появлению клинических симптомов РА часто предшествует формирование аутоиммунитета, характеризующееся наличием вышеприведенных аутоантител, что подтверждается ретроспективным анализом когорт пациентов с диагностированным заболеванием [113]. Тем не менее, присутствие аутоантител к антигенам, ассоциированным с РА, не обязательно ведет к развитию заболевания. Более того, описаны случаи серореверсии, характеризующиеся исчезновением аутоантител [114].

Хотя точная причина возникновения симптомов РА остается неизвестной, иммунологические процессы, происходящие в синовиальной оболочке и суставной жидкости, характеризуются высвобождением цитокинов синовиальными макрофагами, такими как фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 и IL-6, которые тесно связаны с воспалительными процессами, активацией и стимуляцией фибробластоподобных синовиоцитов (FLS) и остеокластов [115]. Повышенная активность остеокластов способствует эрозии кости. При активации FLS происходит продуцирование матриксных металлопротеиназ, что приводит к деградации хряща, что, в свою очередь, запускает механизм обратной связи, посредством которого хрящ секретирует протеазы [116]. Кроме того, FLS стимулируют экспрессию рецептора-активатора лиганда ядерного фактора  $\kappa$ B (RANKL), тем самым облегчая связывание T-клеток с поверхностными белками остеокластов, что увеличивает активность остеокластов и последующую эрозию кости [117].

Нейтрофилы в синовиальной жидкости вырабатывают протеазы и активные формы кислорода, что потенциально приводит к эрозии костей и деградации хрящей [118]. Кроме того, иммунные комплексы, такие как агрегаты антител, способствуют воспалению и гиперактивации системы комплемента [119]. Ангиогенез является еще одним признаком РА и облегчает миграцию иммунных клеток в суставы из-за повышенной проницаемости сосудов и экспрессии молекул адгезии, таких как VCAM-1 [120]. CD4<sup>+</sup> T-клетки играют ключевую роль в развитии воспаления, эрозии костей и деградации хряща, стимулируя экспрессию RANKL и продуцируя IL-17, который в свою очередь увеличивает продуцирование хемокинов CXCL1 (KC/Gro $\alpha$ ), CXCL2 (MIP2 $\alpha$ /Gro $\beta$ ), CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP1), CCL7 (MCP3), CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), увеличивающих воспаление и рекрутирующих нейтрофилы, макрофаги и лимфоциты к синовиальной мембране [121,122]. CD4<sup>+</sup> T-хелперы первого типа (Th1), продуцирующие IFN- $\gamma$  способствуют продуцированию провоспалительных цитокинов и хемокинов синовиоцитами FLS [123].

Полногеномное секвенирование выявило многочисленные локусы генетического риска, связанные с РА [124]. Многие из этих локусов не являются уникальными для РА и представляют собой аллели предрасположенности к различным аутоиммунным заболеваниям. Например, нерецепторная тирозинфосфатаза 22 типа (PTPN22) имеет общий однонуклеотидный полиморфизм, который связан с повышенным риском развития Д1Т, РА, СКВ, витилиго и болезни Грейвса.

Одним из известных рисков развития РА связан с генетическими вариациями в области HLA-II, что также объясняет ключевое участие CD4<sup>+</sup> Т-клеток в патогенезе заболевания. Генетическая предрасположенность ассоциирована с аллелями HLA-DRB1 (в особенности HLA-DRB1\*01:01, HLA-DRB1\*01:02, HLA-DRB1\*04:01, HLA-DRB1\*04:04), несущими мотив общего эпитопа из пяти аминокислот (QKRAA, QRRAA или RRRAA в положениях 70–74 цепи DRB1) [125]. Следует отметить, что эти аллели преимущественно положительно ассоциированы с АСРА-положительным РА, в то время как АСРА-отрицательный РА ассоциирован с HLA-DRB1\*03:01 [126]. С механистической точки зрения молекулы HLA-DRB1, несущие общий эпитоп, вероятно, презентруют аутоантигенные пептиды, которые приводят к формированию аутореактивного репертуара CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Подобные аутоантигенные пептиды потенциально несут отрицательный или нейтральный заряд в положении P4, что позволяет им связываться с положительно заряженным карманом P4 РА-ассоциированных аллелей HLA-DR. Соответственно, антигенные пептиды, несущие положительный заряд в данном положении, не смогут быть презентированными на данных аллелях. Цитруллинирование модифицирует свойства пептидов благодаря изменению позитивно заряженных аргинина или лизина на нейтральный цитруллин. Подобная трансформация улучшает связывание аутоантигенных пептидов с молекулами HLA-DR, несущими общий эпитоп. Однако было показано, что другие позиции HLA-DR (11, 71, 74) также ассоциированы с риском развития РА [127]. Кроме того, идентифицированы

антигенные пептиды не обладающие ПТМ, но активирующие аутореактивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки при патогенезе РА [128].

### 2.11 Антигены, участвующие в патогенезе РА

Известен ряд антигенов, вызывающих активацию и экспансию аутореактивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток при РА. Большинство иммунодоминантных антигенов, идентифицированных в синовиальных тканях, относятся к молекулярным шаперонам, синовиальным пептидам, кросс-реактивным бактериальным антигенам, внеклеточным и клеточным пептидам с ПТМ модификациями [129]. Список некоторых идентифицированных аутоантигенных пептидов в комплексе с HLA-DR, вызывающих активацию аутореактивных Т-клеток приведен в Таблице 2.

**Таблица 2. Список аутоантигенных пептидов, опубликованных в базе данных иммунных эпитопов (IEDB – immune epitope database), участвующих в патогенезе РА [129].**

№	Антиген	Последовательность эпитопа	HLA-II	Эффект на Т-клеточную активацию	Цитрулинирование или специфическая ПТМ	Ссылка
Пептиды, полученные из белков теплового шока и консервативных белков						
1	BiP (336–355)	RSTMKPVQKV LEDSDLKKS	HLA-DRB1*04:01	Пролиферация, IFN- $\gamma$ , IL-17	-	[130]
2	HSP60 (535–549)	ALSTLVNRLK VGLQ	DRB1-SE	Пролиферация, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$	-	[131]
Синовиальные пептиды, полученные из нативных белков						
3	Col2 (259–273)	GIAGFKGEQGP KGET	HLA-DRB1*04:01	Слабая пролиферация, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-2	Галактозилирование: сильная пролиферация, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-2	[132]

4	Col2 (261–273)	AGFKGEQGPK GET	HLA- DRB1*04:01	Активация, CD40L, IL-17, IL-4	Активация, CD40L, IL- 17, IL-4	[133]
5	Хрящевой протеогликан (268–282)	YLAWQAGMD MCSAGW	DRB1-SE	Пролифераци я, IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP1	-	[131]
6	HCgp39 (263–275)	FTLASSETG	HLA- DRB1*04:01	Пролифераци я	-	[134]
7	hnRNP- A2/RA33(11 7–133)	RDYFEEYGKID TIEHT	DRB1-SE	Пролифераци я, IFN- $\gamma$ , IL-2	-	[135]
8	PAD4	DPGVEVTLTM KAASGSTGDQ	DRB1-SE	Пролифераци я, TNF- $\alpha$	-	[136]
Пептиды внеклеточного матрикса						
9	Fibrinogen- $\alpha$ (79–91)	QDFTNRINKLK NS	DRB1-SE	-	Слабая пролиферация, IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-6	[137]
10	Col2 (1237– 1249)	QYMRADQAAG GLR	DRB1-SE	-	Слабая пролиферация, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17	[137]
11	Col2 (311– 325)	APGNRGFPGQD GLAG	DRB1-SE *10:01	-	CD40L, TNF- $\alpha$ , IL-17F, IL-10, IL-13	[138]
12	VIME (66– 78)	SAVRARSSVPG VR	DRB1-SE	-	Слабая пролиферация, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17	[137]
13	Агрекан (84–103)	VVLLVATEGR VRVNSAYQDK	DRB1-SE	-	IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-17	[137]
14	Тенасцин	VSLISRRGDMS SNPA	DRB1-SE *04:01	-	Слабая пролиферация, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10	[139]
15	Тенасцин 56	QGQYELRVDL RDHGE	DRB1-SE *04:01	-	Слабая пролиферация, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10	[139]
16	CILP (982– 996)	GKLYGIRDVRS TRDR	DRB1-SE *10:01	-	Пролиферация, IL-17	[140]
17	$\alpha$ -снолаза (26–40)	TSKGLFRAAVP SGAS	DRB1-SE	-	IFN- $\gamma$	[141]
18	$\alpha$ -снолаза (326–340)	KRIAKAVNEKS CNCL	DRB1-SE	-	Пролиферация, IL-17	[142]
Пептиды, элюированные с HLA-DR из синовиальных тканей						
19	GNS	FEPFFMMIATP APH	DRB1-SE	IFN- $\gamma$	-	[143]
20	FLNA	NPAEFVVNTSN AGAG	DRB1-SE	IFN- $\gamma$	-	[143]



21	Гелсолин	DAYVILKTVQL RNGN	DRB1-SE *01:01	CD40L, IFN- $\gamma$	-	[144]
22	Гистон H2B	MNSFVNDIFERI	DRB1-SE *04:01	CD40L, IFN- $\gamma$	CD40L, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$	[144]
23	Гистон 4	DNIQGITKPAIR R	DRB1	CD40L, IFN- $\gamma$	-	[144]
24	PG4	THTIRIQYSPAR	DRB1-SE *04:01	-	CD40L, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$	[144]
25	MPO	SNEIVRFPTDQL TPDQ	DRB1	CD40L, IFN- $\gamma$	-	[144]

BiP – Binding immunoglobulin protein; CILP – cartilage intermediate-layer protein; Col2 – collagen 2; FLNA – filamin A; GNS – N-acetylglucosamine-6-sulfatase; Hae: haemagglutinin; Hcgp39 – human cartilage glycoprotein 39; hn-RNP-A2 – heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2; HSP – heat shock protein; MPO – myeloperoxidase; PAD4 – peptidylarginine deiminase 4; PG4 – proteoglycan 4; VIME – vimentin.

Традиционные протоколы лечения РА включают нестероидные противовоспалительные препараты (NSAIDs), болезнь-модифицирующие противоревматические препараты (DMARDs) и терапевтические моноклональные антитела, блокирующие функции цитокинов, включающих IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$ . Использование подобного подхода, включающего неспецифическую иммунную супрессию, увеличивает восприимчивость к инфекциям, что осложняется различными побочными эффектами. Следовательно, сохраняется потребность в высокоэффективных и персонализированных схемах лечения РА, в частности, направленных на специфическое воздействие на комплексы pMHC.

Одним из перспективных подходов для разработки новых таргетных терапий является индукция толерантности на основе информации о последовательности аутоантигенных пептидов. ДК играют ключевую роль в поддержании иммунологической толерантности, и было показано, что таргетная доставка антигена в сочетании с антителами, специфичными к популяции ДК, способствует индукции толерантности у мышей [145]. Иммунотерапия на основе толерогенных ДК, модифицированных ингибитором NF- $\kappa$ B и загруженных цитруллинированными антигенными пептидами Col2, фибриногена и виментина,

прошла первую фазу клинических испытаний у пациентов с РА [146]. Из-за недостатков работы с клеточным источником, таким как ДК, включающих ограниченность ресурса и стандартизации, были предложены липосомы, доставляющие антиген и ингибиторы NF- $\kappa$ B к ДК мышей с антиген-индуцированным артритом [147]. Подобные липосомы способствовали дифференциации антиген-специфичных Treg, анергии Т-клеток памяти, а также супрессировали протеогликан-индуцированный артрит в антиген-специфичной манере [148]. Липосомы, энкапсулирующие антиген (Col2<sub>259-273</sub>) и ингибитор активации ДК тестируется в первой фазе клинических испытаний у пациентов с РА, несущих HLA-DRB1\*04:01 или HLA-DRB1\*01:01 [149]. Более того, разрабатываются подходы с деплецией аутореактивных антиген-специфичных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в контексте других АЗ путем окраски мультимерами МНС-II, несущими токсин или таргетной элиминации антителами [150,151].

## ***2.12 Иммунология СКВ***

СКВ — аутоиммунное ревматическое заболевание, характеризующееся разнообразными клиническими проявлениями, включающими поражение кожи, суставов, ЦНС, сердца, сердечно-сосудистой системы и почек, что известно как волчаночный нефрит. При СКВ циркулирующие аутоантитела приводят к образованию иммунных комплексов антиген-антитело [152]. Данные комплексы в результате вызывают провоспалительный ответ [153]. Нарушение регуляции апоптотического процесса и неэффективная элиминация апоптотических клеток способствуют высвобождению аутоантигенов, что тем самым увеличивает вероятность их идентификации Т- и В-клетками.

Установленным маркером при СКВ является наличие антител к ядерным антигенам (Sm – Smith, Ro/SSA, La/SSB, dsDNA, гистоны и т.д.), что предполагает ключевое участие аутореактивных В-клеток в патогенезе заболевания [154]. Антитела к Ro/SSA и La/SSB обнаруживаются примерно у 30-40% пациентов с

СКВ. Хотя эти антитела также могут встречаться при других аутоиммунных заболеваниях, таких как синдром Шегрена, они особенно значимы у пациентов с кожными высыпаниями и фотосенситивностью. Антитела к двухцепочечной ДНК обладают высокой специфичностью к СКВ ассоциированы с активностью заболевания, особенно в случаях волчаночного нефрита, где они способствуют повреждению почек через образование иммунных комплексов. Также важным маркером являются антитела к b2GPI, который является кофактором, необходимым для взаимодействия антифосфолипидных антител с фосфолипидами. Он связывается с отрицательно заряженными фосфолипидами, включая кардиолипин, и обладает антикоагулянтной активностью. Данные антитела ассоциированы с АФС, но дополнительно служат маркером на повышенный риск тромбообразования при СКВ. Для терапии СКВ активно используются препараты, направленные на таргетирование В-клеток, такие как ритуксимаб – антитело, направленного против CD20 – универсального маркера В-клеток, а также белимумаб, который блокирует фактор выживания В-клеток (BLyS) [155]. Начинает использоваться CAR-T терапия, направленная против CD19<sup>+</sup> В-клеток [156].

CD4<sup>+</sup> Т-клетки также играют важную роль в патогенезе СКВ, регулируя В-клеточный ответ и способствуя развитию заболевания посредством продукции провоспалительных цитокинов. При СКВ наблюдается гиперактивация сигнального пути TCR Т-клеток, что может нарушать процессы центральной негативной селекции в тимусе, что, в свою очередь, приводит к образованию репертуаров аутореактивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, продуцирующих провоспалительные цитокины, такие как IL-2 и IFN- $\gamma$  (Th1) и IL-17 (Th17) [157]. [158]. Именно Th17 клетки инфильтрируют почки пациентов с волчаночным нефритом, а также пораженные участки кожи [159]. Кроме того, СКВ характеризуется наличием дефективных Treg, что подтверждается как на мышинных моделях, так и у пациентов [160].

На важную роль CD4<sup>+</sup> Т-клеток в патогенезе СКВ указывает также наличие аллелей HLA-II, ассоциированных с данным заболеванием, таких как HLA-DRB1\*03:01, HLA-DRB1\*15:01 и некоторых других [161–163]. Носительство HLA-DRB1\*03:01 имеет наибольшую статистически значимую корреляцию с наличием аутоантител против Ro/SSA и La/SSB.

На данный момент выявлено некоторое количество аутоантигенов, которые могут презентироваться на HLA-II и активировать аутореактивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки при СКВ. Однако для большинства этих аутоантигенов еще не установлена специфичность презентации на HLA-II. Использование Т-клеточных библиотек и антиген-специфичное обогащение помогли идентифицировать Т-клетки, продуцирующие IFN- $\gamma$  и IL-17, специфичные к SmD1, RNP70, Ro, La, гистону у пациентов с СКВ [164]. При волчаночном нефрите патогенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки были активированы виментином, аннексином А2 [165]. Также разработан метод таргетной терапии с использованием последовательности аутореактивного TCR, таргетирующего аутоантигенный пептид SmB/B'58-72 в контексте HLA-DRB1\*15:01. Treg были трансдуцированы данным TCR, в результате чего суппрессировали провоспалительный ответ *in vitro* и развитие волчаночного нефрита в мышинной гуманизированной модели [166].

В заключение, презентация аутоантигенов на молекулах HLA-II играет ключевую роль в патогенезе ряда аутоиммунных заболеваний, таких как РА и СКВ. Механизмы, связанные с активацией аутореактивных Т-клеток, генетической предрасположенностью и нарушением иммунной толерантности, являются основой воспалительных процессов и повреждения тканей. Современные подходы к лечению, направленные на таргетирование специфических антигенных комплексов и модуляцию иммунных ответов, открывают перспективы для разработки более эффективных и персонализированных терапий, что, в свою очередь, подчеркивает важность дальнейших исследований в этой области.

### 3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 3.1 Пациенты и здоровые доноры

Для изучения аутореактивного CD4<sup>+</sup> Т-клеточного ответа при РА в исследование были включены 15 пациентов с диагнозом РА и со специфическими аллелями HLA-II (HLA-DRB1\*01:01 или HLA-DRB1\*04:01), включающих 14 женщин и 1 мужчину. Средний возраст пациентов составил 50±12,61 года. В контрольную группу были включены 11 HDs со специфическими аллелями HLA-II (HLA-DRB1\*01:01 или HLA-DRB1\*04:01) без ревматических заболеваний, включающих 7 женщин и 4 мужчины. Средний возраст доноров составил 36±9,14 года. Для диагностики РА использовался критерий ACR/EULAR 2010 [167]. Все доноры подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при Научно-исследовательском институте ревматологии имени В. А. Насоновой (протокол №3 от 02.02.2023). Все пациенты прошли обследование и иммунологические исследования, включающие определение С-реактивного белка (CRP), RF и антител к цитруллинированному циклическому пептиду (АССР). Концентрацию CRP (верхняя граница нормы – 5 мг/л) и RF IgM (верхняя граница нормы – 15 IU/мл) в сыворотке крови определяли методом иммунонефелометрии на анализаторе BN ProSpec (Siemens). Количественное определение АССР в сыворотке крови проводили электрохемилюминесцентным методом на анализаторе Cobas e411 (Roche, верхняя граница нормы – 17 U/мл) и методом ИФА (Axis Shield Diagnostics) (верхняя граница нормы – 5 U/мл).

Для идентификации последовательностей TCR CD4<sup>+</sup> Т-клеток при СКВ были включены 3 пациента (женщины) с диагнозом СКВ со специфическим аллелем HLA-II (HLA-DRB1\*15:01). Для диагностики СКВ использовался критерий SLEDAI-2k. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в

исследовании. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при Научно-исследовательском институте ревматологии имени В. А. Насоновой.

Для оценки эффективности антиген-специфической экспансии с помощью EVs были включены 4 HDs (2 мужчины, 2 женщины) со специфическим аллелем HLA-II (HLA-DRB1\*15:01). Все доноры подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при Научно-исследовательском институте ревматологии имени В. А. Насоновой.

Клинические характеристики пациентов и HDs приведены в Приложении 1. Таблице 10.

### ***3.2 Химические реактивы, буферные растворы и сопутствующие материалы***

Среды:

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

2хYT-агар: 2хYT, 18 г/л агара.

SOB: 20 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л NaCl, 250 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>.

SOC: SOB, 50 мМ глюкоза.

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

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

Среда для ведения клеточной культуры HEK293F: FreeStyle (Gibco) с добавлением 10% FBS HyClone, антибиотик-антимикотик (Gibco).

Среда для ведения клеточной культуры HEK293T, HeLa: DMEM full – GlutaMax (100X), MEM NEAA (100X), пируват натрия (100X), антибиотик/антимикотик (100X) с добавлением 10% FBS HyClone (Gibco).

Среда для ведения клеточной культуры Jurkat 76 TPR, CD4<sup>+</sup> Т-клеток, моноклеарные клетки периферической крови (PBMC – peripheral blood mononuclear cells), моноцитов, ДК: RPMI full – Glutamax (100X), MEM NEAA (100X), пируват натрия (100X), антибиотик/антимикотик (100X) с добавлением 10% FBS NuClone (Gibco). Среда для ведения клеток для внутриклеточного окрашивания антителами: AIM-V (Gibco).

#### Растворы:

TE: 10 mM Трис-НСl, 1 mM ЭДТА, pH 8,0.

TBE (10x): 0,89 M трис(гидроксиметил)аминометан, 0,89 M борная кислота, 20 mM ЭДТА, pH 8,0. Буфер нанесения образцов для электрофореза в агарозном геле (10x): 0,1% бромфеноловый синий, 0,5% SDS, 0,1 M ЭДТА, pH 8,0, 50% глицерина.

PBS: 8,0 г/л NaCl, 0,2 г/л KCl, 1,15 г/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 г/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2.

TBS: 20 mM Трис-НСl, 150 mM NaCl, pH 7,5.

Буфер элюции для аффинной хроматографии Protein G: 100 mM Gly-НСl, pH 2,5. Буфер нанесения для металл-хелатной хроматографии: 50 mM фосфат натрия, 300 mM NaCl, 2 mM имидазол, pH 8,0.

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

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

Концентрирующий гель: 5% смеси акриламид-бисакриламид (29:1), 0,1% SDS, 0,125 M Трис-НСl, pH 6,8.

Разделяющий гель: 12% смеси акриламид-бисакриламид (29:1), 0,1% SDS, 0,375 M Трис–НСl, pH 8,9.

Буфер нанесения образцов для электрофореза по Леммли (2x): 5% 2-меркаптоэтанола, 4% SDS, 0,25 M Трис–НСl, pH 6,8, 4 mM ЭДТА, 10% глицерина, 0,25 мг/мл бромфенолового синего.

Электродный буфер для электрофореза по Леммли (5х): 72 г/л глицина, 5 г/л SDS, 6,5 г/л Трис-НСl, рН 8,3.

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

Карбонатный буфер: 1,5 г/л  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 29,3 г/л  $\text{NaHCO}_3$ , рН 9,6.

Блокирующий буфер для иммуноферментного анализа (ИФА): карбонатный буфер, 2% обезжиренного сухого молока.

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

Фаговый связывающий буфер: 50 мМ цитрат натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), 150 мМ  $\text{NaCl}$ , 2 мМ ЭДТА, 0,2% NP40, 1 мМ PMSF, рН 6

Буфер для связывания с бактериофагами (FACS): 1х PBS, 0,5% бычий сывороточный альбумин (BSA – bovine serum albumin), 2мМ ЭДТА, 0,025% азида натрия

Антибиотики:

Раствор ампициллина/канамицина в воде с концентрацией 50–100 мг/мл.  
Раствор зеоцина в воде с концентрацией 50–100 мг/мл.

### **3.3 Методы работы с клетками бактерий**

#### **3.3.1 Трансформация клеток *E.coli* методом теплового шока**

К замороженной на льду аликвоте объемом 100 мкл компетентных клеток штамма DH5 $\alpha$  *E.coli* (Евроген, Россия) добавляли раствор ДНК и инкубировали смесь в течение 30 минут на льду. Затем пробирки с клетками нагревали до 42°C в течение 40 секунд, после чего снова инкубировали на льду в течение 2 минут. Суспензию клеток переносили в 1 мл теплой среды SOC без добавления антибиотиков и инкубировали в термостате при 37°C в течение 40 минут. Это



позволяло восстановить клеточную стенку и начать экспрессию генов, обеспечивающих устойчивость к селективным антибиотикам. Затем клетки высевали на чашку Петри с LB-агаром и селективным антибиотиком и помещали эту чашку в термостат при 37°C на 14–16 часов.

### *3.3.2 Полимеразная цепная реакция для клональной селекции*

Для подготовки реакционной смеси на одну реакцию использовали следующие компоненты и объемы: 2 мкл десятикратного буфера для Taq-полимеразы (Евроген, Россия), по 10 пмоль прямого и обратного праймера, 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата (Евроген, Россия), 0,2 мкл Taq-полимеразы (Евроген, Россия), и стерильной воды до объема 20 мкл. Далее, бактериальные колонии переносились в пробирки с помощью петли, и одновременно проводилась маркировка на свежей чашке Петри. Процесс полимеразной цепной реакции (ПЦР) включал следующие этапы: денатурацию при 95°C в течение 3 минут, а затем проводилось 25 циклов ПЦР (денатурация 95°C 30 сек, отжиг праймеров  $X = 2^\circ\text{C} \times n(\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times n(\text{G}+\text{C}) - 5^\circ\text{C}$  30 сек, элонгация 72°C 30–90 сек из расчета скорости полимеразы 1000 пар в минуту и длины фрагмента). После завершения ПЦР продукты анализировались с помощью электрофореза в агарозном геле.

### *3.3.3 Ночная культура*

Для получения ночной культуры, бактериальную колонию сеяли в 5 мл среды 2xYT, добавляя селективный антибиотик. Затем клетки инкубировали при 37°C с интенсивной аэрацией в течение приблизительно 12–14 часов.

### 3.3.4 Экспрессия и очистка отдельных фаговых частиц и аутоантигенной фаговой библиотеки

Вектор fADL-1e был трансформирован в TG-1 клетки *E. coli* на чашку Петри с 2хУТ-агаром, содержащим 50 мкг/мл канамицина и 2% глюкозы. Полученные колонии переносились в 5 мл ночник среды 2хУТ, также содержащий 50 мкг/мл канамицина и 2% глюкозы. На следующий день ночник разбавляли в 100 раз средой 2хУТ, содержащей 50 мкг/мл канамицина и инкубировали при 30°C в течение 16–24 часов.

Вектор pHen2 был трансформирован в TG-1 клетки *E. coli* на чашку Петри с 2хУТ-агаром, содержащим 100 мкг/мл ампициллина и 2% глюкозы. Полученные колонии переносились в 5 мл ночник среды 2хУТ, также содержащий 100 мкг/мл ампициллина и 2% глюкозы. На следующий день ночник разбавляли в 100 раз средой 2хУТ, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, 2% глюкозы и инкубировали при 37°C до оптической плотности  $OD_{600} = 0.5$ . Далее 10 мл культуры ( $4 \times 10^9$  клеток) были инфицированы гиперфагом M13K07ΔpIII (Progen) в соотношении 1:20 (клетки:гиперфаг) и инкубированы 30 минут при 37°C без качания [168]. Клетки осаждали 10 минут при 3000g, а осадок ресуспендировали в 200 мл среды 2хУТ, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл канамицина и инкубировали при 30°C в течение 16–24 часов.

Ранее полученная в лаборатории биокатализа ГНЦ ИБХ РАН аутоантигенная фаговая библиотека на основе вектора fADL-1e представлена в виде пептидов из 44 ак с перекрытием 14 ак. Библиотека содержит 11973 аутоантигенных пептидов. Трансформированные клетки TG-1, хранящиеся на –80°C, инокулировали в 5 мл ночника со средой 2хУТ, содержащий 50 мкг/мл канамицина и 2% глюкозы и инкубировали при 37°C в течение 16–24 часов. На следующий день ночник разбавляли в 100 раз средой 2хУТ, содержащей 50 мкг/мл канамицина и инкубировали при 30°C в течение 24 часов.

Рекомбинантные бактериофаги очищали методом двойного осаждения полиэтиленгликолем-6000 (ПЭГ-6000) [169]. Концентрацию частиц бактериофага определяли с помощью HRP (horseradish peroxidase, пероксидаза хрена)-конъюгированных антител против M13 (клон RL-ph2, Santa Cruz Biotechnology) и против FLAG (клон M2, Sigma-Aldrich).

### 3.3.5 Отбор антигенных пептидов, связывающих молекулы HLA-DR, методом фагового дисплея

Для оценки эффективности отборов методом фагового дисплея и сравнения экспрессионных систем на основе fADL-1e и pHen2 использовались бактериофаги, несущие фрагмент белка гемагглютинаина HA<sub>306-318</sub> (PKYVKQNTLKLAT) – P#4, положительный контроль для HLA-DRB1\*01:01 и иррелевантный пептид (CILDLPKFC) – P#1, а также их смесь P#4:P#1 = 1:100. Аутоантигенная библиотека была использована на основе вектора fADL-1e. Рекомбинантные белки HLA-DR и HLA-DM или только HLA-DM инкубировали в эквимольном количестве (50 пмоль) с  $2,5 \times 10^9$  фагов в фаговом связывающем буфере в 50 мкл при 25°C в течение 24 часов. После инкубации смесь разбавляли до 1 мл фаговым связывающим буфером, содержащим 0,5% сухого молока, и наносили на иммуносорбирующую пробирку (Nunc) на 2 часа при 37°C, с иммобилизованным антителом L243 и предварительно блокированную 5% сухим молоком. Были выполнены последовательные стадии отмывки 10 порциями PBS по 4 мл с 0,1% Tween 20 и 10 порциями PBS по 4 мл. Элюцию связанных фагов осуществляли инкубацией с 1,5 мл 100 mM Gly-HCl, pH 2,5, при 25°C в течение 10 мин с агитацией и с последующей нейтрализацией 2M Tris-HCl, pH 8. Элюированные фаги использовали для заражения клеток *E. coli* TG-1 в лог-фазе (OD<sub>600</sub> = 0,6) в течение 30 мин без агитации для экспрессии, очистки бактериофагов и последующего раунда отбора. Для оценки значения колониеобразующих единиц (КОЕ)

зараженные клетки высевались на 2хYT агар, содержащий канамицин (fADL-1e) или ампициллин (pHen2). КОЕ сравнивали между последней отмывкой и элюатом.

### *3.3.6 Связывание антигенных пептидов, представленных на бактериофагах, с HLA-DR, экспрессированным на дендритных клетках*

Клеточные линии мышинных ДК (DC2.4), в количестве  $2 \times 10^6$ , трансдуцированные или нетрансдуцированные HLA-DRB1\*01:01 были фиксированы фиксирующим буфером (R&D Systems). Фиксированные клетки были промыты PBS и ресуспендированы в буфере для связывания с бактериофагами (FACS) с  $7 \times 10^{12}$  бактериофаговых частиц/мл. Образцы были инкубированы при 37°C в течение 16 часов с качанием. Далее образцы были отмыты три раза PBS и инкубированы сначала с anti M13 (1:500, клон RL-ph2, Santa Cruz Biotechnology), а затем с anti-mouse IgG-FITC (1:200, Biolegend) в течение 40 минут при 4°C с качанием. Окрашивание анализировали методом проточной цитофлуориметрии с использованием прибора NovoCyte 2060 (ACEA Biosciences). Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo (BD Biosciences).

### *3.3.7 Оценка связывания аутоантигенных пептидов с HLA-DR с помощью NetMHCIIpan*

Каждый пептид (44 ак) библиотеки аутоантигенов был поделен на все возможные пептиды (15 ак). Связывание между полученными пептидами и HLA-DRB1\*01:01/HLA-DRB1\*04:01/HLA-DRB1\*15:01 было предсказано с использованием NetMHCIIpan v4.0. Затем аффинность связывания между пептидом (44 ак) и HLA-DR определяли как максимальную аффинность среди всех полученных вариантов пептидов (15 ак). Для реализации была использована ранее разработанная программа T-CoV [170]. Кривые ROC были построены и

визуализированы с использованием пакетов `scikit-learn` и `seaborn` для языка программирования Python.

### ***3.4 Методы работы с нуклеиновыми кислотами***

#### ***3.4.1 Амплификация фрагментов ДНК методом ПЦР***

Для подготовки реакционной смеси использовали следующие компоненты (объемы указаны на одну реакцию): 10 нг матричной ДНК, 5 мкл десятикратного буфера для Taq-полимеразы или Tersus-полимеразы (Евроген), 15 пмоль прямого и обратного праймеров, 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата (Евроген), 1 мкл Taq-полимеразы или Tersus-полимеразы (Евроген), и стерильную воду до объема 50 мкл. Процесс ПЦР включал следующие шаги: сначала денатурацию при 95°C в течение 3 минут, затем проводили 25 циклов (денатурация 95°C 30 сек, отжиг праймеров  $X = 2^{\circ}\text{C} \times n(\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times n(\text{G}+\text{C}) - 5^{\circ}\text{C}$  30 сек, элонгация 72°C 30–90 сек из расчета скорости полимеразы 1000 пар в минуту и длины фрагмента). В случае перекрывающейся ПЦР процесс проводился в два этапа: на первом этапе получали 2–3 фрагмента отдельно с помощью стандартной программы ПЦР, а на втором этапе полученные перекрывающиеся фрагменты использовались в качестве матрицы, и праймеры добавлялись после 5 циклов, чтобы перекрывающиеся фрагменты успели отжечься друг на друга. После завершения ПЦР продукты анализировали с использованием электрофореза в агарозном геле. Полученные продукты ПЦР очищали с использованием набора Cleanup Standard (Евроген).

#### ***3.4.2 Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции***

Рестрикцию ДНК (включая параметры такие как буфер, температура, время инкубации и количество) выполняли в соответствии с рекомендациями,

предоставленными производителем соответствующих ферментов. В случае рестрикции плазмидной ДНК, в последние 10 минут инкубации добавляли фосфатазу FastAp (Thermo). Для очистки ДНК использовали набор Cleanup Standard (Евроген).

### *3.4.3 Лигирование*

Для выполнения лигирования применялся набор T4 DNA Ligase и T4 DNA Ligase Buffer (Thermo) в соответствии с инструкцией производителя. Процедура лигирования проводилась в объеме 10 мкл с молярным соотношением вектора и вставки 1:10, и продолжалась в течение 1–2 часов при комнатной температуре или 14–16 часов при 4°C.

### *3.4.4 Выделение плазмидной ДНК*

Клетки осаждались путем центрифугирования на протяжении 10 минут при скорости 3000g при комнатной температуре. Затем проводилось выделение плазмидной ДНК в соответствии с инструкцией, предоставленной в наборе Plasmid Miniprep (Евроген).

### *3.4.5 Электрофорез ДНК в агарозном геле*

Для проведения электрофореза использовали 1% агарозный гель, который был приготовлен на основе однократного TBE и содержал бромистый этидий в концентрации 0.5 мкг/мл. Пробы смешивали с 4X буфером для нанесения (Евроген) и наносили на гель одновременно с маркером для определения размеров фрагментов ДНК – 1k DNA Ladder (Евроген). Электрофорез проводили в буфере TBE в гель-электрофорезной камере от Helicon при силе тока 100 мА. Разделенную

ДНК визуализировали при длине волны 254 нм с помощью трансиллюминатора или системы гель-документации (Bio-Rad).

#### *3.4.6 Электрофорез ДНК в полиакриламидном геле*

Для проведения электрофореза использовался полиакриламидный гель с концентрацией акриламида и бисакриламида 19:1, приготовленным на основе 1x TBE. Толщина аналитического геля составляла 0,75 мм. Перед началом электрофореза проводили предварительный этап при напряжении 90–110 В в течение 10 минут. Пробы смешивали в соотношении 1:10 с буфером для нанесения и наносили их на гель. Электрофорез начинали при 90 В до того момента, когда пробы входили в гель, затем постепенно увеличивали напряжение до 130–140 В. По завершении электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия с концентрацией 1 мкг/мл и визуализировали при помощи системы гель-документации (Bio-Rad).

#### *3.4.7 HLA-типирование*

Для определения генотипа HLA-II донора РВМС ресуспендировали в реагенте Qiazol (Qiagen), общую РНК экстрагировали в соответствии с протоколом производителя (Qiagen) и использовали для приготовления библиотек секвенирования (NGS).

Синтез первой цепи кДНК осуществляли с использованием специфических праймеров, соответствующих высококонсервативным участкам генов HLA-DRB. Затем кДНК амплифицировали с помощью смесей праймеров, покрывающих экзоны 2-3 HLA-II, в отдельных реакциях ПЦР для каждого донора. Восемь продуктов первых ПЦР-реакций каждого донора смешивали и амплифицировали с помощью набора IDT for Illumina UD Indexes (Illumina). Библиотеки очищали

магнитными частицами Ampure XP (Beckman Coulter) согласно протоколу производителя. Секвенирование проводили на Illumina MiSeq (Illumina).

Биоинформатический анализ данных проводился в RIDE с использованием специального алгоритма (<https://github.com/asya-minervina/HLA>), который выравнивает необработанные чтения секвенирования с базой данных последовательностей HLA (извлеченной из базы данных IMGT/HLA).

### *3.4.8 Высокпроизводительное секвенирование ДНК бактериофагов и анализ данных*

Для подготовки библиотек NGS использовали двухэтапную ПЦР. Очищенные фаговые частицы амплифицировали с помощью прямого праймера (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTAACGAGGGCAA-3') и обратного праймера (5'-TCGTGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAACAGTTTCGGCTT-3') с использованием максимального количества раундов амплификации до появления продукта ПЦР, оцененного электрофорезом в агарозном геле. Полученный продукт очищали с помощью магнитных частиц Ampure XP (Beckman Coulter) и амплифицировали с использованием прямого (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXXTCGTGGCAGCGTCAG-3') и обратного праймеров (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATXXXXXXXXXGTCTCGTGGGCTCGG-3'), несущих специфические последовательности индексов. Полученные библиотеки очищали магнитными частицами Ampure XP (Beckman Coulter) и секвенировали на MiSeq (Illumina). Последовательности аутоантигенных пептидов идентифицировали с помощью программного обеспечения MiXCR (Milaboratory).

### *3.5 Хроматографические методы работы с белками*



### 3.5.1 Выделение и очистка HLA-DR (клеточная линия S2)

Плазмиды, содержащие гены HLA-DR с индуцибельным промотером МТ, связанным с металлотионином, использовались для экспрессии в клетках *Drosophila melanogaster* линии S2. Культуры клеток разводили до достижения плотности 10 миллионов клеток/мл. Для индукции экспрессии HLA-DR использовали  $\text{CuSO}_4$  в концентрации 1 мМ, проводя инкубацию при 26°C в течение 7 дней с качанием при скорости 160 оборотов в минуту. Затем клеточную культуру подвергали центрифугированию при 11000g в течение 20 минут при 4°C. Супернатант пропускали через фильтр с размером пор 0,22 мкм и затем концентрировали в 10 раз на приборе Pellicon (Millipore). Концентрат диализировали в течение 16 часов против PBS при 4°C. Далее, проводили металл-хелатную хроматографию. Полученный элюат переносили в буфер А (Mono Q) для ионообменной хроматографии, концентрировали его с использованием фильтров Amicon 10 кДа. Затем проводили анионообменную хроматографию на колонке MonoQ (GE Healthcare) с скоростью 1 мл в минуту. Наносили образец в буфере А (Mono Q), а элюцию выполняли в буфере В (Mono Q) с градиентом NaCl от 0 до 1 М. Фракции, содержащие наибольшее количество HLA-DR, были объединены на основе результатов ИФА, концентрированы в TBS с использованием фильтров Amicon 10 кДа и хранились при 4°C.

### 3.5.2 Выделение и очистка HLA-DM/HLA-DR (клеточная линия HEK293F)

После того как HEK293F экспрессировали продукт в течение 5 дней в колбе, культуральную среду центрифугировали при 11000g в течение 20 минут при 4°C. Затем супернатант фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм, концентрировали в 10 раз с использованием Pellicon (Millipore). Полученный концентрат наносили на аффинную колонку Protein G (GE Healthcare), которая предварительно уравновешивалась с помощью PBS. Элюцию проводили с

использованием 5 объемов буфера для аффинной хроматографии Protein G и затем немедленно нейтрализовали до pH 7,6. Элюаты концентрировали с помощью фильтров Amicon 30 кДа и хранили при 4°C.

### 3.5.3 Обработка тромбином для диссоциации CLIP

Для тех комплексов, которые имели пептид CLIP, прикрепленный к N-концу  $\beta$ -цепи через линкер с сайтом тромбина, производили обработку с использованием биотинилированного тромбина (Millipore) в количестве 2 U на 1 мг HLA-DR в течение 1 часа при комнатной температуре. Для избавления от биотинилированного тромбина, смесь наносили на смолу стрептавидин-агарозы (Millipore) в течение 30 минут. Затем смолу центрифугировали, собирали супернатант, переносили в TBS и хранили при 4°C.

### 3.5.4 Выделение и очистка пептидов, слитых с тиоредоксином (Trx)

Ночную культуру *E. coli* штамма BL21 (DE3), трансформированную плазмидой pET32bCN, содержащей последовательность пептида, слитого с trx, разбавляли в среде 2xYT в соотношении 1:100. Затем культуру выращивали до того момента, пока оптическая плотность не достигала OD=0,6–0,8 при 37°C. Для индукции экспрессии рекомбинантных белков добавляли 1 mM IPTG и инкубировали ещё 3–4 часа при 37°C. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 3000g при 4°C. Далее клеточный осадок ресуспендировали в 20 мл буфера нанесения для металл-хелатной хроматографии. К этой суспензии клеток добавляли лизоцим до концентрации 0,2 мг/мл и инкубировали на льду в течение 30 минут. К лизату применяли ультразвук до тех пор, пока вязкость не исчезала. Полученный раствор центрифугировали при 10000g в течение 20 минут при 4°C. Супернатант отбирали и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Далее проводили первый этап разделения белкового раствора, который

включал металл-хелатную хроматографию на колонке со смолой Ni-NTA (Qiagen). Колонку предварительно промывали буфером нанесения для металл-хелатной хроматографии, а в пробу для нанесения добавляли имидазол до концентрации 2 мМ для предотвращения неспецифического связывания. После нанесения пробы, колонку промывали 10 объемами буфера промывки для металл-хелатной хроматографии. Элюция производилась с использованием 5 объемов буфера элюции для металл-хелатной хроматографии. Полученный элюат переводили в PBS и концентрировали на фильтрах Amicon 10 кДа. Второй этап включал гель-фильтрационную хроматографию на колонке Superdex 30 (GE Healthcare). Фракции, содержащие пептиды, связанные с trx, были выбраны на основе белкового электрофореза и объединены. Затем фракции концентрировали с использованием фильтра Amicon 10 кДа, переводили в PBS и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для биотинилирования 100 мкг очищенного пептида, связанного с trx, использовали Sulfo-NHS-LC-биотин (Thermo) в соотношении 1:20. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 30 минут. После завершения реакции удаляли биотин, последовательно концентрируя и разбавляя смесь в буфере Tris-HCl (pH 9,0) и TBS с использованием фильтра Amicon 10 кДа. Биотинилированные пептиды хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### ***3.6 Аналитические методы работы с белками***

#### ***3.6.1 Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле***

Электрофорез проводился в соответствии с стандартной методикой Лэммли [171]. Для этой процедуры был подготовлен двухкомпонентный гель, состоящий из 5% концентрирующего геля и 12% разделяющего геля. Для индуцирования полимеризации сначала был добавлен N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин до достижения концентрации 0,1%, а затем персульфат аммония до достижения концентрации 0,1%. Образцы белковых препаратов были смешаны с буфером

нанесения в соотношении 1:1, затем прогреты в течение 5 минут при температуре 95°C. Полученную смесь наносили на гель, после чего производили электрофорез в электродном буфере с напряжением 90 В до тех пор, пока краситель не достигал разделяющего геля. Затем сила тока устанавливалась на уровне 25 мА на каждую пластину геля. Электрофорез осуществлялся до тех пор, пока краска полностью не выходила из разделяющего геля. По завершении этого процесса разделяющий гель отделяли и окрашивали с использованием Кумасси синего R-250. Разделяющий гель инкубировали в течение 5 минут в горячем растворе, состоящем из 10% этанола и 10% уксусной кислоты. После этой процедуры гель помещали в горячий окрашивающий раствор и выдерживали там в течение 10 минут. Затем гель проходил многократное отмывание в горячем растворе, состоящем из 10% этилового спирта и 10% уксусной кислоты, до тех пор, пока полностью не исчезало фоновое окрашивание.

### *3.6.2 Иммуноферментный анализ*

ИФА был проведен в соответствии с принципом "sandwich ELISA – enzyme linked immunosorbent assay". На первом этапе иммобилизовались антитела (для связывания HLA-DR использовался клон L243 – гибридома; для связывания бактериофагов использовались anti M13 антитела – Sigma) в лунках, используя карбонатный буфер, с концентрацией 5 мкг/мл, и инкубировали их в течение 14–16 часов при 4°C. Затем лунки промывали 3 раза в течение 5 минут с использованием раствора PBS-Tween 0,1%. Далее инкубировали с блокирующим буфером при 37°C в течение 1 часа с качанием. После блокировки удаляли блокирующий буфер и снова промывали лунки 3 раза по 5 минут в растворе PBS-Tween 0,1%. Исследуемые образцы (клеточные лизаты, содержащие HLA-DR; HLA-DR, связанный с trх-пептидом, бактериофаги) или их разведения в конъюгатном буфере добавляли в лунки по 50 мкл и инкубировали 1 час при 37°C, затем снова промывали трижды. После этого вносили по 50 мкл антител-HRP (для детекции

бактериофагов использовали anti M13-HRP – клон RL-ph2, Santa Cruz Biotechnology, разведение 1:2000 или anti FLAG-HRP – клон M2, Sigma, разведение 1:5000) или стрептавидина-HRP (для детекции trx-пептидов – Abcam, разведение 1:5000), разведенных конъюгатным буфером, и инкубировали еще 1 час при 37°C, после чего снова проводили тройную отмывку. Для детекции HLA-DR сначала проводили инкубацию с кроличьей anti МНС-II сывороткой (разведение 1:20000) в течение 1 часа при 37°C, после чего проводили тройную отмывку. Далее осуществлялась инкубация с антителами анти-rabbit-HRP (Sigma, разведение 1:5000). Для визуализации реакции во всех лунках добавляли по 50 мкл раствора тетраметилбензидина. Реакцию останавливали, добавляя 10% раствор фосфорной кислоты, и измеряли абсорбцию при длине волны 450 нм с использованием планшетного спектрофотометра Varioskan Flash (Thermo).

### *3.6.3 Оценка связывания слитого с тиоредоксином пептида с HLA-II*

Для оценки связывания пептида с HLA-DR (HLA-DRB1\*01:01, HLA-DRB1\*04:01, HLA-DRB1\*15:01), биотинилированные, слитые с trx, пептиды (750 нМ) инкубировали с рекомбинантным белком HLA-DR, несущим Fc-фрагмент (150 нМ) при 37°C в PBS в 50 мкл в течение 16–18 часов.

Комплексы HLA-DR/trx-пептид наносили на иммуносорбентный планшет (Nunc) с иммобилизованным антителами L243. Биотинилированные пептиды, связанные с HLA-DR, количественно оценивали с помощью конъюгированного с HRP стрептавидина по ранее разработанному протоколу [17].

В качестве положительного контроля использовали пептиды trx-НА<sub>306-318</sub> (для HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01) и trx-MBP<sub>85-99</sub> (для HLA-DRB1\*15:01). Пептид TL (тиоредоксин без слитого пептида) использовали в качестве отрицательного контроля.

### *3.7 Работа с культурами эукариотических клеток*

#### *3.7.1 Клеточная культура адгезионных линий*

1. Культивация проводилась при условиях 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.
2. Клетки выращивали в стерильных 6-луночных плашках или флаконах с объемом 25 см<sup>2</sup> или 75 см<sup>2</sup>.
3. Когда клетки достигали максимальной конфлюентности (80–90%), они пересаживались в новые флаконы.
4. Для посева клеток их сначала промывали дважды 5 мл раствором PBS (Gibco или ПанЭко).
5. Затем к клеткам добавляли 500 мкл 0,05% Trypsin-EDTA (Gibco) и инкубировали их в течение 1 минуты.
6. После инкубации удаляли супернатант и инкубировали клетки в термостате при 37°C в течение 5 минут.
7. Затем клетки аккуратно смывали новой средой DMEM, осуществляли подсчет и пересевали их в необходимое количество новых флаконов.

#### *3.7.2 Клеточная культура суспензионных линий*

Клетки выращивались в стерильных 6-луночных плашках или флаконах с объемами 25 см<sup>2</sup> или 75 см<sup>2</sup>.

При достижении концентрации клеток более  $2.5 \times 10^6$  клеток/мл, их пересевали:

1. Отбирали необходимое количество клеток.
2. Клетки переносили в стерильный флакон.
3. Добавляли теплую среду до достижения окончательного объема 5–15 мл.

### 3.7.3 Трансфекция для получения лентивирусных частиц

Трансфекцию плазмидных векторных конструкций в эукариотических клетках линии НЕК293Т проводили, используя реагент PEI (Invitrogen). Все манипуляции выполнялись в стерильных условиях. Для трансфекции применяли пакирующие плазмиды, включая GAG, REV и VSV-G. За день до начала трансфекции клетки НЕК293Т разводили до концентрации  $0,6 \times 10^6$  клеток/мл, таким образом, чтобы к моменту трансфекции конfluence достигала 70–90%. Компоненты для проведения трансфекции выбирали в соответствии с пропорциями, указанными в Таблице 3.

**Таблица 3. Компоненты для трансфекционной смеси.**

Плазмиды	6-ти луночный планшет
GAG	2 мкг
REV	1 мкг
VSV-G	0.4 мкг
Конструкция с геном интереса	2 мкг
PEI	8 мкл

Очищенная плазмидная ДНК разводилась в 250 мкл Opti-MEM (Gibco) (Раствор 1). Отдельно PEI добавлялся к 250 мкл Opti-MEM (Раствор 2). Раствор 2 инкубировался в течение 5 минут, затем Раствор 2 был осторожно добавлен к Раствору 1 по каплям. После этого смесь инкубировалась в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем смесь добавляли к клеткам. После 6 часов инкубации заменяли среду, и клетки инкубировали еще 48 часов. Супернатант, содержащий вирусные частицы, был собран и центрифугировался при 300g в течение 10 минут для удаления клеток. После этого супернатант фильтровали через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Вирусный супернатант хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Для трансфекции 100 мл культуры НЕК293F с плотностью 1 млн клеток/мл (экспрессия HLA-DR слитого с Fc-фрагментом) добавляли 100 мкг ДНК в 3 мл

Opti-MEM (Раствор 1). Отдельно 200 мкл PEI добавлялся к 250 мкл Opti-MEM (Раствор 2). Раствор 2 инкубировался в течение 5 минут, затем Раствор 2 был осторожно добавлен к Раствору 1 по каплям. После этого смесь инкубировалась в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем смесь добавляли к клеткам. Экспрессия HLA-DR осуществлялась в течение 5 дней.

#### *3.7.4 Выделение PBMC, моноцитов и CD4<sup>+</sup> T-клеток*

Для PBMC были выполнены следующие шаги: сначала кровь разбавляли в 3–5 раз раствором PBS, предварительно нагретым до 37°C, и наслаивали на поверхность нагретого до 37°C раствора фиколла (ПанЭко). Затем проводили центрифугирование в течение 45 минут при 650g с минимальным разгоном и торможением центрифуги. Далее изолированные PBMC промывали дважды раствором PBS. Для дифференциации ДК PBMC высевали в культуральные флаконы площадью 25 см<sup>2</sup> в концентрации 6x10<sup>6</sup> клеток/мл. После 2 часов инкубации несвязавшиеся клетки удаляли и среду заменяли на среду RPMI full, содержащую IL-4 (100 нг/мл) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) (50 нг/мл) (StemCellTechnologies). ДК дифференцировали в течение 6 дней со сменой среды каждые 2 дня. Бактериальный липополисахарид (10 мкг/мл) добавляли через 6 дней и ДК культивировали в течение 24 часов для матурации. CD4<sup>+</sup> T-клетки выделяли из PBMC с помощью набора Human EasySep CD4<sup>+</sup> T cell isolation kit (StemCellTechnologies) согласно инструкции производителя.

#### *3.7.5 Трансдукция эукариотических клеток лентивирусами*

Клетки в концентрации 1x10<sup>6</sup> клеток/мл были смешаны с 500 мкл лентивирусного супернатанта в 6-луночной планшете, к которому добавили 1 мкг/мл Полибрена (Millipore). Затем планшеты центрифугировали при 1200g в



течение 90 минут при 32°C и инкубированы в течение 16–18 часов при 37°C. После этого среду заменяли свежей и через 2 дня проводили оценку трансдукции с помощью проточной цитофлуорометрии с использованием прибора NovoCyte 2060 (ACEA Biosciences). Клеточную линию Jurkat 76 TPR модифицировали кДНК молекул CD4 и определенного TCR. Через 3 дня после трансдукции CD4, Jurkat 76 TPR CD4<sup>+</sup> отбирали с помощью 1 мкг/мл пурамицина (InvivoGen) в течение 7 дней. Экспрессию молекул CD4 оценивали с помощью anti-human CD4-APC-Alexa Fluor 750 (клон S3.5, Thermo), anti-human TCR-APC (клон IP26, Biolegend) и anti-human CD3-APC (клон ОКТ3, Biolegend), соответственно. Клеточную линию HeLa модифицировали кДНК молекул CD80, а также HLA-DR совместно с антигенными пептидом на N-конце β цепи или нет. Экспрессию оценивали с помощью anti-human CD80-PE (клон W17149D, Biolegend) и anti-human HLA-DR-APC (клон L243, Biolegend), соответственно. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo (BD Biosciences).

### *3.7.6 Получение искусственных внеклеточных везикул*

EVs были созданы на основе клеточных линий HeLa с использованием химического агента цитохалазин В. Процесс включал следующие этапы:

1. Клетки HeLa были обработаны трипсином, затем промыты PBS и ресуспендированы в 5 мл буфера для получения EVs (DMEM, 10% FBS, 1% Pluronic F-127) с концентрацией  $1 \times 10^6$  клеток/мл.
2. Обработка цитохалазином В (Sigma) проводилась при концентрации 10 мкг/мл в течение 30 минут при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.
3. После обработки цитохалазином В клеточную суспензию интенсивно встряхивали в течение 30 секунд.
4. Затем полученную суспензию клеток дважды центрифугировали (при 4°C, 100g в течение 5 минут) для отделения клеток.

5. Сбор EVs из супернатанта осуществляли, проводя центрифугирование при 4°C, 3000g, в течение 20 минут.
6. Полученные EVs ресуспендировали в буфере для получения EVs и анализировали методом проточной цитофлуориметрии с использованием прибора NovoCyte 2060 (ACEA Biosciences). Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo (BD Biosciences).

### *3.7.7 Проточная цитофлуориметрия*

Для окрашивания клеток проводили следующие шаги:

1.  $0,1 \times 10^6$  клеток центрифугировали в течение 10 минут при 300g.
2. Осадок ресуспендировали в PBS.
3. К клеткам добавляли соответствующие антитела в рекомендованных производителем концентрациях (Приложение 3. Таблица 11).
4. Инкубировали на льду в темноте в течение 1 часа.
5. Клетки промывали 2 раза пятью объемами PBS.
6. Ресуспендировали клетки в 100 мкл PBS для последующего цитофлуориметрического анализа на приборе NovoCyte 2060 (ACEA Biosciences). Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo (BD Biosciences).

Для окрашивания искусственных EVs проводили следующие действия:

1. К  $0,1 \times 10^6$  EVs добавляли антитела для характеристики поверхностных маркеров.
2. Инкубировали в течение 30 минут при 4°C.
3. Трижды промывали EVs 500 мкл в буфере (DMEM, 10% FBS и 1% Pluronic F-127) при скорости центрифугирования 5000g в течение 10 минут.
4. Далее проводили анализ методом проточной цитофлуориметрии на приборе NovoCyte 2060 (ACEA Biosciences). Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo (BD Biosciences).

### *3.7.8 Идентификация аутоантигенных пептидов, представленных на молекулах HLA-DR дендритных клеток человека, с помощью метода жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии*

ДК, полученные из моноцитов, снимали с помощью клеточного скребка, окрашивали антителами anti-human CD11c-FITC (клон 3.9, Biolegend), anti-human CD80-PE (клон W17149D, Biolegend), anti-human HLA-DR-APC (клон L243, Biolegend) для подтверждения фенотипа. Далее лизировали в PBS с 0,25% дезоксихолата натрия в присутствии ингибиторов, не содержащих ЭДТА (Roche), PMSF, пепстатина, ЭДТА в течение 1 часа при 4°C, после чего центрифугировали при 16000g в течение 20 минут. Клеточные лизаты инкубировали с колонкой Protein A в течение 30 минут при 4°C. Полученный элюат инкубировали в течение 14–16 часов при 4°C со смолой Protein A с ковалентно связанным антителом L243. Смолу готовили согласно опубликованному протоколу [172]. Смолу промывали 40 объемами PBS. Комплексы pMHC элюировали 0,1% ТФУ (трифторуксусная кислота) и нагревали при 70°C в течение 10 минут для элюирования пептидов.

Альтернативно, клеточные лизаты наносили на колонку Superdex75 (GE Healthcare). Собирали высокомолекулярные фракции, где наличие молекул HLA-DR подтверждали ИФА с иммобилизованными mAb L243. Детекцию проводили с помощью кроличьей поликлональной сыворотки против MHC-II и конъюгированных с HRP антикроличьих антител (Sigma). Фракции лиофилизировали и обессоливали с использованием SDB-RPS StageTips, как описано ранее [173].

Анализ методом жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS – liquid chromatography–mass spectrometry) проводился с использованием масс-спектрометра Q Exactive HF Orbitrap (Thermo), соединенного с системой Ultimate 3000 Nano LC (Thermo) через источник наноэлектроспрея (Thermo). Пептиды загружали в колонку-ловушку Acclaim

PerMap 100 (100 мкм × 2 см) и разделяли на колонке Acclaim PerMap 100 (75 мкм × 50 см) (Thermo). Корреляцию MS/MS-спектров с пептидными последовательностями проводили с использованием программного обеспечения PEAKS Studio 8.0 [174].

### 3.7.9 Внутриклеточное окрашивание на провоспалительные цитокины IFN- $\gamma$ и IL-2

CD4<sup>+</sup> Т-клетки или PBMC высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток на лунку в 100 мкл бессывороточной среды AIM-V (Gibco). К CD4<sup>+</sup> Т-клеткам добавляли CD80<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> клетки HeLa или EVs в соотношении 1:1 в течение 3 часов. В случае использования CD80<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> HeLa добавляли синтетический пептид в финальной концентрации 1 мкМ. После этой первоначальной стимуляции добавляли брэфелдин А (BrA) (Merck) до конечной концентрации 10 мкг/мл. Равное количество BrA добавляли к нестимулированным клеткам служащих отрицательным контролем, а также к клеткам служащим положительным контролем, которые были стимулированы иономицином в концентрации 1 мкМ и фобол-12-миристан-13-ацетатом (PMA) в концентрации 40 нМ (Merck) в течение 2 часов. После добавления BrA планшеты инкубировали в течение 14–16 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки промывали PBS и окрашивали флуоресцентными антителами анти-CD3-FITC (клон ОКТ3, BioLegend), анти-CD4-APC-Cy7 (клон S3.5, Thermo) в течение 15 минут. После окрашивания клетки промывали PBS и фиксировали 2% параформальдегидом (Merck) при 4°C в течение 20 минут. После фиксации клетки промывали 0,2% раствором сапонины в PBS (Merck) и окрашивали флуоресцентными антителами анти-IFN $\gamma$ -PE (клон 4S.B3, BioLegend) и/или анти-IL-2-APC (клон MQ1-17H12, BioLegend) в течение 40 минут в 0,2% сапонине в PBS. Окрашенные клетки анализировали с использованием Novocyte 2060 (ACEA Biosciences). Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo (BD Biosciences).

### *3.7.10 Стимуляция CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR везикулами*

CD80<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> EVs или клетки HeLa совместно культивировали с антиген-специфическими CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR линиями ( $1 \times 10^5$ /лунку) в нужном соотношении (1:10, 1:2, 1:1, 2:1, 5:1) в 96-луночных планшетах с плоским дном в конечном объеме 200 мкл. В случае использования CD80<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> HeLa добавляли синтетический или пептид, слитый с тиоредоксином [175], в концентрациях 0,5-100 мкМ. В качестве положительного контроля использовали стимуляцию иономицином в концентрации 1 мкМ и PMA в концентрации 40 нМ (Merck). Через 24 часа клетки собирали и экспрессию репортерного зеленого флуоресцентного белка (GFP) измеряли с использованием проточного цитометра Novocyte 2060 (ACEA Biosciences). Альтернативно стимулированные CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR окрашивали anti-human CD69-APC (клон FN50, Biolegend), чтобы оценить уровень экспрессии данного маркера активации Т-клеток. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo (BD Biosciences).

### *3.7.11 Антиген-специфическая экспансия CD4<sup>+</sup> Т-клеток*

Для внутриклеточной окраски на провоспалительные цитокины, CD80<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> EVs совместно культивировали с CD4<sup>+</sup> Т-клетками в 24, 48, 96-луночных планшетах с плоским дном в соотношении 1:1 в течение трех дней в RPMI full. Затем среда заменялась на содержащую IL-2 (12 U/мл) и замена происходила каждые два дня в течение 10 дней. Последняя замена среды происходила без добавления IL-2. Далее происходила рестимуляция EVs в соотношении 1:1. В качестве положительного контроля использовали стимуляцию иономицином в концентрации 1 мкМ и PMA в концентрации 40 нМ (Merck).

Для анализа последовательностей TCR CD4<sup>+</sup> T-клетки стимулировали EVs в соотношении 1:1 в течение трех дней. Далее каждые два дня производилась смена среды с добавлением IL-2 (12 IU/мл) до 2 недель.

РВМС ресуспендировали при концентрации  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл в RPMI full с IL-4 (100 нг/мл), GM-CSF (50 нг/мл) и Flt3-L (Fms-related tyrosine kinase 3 ligand) (50 нг/мл) (StemCell Technologies). Клеточную суспензию (200 мкл) добавляли в 96-луночный круглодонный планшет (Corning) и инкубировали в течение 24 часов. Затем половину среды меняли на среду с конечной концентрацией 1 мкМ каждого из синтетических пептидов и 10 мкг/мл бактериального липополисахарида и инкубировали в течение 24 часов. Затем половину среды меняли на конечную концентрацию IL-2 (10 IU/мл), IL-7 (10 нг/мл) и IL-15 (10 нг/мл). Среду меняли каждые 2–3 дня до 10 дня. Последняя смена среды была без ростовых факторов.

### *3.7.12 Секвенирование T-клеточных рецепторов*

Тотальную РНК из CD4<sup>+</sup> T-клеток после антиген-специфичной экспансии выделяли с помощью Qiazol (Qiagen). Далее приготовление библиотек для широкомасштабного секвенирования осуществлялось с помощью набора Human TCR RNA multiplex (MiLaboratories) по рекомендациям производителя. NGS секвенирование осуществлялось с помощью платформы BGI (Beijing Genomics Institute).

### *3.7.13 Конфокальная микроскопия*

Клетки HeLa или EVs наносили на 96-луночный стеклянный планшет для визуализации, покрытый поли-L-лизином (Eppendorf), и центрифугировали при 100g в течение 10 минут при комнатной температуре. Прикрепленные клетки/EVs фиксировали в 4% параформальдегиде в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре и окрашивали Hoechst 33342 (Invitrogen), антителами против CD80-PE

человека (клон W17149D, Biolegend) и антителами против HLA-DR-APC человека (клон L243, Biolegend). Конфокальные изображения были получены с помощью микроскопа LSM 980 (ZEISS).

### *3.7.14 Статистический анализ*

Статистический анализ проводился с помощью GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software) и Python. Обозначения на всех рисунках: ns –  $p \geq 0.05$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## 4 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1 Сравнение систем фагового дисплея антигенных пептидов HLA-II

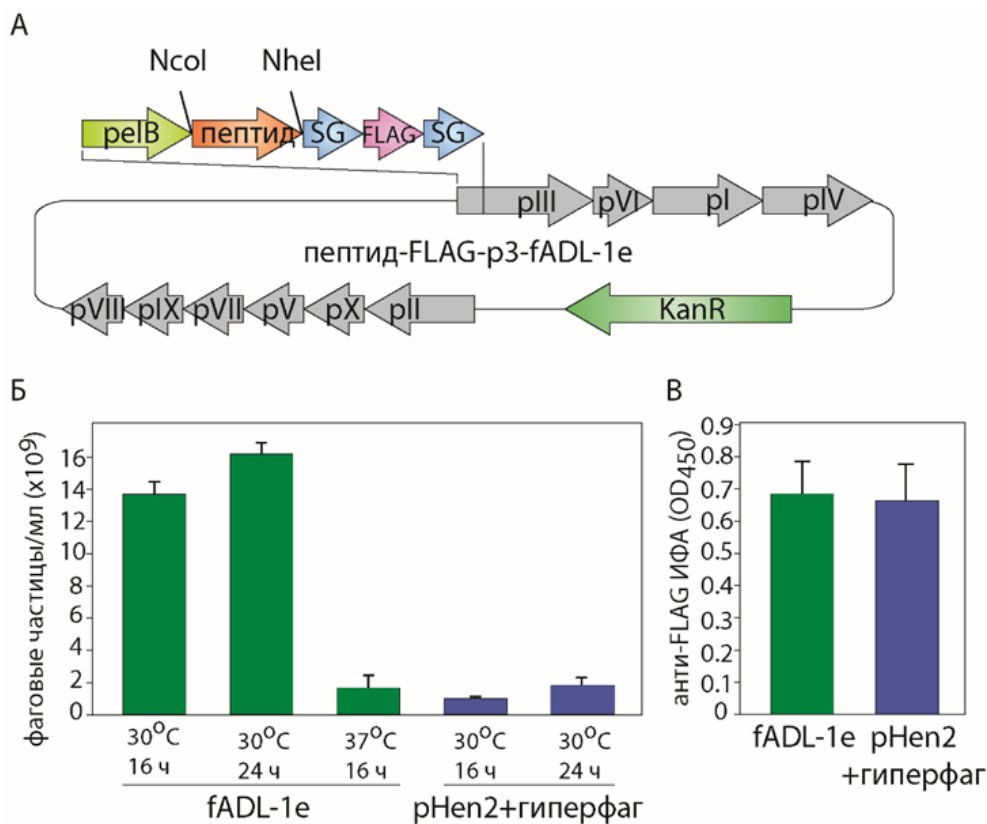
Идентификация новых лигандов HLA-II *in vitro* представляет собой неординарную задачу, обусловленную невозможностью воссоздания нативной среды для HLA-II и низкой растворимостью этого белкового комплекса в водных растворах, связанной с наличием трансмембранных доменов. Ранее сообщалось, что укороченная форма HLA-II обладает повышенной растворимостью [171] при сохранении большинства важных структурных особенностей. В связи с этим в качестве рецептора была использована рекомбинантная форма человеческого HLA-II, а именно HLA-DRB1\*01:01, с редуцированными трансмембранными доменами как  $\alpha$ , так и  $\beta$  цепей, слитыми с лейциновой застежкой Jun-Fos. Для обеспечения оптимальных условий загрузки пептидов на HLA-DRB1\*01:01 в условиях *in vitro* применяли рекомбинантный HLA-DM, слитый с Fc-фрагментом, который выполнял функцию каталитического шаперона, способствующего обмену пептидов [176].

Антигенные пептиды, способные связываться с HLA-II, экспонировались на поверхности бактериофагов, а их отбор осуществляли методом фагового дисплея. Этот метод позволяет одновременно тестировать широкий спектр пептидных последовательностей на их способность к связыванию с HLA-II. Более того, каждая бактериофаговая частица несёт специфический пептид, который связан с соответствующей ДНК-последовательностью в геноме фага, что существенно упрощает идентификацию антигенных пептидов [177].

Для выбора оптимальной системы отбора лигандов HLA-II *in vitro* применяли фаговый дисплей потенциальных пептидных эпитопов с использованием двух типов генетических конструкций: fADL-1e (Рисунок 8А) и pHen2. Конструкция fADL-1e представляет собой фаговый вектор, тогда как pHen2 является фagemидным вектором и требует наличия фага-помощника для экспрессии



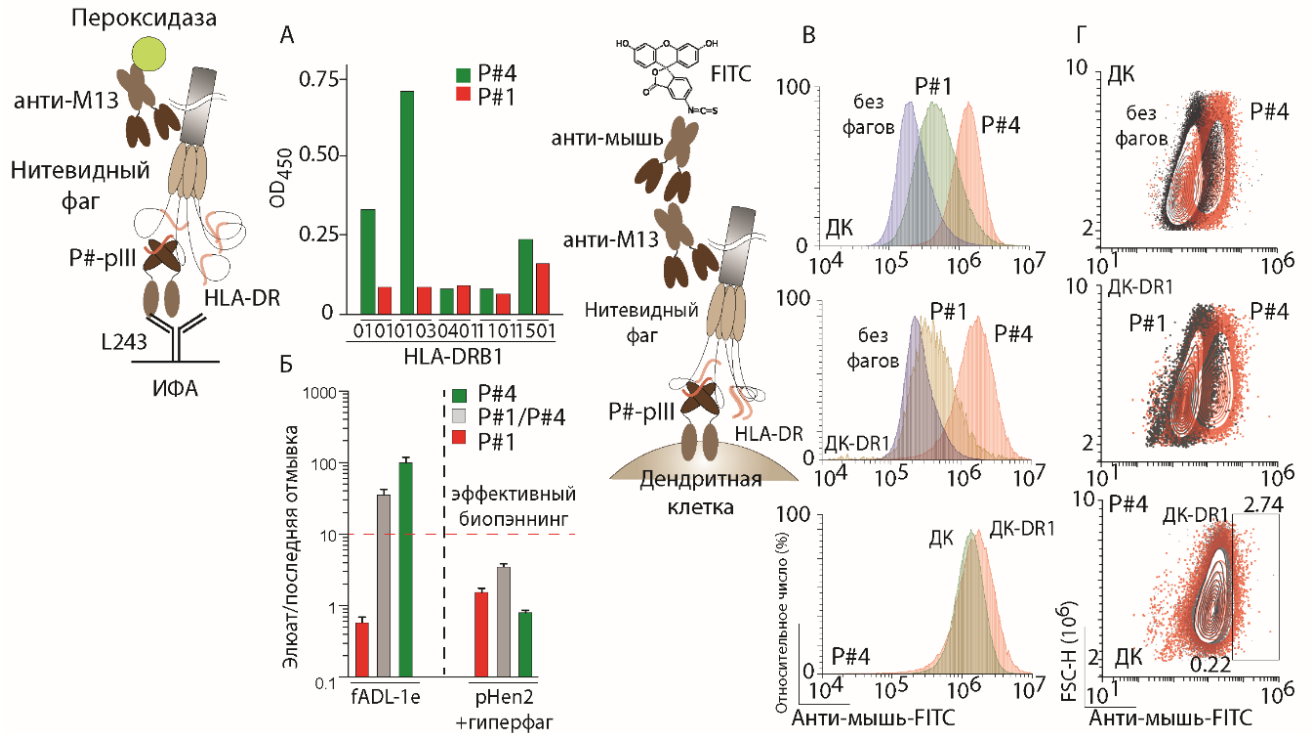
бактериофаговых частиц. Среди нитевидных бактериофагов (M13, f1, fd) наиболее часто для экспонирования пептидов используют белки p3 и p8 [178]. Однако экспонирование на белке p8, представленном тысячами копий на бактериофаговой частице, может приводить к конформационным изменениям пептидов и снижению их сродства к таргетному белку. В то же время белок p3, имеющий всего пять копий, минимизирует вероятность подобных изменений. Обе генетические конструкции обеспечивали экспрессию нужного пептида на поверхности белка p3. Дополнительно, через серин-глициновые линкеры к конструкции добавляли FLAG-эпитоп для детекции. При сравнении уровней экспрессии фаговых частиц при 30°C установлено, что бактериофаги на основе fADL-1e продуцировались в больших количествах по сравнению с pHen2 (Рисунок 8Б), однако уровень экспрессии FLAG-эпитопа в обеих системах был идентичным (Рисунок 8В). Данные результаты были получены в соавторстве с Овчинниковой Л.А. [179].



**Рисунок 8. Сравнение выхода фаговых частиц, экспрессированных с использованием различных генетических конструкций (А) Схематическое изображение конструкции fADL-1e, кодирующей пептид, экспонированный на белке p3 через серин-глициновые линкеры и эпитоп FLAG. (Б) Определению**

количества фаговых частиц, полученных в различных системах при варьировании времени и температуры экспрессии. **(В)** Оценка уровня экспрессии эпитопа FLAG ( $1 \times 10^9$  частиц/мл) в fADL-1e и pHen2 системах.

В качестве модельного лиганда был выбран пептид белка гемагглютинина P#4 вируса гриппа А (PKYVKQNTLKLAT) [180], который, согласно литературным данным, обладает высокой аффинностью к HLA-DRB1\*01:01 [44]. В качестве отрицательного контроля использовали иррелевантный пептид P#1 (CILDLPKFC). Была выполнена проверка связывания бактериофагов, экспонирующих пептиды P#1 и P#4, с HLA-DRB1\*01:01, а также аллелями HLA-DRB1\*01:03, 04:01, 11:01, 15:01 методом ИФА (Рисунок 9А). HLA-DRB1\*01:01 демонстрировал специфическое связывание с P#4. HLA-DRB1\*01:03 также продемонстрировал связывание с P#4, что обусловлено высокой степенью гомологии с HLA-DRB1\*01:01 (различие в трех ак). Далее был проведен фаговый отбор, в котором использовались три группы бактериофагов: (i) несущие только пептид P#4, (ii) несущие только P#1 и (iii) смесь фагов, несущих P#4 и P#1, в соотношении 1:100 (Рисунок 9Б). Для всех трех вариантов был проведен один раунд селекции. После взаимодействия фаговых частиц с HLA-DRB1\*01:01 комплексы фаг-HLA-DR захватывались с помощью anti-human HLA-DR антител, предварительно иммобилизованных на иммуносорбентных пробирках. После тщательной отмывки связанные фаги элюировались и использовались для инфицирования клеток *E. coli* TG1.



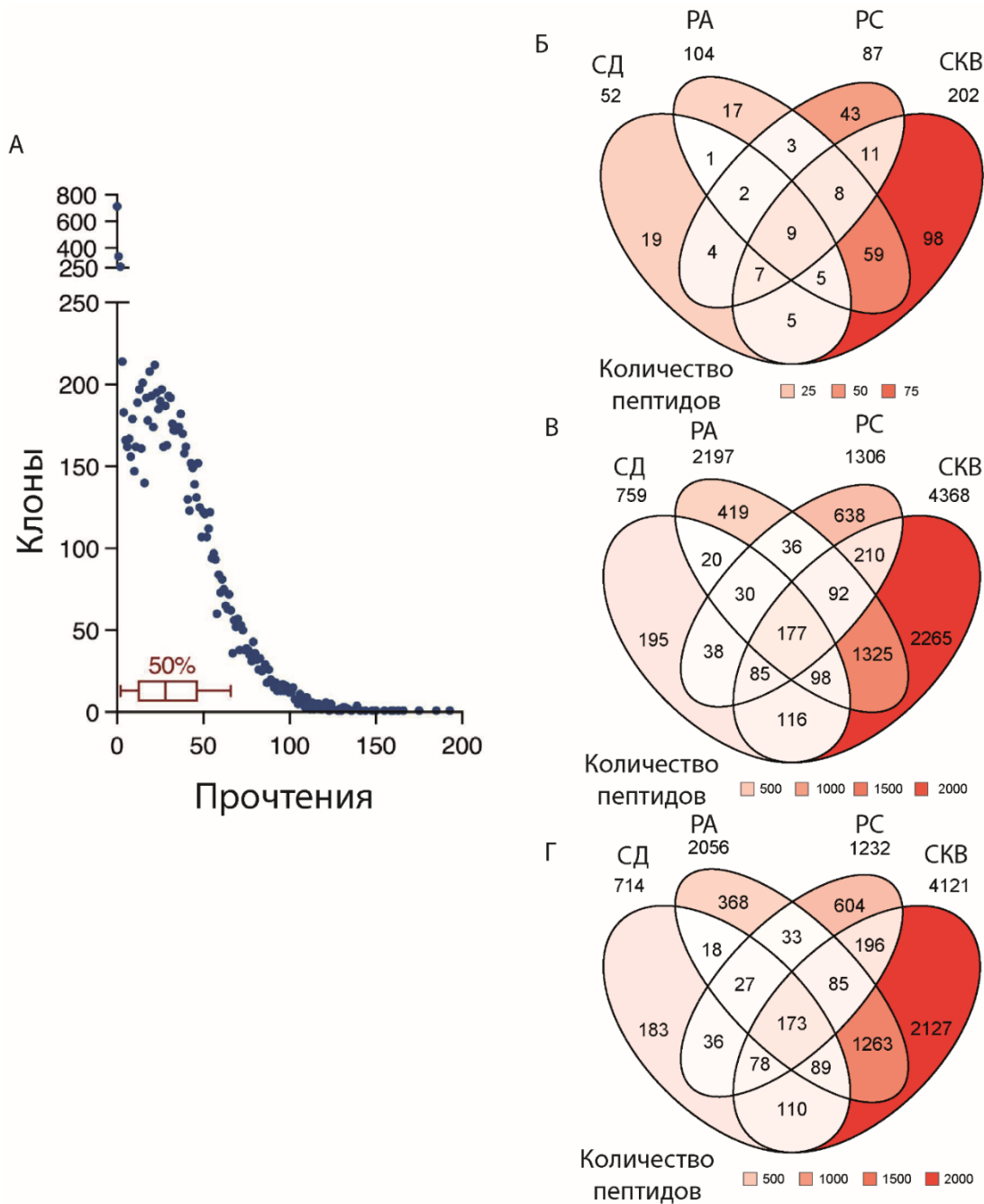
**Рисунок 9. Отбор антигенных пептидов, экспонированных на fd бактериофагах, на HLA-II.** (А) Анализ связывания антигенных пептидов, экспонированных на фаговых частицах, с различными рекомбинантными молекулами HLA-DR (HLA-DRB1\*01:01; 01:03, 04:01, 11:01, 15:01) методом ИФА; (Б) Отбор антигенных пептидов на HLA-DRB1\*01:01 с помощью фагового дисплея на основе вектора fADL-1e (слева) и pHen2 (справа). Рекомбинантный HLA-DRB1\*01:01 (в комплексе с HLA-DM) инкубировали с его пептидным лигандом (P#4), иррелевантным пептидом (P#1) или их смесью (соотношение P#4/P#1 = 1:100), экспонированными на поверхности бактериофага. Комплексы фаг-HLA-DR захватывались антителами против HLA-DR, иммобилизованными на сорбенте. После серии отмывок и элюции полученными бактериофагами инфицировали клетки *E. coli* TG1. Для каждого эксперимента определяли КОЕ в последней отмывке и элюате. Отношение КОЕ элюата к последней отмывке ( $n = 3$ ) представлено на логарифмической оси ординат. Значение, превышающее один порядок, указывает на эффективный отбор; (В,Г) Взаимодействие HLA-DRB1\*01:01, экспрессированного на ДК, с антигенными пептидами, экспонированными на бактериофагах на основе fADL-1e. Нетрансдуцированные ДК и ДК, трансдуцированные HLA-DRB1\*01:01 (ДК-DR1), инкубировали с бактериофагами fADL-1e, экспонирующими пептиды P#1 или P#4 в концентрации  $7 \times 10^{12}$  фаговых частиц/мл. Детекция бактериофагов проводилась методом проточной цитофлуориметрии с использованием последовательного окрашивания anti-M13 и anti-mouse IgG-FITC. ДК – дендритные клетки.

Существенная разница между значением КОЕ, обнаруженных на последнем этапе отмывки, и элюированных образцов наблюдалась только для системы на основе fADL-1e. Заметное увеличение КОЕ до двух порядков было обнаружено во фракциях элюата по сравнению с соответствующими фракциями последней стадии отмывки в случае отборов с фагами, несущими Р#4, и смесью Р#4/Р#1. Напротив, отбор с фагами, несущими irrelevantный пептид Р#1, практически не выявил клонов в элюате, что подтверждает минимальное неспецифическое взаимодействие HLA-DR с фагами. В случае использования системы на основе pHen2 не было выявлено значительных различий между КОЕ, полученными на последнем этапе отмывки, и в элюате, что указывает на её меньшую эффективность по сравнению с системой fADL-1e. Также было проведено исследование способности связывания антигенных пептидов, экспонированных на бактериофагах, с молекулами HLA-DRB1\*01:01, представленными на клеточных линиях. Клеточный анализ продемонстрировал специфическое связывание фагов на основе вектора fADL-1e, экспонирующего пептид Р#4, по сравнению с фагами, несущими irrelevantный пептид Р#1, с клеточной линией мышинных ДК (DC2.4), экспрессирующей рекомбинантный HLA-DRB1\*01:01 (Рисунок 9В, Г). Однако стоит отметить, что фаги, экспрессирующие Р#4, также связывались с нетрансдуцированными ДК. Это можно объяснить способностью пептида Р#4, связывать многие варианты HLA-DR, что было показано ранее [181,182] и в данном исследовании (Рисунок 9А). Мышечные клетки DC2.4 также экспрессируют мышечные МНС-II, которые также потенциально могут связывать фаги, экспрессирующие пептид Р#4.

Таким образом, для дальнейшего поиска антигенных пептидов, способных связываться с HLA-DR, было решено использовать метод фагового отбора на основе экспрессионной системы fADL-1e.

#### ***4.2 Аутоантигенная библиотека пептидов на основе генетической конструкции fADL-1e***

Как было отмечено в литературном обзоре, поиск новых аутоантигенных пептидов, способных связываться с положительно ассоциированными с АЗ аллелями HLA-II, актуален для разработки новых терапевтических подходов к лечению этих заболеваний. В этой связи в лаборатории биокатализа ГНЦ ИБХ РАН ранее была создана аутоантигенная библиотека, содержащая аутоантигены, ассоциированные с различными аутоиммунными патологиями и процессами протеасомной деградации [183]. Аутоантигенные белки, входящие в библиотеку, вызывают гуморальный иммунный ответ при различных АЗ, согласно ранее опубликованным данным (AAgAtlas – <http://biokb.ncpsb.org/aagatlas>). Наибольшую часть библиотеки, ассоциированную с АЗ, составляли аутоантигенные пептиды, соответствующие белкам, ассоциированным с сахарным диабетом (СД), РА, РС и СКВ. При проверке представленности синтезированной библиотеки с помощью NGS было детектировано 94% пептидов от общего теоретического числа (Рисунок 10А).



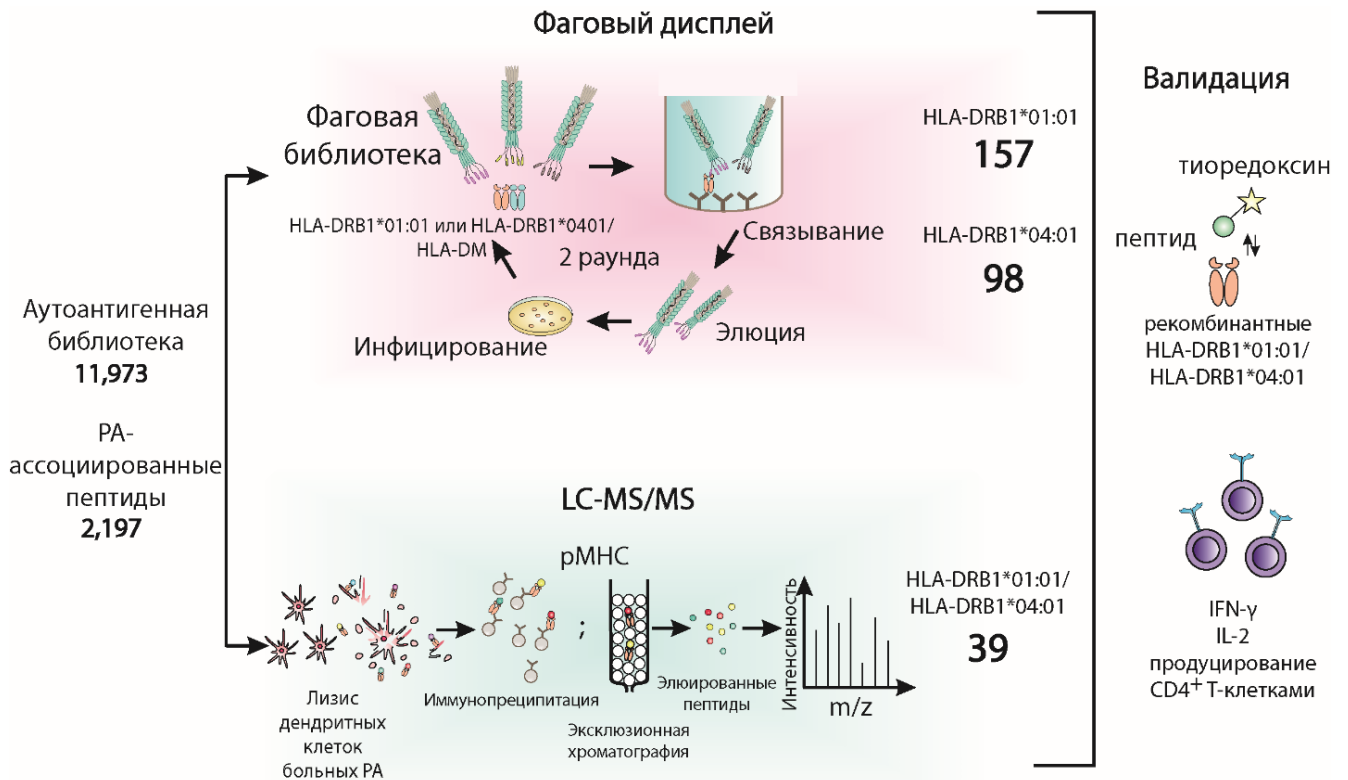
**Рисунок 10. Состав библиотеки аутоантигенов.** (А) Анализ распределения прочтений среди клонов полученной синтетической библиотеки с помощью NGS секвенирования. (Б) Распределение аутоантигенных белков, ассоциированных с СД, РА, РС и СКВ, в теоретической библиотеке. (В) Распределение аутоантигенных пептидов, соответствующих белкам, ассоциированных с СД, РА, РС и СКВ, в теоретической библиотеке. (Г) Распределение аутоантигенных пептидов синтезированной библиотеки ДНК. СД – сахарный диабет, РА – ревматоидный артрит, РС – рассеянный склероз, СКВ – системная красная волчанка.

Для поиска аутоантигенных пептидов были выбраны 104 и 202 аутоантигенных белка, для которых ранее был задокументирован гуморальный иммунный ответ при РА и СКВ, соответственно (Рисунок 10Б). Основная концепция использования такой библиотеки для поиска аутоантигенных пептидов HLA-II заключалась в выявлении новых аутоиммунных эпитопов для CD4<sup>+</sup> Т-клеток среди известных потенциальных эпитопов В-клеток. Полученная аутоантигенная библиотека представляла собой 11973 пептида длиной 44 ак с перекрытием в 14 ак, включая 2197 и 4368 пептидов, связанных с развитием РА и СКВ, соответственно (Рисунок 10В). Данные секвенирования показали, что 2056 пептидов для РА и 4121 пептид для СКВ были представлены в синтезированной аутоантигенной библиотеке (Рисунок 10Г). Учитывая, что ранее было продемонстрировано, что фаговый дисплей эффективно функционирует в экспрессионной системе fADL-1e, для дальнейшего фагового отбора эта аутоантигенная библиотека была использована в системе fADL-1e.

#### ***4.3 Использование аутоантигенной библиотеки для поиска новых аутоантигенных пептидов, ассоциированных с РА***

Для поиска новых аутоантигенных пептидов, ассоциированных с РА, были выбраны два РА-ассоциированных аллеля – HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01. Экспериментальный процесс поиска этих пептидов можно разделить на два основных этапа: (i) фаговый отбор и (ii) оценка презентации РА-ассоциированных аутоантигенных пептидов на ДК, полученных из моноцитов, пациентов с РА, несущих аллели HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01. Поскольку определенные клоны из аутоантигенной библиотеки могут не проэкспрессироваться, для повышения надежности идентификации пептидов, связывающихся с HLA-DR, ассоциированными с РА, был предложен двойной подход, сочетающий скрининг фаговой аутоантигенной библиотеки с прямой идентификацией потенциально аутоантигенных пептидов в иммунопептидоме HLA-DR больных РА. На этапе

валидации отобранные пептиды были протестированы на связывание с рекомбинантными молекулами HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 *in vitro*, а также оценена их способность индуцировать провоспалительный CD4<sup>+</sup> Т-клеточный ответ у пациентов с РА (Рисунок 11). Дополнительно эффективность фагового отбора оценивалась с использованием программы NetMHCIIpan 4.0, которая оценивает аффинность пептидов к определенным аллелям HLA-II [184].



**Рисунок 11. Идентификация РА-ассоциированных антигенных пептидов, презентированных на HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 с помощью анализа данных скрининга аутоантигенной фаговой библиотеки и масс-спектрометрии иммунопептидома HLA-DR.** Отбор антигенных пептидов проводился параллельно с помощью фагового дисплея аутоантигенной библиотеки и анализа иммунопептидома HLA-DR ДК, полученных из моноцитов больных РА и HDs, положительно генотипированных по HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01. Иммунопептидом HLA-DR был проанализирован с помощью LC-MS/MS. Отобранные РА-ассоциированные аутоантигенные пептиды впоследствии были получены в рекомбинантной форме, и их связывание с HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 было подтверждено индивидуально *in vitro*. Была оценена способность найденных пептидов связывать и активировать CD4<sup>+</sup> Т-клетки в составе HLA-DR. LC-MS/MS – метод жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии.



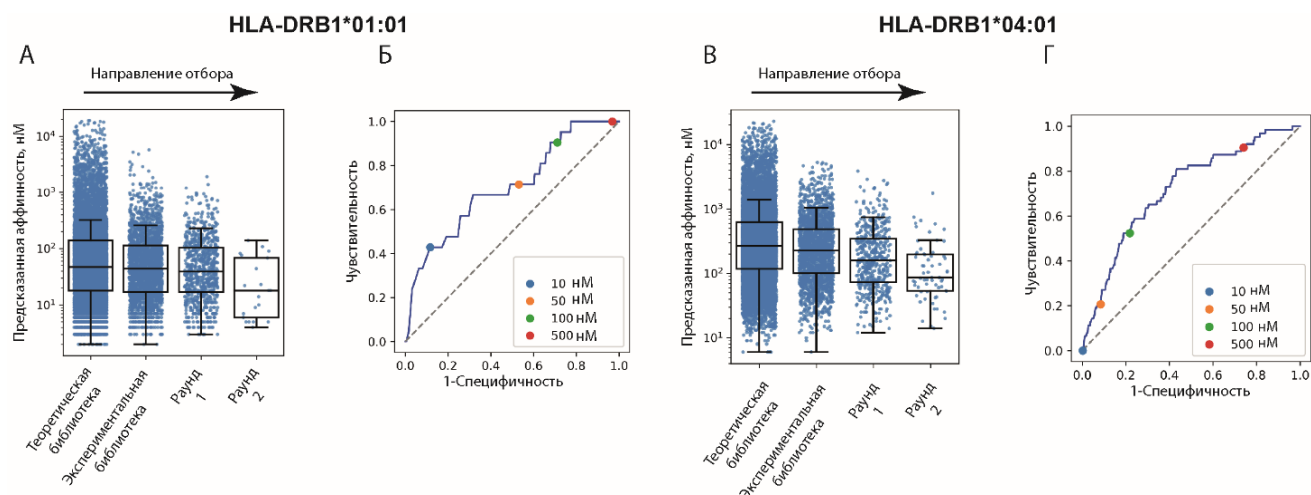
Мы провели два раунда фагового отбора с использованием библиотеки, полученной с помощью системы fADL-1e, и рекомбинантных белков HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01, экспрессируемых в клеточной линии *D. melanogaster* S2 и, соответственно обладающих пустой пептид-связывающей бороздой. Шаперон HLA-DM использовали как природный катализатор загрузки антигенных пептидов в пептид-связывающую борозду молекул HLA-DR. Ранее было показано, что кинетика загрузки антигена на молекулы HLA-DR может существенно влиять на эффективность презентации пептидов, при этом антигены с высоким сродством, но низкой кинетикой загрузки, могут презентироваться на клеточной поверхности с меньшей вероятностью, что объясняется конкурентной средой в поздних эндосомах АПК [17]. Шаперон HLA-DM облегчает кинетику загрузки антигена на молекулы HLA-DR, дифференциально катализируя пептидный обмен и редактируя репертуар антигенов, представленных на молекулах HLA-II [185]. Значимость роли HLA-DM для презентации эпитопов Т-клеток, ассоциированных с РА, была продемонстрирована для аллелей риска HLA-DR (DRB1\*01:01, DRB1\*01:02, DRB1\*04:01 и DRB1\*04:04), несущих общий эпитоп [186]. Поэтому в нашем исследовании мы включили шаперон HLA-DM в фаговый дисплей с целью создания естественных условий для загрузки аутоантигенных пептидов на молекулы HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01.

В качестве контроля были проведены два идентичных раунда отбора, в которых отсутствовал белок HLA-DR, при сохранении тех же условий. Последовательности элюированных аутоантигенных пептидов были определены после каждого этапа фагового дисплея с помощью NGS. Анализировались данные как из исходной библиотеки, так и после каждого раунда селекции на HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01, а также из соответствующих контрольных раундов. Начиная с исходной библиотеки, содержащей 11973 пептида, разнообразие лигандов снизилось до 770 пептидов (первый раунд) и 21 последовательности (второй раунд) для HLA-DRB1\*01:01, и до 450 пептидов

(первый раунд) и 63 последовательностей (второй раунд) для HLA-DRB1\*04:01 после вычитания пептидов, обнаруженных в отрицательных контрольных отборах.

#### ***4.4 Предсказывание in silico связывания пептидов с HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 и оценка точности фагового дисплея.***

Мы определяли расчетную аффинность связывания с HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 для репертуаров пептидов в исходной библиотеке и после раундов селекции с помощью программы NetMHCIIpan. Результаты фаговых отборов и виртуальных предсказаний показали статистически значимое сходство. В частности, предсказанная аффинность связывания для пептидов, отобранных после второго раунда, была в среднем выше, чем для остальных пептидов ( $p < 0,002$ , Рисунок 12А, 12В). Для дальнейшего анализа мы использовали пороговое значение аффинности связывания, например 50 нМ, чтобы выделить два репертуара пептидов: высокоаффинные (с аффинностью выше порогового значения) и низкоаффинные (с аффинностью ниже порогового значения). Это позволило рассчитать чувствительность (доля высокоаффинных пептидов среди пептидов после двух раундов отбора) и специфичность (доля низкоаффинных пептидов, исключенных после второго раунда отбора). Далее, предсказанные пороговые значения аффинности связывания были нанесены на график с полученными значениями чувствительности и специфичности (ROC) (Рисунок 12Б, 12Г). Площади под кривыми ROC (AUC) для HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 составляли 0,7 и 0,72 соответственно, что указывает на умеренную и значительную степень соответствия между экспериментальными результатами фагового дисплея и расчетными предсказаниями.



**Рисунок 12. Определение эффективности фаговых отборов с помощью NetMHCIIpan.** А, Б: Прогнозируемая аффинность лигандов достоверно ( $p < 0,002$ ) снижается при отборе от исходной теоретической библиотеки ко второму раунду отбора: (А) – HLA-DRB1\*01:01, (Б) – HLA-DRB1\*04:01. В, Г: ROC-кривые для лигандов, не прошедших ни одного отбора, против прошедших второй отбор: (В) - HLA-DRB1\*01:01, (Г) - HLA-DRB1\*04:01. Цветными точками дополнительно отмечены часто используемые пороговые значения (10, 50, 100, 500 нМ). Статистический анализ проводился с использованием теста Манна-Уитни.

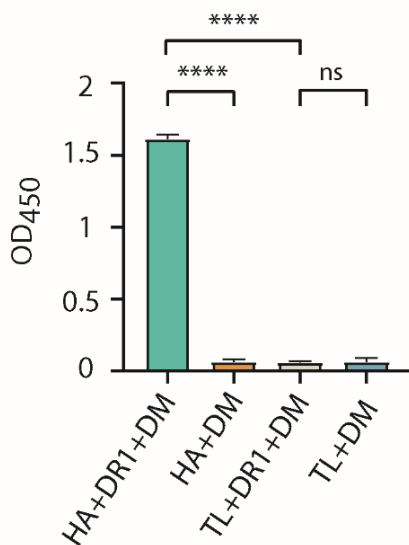
#### 4.5 Оценка связывания индивидуальных аутоантигенных пептидов с HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01

Точность и надежность результатов фагового дисплея была дополнительно подтверждена экспериментами по связыванию пептидов с HLA-DR *in vitro*. Рекombинантные аутоантигенные пептиды, отобранные с помощью фагового дисплея, были экспрессированы в *E. coli* в виде слитых белков с бактериальным *trx* в качестве белка носителя [187] Это позволило подтвердить связывание пептидов с рекомбинантными молекулами HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01, полученными в комплексе с Fc-фрагментом человеческого иммуноглобулина. Экспрессия HLA-DR осуществлялась в клеточной линии HEK293F, что способствовало более быстрому и высокому уровню экспрессии по сравнению с клеточной линией S2. В используемой конструкции для экспрессии HLA-DR был включен пептид CLIP, соединенный через тромбиновый сайт на N-конце  $\beta$ -цепи

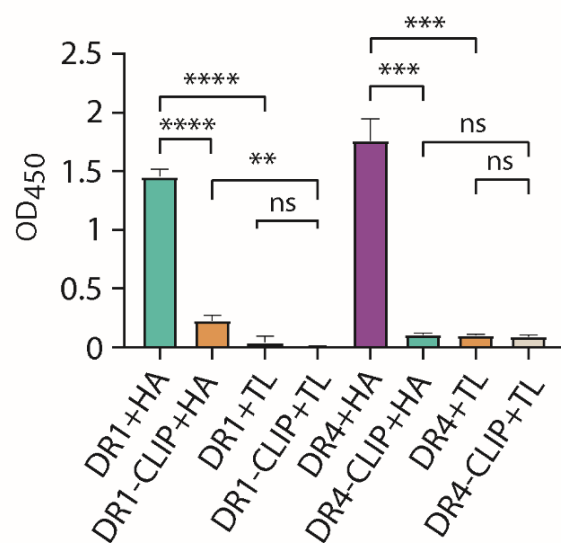
HLA-DR. Пептид CLIP выполняет функцию предотвращения связывания с ненужными пептидами, аналогично естественным условиям в эндосомах АПК, и при обработке тромбином происходит его обмен на другие антигенные пептиды.

Предварительно была проведена оценка взаимодействия HLA-DR с Fc-фрагментом и trх-пептидами *in vitro* с использованием метода ИФА с иммобилизованными антителами против HLA-DR. В качестве положительного контроля использовался trх-НА<sub>306-318</sub> для обеих аллелей HLA-DR, а отрицательный контроль содержал только trх (TL). Результаты показали, что комплекс HLA-DRB1\*01:01 с Fc-фрагментом не проявлял неспецифического взаимодействия с trх-пептидами (Рисунок 13А). Также была проведена оценка загрузки положительного контроля после предварительной обработки HLA-DR тромбином, и без этой обработки наблюдалось значительно более низкое связывание пептида (Рисунок 13Б). Полученные данные свидетельствуют о том, что комплекс HLA-DR, полученный в клеточной линии НЕК293F, не связывает пептиды окружающей среды и не проявляет неспецифического связывания, что аналогично результатам для HLA-DR, экспрессированного в клетках S2 [17]. Это подтверждает пригодность данной системы для оценки связывания с trх-пептидами *in vitro*.

А



Б



**Рисунок 13. Проверка специфичности взаимодействия HLA-DR с Fc-фрагментом и trх-пептидов, путем оценки аффинности с помощью ИФА. (А) Оценка связывания положительного контроля trх-НА<sub>306-318</sub> и отрицательного**

контроля TL с HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DM. (Б) Оценка связывания trх-НА<sub>306-318</sub> и TL с комплексами HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 с обмениваемым и необмениваемым CLIP. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001.

Аутоантигенные пептиды для связывания *in vitro* были выбраны на основе их обогащения по результатам NGS во втором раунде отбора на HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01, а также на основе их отсутствия во втором раунде контрольного отбора. В результате были отобраны шесть таких антигенных пептидов для HLA-DRB1\*01:01 и восемь пептидов для HLA-DRB1\*04:01. Эти пептиды были синтезированы в виде trх-пептидов, состоящих из 44 ак (Таблица 4).

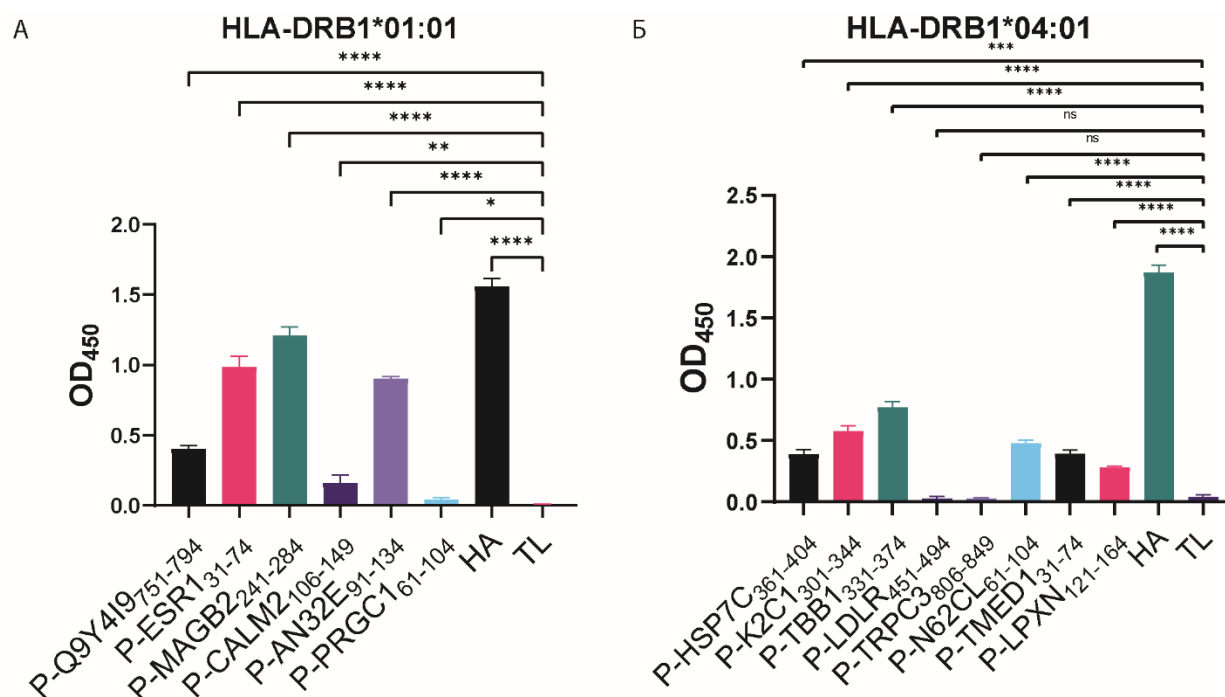
**Таблица 4. Пептиды, отобранные для связывания *in vitro* по результатам фагового отбора на HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01.**

№	HLA-DR	Последовательность	Uniprot	Название
1	DR1	LYDHSRVLLKAENSHSHSDYIN ASPIMDHDPRNPAYIATQGPL	P-Q9Y4I9 <sub>751-794</sub>	Tyrosine phosphatase IA-2beta
2	DR1	LKIPLERPLGEVYLDSSKPAVYN YPEGAAAYEFNAAAAANAQVYG	P-ESR1 <sub>31-74</sub>	Estrogen receptor
3	DR1	FGEPWKLITKDLVQEKYLEYKQ VPSSDPPRFQFLWGPRAYAETS	P-MAGB2 <sub>241-284</sub>	Melanoma-associated antigen B2
4	DR1	LRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIR EADIDGDGQVNYEEFVQMMTA K	P-CALM2 <sub>106-149</sub>	Calmodulin-2
5	DR1	TYLNLSGNKIKDLSTVEALQNLK NLKSLDLFNCEITNLEDYRES	P-AN32E <sub>91-134</sub>	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E
6	DR1	QSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENE ANLLAVLTETLDSLVPDED	P-PRGC1 <sub>61-104</sub>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
7	DR4	KSINPDEAVAYGAAVQAAILSGD KSENVQDLLLLDVTPLSLGIE	P-HSP7C <sub>361-404</sub>	Isoform 2 of Heat shock cognate 71 kDa protein
8	DR4	LQAKLDNLQQEIDFLTALYQAEI SQMQTQISETNVILSMDNNRS	P-K2C1 <sub>301-344</sub>	Keratin, type II cytoskeletal 1
9	DR4	LSVQTRNSSCFVEWIPNNVKVAV CDIPPRGLSMAATFIGNNTAI	P-TBB1 <sub>331-374</sub>	Tubulin beta-1 chain

10	DR4	ICSTQLDRAHGVSSYDTVISRDIQ APDGLAVDWIHSNIYWTDSV	P-LDLR <sub>451-494</sub>	Low-density lipoprotein receptor
11	DR4	RLQKDIEMGMGNSKSRLNLFTQ SNSRVFESHFSNLSLNQPTRYQ	P-TRPC <sub>3806-849</sub>	Short transient receptor potential channel 3
12	DR4	TSTVSVVATPVMTYGHLEGLINE WNLELEDQEKYFLLQATQVNA	P-N62CL <sub>61-104</sub>	Nucleoporin-62 C-terminal-like protein
13	DR4	DGEFTFLPAGRKQCFYQSAPAN ASLETEYQVIGGAGLDVDFTL	P-TMED1 <sub>31-74</sub>	Transmembrane emp24 domain-containing protein 1
14	DR4	KQDHKASLDSMLGGLEQELQDL GIATVPGKHCASCQKPIAGKVI	P-LPXN <sub>121-164</sub>	Leupaxin

P (phage) – пептиды, отобранные в фаговом отборе.

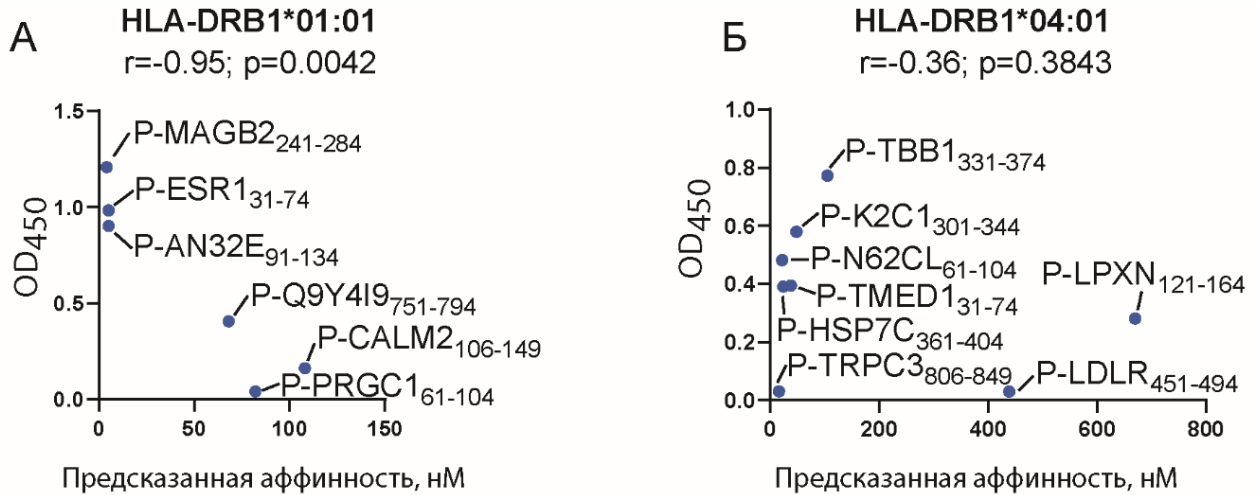
Большинство из исследуемых trx-пептидов продемонстрировали статистически значимое связывание с молекулами HLA-DRB1\*01:01 (Рисунок 14А) или HLA-DRB1\*04:01 (Рисунок 14Б) после ночной инкубации.



**Рисунок 14. Проверка связывания отдельных пептидов, полученных фаговым отбором.** (А) Рекombинантный HLA-DRB1\*01:01 (150 нМ) инкубировали в течение 16–18 часов с биотинилированными рекомбинантными trx-пептидами (750 нМ), обогащенными в фаговом дисплее. (Б) Рекombинантный HLA-DRB1\*04:01 (150 нМ) инкубировали в течение 16–18 часов с биотинилированными рекомбинантными trx-пептидами (750 нМ), обогащенными в фаговом дисплее. Trx-НА использовался в качестве положительного контроля, TL в качестве отрицательного. Статистический анализ проводился с

использованием t-критерия Стьюдента \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . P (phage) – пептиды, отобранные в фаговом отборе.

Было обнаружено, что экспериментально определенная аффинность, прямо пропорциональная значению поглощения в ИФА при  $OD_{450}$  после ночной инкубации HLA-DRB1\*01:01 с пептидами, коррелируют с предсказанной аффинностью, рассчитанной с использованием NetMHCIIpan (Рисунок 15А). Так, более низкие значения предсказанной аффинности свидетельствуют о более высокой аффинности (обратная корреляция), в то время как более высокие значения  $OD_{450}$  в ИФА указывают на большую аффинность (прямая корреляция). Таким образом, соответствие между этими величинами можно интерпретировать как показатель отрицательной корреляции. В частности, мы определили высокое значение отрицательной корреляции ( $r = -0,95$ ) для HLA-DRB1\*01:01, что указывает на хорошее соответствие предсказанным *in silico* аффинностями. Однако отрицательная корреляция для HLA-DRB1\*04:01 была незначительной ( $r = -0,36$ ) (Рисунок 15Б). Примечательно, что пептид P-LPXN<sub>121-164</sub> продемонстрировал относительно высокое экспериментальное связывание с молекулой HLA-DRB1\*04:01, несмотря на самое низкое предсказываемое сродство (670 нМ). С другой стороны, пептид P-TRPC3<sub>806-849</sub> с самым высоким предсказываемым связыванием (15 нМ) не продемонстрировал экспериментального связывания с белком HLA-DRB1\*04:01. Это несоответствие может быть связано с ограничениями в обучающих данных, использованных для программы NetMHCIIpan 4.0 [188].



**Рисунок 15. Расчёт корреляции между экспериментальной и предсказанной с помощью NetMHCIIpan аффинностью.** (А) Корреляция между экспериментально полученным значением поглощения  $OD_{450}$  в реакции ночного связывания trx-пептидов с рекомбинантными HLA-DRB1\*01:01 и предсказанной аффинностью NetMHCIIpan. (Б) Корреляция между экспериментально полученным значением поглощения  $OD_{450}$  в реакции ночного связывания trx-пептидов с рекомбинантными HLA-DRB1\*04:01 и предсказанной аффинностью NetMHCIIpan. Использовался коэффициент корреляции Пирсона. P (phage) – пептиды, отобранные в фаговом отборе.

На основе данных NGS мы идентифицировали в исходной экспрессированной фаговой библиотеке пулы пептидов с относительно высокой предсказанной аффинностью, полученной с помощью NetMHCIIpan, которые, однако, не были отобраны при инкубации фаговой библиотеки с молекулами HLA-DR. Для проверки точности предсказания аффинности с использованием NetMHCIIpan, мы наработали отдельные пептиды в виде trx-пептидов и оценили их связывание с рекомбинантными молекулами HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01. Поскольку предсказание аффинности проводилось для пептидов длиной 15 ак, мы синтезировали пептиды именно такой длины. Для каждого из двух аллелей HLA-DR было выбрано по четыре пептида с предсказанной аффинностью в диапазоне от 2 до 12 нМ (Таблица 5).

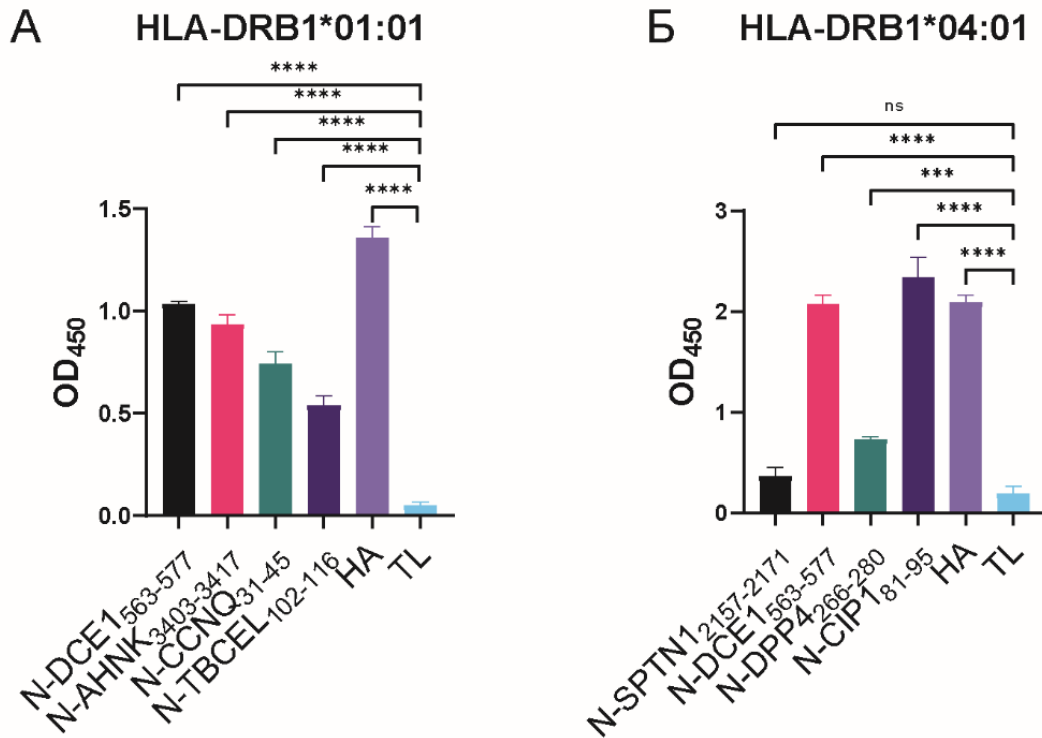


**Таблица 5. Пептиды, отобранные для связывания *in vitro* по результатам предсказаний NetMHCIIpan.**

№	HLA-DR	Последовательность	Uniprot	Название	Предсказанная аффинность NetMHCIIpan, нМ
1	DR1	ANFFRMVISNPAATQ	N-DCE1 <sub>563-577</sub>	Glutamate decarboxylase 1	2
2	DR1	FKMPFLSISPKVSM	N-AHNAK <sub>3403-3417</sub>	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	2
3	DR1	ARFIMEAGVKLGMR	N-CCNQ <sub>31-45</sub>	Cyclin-Q	3
4	DR1	LEFLNLSSNPLNSV	N-TBCEL <sub>102-116</sub>	Tubulin-specific chaperone cofactor E-like protein	3
5	DR4	IKSFRVASNPYTWFT	N-SPTN1 <sub>2157-2171</sub>	Isoform 3 of Spectrin alpha chain non-erythrocytic 1	9
6	DR4	ANFFRMVISNPAATQ	N-DCE1 <sub>563-577</sub>	Glutamate decarboxylase 1	6
7	DR4	VKFFVVNTDSLSSVT	N-DPP4 <sub>266-280</sub>	Dipeptidyl peptidase 4	10
8	DR4	RPEIVLDISSRALAF	N-CIP1 <sub>81-95</sub>	E3 ubiquitin-protein ligase CCNB1IP1	12

N (NetMHCIIpan) – пептиды, показавшие высокое значение аффинности по результатам предсказаний NetMHCIIpan, но не отобранные в фаговом отборе.

Все trх-пептиды, за исключением N-SPTN1<sub>2157-2171</sub> для HLA-DRB1\*04:01, продемонстрировали статистически значимое связывание с молекулами HLA-DR в ходе ночной инкубации (Рисунок 16).



**Рисунок 16. Проверка связывания с HLA-DR пептидов с высокой аффинностью по данным NetMHCIIpan.** (А) Рекombинантный HLA-DRB1\*01:01 (150 нМ) инкубировали в течение 16–18 часов с биотинилированными рекомбинантными trх-пептидами (750 нМ), продемонстрировавших высокое значение аффинности по данным NetMHCIIpan. (Б) Рекombинантный HLA-DRB1\*04:01 (150 нМ) инкубировали в течение 16–18 часов с биотинилированными рекомбинантными trх-пептидами (750 нМ), продемонстрировавших высокое значение аффинности по данным NetMHCIIpan. Trх-НА использовался в качестве положительного контроля, TL в качестве отрицательного. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . N (NetMHCIIpan) – пептиды, показавшие высокое значение аффинности по результатам предсказаний NetMHCIIpan, но не отобранные в фаговом отборе.

Так как 7 из 8 пептидов с предсказанной высокой аффинностью по данным NetMHCIIpan действительно проявили статистически значимое связывание, можно сделать вывод, что программа NetMHCIIpan корректно предсказала их аффинности. В данном случае, вероятно, имеет место недостаток фагового отбора, при котором определенные клоны могли не проэкспрессироваться. Эти результаты дополнительно подтверждают надежность нашего дуального подхода для поиска новых аутоантигенных пептидов, представленных на молекулах HLA-DR, который

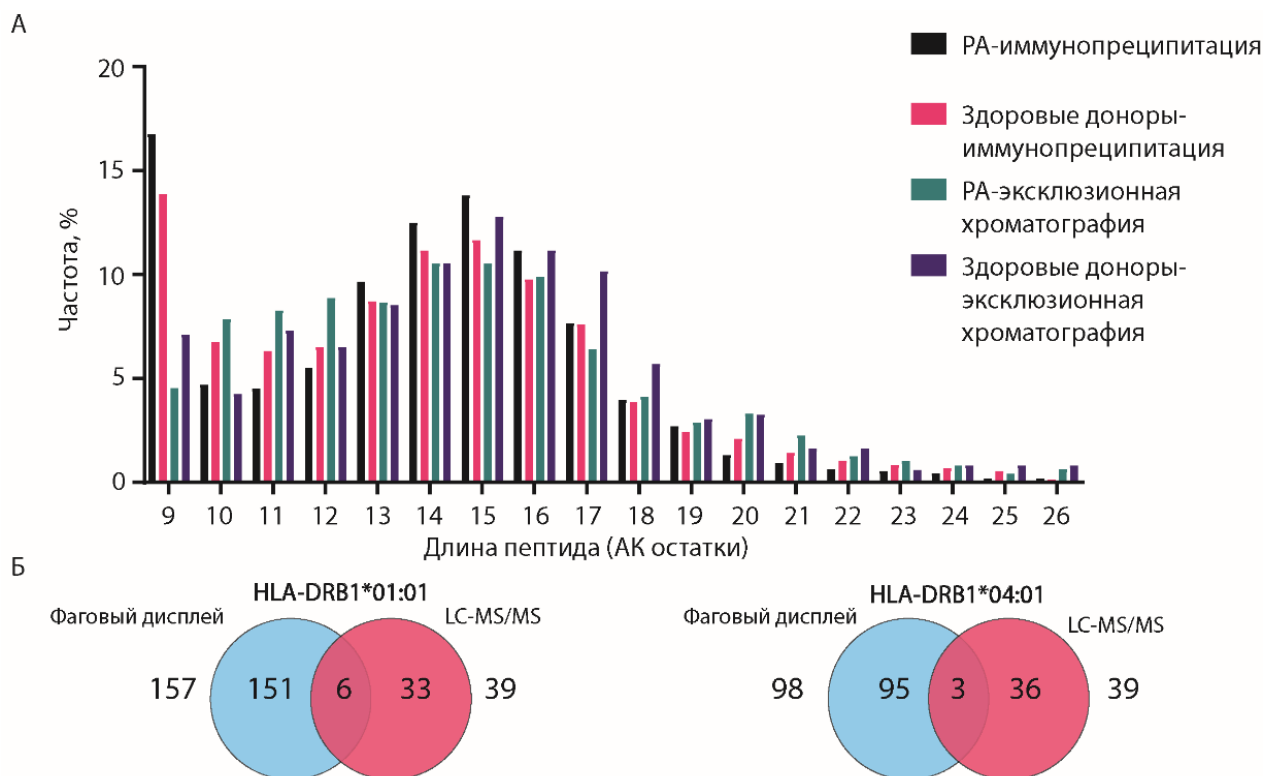
включает как фаговый отбор, так и прямой анализ иммунопептидома HLA-DR у доноров, несущих РА-ассоциированные аллели.

#### ***4.6 Ряд аутоантигенных пептидов HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 идентифицированы одновременно фаговым отбором и обнаружены на HLA-DR ДК у доноров с РА***

Следующим этапом работы стал поиск аутоантигенных пептидов, ассоциированных с РА, как потенциальных природных эпитопов для CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Для этого был проведен LC-MS/MS анализ иммунопептидома HLA-DR из ДК, полученных от пяти пациентов с РА, носителей аллелей HLA-DRB1\*01:01 или HLA-DRB1\*04:01, и четырех HDs с теми же аллелями. Идентифицированные пептиды, ассоциированные с РА, затем были охарактеризованы с использованием анализа связывания с соответствующими молекулами HLA-DR *in vitro*, как описано выше.

Для того чтобы выявить максимально полный спектр аутоантигенных пептидов, представленных на молекулах HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01, мы использовали два параллельных протокола подготовки образцов, а затем объединили полученные данные после масс-спектрометрии. Первый метод включал иммунопреципитацию комплексов HLA-DR с применением моноклональных антител, специфичных к HLA-DR, связанных со смолой Protein A. Второй метод представлял собой эксклюзионную хроматографию клеточного лизата ДК с выбором фракций, содержащих HLA-DR, по результатам ИФА. Элюированные пептиды были проанализированы с использованием LC-MS/MS. Распределение длин идентифицированных пептидов оказалось соответствующим длинам пептидов, которые обычно представлены на молекулах HLA-DR в естественных условиях (13–17 ак) (Рисунок 18А). Однако в процессе клеточного лизиса и элюции пептидов некоторые антигенные последовательности подвергались укорачиванию, что могло быть вызвано действием клеточных

протеаз и условиями элюции. Это особенно заметно в случае с протоколом иммунопреципитации, где значительная часть пептидов была представлена пептидами длиной 9 ак.

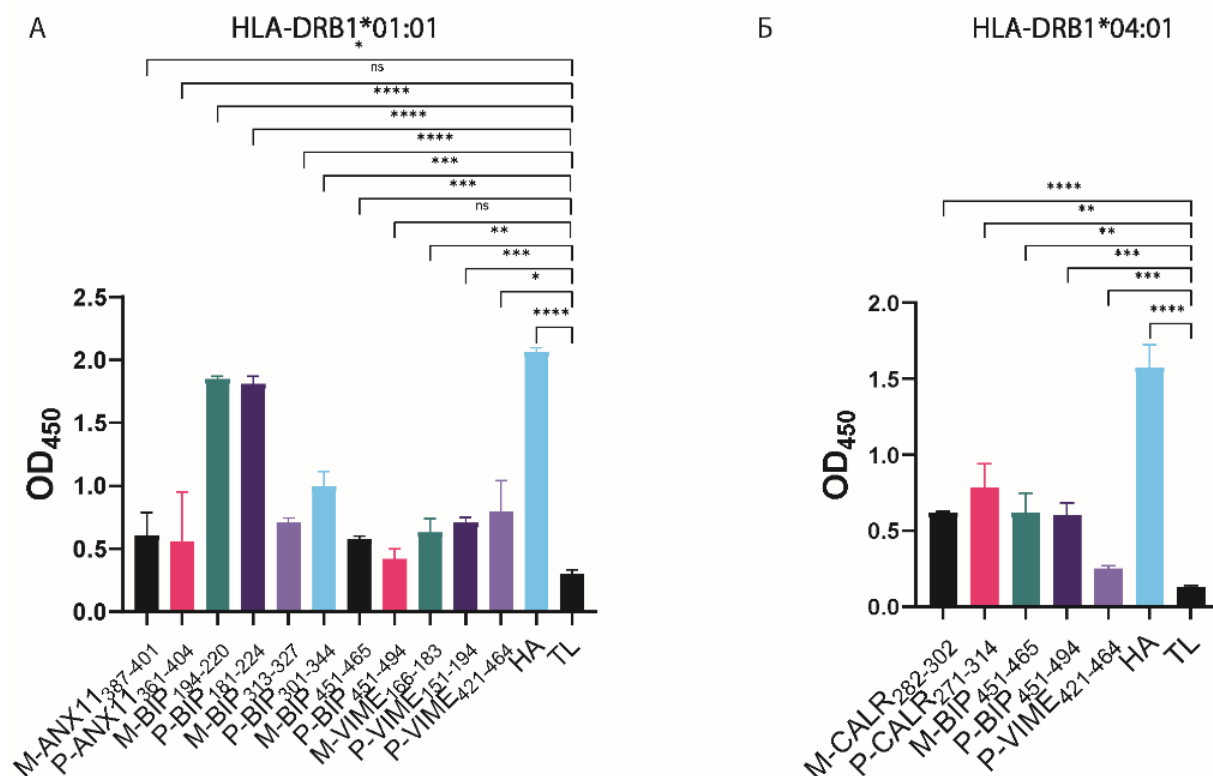


**Рисунок 18. Аутоантигенные пептиды, идентифицированные с помощью LC-MS/MS и их пересечение с фаговым отбором.** (А) Распределение длины пептидов, анализируемых с помощью LC-MS/MS. (Б) На диаграммах Венна показано количество пептидов, отобранных с помощью фагового дисплея (первый или второй раунд) и LC-MS/MS и их пересечение для HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01.

Для устранения этого экспериментального недочета, пептиды, длина которых была меньше 15 ак, были расширены до 15 ак на основе средней длины пептидов, презентруемых на молекулах HLA-DR. Это расширение проводилось с учетом максимальной расчетной аффинности, определенной с помощью NetMHCIIpan. Пептиды, имевшие перекрытие в сырых масс-спектрометрических данных, были объединены. В результате анализа образцов ДК пациентов с РА с использованием LC-MS/MS было идентифицировано 846 пептидов, из которых 39 были отнесены к РА-ассоциированным с помощью AAgAtlas. Среди пептидов,

идентифицированных с помощью LC-MS/MS, 6 из 157 (3,8%) PA-ассоциированных пептидов, были также отобраны фаговым дисплеем для HLA-DRB1\*01:01. Для HLA-DRB1\*04:01 мы обнаружили 3 из 98 (3,1%) пептидов, отобранных фаговым дисплеем (Рисунок 18Б).

Чтобы проверить, обладают ли аутоантигенные пептиды, идентифицированные с помощью LC-MS/MS и отобранные с помощью фагового дисплея (пептиды длиной 44 ак) общим эпитопом для связывания с HLA-DR, мы получили аутоантигены в слитой с trx форме как в виде, котором они были в масс-спектрометрическом анализе, так и в виде последовательностей в 44 ак для проверки связывания с рекомбинантными HLA-DR *in vitro*. Примечательно, что P-VIME<sub>421-464</sub> был обнаружен в данных LC-MS/MS в полноразмерной для фагового дисплея форме длиной в 44 ак. В целом, все аутоантигенные пептиды продемонстрировали сопоставимое связывание для HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01, как в длиной 44 ак, так и в короткой форме, несмотря на некоторые различия в предсказанной аффинности. Например, предсказанная аффинность для M-BIP<sub>313-327</sub> и M-BIP<sub>451-465</sub> была выше 500 нМ для HLA-DRB1\*01:01 по сравнению с 92 нМ для P-BIP<sub>301-344</sub> и 140 нМ для P-BIP<sub>451-494</sub> (Рисунок 19А). Аналогичным образом, пептиды M-CALR<sub>282-302</sub> и M-BIP<sub>451-465</sub>, идентифицированные LC-MS/MS для HLA-DRB1\*04:01, имели более низкую аффинность, предсказанную NetMHCIIpan, по сравнению с их полноразмерным вариантом, но продемонстрировали аналогичное связывание в ИФА (Рисунок 19Б).



**Рисунок 19. Проверка связывания trx-пептидов с HLA-DR, отобранных LC-MS/MS.** (А) Рекombинантный HLA-DRB1\*01:01 (150 нМ) инкубировали в течение 16–18 часов с биотинилированными рекombинантными trx-пептидами (750 нМ), отобранными LC-MS/MS. (Б) Рекombинантный HLA-DRB1\*04:01 (150 нМ) инкубировали в течение 16–18 часов с биотинилированными рекombинантными trx-пептидами (750 нМ), отобранными LC-MS/MS. Trx-HA использовался в качестве положительного контроля, TL в качестве отрицательного. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . P (phage) – пептиды, отобранные в фаговом отборе. M (mass spectrometry) – пептиды, отобранные LC-MS/MS.

Чтобы оценить роль полученных аутоантигенов при развитии РА, а конкретнее, возможность появления аутореактивного CD4<sup>+</sup> Т-клеточного ответа на данные аутоантигены в комплексе с HLA-DR, выработку IFN- $\gamma$  и IL-2 оценивали путем совместной инкубации PBMC HLA-DRB1\*01:01-положительных пациентов с РА (n=6) и HD (n=4) или HLA-DRB1\*04:01-положительных пациентов с РА (n=5) и HD (n=4) вместе с синтетическими пептидами, отобранными фаговым дисплеем и LC-MS/MS с длиной идентифицированной LC-MS/MS (Таблица 6). В отличие от других пептидов, отобранных фаговым дисплеем и LC-MS/MS, P-VIME<sub>421-464</sub>

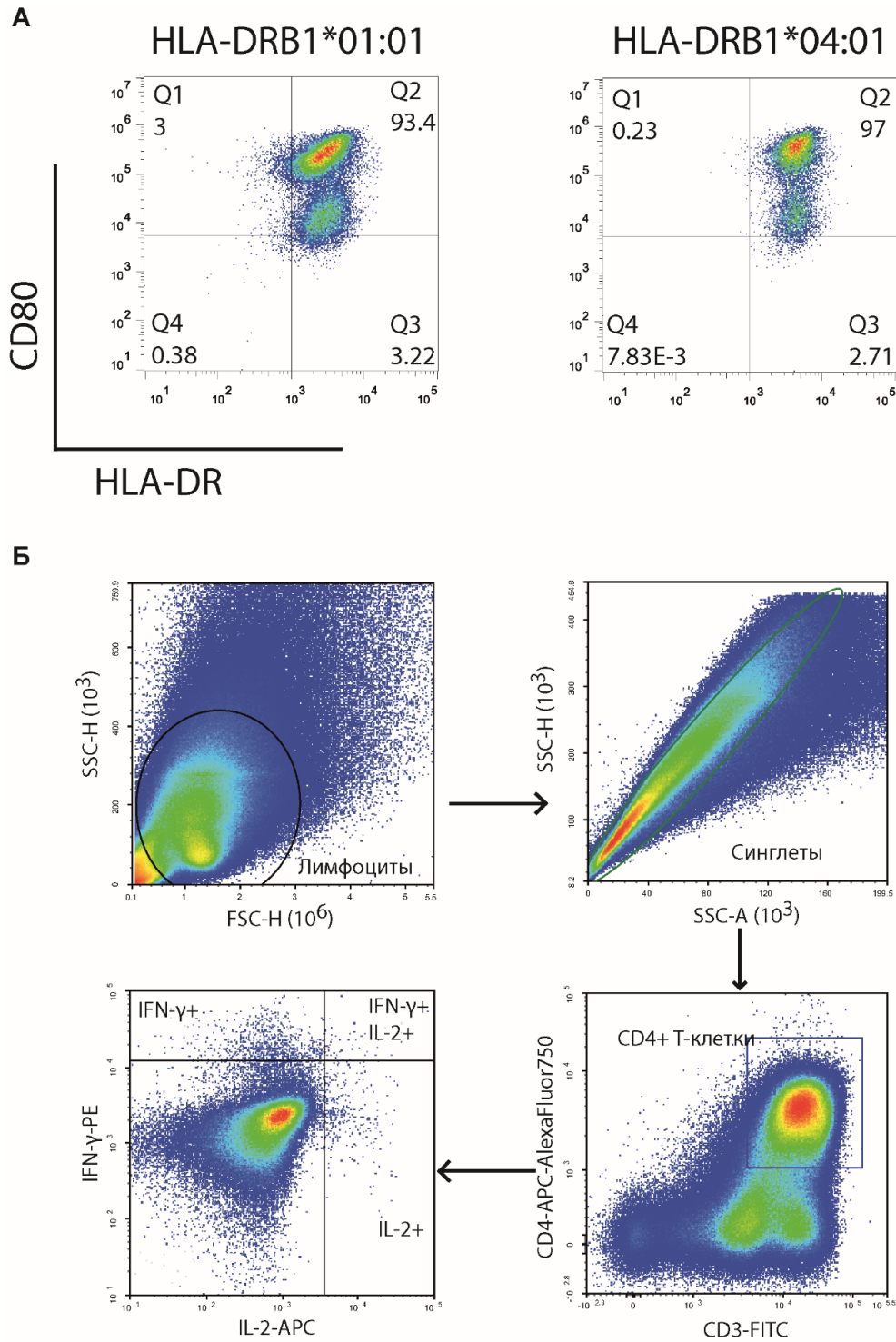
встречался в масс-спектрометрических данных также и HDs, поэтому для анализа CD4<sup>+</sup> Т-клеточного ответа не использовался.

**Таблица 6. Последовательности синтетических пептидов, отобранных одновременно фаговым дисплеем и LC-MS/MS, используемых для оценки CD4<sup>+</sup> Т-клеточного ответа у пациентов с РА и HD.**

№	HLA-DR	Последовательность	Uniprot	Название
1	DR1	SRAHLVAVFNEYQRM	M-ANX11 <sub>387-401</sub>	Annexin A11
2	DR1/DR4	FSTASDNQPTVTIKV	M-BIP <sub>451-465</sub>	Endoplasmic reticulum chaperone BiP
3	DR1	NVMRIINEPTAAAIAYGLDKRE GEKNI	M-BIP <sub>194-220</sub>	Endoplasmic reticulum chaperone BiP
4	DR1	NDKARVEVERDNLAEDIM	M-VIME <sub>166-183</sub>	Vimentin
5	DR1	YEGEDFSETLTRAKF	M-BIP <sub>313-327</sub>	Endoplasmic reticulum chaperone BiP
6	DR4	NPDYKGTWINPEIDNPEYSPD	M-CALR <sub>282-302</sub>	Calreticulin

M (mass spectrometry) – пептиды, отобранные LC-MS/MS.

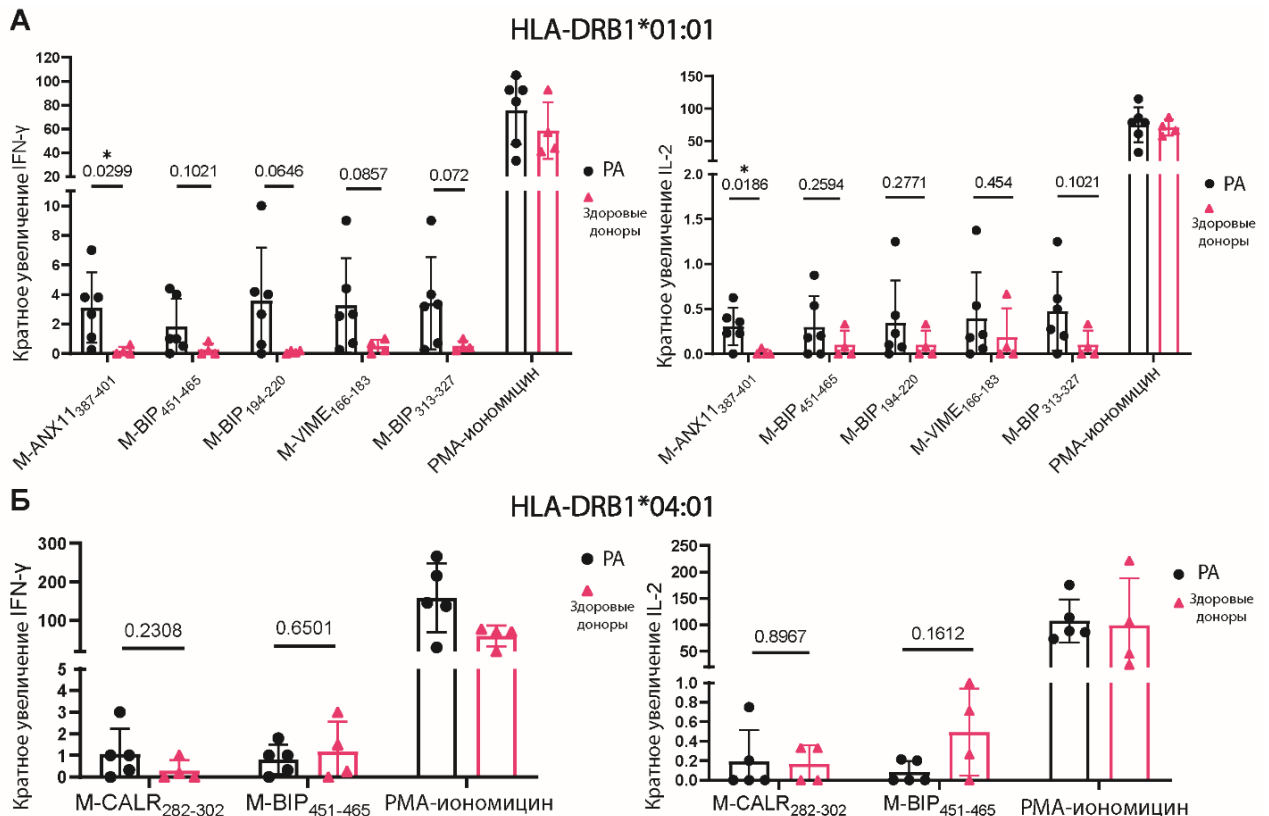
Для детекции продукции провоспалительных цитокинов предварительно проводилась антиген-специфическая экспансия пулом пептидов (M-ANX11<sub>387-401</sub>, M-BIP<sub>451-465</sub>, M-BIP<sub>194-220</sub>, M-VIME<sub>166-183</sub>, M-BIP<sub>313-327</sub> для РВМС из HLA-DRB1\*01:01<sup>+</sup> доноров и M-BIP<sub>451-465</sub>, M-CALR<sub>282-302</sub> для РВМС из HLA-DRB1\*04:01<sup>+</sup> доноров), после которой происходила рестимуляция РВМС отдельными пептидами, представленными на клеточной линии HeLa. Данная линия была последовательно модифицирована ко-стимулирующей молекулой CD80, необходимой для Т-клеточной активации, а также комплексами HLA-DRB1\*01:01 или HLA-DRB1\*04:01, необходимыми для презентации пептида (Рисунок 20А). Стратегия окрашивания CD4<sup>+</sup> Т-клеток после рестимуляции аутоантигенными пептидами представлена на Рисунке 20Б.



**Рисунок 20. Стратегии окрашивания клеток для антиген-специфической экспансии.** (А) Двойное окрашивание клеточных линий HeLa, экспрессирующих CD80 и HLA-DRB1\*01:01 или HLA-DRB1\*04:01. (Б) Пример окрашивания антителами anti-human CD3, anti-human CD4, anti-human IL-2, anti-human IFN- $\gamma$  для идентификации популяции CD4<sup>+</sup> Т-клеток, продуцирующих IL-2 и IFN- $\gamma$ .



Среди используемых синтетических пептидов M-ANX11<sub>387-401</sub> вызывал статистически значимую разницу ( $p=0,0299$ ) в выработке IFN- $\gamma$  и ( $p=0,0186$ ) IL-2 между HLA-DRB1\*01:01<sup>+</sup> больными с РА и HDs (Рисунок 21А). Разница между HLA-DRB1\*04:01<sup>+</sup> пациентами с РА и HDs была статистически незначительной (Рисунок 21Б).



**Рисунок 21. Оценка продуцирования провоспалительных цитокинов CD4<sup>+</sup> Т-клетками пациентов с РА по сравнению с HDs.** (А) Синтетические пептиды использовали для стимуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток из PBMC HLA-DRB1\*01:01<sup>+</sup> пациентов с РА (n=6) и HD (n=4) и детекции IFN- $\gamma$  или IL-2. (Б) Синтетические пептиды использовали для стимуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток из PBMC HLA-DRB1\*04:01<sup>+</sup> пациентов с РА (n=5) и HD (n=4) и детекции IFN- $\gamma$  или IL-2. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Уэлча \*  $p < 0,05$ . М (mass spectrometry) – пептиды, отобранные LC-MS/MS.

ANX11 впервые охарактеризован как ассоциированный с РА через вовлечение аутореактивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Антитела к ANX11 ранее были описаны у пациентов с РА, а также были обнаружены в сыворотке пациентов с СКВ и АФС [189–191], что свидетельствует о его участии в аутоиммунных процессах в

целом. Предполагается, что ANX11 может играть роль в апоптозе при РА [192]. Он также способен связываться с ALG-2 и S100A6, двумя важными белками, участвующими в развитии апоптоза [193,194], что может привести к образованию апоптотических тел и их захвату АПК, что, в свою очередь, может способствовать презентации фрагментов ANX11 на молекулах HLA-II для CD4<sup>+</sup> Т-клеток.

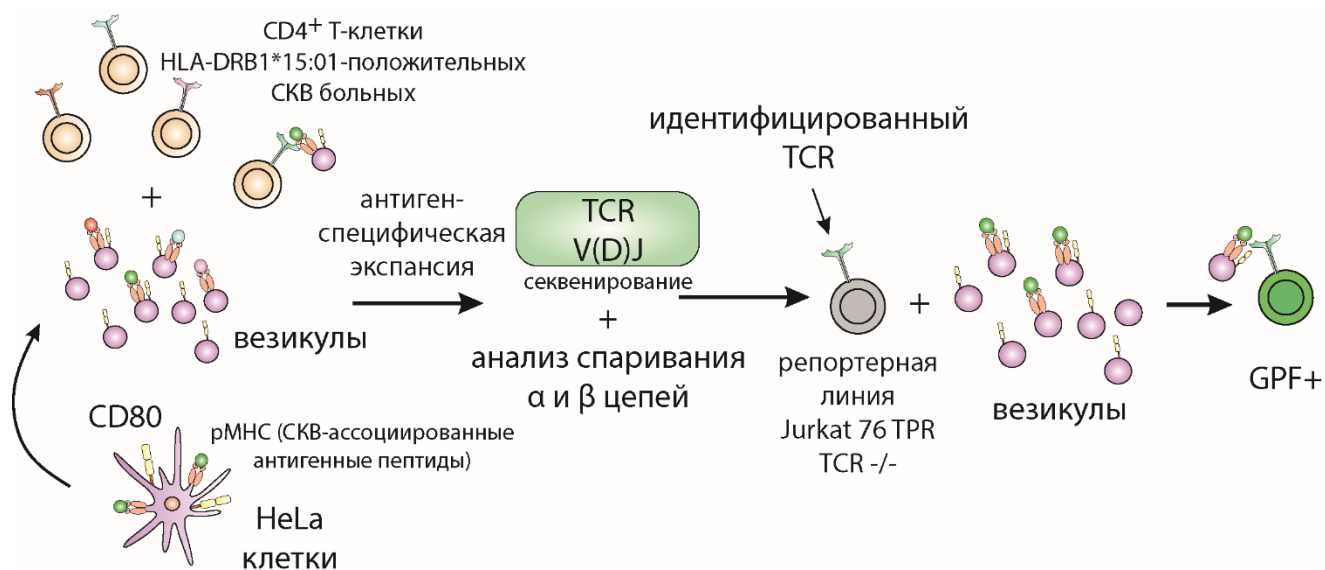
Кроме того, несколько других аутоантигенных пептидов, полученных в результате двойного отбора и протестированных на активацию CD4<sup>+</sup> Т-клеток, не вызвали статистически значимого повышения уровней IFN- $\gamma$  и IL-2. Это может быть объяснено взаимодействием CD4<sup>+</sup> Т-клеток разных фенотипов [195]. Например, пептид VIP<sub>451-465</sub> частично перекрывается с VIP<sub>456-475</sub>, который, как сообщалось, способствует пролиферации Treg, секретирующих IL-10 [128].

Подводя итог данного раздела, посвященного РА, были идентифицированы аутоантигенные пептиды, ассоциированные с РА, представленные на молекулах HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01, используя двойной подход, основанный на скрининге библиотеки аутоантигенов человека *in vitro* и анализе иммунопептидома HLA-DR пациентов с РА. Обнаруженные антигенные пептиды могут быть таргетированы аутореактивными CD4<sup>+</sup> Т-клетками в процессе патогенеза РА и обладают потенциалом для разработки методов таргетной антиген-специфической терапии [196,197].

#### ***4.7 Поиск аутоантигенных пептидов и аутореактивных TCR, ассоциированных с СКВ***

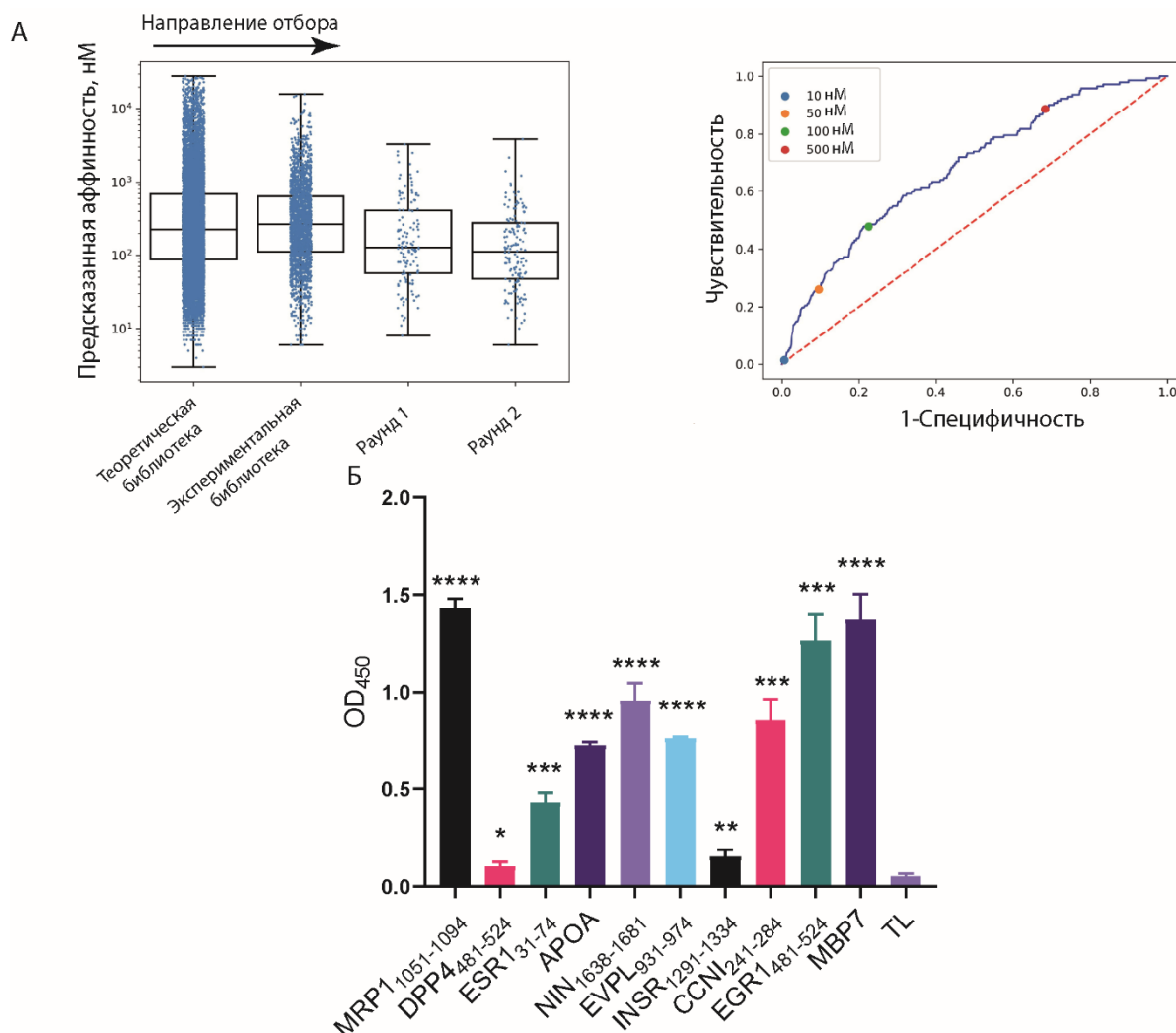
Для поиска аутоантигенных последовательностей, представленных на HLA-DR, мы выбрали СКВ-ассоциированный аллель HLA-DRB1\*15:01. Для этой цели мы также использовали аутоантигенную библиотеку для проведения фагового отбора на ассоциированный с СКВ рекомбинантный HLA-DRB1\*15:01, полученный в клеточной линии S2, по протоколу, аналогичному описанному выше (Рисунок 22). Как и в исследовании, посвященном РА, эффективность фагового

отбора была подтверждена предсказательными расчетами аффинности с использованием NetMHCIIpan. Учитывая, что репертуар аутореактивных TCR при СКВ ограничен, мы решили сконцентрироваться на поиске новых TCR, взаимодействующих с пептидами, представленных на HLA-DRB1\*15:01. Для этого отобранные аутоантигенные пептиды в комплексе с HLA-DRB1\*15:01 были представлены на искусственных EVs, которые использовались для стимуляции CD4<sup>+</sup> T-клеток, полученных от пациентов с СКВ, несущих аллель HLA-DRB1\*15:01. Экспансированные T-клетки после 2х недельной инкубации с EVs использовались далее для выделения РНК и секвенирования репертуара TCR. Биоинформатический анализ позволил определить правильно спаренные  $\alpha$  и  $\beta$  цепи TCR, которые взаимодействовали с комплексами рМНС. Антиген-специфичность данных TCR была подтверждена путем активации с помощью EVs, несущих аутоантигенный пептид.



**Рисунок 22. Схема поиска новых аутоантигенных пептидов и взаимодействующих с ними TCR при развитии СКВ.** Для поиска аутоантигенных пептидов, представленных на HLA-DRB1\*15:01, был использован фаговый отбор с использованием аутоантигенной библиотеки. Отобранные пептиды были представлены на искусственных EVs, чтобы стимулировать CD4<sup>+</sup> T-клетки из пациентов с СКВ. Репертуар TCR, взаимодействующих с рМНС, был секвенирован, а их антиген-специфичность подтверждена с помощью репортёрной линии Jurkat 76 TPR, несущей исследуемые TCR, в которой запускается синтез GFP в ответ на стимуляцию специфичным комплексом рМНС на EVs.

Мы провели два раунда фагового отбора с использованием рекомбинантных белков HLA-DRB1\*15:01 и HLA-DM. Для оценки результатов отбора были проанализированы последовательности исходной экспрессированной фаговой библиотеки, а также фаги, элюированные после каждого раунда, с помощью NGS. Параллельно осуществлялся фаговый отбор в подобных условиях, но без HLA-DRB1\*15:01, в качестве отрицательного контроля. Каждая из суб-библиотек, полученная после секвенирования последовательностей аутоантигенных пептидов на различных этапах отбора, а также исходная полноразмерная библиотека пептидов, были оценены с помощью NetMHCIIpan на возможность связывания с HLA-DRB1\*15:01 (Рисунок 23А). Результаты показали, что с каждым раундом фагового отбора средство пептидов к HLA-DR увеличивалось (числовые значения предсказанной аффинности снижались). Уровень эффективности отбора был дополнительно подтвержден значением показателя  $AUC = 0,68$ .



**Рисунок 23. Анализ эффективности фагового отбора на HLA-DRB1\*15:01.** (А) Предсказываемая аффинность лигандов увеличивается при фаговом отборе от исходной теоретической библиотеки ко второму раунду фагового отбора. ROC-кривые для лигандов, не прошедших ни одного отбора, против прошедших второй отбор. (Б) Рекombинантный HLA-DRB1\*15:01 (150 нМ) инкубировали в течение 16–18 часов с биотинилированными рекombинантными trх-пептидами (750 нМ), обогащенными в фаговом отборе. Trх-MBP7 использовался в качестве положительного контроля, TL в качестве отрицательного. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Далее, аналогично фаговым отборам на HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01 мы проверили, будут ли аутоантигенные пептиды, обогащенные в ходе фагового отбора, связывать рекombинантный белок HLA-DRB1\*15:01, слитый с Fc-фрагментом и полученный в клеточной линии HEK293F. Аутоантигенные

пептиды выбирались на основе обогащения по результатам NGS во втором раунде отбора на HLA-DRB1\*15:01 и отсутствия во втором раунде контрольного отбора. Мы выбрали девять аутоантигенных пептидов и экспрессировали их в виде trx-пептидов, состоящих из 44 ак (Таблица 7).

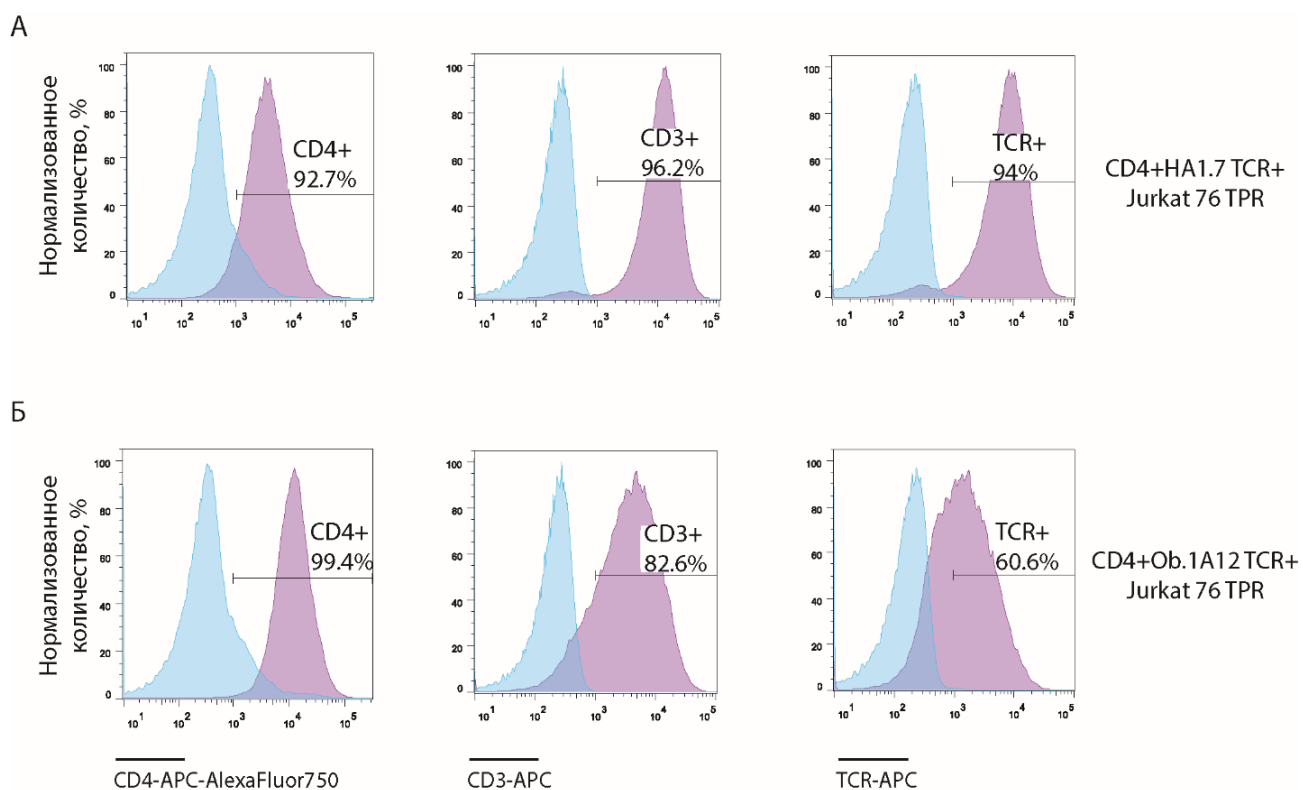
**Таблица 7. Пептиды, отобранные для связывания *in vitro* по результатам фагового отбора на HLA-DRB1\*15:01.**

№	Последовательность	Uniprot	Название
1	DLLHSILRSPMSFFERTPSGNLVNRFSKEL DTVDSMIPEVIKMF	MRP1 <sub>1051-1094</sub>	Multidrug resistance-associated protein 1 isoform X3
2	TLHSSVNDKGLRVLEDNSALDKMLQNV QMPSKKLDFIILNETKF	DPP4 <sub>481-524</sub>	Dipeptidyl-peptidase 4
3	LKIPLERPLGEVYLDSSKPAVYNYPEGAA YEFNAAAAANAQVYG	ESR1 <sub>31-74</sub>	Estrogen receptor protein
4	TVTGRTCQAWSSMTPHSHSRTPEYYPNA GLIMNYCRNPDAVAAP	APOA	Chain A, Apolipoprotein (a)
5	FNLKEELERCKVQSSTLVSSLEAELSEVK IQTHIVQQENHLLKD	NIN <sub>1638-1681</sub>	Ninein centrosomal protein
6	VQHELEAQRSQLLQLRTQRPLERLEEKE VVEFYRDPQLEGSLSR	EVPL <sub>931-974</sub>	Envoplakin isoform 2
7	KDDLHPSFPEVSFFHSEENKAPESSELEM EFEDMENVPLDRSSH	INSR <sub>1291-1334</sub>	Insulin receptor isoform X1
8	ELVAHHLSTLQSSLPLNSVYVYRPLKHT LVTCDKGVFRLHPSSV	CCNI <sub>241-284</sub>	Cyclin-I isoform g
9	TYPSPVHSGFPSPSVATTYSSVPPAFAAQ VSSFPSAVTNSFSA	EGR1 <sub>481-524</sub>	EGR1

Все выбранные trx-пептиды показали статистически значимое связывание с рекомбинантным HLA-DRB1\*15:01 после ночной инкубации (Рисунок 23Б), что дополнительно подтверждает эффективность фагового отбора.

#### **4.8 Получение модифицированных клеточных линий HeLa и Jurkat 76 TPR для проверки антиген-специфичности TCR**

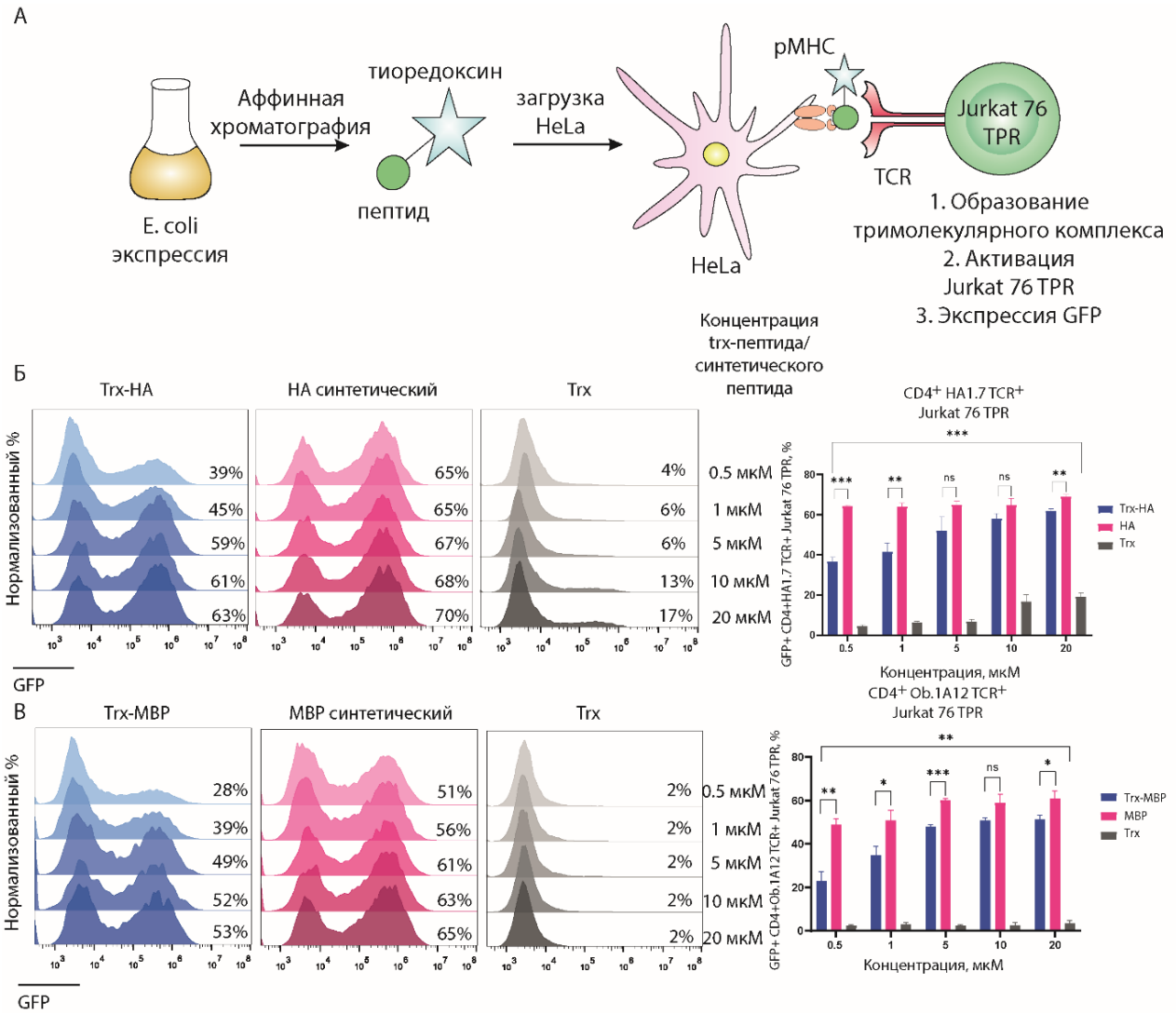
Далее мы решили исследовать, могут ли идентифицированные аутоантигенные пептиды, отобранные фаговым дисплеем в комплексе с HLA-DRB1\*15:01 активировать аутореактивные TCR у больных СКВ. Для этого мы создали модельную систему проверки антиген-специфичности TCR. Для изучения аутореактивного T-клеточного ответа, нами были получены клеточные линии, несущие ко-стимулирующие молекулы CD80 и антигенные пептиды в контексте HLA-DR. Активация T-клеток зависит от двух основных сигналов: один опосредован взаимодействием TCR с комплексами pMHC, а другой участием костимулирующих молекул, таких как CD28, экспрессируемых на T-клетках, которые взаимодействуют с молекулами CD80, экспрессируемыми на АПК [175]. Для оценки активации CD4<sup>+</sup> T-клеток, мы использовали созданную ранее модельную репортерную клеточную линию Jurkat 76 TPR, экспрессирующую GFP при активации ядерного фактора активированных T-клеток (NFAT), а также не имеющую эндогенного TCR [198]. Данную линию мы модифицировали для экспрессии CD4 рецептора, также необходимо для взаимодействия с комплексом pMHC, а также HA1.7 TCR (Рисунок 24А) или Ob.1A12 TCR (Рисунок 24Б). Конструкции содержали человеческие константные регионы TCR. При экспрессии TCR T-клетки также начинают экспрессировать молекулы CD3, инициирующие активацию NFAT, при узнавании TCR комплекса pMHC. HA1.7 и Ob.1A12, специфичны к пептиду HA<sub>306-318</sub> гриппа А в контексте HLA-DRB1\*01:01 и аутоантигенного MBP<sub>85-99</sub> (MBP7) в контексте HLA-DRB1\*15:01, соответственно. HA1.7 связывает родственный комплекс pMHC с относительно высокой аффинностью [42]. Ob.1A12 – аутореактивный TCR и демонстрирует более низкую аффинность к pMHC из-за альтернативной топологии позиционирования TCR [43].



**Рисунок 24. Создание клеточных линий Jurkat 76 TRP, несущих молекулы CD4 и TCR.** Клеточная линия Jurkat 76 TPR была последовательно трансдуцирована лентивирусами, кодирующими молекулы CD4 и (А) HA1.7 или (Б) Ob.1A12 TCR. Голубая гистограмма – нетрансдуцированные Jurkat 76 TPR. % показывает положительную популяцию клеток.

Для презентации антигенных пептидов была использована модифицированная линия HeLa, несущая комплекс HLA-DR и костимулирующие молекулы CD80. Была использована ступенчатая лентивирусная трансдукция клеток HeLa конструкциями, кодирующими CD80 и молекулы HLA-DRB1\*01:01/HLA-DRB1\*15:01. Далее для проверки модельной системы активации к смешанным клеткам линий CD80<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> HeLa и CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR добавляли соответствующие пептиды в синтетической или рекомбинантной форме, HA<sub>306-318</sub> (PKYVKQNTLKLAT) или MBP (синтетический - MBP<sub>85-99</sub> (ENPVVHFFKNIVTPR), trx - MBP<sub>81-104</sub> (QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQG)) и оценивали далее активацию с помощью проточной цитофлуорометрии (Рисунок 25А). Схемы генетических конструкций приведены в Приложении 2.





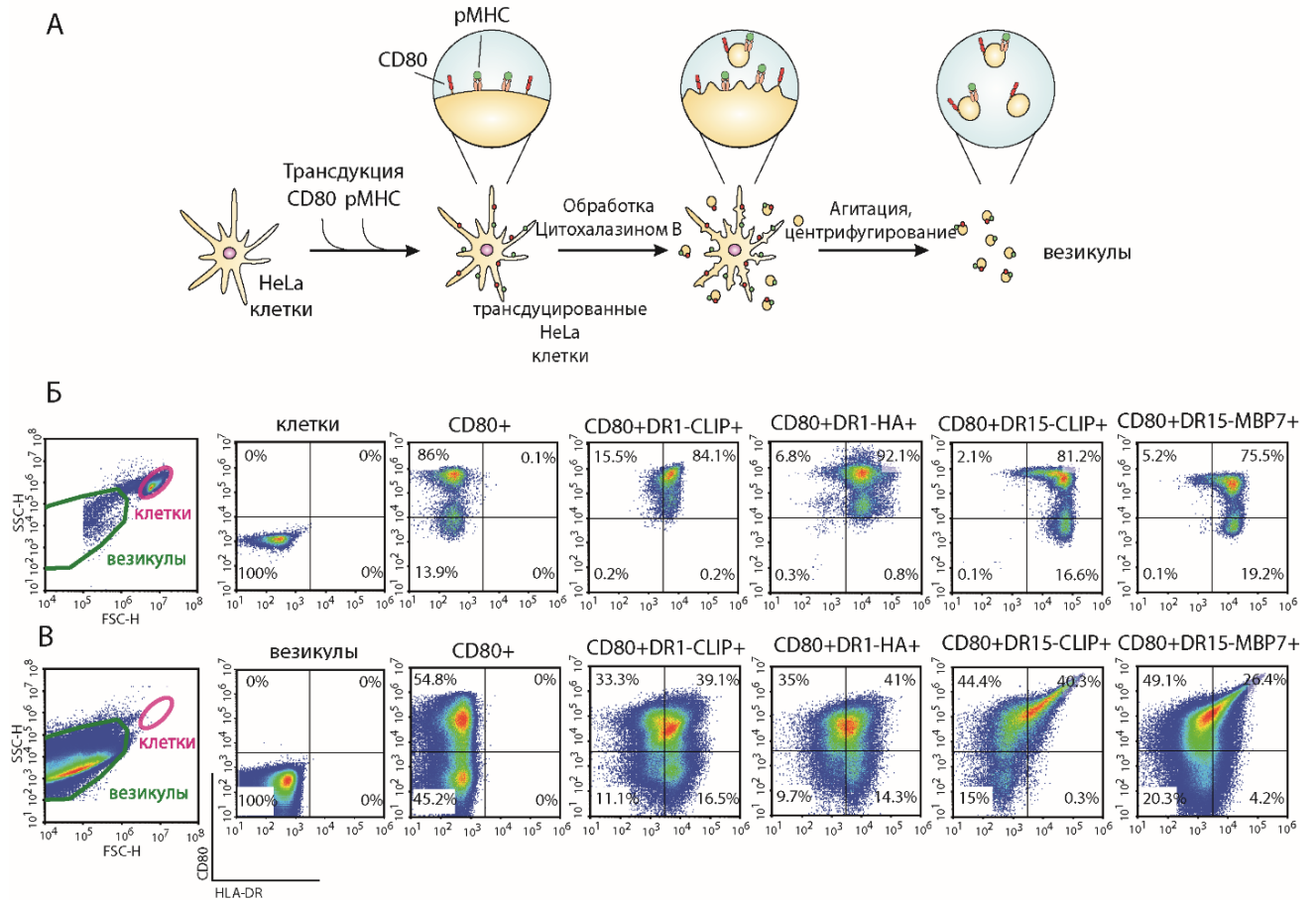
**Рисунок 25. Активация CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR с помощью клеточной линии CD80<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> HeLa.** (A) Схематическое изображение использования антигенных пептидов для активации CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR. (Б) CD4<sup>+</sup> HA1.7 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR клетки инкубировали с CD80<sup>+</sup> HLA-DRB1\*01:01<sup>+</sup> HeLa в течение 16 часов с синтетическим пептидом HA или trx-HA в концентрации 0,5, 1, 5, 10 и 20 мкМ. Белок-носитель trx использовали в качестве отрицательного контроля. Анализ проводили с помощью проточной цитометрии. Значения указывают процент активированных клеток, экспрессирующих GFP. Показаны репрезентативные профили проточной цитометрии. Процент GFP-положительных клеточных линий CD4<sup>+</sup> HA1.7 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR, инкубированных с CD80<sup>+</sup> HLA-DRB1\*01:01<sup>+</sup> HeLa, загруженными синтетическим пептидом HA или trx-HA в концентрации 0,5, 1, 5, 10 и 20 мкМ показан как среднее ± стандартное отклонение трех повторов эксперимента. (В) CD4<sup>+</sup> Ob.1A12 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR клетки инкубировали с CD80<sup>+</sup> HLA-DRB1\*15:01<sup>+</sup> HeLa в течение 16 часов с синтетическим пептидом MBP или trx-MBP в концентрации 0,5, 1, 5, 10 и 20 мкМ. Белок-носитель trx использовали в качестве отрицательного контроля. Анализ проводили с помощью проточной цитометрии. Значения указывают процент

активированных клеток, экспрессирующих GFP. Показаны репрезентативные профили проточной цитофлуорометрии. Процент GFP-положительных клеточных линий CD4<sup>+</sup> Ob.1A12 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR, инкубированных с CD80<sup>+</sup> HLA-DRB1\*15:01<sup>+</sup> HeLa, загруженными синтетическим пептидом MBP или trx-MBP в концентрации 0,5, 1, 5, 10 и 20 мкМ показан как среднее ± стандартное отклонение трех повторов эксперимента. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Уэлча: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001 [175].

В результате активация линий CD4<sup>+</sup> HA1.7 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR происходила при добавлении синтетического пептида и trx-пептида, причем статистическая разница в активации между рекомбинантным и синтетическим HA отсутствовала при концентрациях антигена 5 и 10 мкМ (Рисунок 25Б). Подобная ситуация наблюдалась и для CD4<sup>+</sup> Ob.1A12 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR при добавлении обоих антигенов MBP в концентрации 10 мкМ (Рисунок 25В). Активация с помощью белка-носителя trx для обеих линий CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR была незначительной.

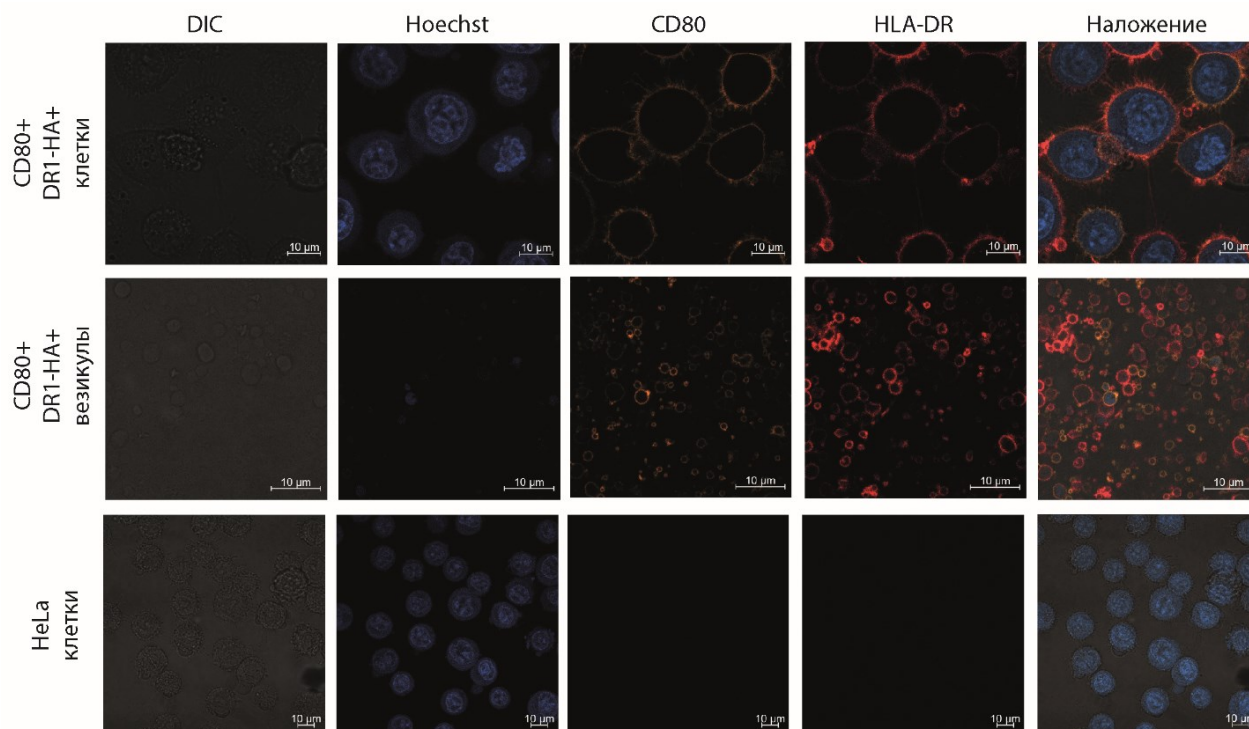
Далее мы решили использовать такие модифицированные клеточные линии HeLa для получения искусственных EVs, которые потенциально способны активировать CD4<sup>+</sup> Т-клетки и которые можно использовать для антиген-зависимой Т-клеточной экспансии. На этот раз линия CD80<sup>+</sup> HeLa модифицировалась комплексом рМНС, где конкретный пептид был ковалентно связан с N-концом β цепи HLA-DR, таким образом каждый комплекс HLA-DR был загружен необходимым антигенным пептидом. Для получения EVs клеточные линии CD80<sup>+</sup> рМНС<sup>+</sup> HeLa обрабатывали цитохалазином В, который вызывает быстрый распад актинового цитоскелета и образование удлиненных трубчатых выступов из клетки, которые можно отделить путем встряхивания (Рисунок 26А). Полученные EVs отделяли от клеток серией настольных центрифугирований. Эта процедура привела к получению EVs, несущих реплики белков поверхности мембраны, экспрессируемых исходной клеткой. Присутствие CD80 и рМНС на поверхности исходных клеток (Рисунок 26Б), а также полученных из них EVs (Рисунок 26В) было подтверждено с помощью проточной цитофлуорометрии. Для последующих экспериментов по активации нам понадобились EVs, несущие

узнаваемые антигены для HA1.7 и Ob.1A12 TCR – HA на HLA-DRB1\*01:01 (DR1-HA<sup>+</sup>) и MBP на HLA-DRB1\*15:01 (DR15-MBP7<sup>+</sup>), а также те же аллели, но с пептидом CLIP (DR1-CLIP<sup>+</sup>, DR15-CLIP<sup>+</sup>) в качестве отрицательного контроля.



**Рисунок 26. Создание искусственных EVs, несущих молекулы CD80 и pMHC.** (А) Схематическое изображение основных этапов генерации EVs из клеточных линий CD80<sup>+</sup> pMHC<sup>+</sup> HeLa. (Б) Окрашивание на молекулы CD80 и HLA-DR на клеточных линиях HeLa. (В) Окрашивание на молекулы CD80 и HLA-DR на EVs, полученных из HeLa. Контрольные нетрансдуцированные клетки и трансдуцированные клетки или EVs окрашивали флуоресцентными антителами anti-human CD80-PE, anti-human HLA-DR-APC. Анализ проводили с помощью проточной цитофлуорометрии.

Нетрансдуцированные клетки, а также CD80<sup>+</sup> DR1-HA<sup>+</sup> клетки и полученные из них EVs дополнительно оценивали на экспрессию молекул CD80 и HLA-DR с помощью конфокальной микроскопии (Рисунок 27).

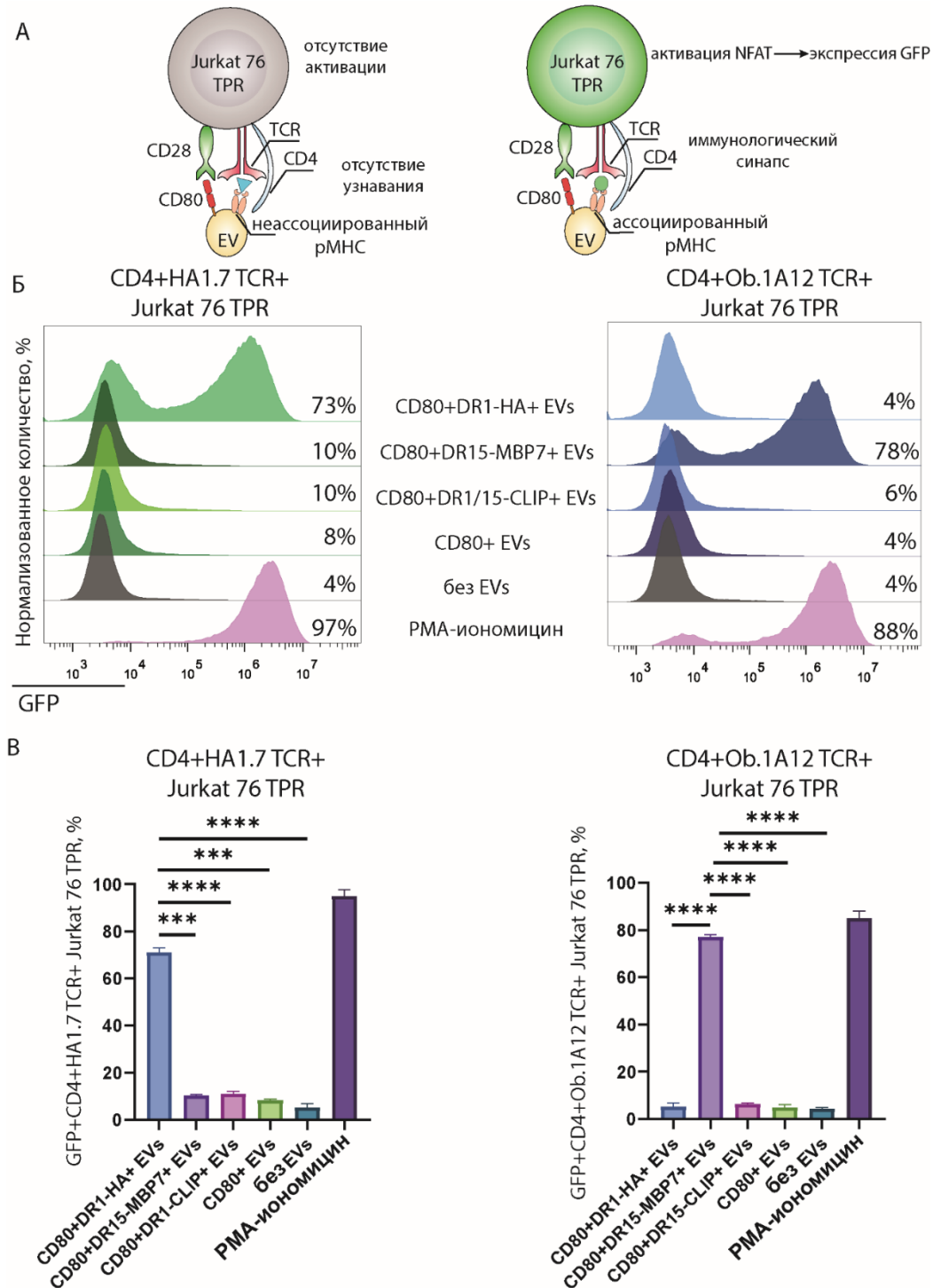


**Рисунок 27. Конфокальная микроскопия нетрансдуцированных HeLa и CD80<sup>+</sup> DR1-HA<sup>+</sup> HeLa или EVs.** Ядра были окрашены Hoechst 33342 (синий), а молекулы CD80 и HLA-DR были окрашены anti-human CD80-PE-(оранжевый) и anti-human HLA-DR-APC (красный) конъюгированными антителами, соответственно.

#### ***4.9 EVs, несущие родственный комплекс pMHC, активируют CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR антиген-специфическим образом***

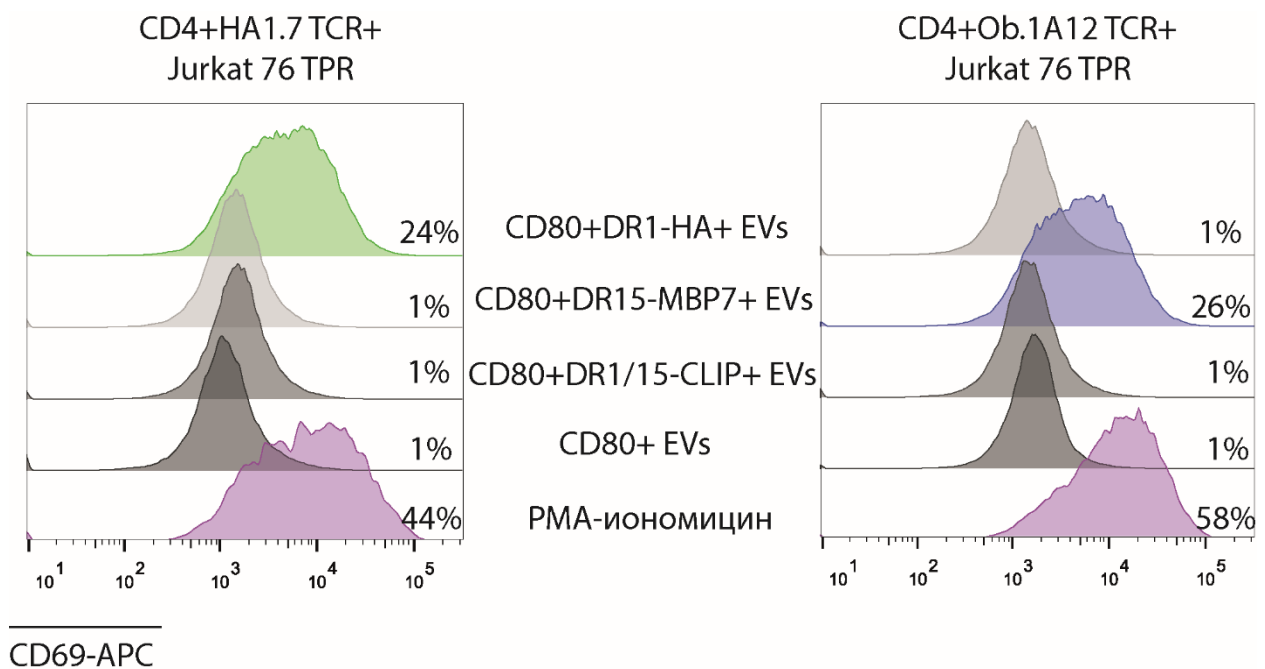
Затем мы оценили активационный потенциал EVs при инкубации с клеточными линиями CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR, где при взаимодействии TCR с ассоциированным комплексом pMHC происходит активация T-клеток и экспрессия GFP (Рисунок 28А), также как и в случае со стимуляцией CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR синтетическим или рекомбинантным антигенным пептидом. Полученные данные показали, что активация клеток CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR происходила исключительно при инкубации с EVs, несущими родственные комплексы pMHC (Рисунок 28Б). Пятикратный избыток CD80<sup>+</sup> DR1-HA<sup>+</sup> EVs активировал CD4<sup>+</sup> HA1.7 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR – в результате 73% популяции экспрессировала GFP. И наоборот, инкубация с EVs, несущими исключительно молекулы CD80 или

нерелевантные комплексы рМНС (DR1-CLIP или DR15-MBP7), приводила к незначительной активации, при этом GFP-положительные клетки составляли менее 10% популяции. Аналогично, линия CD4<sup>+</sup> Ob.1A12 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 активировалась исключительно в ответ на инкубацию с CD80<sup>+</sup> DR15-MBP7<sup>+</sup> EVs. Антиген-специфичность активации была статистически значимой для обеих линий CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR (Рисунок 28В).



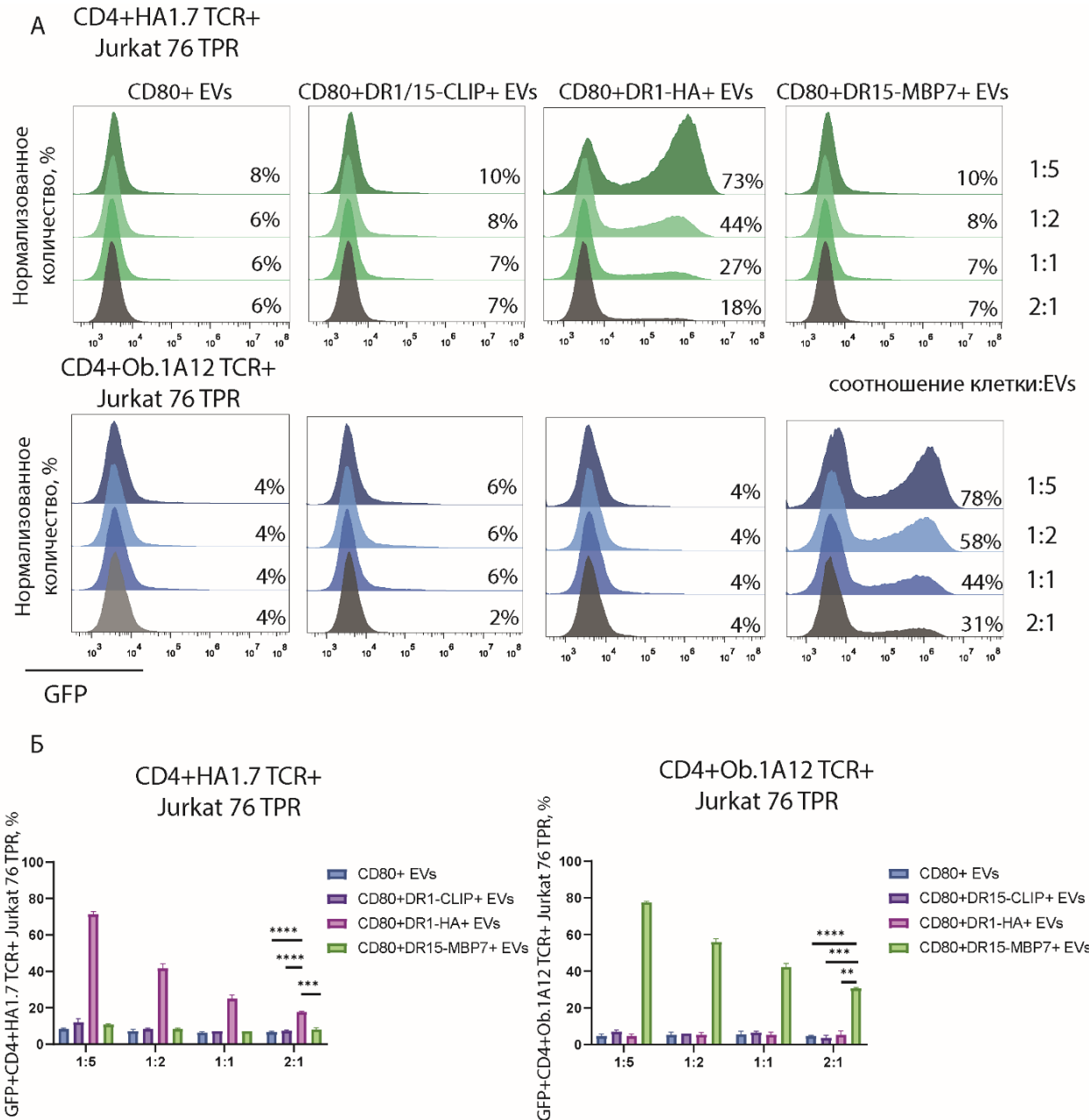
**Рисунок 28. Стимуляция клеток CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR посредством CD80<sup>+</sup> pMHC<sup>+</sup> EVs.** (А) Схематическое изображение активации NFAT, экспрессии GFP линиями CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR при распознавание родственного pMHC. (Б) Клетки CD4<sup>+</sup> HA1.7 TCR<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Ob.1A12 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR инкубировали с 5-кратным избытком EVs в течение 16–18 часов. Отсутствие EVs использовали в качестве отрицательного контроля. Стимуляцию PMAи иономицином использовали в качестве неспецифического положительного контроля. Анализ проводили с помощью проточной цитофлуорометрии. Значения указывают процент активированных GFP-экспрессирующих клеток CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR. (В) Процент GFP-положительных клеточных линий CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR, подвергшихся инкубации с EVs, показан как среднее ± стандартное отклонение трех экспериментальных повторов. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Уэлча: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001. NFAT – ядерный фактор активированных Т-клеток.

Мы также подтвердили антиген-специфичную активацию CD4<sup>+</sup> HA1.7 TCR<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Ob.1A12 TCR<sup>+</sup> путем измерения экспрессии маркера активации Т-клеток – CD69 (Рисунок 29).



**Рисунок 29. Оценка экспрессии CD69 на активированных CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> клетках Jurkat 76 TPR.** CD4<sup>+</sup> HA1.7 TCR<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Ob.1A12 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR инкубировали с пятикратным избытком EVs в течение 16–18 часов. Стимуляцию PMA и иономицином использовали в качестве неспецифического положительного контроля. Анализ проводили с помощью проточной цитофлуорометрии. Значения указывают процент активированных CD69<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR.

Наблюдаемая активация CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR зависела от количества EVs, как для вирусного CD4<sup>+</sup> HA1.7 TCR<sup>+</sup>, так и аутоиммунного Ob.1A12 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR (Рисунок 30А). Так, большее количество EVs вызывало больший процент CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR, экспрессирующих GFP. Мы отметили, что EVs, несущие низкоаффинные комплексы DR15-MBP7 индуцировали более сильную активацию в клетках CD4<sup>+</sup> Ob.1A12 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR, в меньших количествах по сравнению с комплексами DR1-НА, активирующими CD4<sup>+</sup> HA1.7 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR. Так, при соотношении CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR:EVs = 2:1, DR15-MBP7 комплексы активировали клетки на 31%, в то время как DR1-НА на 18%. При данном соотношении разница между родственными рМНС и иррелевантными рМНС была статистически значимой для обеих линий CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR (Рисунок 30Б). Полученные данные могут указывать на то, что EVs усеяны рМНС комплексами и костимулирующими молекулами CD80 и их активационный потенциал обуславливается не сколько аффинностью, а авидностью комплексов рМНС к TCR. Так как это в значительной мере реплицирует естественные условия активации CD4<sup>+</sup> Т-клеток, использование EVs подтверждает свою валидность для антиген-специфичной активации и экспансии CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Таким образом, TCR как с высокой, так и с низкой аффинностью демонстрируют индукцию активации Jurkat 76 TPR в ответ на инкубацию с соответствующими EVs, которая при этом не вызывает какой-либо заметной неспецифической фоновой активации. Наши данные демонстрируют способность CD80<sup>+</sup> рМНС<sup>+</sup> EVs стимулировать антиген-специфичный ответ у модельных линий CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR.



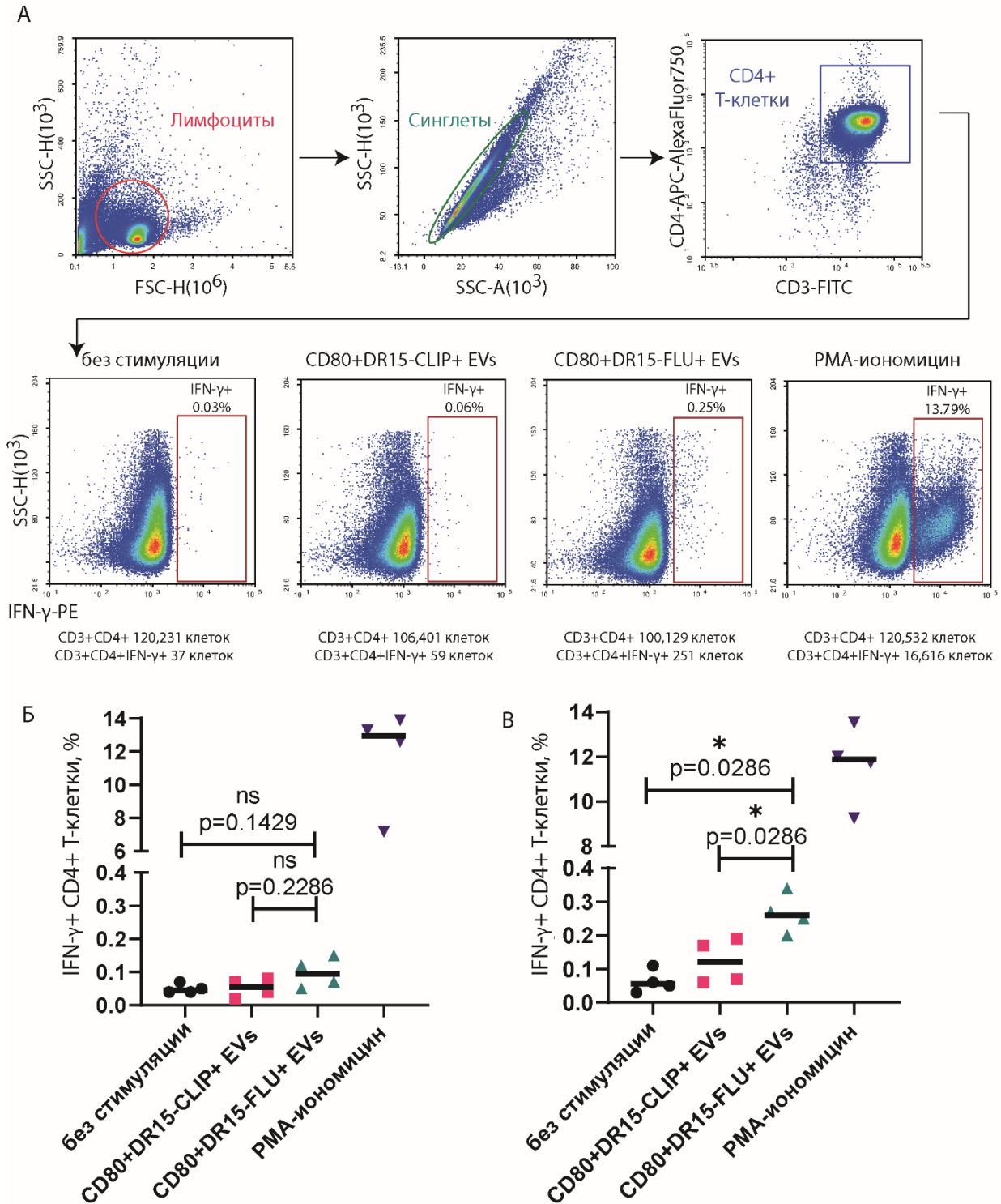
**Рисунок 30. Стимуляция клеток CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR EVs в разных соотношениях.** (А) Клетки CD4<sup>+</sup> HA1.7 TCR<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Ob.1A12 TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR были инкубировали с EVs в течение 16–18 часов с соотношением клетки:EVs 1:5, 1:2, 1:1 и 2:1. Анализ проводили с помощью проточной цитофлуорометрии. Значения указывают процент активированных клеток, экспрессирующих GFP. Показаны репрезентативные профили проточной цитофлуорометрии. (Б) Процент GFP-положительных клеточных линий CD4<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR инкубировавшихся с EVs, показан как среднее ± стандартное отклонение трех экспериментальных повторов. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Уэлча \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001.



#### ***4.10 EVs индуцируют антиген-специфическую экспансию редких клонов CD4<sup>+</sup> Т-клеток***

Далее мы оценили возможность использования EVs для стимуляции и антиген-специфической экспансии CD4<sup>+</sup> Т-клеток человека. Мы создали EVs, несущие эпитоп гемагглютинина вируса гриппа В (Flu В HA<sub>270-286</sub> – GKTGTIVYQRGVLLPQK), представленный в комплексе HLA-DRB1\*15:01 (DR15-FLU). Ранее было показано, что этот специфический эпитоп является иммунодоминантным для CD4<sup>+</sup> Т-клеток у доноров, несущих аллель HLA-DRB1\*15:01, путем окраски тетрамерами МНС-II [20].

Мы выделили CD4<sup>+</sup> Т-клетки у четырех HLA-DRB1\*15:01<sup>+</sup> HDs. Изолированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки затем подвергались стимуляции EVs в течение 3 дней с последующей 10-дневной экспансией с добавлением фактора роста Т-клеток IL-2. На 10-й день Т-клетки подвергали рестимуляции EVs, несущими DR15-FLU или, в качестве контроля, DR15-CLIP, в течение 16–18 часов. После повторной стимуляции Т-клетки окрашивались антителами к IFN- $\gamma$  по протоколу для детекции внутриклеточной экспрессии данного провоспалительного цитокина. Стратегия окрашивания CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Т-клеток, а также репрезентативные графики представлены на Рисунке 31А. Разница в активации между DR15-FLU и DR15-CLIP для CD4<sup>+</sup> Т-клеток не подвергшихся предварительной антиген-специфичной экспансии была статистически незначительна (Рисунок 31Б). Разница в проценте клеток IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> между стимуляцией EVs с DR15-FLU или DR15-CLIP после антиген-специфической экспансии была статистически значимой (P=0,0286) (Рисунок 31В).



**Рисунок 31. Антиген-специфическая экспансия  $CD4^+$  Т-клеток человека с помощью EVs.** (А) Стратегия окрашивания  $CD4^+$  IFN- $\gamma^+$  Т-клеток из общей популяции лимфоцитов. Приведены репрезентативные графики экспериментов. (Б) Изолированные  $CD4^+$  Т-клетки из четырех HDs инкубировали с EVs в течение 16–18 часов перед оценкой продукции IFN- $\gamma$ . (В) Изолированные  $CD4^+$  Т-клетки из четырех HDs подвергали антиген-специфичной экспансии с  $CD80^+$  DR15–FLU $^+$  EVs. Спустя 10 дней происходила рестимуляция EVs в течение 16–18 часов перед

оценкой продукции IFN- $\gamma$ . Отсутствие EVs использовалось как отрицательный контроль. В качестве положительного контроля использовали стимуляцию РМА и иономицином. Каждая точка представляет собой среднее значение трех экспериментальных повторов. Статистический анализ проводился с использованием теста Манна-Уитни \*  $p < 0,05$ .

В совокупности, наши результаты иллюстрируют эффективность применения EVs для стимулирования пролиферации антиген-специфичных CD4<sup>+</sup> Т-клеток.

#### ***4.11 Использование EVs для антиген-специфической экспансии CD4<sup>+</sup> Т-клеток пациентов с СКВ для определения последовательностей TCR***

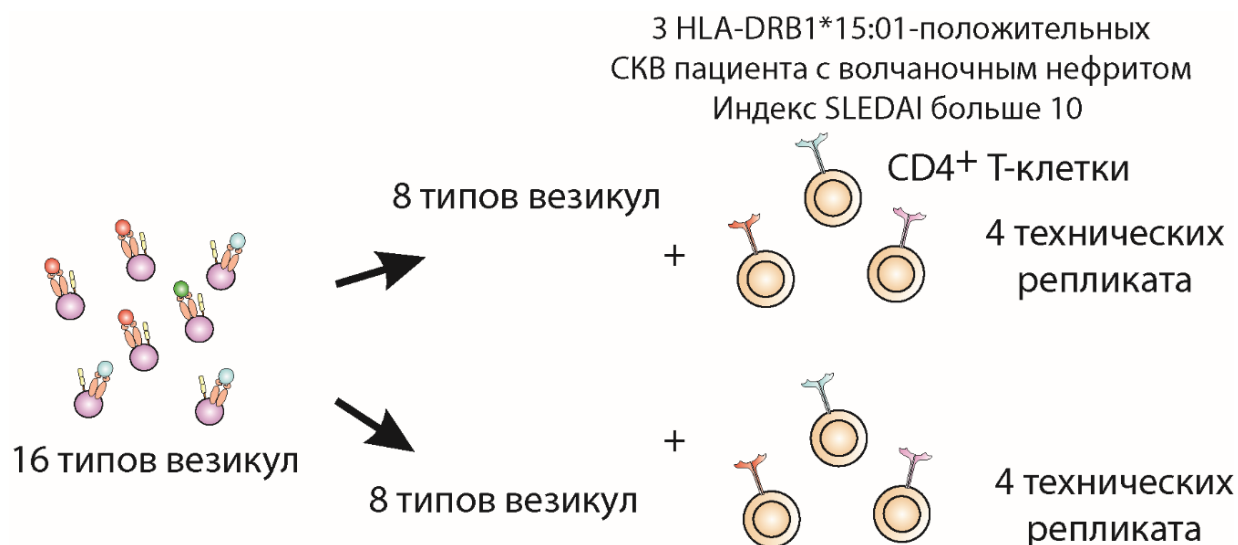
Для поиска взаимодействующих с аутоантигенными пептидами TCR и оценки их последовательностей у пациентов с СКВ, мы выбрали 12 аутоантигенных пептидов, ассоциированных с СКВ, согласно данным AAgAtlas, которые были отобраны во втором раунде фагового дисплея на HLA-DRB1\*15:01, но не встречались в контрольных отборах (Таблица 8). В дополнение к этим пептидам, в пул для анализа были добавлены четыре СКВ-ассоциированных пептида с высокой предсказанной аффинностью к HLA-DRB1\*15:01 по результатам NetMHCIIpan, которые не были отобраны в фаговом дисплеем.

**Таблица 8. Аутоантигенные пептиды, используемые для антиген-специфичной экспансии CD4<sup>+</sup> Т-клеток, полученных из HLA-DRB1\*15:01<sup>+</sup> пациентов с СКВ**

№	Последовательность	Uniprot	Название	Фаговый отбор/ NetMHCIIpan
1	KIQTHIVQQENHLLK	NIN <sub>1666-1680</sub>	Ninein	фаговый
2	KPAVYNYPEGAAYEF	ESR1 <sub>48-62</sub>	Estrogen receptor	фаговый
3	SRTPEYYPNAGLIMN	APOA	Apolipoprotein(a)	фаговый
4	SFPEVSFFHSEENKA	INSR <sub>1297-1311</sub>	Insulin receptor	фаговый

5	MGHLKYYLAPKIEDE	PCNA <sub>244-258</sub>	Proliferating cell nuclear antigen	фаговый
6	YKEHLNSMVVERQQL	NIN <sub>901-915</sub>	Ninein	фаговый
7	AGAFLIRESETLKGS	LYN <sub>150-164</sub>	Tyrosine-protein kinase Lyn	фаговый
8	AGSVILLENLRFHVE	PGK1 <sub>113-127</sub>	Phosphoglycerate kinase 1	фаговый
9	TIDVSAISNLIRKHV	ABCA1 <sub>1177-1191</sub>	Phospholipid-transporting ATPase ABCA1	фаговый
10	VQDLLLLDVAPLSLG	HSP76 <sub>390-404</sub>	Heat shock 70 kDa protein 6	фаговый
11	VPPNVILAPSLEAFF	APOA <sub>1026-1040</sub>	Apolipoprotein(a)	фаговый
12	RPDNGFVNYPAKPTL	APOH <sub>210-224</sub>	Beta-2-glycoprotein 1	фаговый
13	LGVFLLWKNWRLKNI	LDLR <sub>804-818</sub>	Low-density lipoprotein receptor	NetMHCIIpan
14	MARIKKWLTFSLGKQ	MBL2 <sub>119-133</sub>	Mannose-binding protein C	NetMHCIIpan
15	FSLKLYHAFSAMKKV	IC1 <sub>149-163</sub>	Plasma protease C1 inhibitor	NetMHCIIpan
16	VISGLRHFTGYRIEL	INSR <sub>808-822</sub>	Insulin receptor	NetMHCIIpan

Последовательности аутоантигенных пептидов, отобранных с помощью фагового дисплея, были сокращены до 15 ак, основываясь на наиболее высокой расчетной аффинности по результатам NetMHCIIpan. Это было сделано с учетом того, что при презентации длинных пептидов (44 ак) TCR могут столкнуться с конформационными трудностями в распознавании комплекса рМНС, что может негативно повлиять на активацию CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Эти пептиды были экспрессированы в комплексе с HLA-DRB1\*15:01 на поверхности клеточной линии CD80<sup>+</sup> HeLa, аналогично предыдущим экспериментам. На основе полученных линий было создано 16 типов EVs, соответствующих количеству пептидов. Параллельно из PBMC трех пациентов с СКВ, носителей HLA-DRB1\*15:01, были изолированы CD4<sup>+</sup> Т-клетки. Все пациенты имели индекс активности заболевания SLEDAI-2k более 10 и волчаночный нефрит в анамнезе. 16 типов EVs были разделены на две группы для дальнейшей антиген-специфической экспансии CD4<sup>+</sup> Т-клеток пациентов с СКВ (Рисунок 32).



**Рисунок 32. Использование EVs, несущих СКВ-ассоциированные аутоантигенные пептиды, для стимуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток больных СКВ и идентификации последовательностей их TCR.**

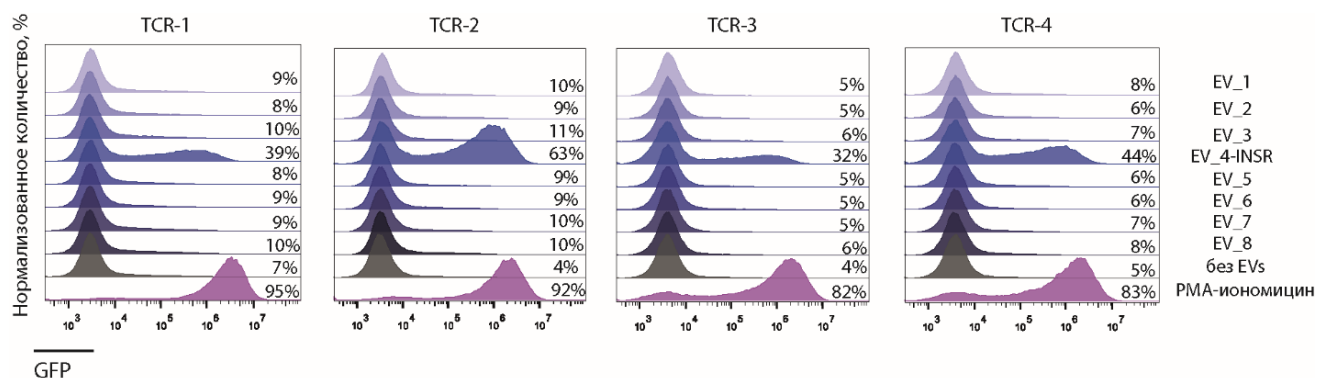
Номера 1-8 из Таблицы 8 составляли первую группу, тогда как 9-16 – вторую. Для каждой группы EVs для каждого пациента выполнялось четыре технических повтора. Антиген-специфичная экспансия проводилась согласно методике, описанной выше, без завершающей рестимуляции. По завершению 14 дней из экспансированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток выделялась тотальная РНК, из которой первоначально синтезировалась кДНК, с помощью праймеров содержащих уникальный молекулярный идентификатор (UMI). Затем происходила мультиплексная амплификация с помощью праймеров к различным вариабельным регионам TCR, далее встраивались адаптеры для секвенирования NGS. Таким образом, четыре технических репликата выступали контролем против других четырех технических репликатов. Соответственно, считалось, что экспансированные последовательности TCR встречающиеся в нескольких репликатах внутри одной группы, но не встречающиеся в репликатах в другой группы, являются экспансированными в ответе на какой-либо из восьми антигенов. Глубина секвенирования составила 100 прочтений на одну Т-клетку. Благодаря такой глубине секвенирования было возможно правильно сопоставить количество

транскриптов  $\alpha$  и  $\beta$  цепей TCR и понять какие из них принадлежат одному T-клеточному клону. В итоге, по результатам секвенирования были обнаружены экспансированные последовательности для четырех TCR для первой группы EVs одного пациента (Таблица 9). Данные последовательности имели одинаковый вариабельный регион  $\alpha$  цепи – TRAV14DV, а также  $\beta$  цепи – TRBV5-4, за исключением TCR-1, который имел TRBV10-3. Подобное соответствие потенциально указывает на то, что данные TCR экспансировались в ответ на одинаковый антигенный пептид.

**Таблица 9. Последовательности экспансированных TCR.**

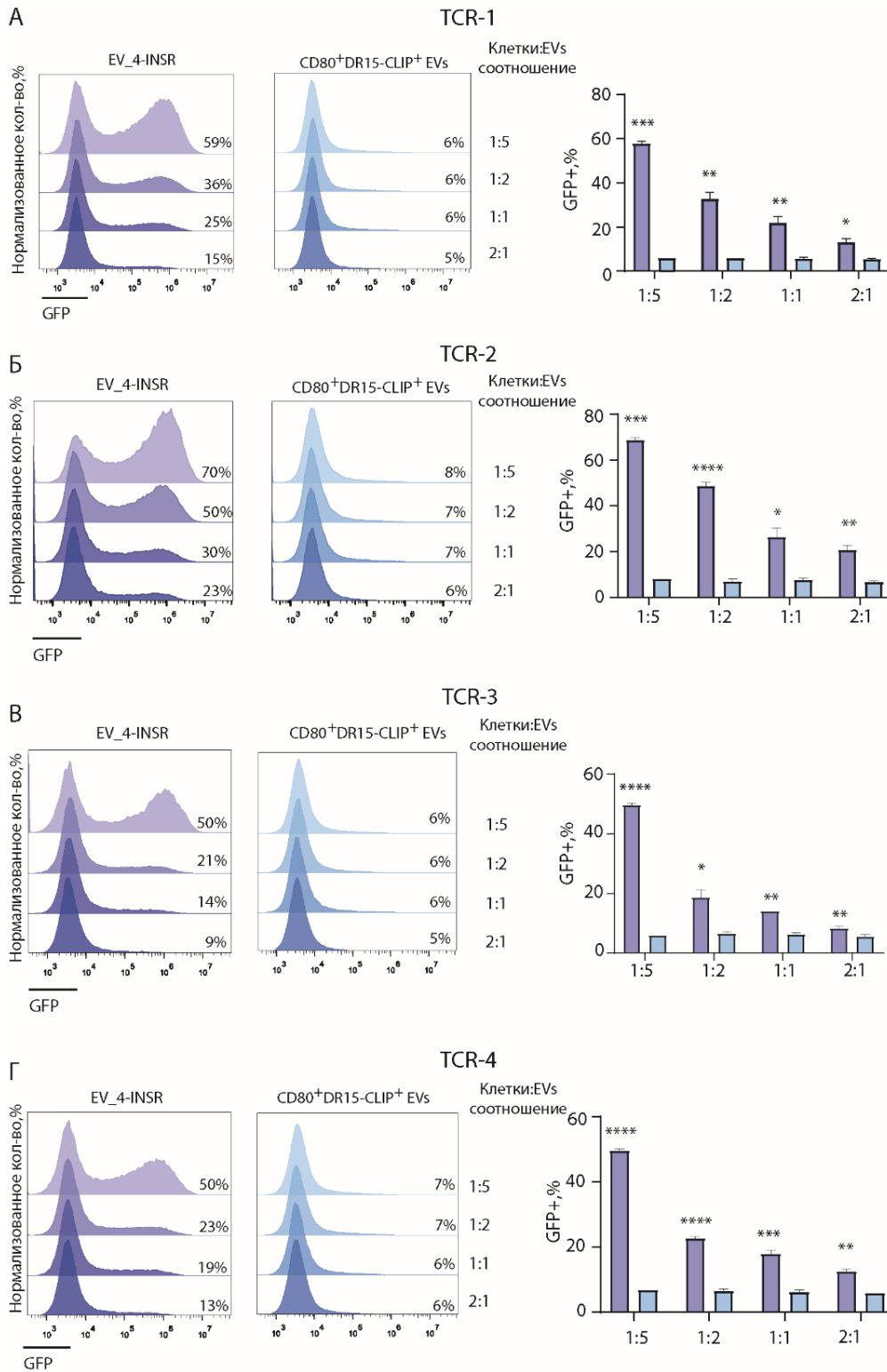
№	TCR	CDR3 ак	V регион	J регион	CDR3 ак	V регион	D регион	J регион
		TCR $\alpha$				TCR $\beta$		
1	TCR-1	CAMRVTVG NQFYF	TRAV14D V4	TRAJ49	CAIRGTSGA SFSYEQYF	TRBV10-3	TRBD2	TRBJ2-7
2	TCR-2	CAMRGGT GGFKTIF	TRAV14D V4	TRAJ9	CASSGISTLS NEQFF	TRBV5-4	TRBD2	TRBJ2-1
3	TCR-3	CAMRERIR SQGNLIF	TRAV14D V4	TRAJ42	CASSSTSYIT GELFF	TRBV5-4	TRBD2	TRBJ2-2
4	TCR-4	CAMRGPG RRALTF	TRAV14D V4	TRAJ5	CASSGLAT TGELFF	TRBV5-4	TRBD2	TRBJ2-2

Из данных последовательностей вариабельных регионов и CDR3 были собраны конструкции с помощью перекрывающейся ПЦР, также содержащие человеческие константные регионы TCR, как и в случае конструкций HA1.7 и Ob.1A12 TCR. На основе конструкций были получены лентивирусные частицы четырех различных TCR, которыми трансдуцировали линию CD4<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR. Полученные линии инкубировали по отдельности с EVs 1-8 в 2,5-кратном избытке EVs. В результате было выяснено, что все четыре линии CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR были активированы EVs №4, несущими фрагмент инсулинового рецептора INSR<sub>1297-1311</sub> в контексте HLA-DRB1\*15:01 (Рисунок 33).



**Рисунок 33. INSR<sub>1297-1311</sub> активирует CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR.** Линии CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR инкубировали с 2,5-кратным избытком EVs в течение 16–18 часов. Отсутствие EVs использовали в качестве отрицательного контроля. Стимуляцию PMA и иономицином использовали в качестве неспецифического положительного контроля. Анализ проводили с помощью проточной цитофлуорометрии. Значения указывают процент активированных GFP-экспрессирующих клеток CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR.

Далее было проверено, активируют ли EVs, несущие INSR<sub>1297-1311</sub> клетки CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR в дозо-зависимой манере. При увеличении количества EVs, несущие INSR<sub>1297-1311</sub> происходило увеличение экспрессии GFP клетками всех четырех линий CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR, что было статистически значимым (Рисунок 34). В качестве отрицательного контроля использовались EVs, несущие DR15-CLIP, не вызвавшие значимой активации во всех четырех линиях CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR.

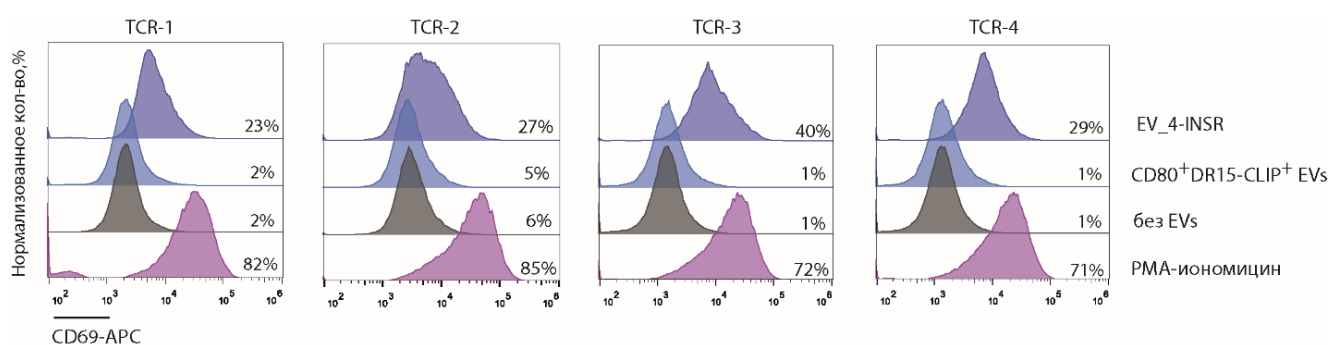


**Рисунок 34. Стимуляция клеток CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR EVs в разных соотношениях.** Клетки CD4<sup>+</sup> СКВ TCR-1, TCR-2, TCR-3 или TCR-4<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR были инкубировали с EVs в течение 16–18 часов с соотношением клетки Jurkat:EVs 1:5, 1:2, 1:1 и 2:1. Анализ проводили с помощью проточной цитофлуорометрии. Значения указывают процент активированных клеток, экспрессирующих GFP. Показаны репрезентативные профили проточной



цитофлуорометрии. Процент GFP-положительных клеточных линий CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR инкубированных с EVs, показан как среднее ± стандартное отклонение трех экспериментальных повторов. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Уэлча \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001.

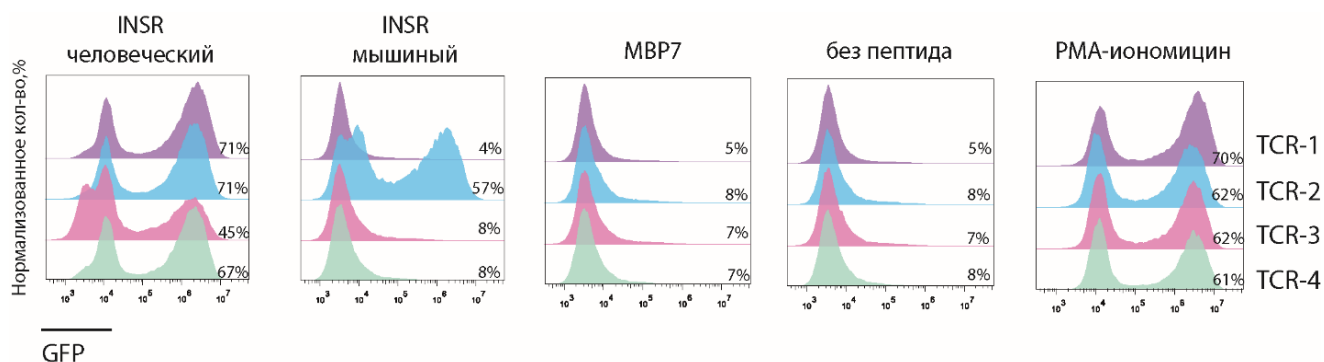
Дополнительно мы подтвердили антиген-специфичную активацию клеточных линий CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR путем измерения экспрессии маркера активации Т-клеток – CD69 (Рисунок 35).



**Рисунок 35. Оценка экспрессии CD69 на активированных CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> клетках Jurkat 76 TPR.** Клетки CD4<sup>+</sup> СКВ TCR-1, TCR-2, TCR-3 или TCR-4<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR инкубировали с пятикратным избытком EVs в течение 16–18 часов. Стимуляцию PMA и иономицином использовали в качестве неспецифического положительного контроля. Анализ проводили с помощью проточной цитофлуорометрии. Значения указывают процент активированных CD69<sup>+</sup>-экспрессирующих CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> клеток Jurkat 76 TPR.

Далее мы подтвердили, что активация четырех клеточных линий CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR происходит и при добавлении синтетического пептида INSR<sub>1297-1311</sub> к полученной линии CD80<sup>+</sup> HLA-DRB1\*15:01<sup>+</sup> HeLa, не несущая ковалентно связанного пептида в пептид-связывающей борозде HLA-DR (Рисунок 36). Чтобы проверить насколько замены в последовательности INSR<sub>1297-1311</sub> могут повлиять на связывание и активацию СКВ TCR, мы дополнительно добавляли к CD80<sup>+</sup> HLA-DRB1\*15:01<sup>+</sup> HeLa мышинный аналог данной последовательности фрагмента инсулинового рецептора, имеющего одну ак замену – SFPEVSFFYSEENKA, мышинный INSR<sub>1287-1301</sub>. В ответе на мышинный аналог активировалась только линия

CD4<sup>+</sup> СКВ TCR-2<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR. Полученные данные говорят о том, что даже замена одной аминокислоты может нарушить формирование тримолекулярного комплекса. Также в качестве отрицательного контроля добавлялся пептид MBP7, при добавлении которого ни одна линия CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR не активировалась.



**Рисунок 36. Стимуляция CD4<sup>+</sup> СКВ TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR синтетическими пептидами.** Клетки CD4<sup>+</sup> СКВ TCR-1, TCR-2, TCR-3 или TCR-4<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR инкубировали с 100 мкМ пептида (INSR человеческий, INSR мышинный, MBP7) в течение 16–18 часов. Стимуляцию PMA и иономицином использовали в качестве неспецифического положительного контроля. Анализ проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Значения указывают процент активированных клеток, экспрессирующих GFP.

СКВ является чрезвычайно гетерогенным заболеванием, поражающее различные органы, благодаря таргетированию аутореактивными Т- и В-клетками различных аутоантигенов. Зачастую СКВ характеризуются наличием сопутствующих синдромов, включающих такие заболевания как волчаночный нефрит, АФС и синдром инсулинорезистентности типа В. Синдром инсулинорезистентности типа В характеризуется присутствием аутоантител к INSR, которые ингибируют связывание инсулина с его рецептором [199]. Наличие данных антител приводит к значительным нарушениям обмена веществ и гипергликемии. В литературных источниках зарегистрированы 31 случай синдрома инсулинорезистентности типа В, связанного с СКВ, где в большинстве случаев присутствовали антитела к INSR [200]. Более того было показано, что 2,6%

пациентов с СКВ дали положительный результат на антитела к INSR, без каких-либо признаков резистентности к инсулину или гипогликемии в этих случаях, что говорит о потенциальном более широком распространении этого аутоантигена у больных СКВ без сопутствующего синдрома инсулинорезистентности типа В [201]. Наличие аутоантител к INSR подразумевает присутствие аутореактивных В-клеток, а также аутореактивных  $CD4^+$  Т-клеток способствующих пролиферации этих аутореактивных В-клеток, которые специфичны к фрагменту INSR, представленному на HLA-II. На настоящий момент опубликованные эпитопы INSR активирующие аутореактивные  $CD4^+$  Т-клетки отсутствуют.

Таким образом, завершая раздел, посвященный СКВ, используя аутоантигенную фаговую библиотеку мы идентифицировали новый эпитоп  $CD4^+$  Т-клеток в аутоантигене INSR, потенциально вовлеченный в патогенез СКВ. Создание модельных клеточных линий  $CD80^+$  HLA-DR<sup>+</sup> HeLa и полученных из них EVs, а также  $CD4^+$  TCR<sup>+</sup> Jurkat 76 TPR позволило идентифицировать INSR-специфичные  $CD4^+$  Т-клетки, а также оценить формирование тримолекулярных комплексов между аутоантигенным пептидом и идентифицированными TCR. Эти результаты могут дать информацию для дальнейших разработок терапий, основанных на последовательностях аутоантигенных пептидов и взаимодействующих с ними TCR при СКВ.

## 5 ВЫВОДЫ

1. В результате скрининга аутоантигенной бактериофаговой библиотеки найдены новые аутоантигенные пептиды, потенциально участвующие в патогенезе ревматоидного артрита и системной красной волчанки, представленные на молекулах HLA-DRB1\*01:01, HLA-DRB1\*04:01 и HLA-DRB1\*15:01, соответственно.

2. Масс-спектрометрический анализ иммунопептидома HLA-DR дендритных клеток пациентов с ревматоидным артритом и здоровых доноров, несущих аллели HLA-DRB1\*01:01 и HLA-DRB1\*04:01, позволил идентифицировать аутоантигенные пептиды, ассоциированные с ревматоидным артритом. Установлено, что часть пептидов, идентифицированных в результате масс-спектрометрического анализа, идентична пептидам, отобраным с помощью фагового дисплея, что свидетельствует в пользу высокой релевантности выявленных аутоантигенов как природных лигандов данных HLA-DR.

3. Детектирован аутореактивный CD4<sup>+</sup> Т-клеточный ответ на новый аутоантигенный пептид аннексина A11 (ANX11<sub>387-401</sub>) в комплексе с HLA-DRB1\*01:01 во фракции мононуклеарных клеток пациентов с РА, что свидетельствует о потенциальной роли данного аутоантигена в патогенезе ревматоидного артрита.

4. Создана система стимуляции и антиген-специфической экспансии человеческих CD4<sup>+</sup> Т-клеток с использованием искусственных внеклеточных везикул, несущих ко-стимулирующие молекулы CD80 и комплексы рМНС.

5. С помощью искусственных внеклеточных везикул обнаружены последовательности четырех Т-клеточных рецепторов, взаимодействующих с фрагментом инсулинового рецептора (INSR<sub>1297-1311</sub>) в комплексе с HLA-DRB1\*15:01 при системной красной волчанке.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

### *Русскоязычные:*

АЗ – аутоиммунные заболевания

ак – аминокислотный остаток

АПК – антигенпрезентирующие клетки

АФС – антифосфолипидный синдром

Д1Т – диабет первого типа

ДК – дендритные клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

кДа – килодальтон

КОЕ – колониеобразующие единицы

ПТМ – посттрансляционные модификации

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РА – ревматоидный артрит

РНК – рибонуклеиновая кислота

РС – рассеянный склероз

СКВ – системная красная волчанка

ЦНС – центральная нервная система

ЭАЭ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит

### *Англоязычные:*

АССР (antibodies to citrullinated cyclic peptide) – антитела к цитруллинированному циклическому пептиду

АСРА (anti-citrullinated protein antibodies) – антитела к цитруллинированному белку

ANX11 (annexin A11) – аннексин А11

AUC (area under the curve) – площадь под кривой

- b2GPI (beta-2 glycoprotein 1) –  $\beta$ -2 гликопротеин I
- BrA (brefeldin A) – брэфелдин А
- CDR (complementarity-determining region) – гипервариабельный участок
- Col2 (type II collagen) – коллаген 2 типа
- CRP (C-reactive protein) – С-реактивный белок
- EVs (extracellular vesicles) – внеклеточные везикулы
- FLS (fibroblast-like synoviocytes) – фибробластоподобные синовиоциты
- GFP (green fluorescent protein) – зеленый флуоресцентный белок
- GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- HD (healthy donor) – здоровый донор
- HLA-II (human leukocyte antigen class II) – человеческий лейкоцитарный антиген II класса
- HRP (horseradish peroxidase) – пероксидаза хрена
- IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) – интерферон-гамма
- IL (interleukin) – интерлейкин
- INS (insulin) – инсулин
- INSR (insulin receptor) – рецептор инсулина
- LC-MS/MS (liquid chromatography–mass spectrometry) – метод жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии
- MBP (myelin basic protein) – основной белок миелина
- MHC-II (major histocompatibility complex class II) – главный комплекс гистосовместимости II класса
- MPO (myeloperoxidase) – миелопероксидаза
- mTEC (medullary thymic epithelial cells) – эпителиальные клетки медуллы тимуса
- NFAT (nuclear factor of activated T cells) – ядерный фактор активированных Т-клеток
- NGS (next generation sequencing) – секвенирование нового поколения

- NOD мыши – non-obese diabetic мыши
- PBMC (peripheral blood mononuclear cells) – моноклеарные клетки периферической крови
- PBS (phosphate-buffered saline) – фосфатно-солевой буфер
- PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) – форбол-12-миристан-13-ацетат
- pMHC (peptide – MHC-II complex) – комплекс пептид-MHC-II
- RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) – рецептор-активатор лиганда ядерного фактора kB
- RF (rheumatoid factor) – ревматоидный фактор
- TCR (T cell receptor) – T-клеточный рецептор
- TNF- $\alpha$  (tumour necrosis factor  $\alpha$ ) – фактор некроза опухоли  $\alpha$
- Treg (T regulatory cells) – T-регуляторные клетки
- Trx (thioredoxin) – тиоредоксин

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Benham H. et al. Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype–positive rheumatoid arthritis patients // *Sci Transl Med*. American Association for the Advancement of Science, 2015. Vol. 7, № 290. P. 290ra87–290ra87.
2. Sonigra A. et al. Randomized phase I trial of antigen-specific tolerizing immunotherapy with peptide/calcitriol liposomes in ACPA+ rheumatoid arthritis // *JCI Insight*. The American Society for Clinical Investigation, 2022. Vol. 7, № 20.
3. Debnath M., Banerjee M., Berk M. Genetic gateways to COVID-19 infection: Implications for risk, severity, and outcomes // *The FASEB Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 34, № 7. P. 8787–8795.
4. Colona V.L. et al. Will GWAS eventually allow the identification of genomic biomarkers for COVID-19 severity and mortality? // *J Clin Invest*. The American Society for Clinical Investigation, 2021. Vol. 131, № 23.
5. Monel B. et al. HIV Controllers Exhibit Effective CD8<sup>+</sup> T Cell Recognition of HIV-1-Infected Non-activated CD4<sup>+</sup> T Cells // *Cell Rep*. Elsevier, 2019. Vol. 27, № 1. P. 142–153.e4.
6. Ishina I.A. et al. MHC Class II Presentation in Autoimmunity // *Cells*. 2023. Vol. 12, № 2.
7. Ishigaki K. et al. HLA autoimmune risk alleles restrict the hypervariable region of T cell receptors // *Nat Genet*. 2022. Vol. 54, № 4. P. 393–402.
8. Lee H.-M. et al. A Broad Range of Self-Reactivity Drives Thymic Regulatory T Cell Selection to Limit Responses to Self // *Immunity*. 2012. Vol. 37, № 3. P. 475–486.
9. Cozzo Picca C. et al. Thymocyte deletion can bias Treg formation toward low-abundance self-peptide // *Eur J Immunol*. John Wiley & Sons, Ltd, 2009. Vol. 39, № 12. P. 3301–3306.
10. Lagattuta K.A. et al. Repertoire analyses reveal T cell antigen receptor sequence features that influence T cell fate // *Nat Immunol*. 2022. Vol. 23, № 3. P. 446–457.
11. Malhotra D. et al. Tolerance is established in polyclonal CD4<sup>+</sup> T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns // *Nat Immunol*. 2016. Vol. 17, № 2. P. 187–195.
12. Mariathasan S. et al. Duration and Strength of Extracellular Signal-Regulated Kinase Signals Are Altered During Positive Versus Negative Thymocyte Selection // *The Journal of Immunology*. American Association of Immunologists, 2001. Vol. 167, № 9. P. 4966–4973.



13. Itano A. et al. The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells. // *Journal of Experimental Medicine*. 1996. Vol. 183, № 3. P. 731–741.
14. Fugger L., Svejgaard A. Association of MHC and rheumatoid arthritis: HLA-DR4 and rheumatoid arthritis - studies in mice and men // *Arthritis Res Ther*. 2000. Vol. 2, № 3. P. 208.
15. Wang J. et al. HLA-DR15 Molecules Jointly Shape an Autoreactive T Cell Repertoire in Multiple Sclerosis // *Cell*. Cell Press, 2020. Vol. 183, № 5. P. 1264–1281.e20.
16. Ooi J.D. et al. Dominant protection from HLA-linked autoimmunity by antigen-specific regulatory T cells // *Nature*. 2017. Vol. 545, № 7653. P. 243–247.
17. Mamedov A. et al. Protective Allele for Multiple Sclerosis HLA-DRB1\*01:01 Provides Kinetic Discrimination of Myelin and Exogenous Antigenic Peptides // *Front Immunol*. 2020. Vol. 10.
18. Mamedov A.E. et al. Loading Rate of Exogenous and Autoantigenic Determinants on Major Histocompatibility Complex Class II Mediates Resistance to Multiple Sclerosis // *Dokl Biochem Biophys*. 2019. Vol. 485, № 1. P. 115–118.
19. Pociot F., Lernmark Å. Genetic risk factors for type 1 diabetes // *The Lancet*. 2016. Vol. 387, № 10035. P. 2331–2339.
20. Xiaomin W. et al. Increased islet antigen-specific regulatory and effector CD4<sup>+</sup> T cells in healthy individuals with the type 1 diabetes-protective haplotype // *Sci Immunol*. American Association for the Advancement of Science, 2020. Vol. 5, № 44. P. eaax8767.
21. Blum J.S., Wearsch P.A., Cresswell P. Pathways of Antigen Processing // *Annu Rev Immunol*. Annual Reviews, 2013. Vol. 31, № 1. P. 443–473.
22. Álvaro-Benito M., Freund C. Revisiting nonclassical HLA II functions in antigen presentation: Peptide editing and its modulation // *HLA*. 2020. Vol. 96, № 4. P. 415–429.
23. Álvaro-Benito M. et al. Quantification of HLA-DM-Dependent Major Histocompatibility Complex of Class II Immunopeptidomes by the Peptide Landscape Antigenic Epitope Alignment Utility // *Front Immunol*. 2018. Vol. 9.
24. Reyes-Vargas E. et al. HLA-DM catalytically enhances peptide dissociation by sensing peptide-MHC class II interactions throughout the peptide-binding cleft // *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 2020. Vol. 295, № 10. P. 2959–2973.
25. Poluektov Y., Kim A., Sadegh-Nasser S. HLA-DO and Its Role in MHC Class II Antigen Presentation // *Front Immunol*. 2013. Vol. 4.

26. Nanaware P.P. et al. HLA-DO Modulates the Diversity of the MHC-II Self-peptidome // *Mol Cell Proteomics*. 2018/12/20. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2019. Vol. 18, № 3. P. 490–503.
27. Surh C.D. et al. Thymic Selection by a Single MHC/Peptide Ligand Produces a Semidiverse Repertoire of CD4+ T Cells // *Immunity*. 1997. Vol. 7, № 2. P. 209–219.
28. Zhou Z. et al. Peptidomic analysis of type 1 diabetes associated HLA-DQ molecules and the impact of HLA-DM on peptide repertoire editing // *Eur J Immunol*. John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 47, № 2. P. 314–326.
29. Collado J.A. et al. Composition of the HLA-DR-associated human thymus peptidome // *Eur J Immunol*. John Wiley & Sons, Ltd, 2013. Vol. 43, № 9. P. 2273–2282.
30. Nielsen M. et al. NetMHCIIpan-2.0 - Improved pan-specific HLA-DR predictions using a novel concurrent alignment and weight optimization training procedure // *Immunome Res*. BioMed Central, 2010. Vol. 6. P. 9.
31. Muixí L. et al. Thyroglobulin Peptides Associate In Vivo to HLA-DR in Autoimmune Thyroid Glands // *The Journal of Immunology*. 2008. Vol. 181, № 1. P. 795.
32. Fissolo N. et al. Naturally presented peptides on major histocompatibility complex I and II molecules eluted from central nervous system of multiple sclerosis patients // *Mol Cell Proteomics*. 2009/06/16. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2009. Vol. 8, № 9. P. 2090–2101.
33. Busch R., Kollnberger S., Mellins E.D. HLA associations in inflammatory arthritis: emerging mechanisms and clinical implications // *Nat Rev Rheumatol*. 2019. Vol. 15, № 6. P. 364–381.
34. Nakayama M. et al. Priming and effector dependence on insulin B:9-23 peptide in NOD islet autoimmunity // *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation, 2007. Vol. 117, № 7. P. 1835–1843.
35. Levisetti M.G. et al. The Insulin-Specific T Cells of Nonobese Diabetic Mice Recognize a Weak MHC-Binding Segment in More Than One Form // *The Journal of Immunology*. 2007. Vol. 178, № 10. P. 6051.
36. Mohan J.F., Petzold S.J., Unanue E.R. Register shifting of an insulin peptide-MHC complex allows diabetogenic T cells to escape thymic deletion // *J Exp Med*. 2011/11/07. The Rockefeller University Press, 2011. Vol. 208, № 12. P. 2375–2383.
37. Yang J. et al. Autoreactive T cells specific for insulin B:11-23 recognize a low-affinity peptide register in human subjects with autoimmune diabetes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. Vol. 111, № 41. P. 14840–14845.

38. Loyal L. et al. Cross-reactive CD4<sup>+</sup> T cells enhance SARS-CoV-2 immune responses upon infection and vaccination // *Science* (1979). American Association for the Advancement of Science, 2022. Vol. 374, № 6564. P. eabh1823.
39. Mørch A.M. et al. Coreceptors and TCR Signaling – the Strong and the Weak of It // *Front Cell Dev Biol.* 2020. Vol. 8.
40. Rudolph M.G., Stanfield R.L., Wilson I.A. HOW TCRS BIND MHCS, PEPTIDES, AND CORECEPTORS // *Annu Rev Immunol. Annual Reviews*, 2006. Vol. 24, № 1. P. 419–466.
41. Rossjohn J. et al. T Cell Antigen Receptor Recognition of Antigen-Presenting Molecules // *Annu Rev Immunol. Annual Reviews*, 2015. Vol. 33, № 1. P. 169–200.
42. Hennecke J., Carfi A., Wiley D.C. Structure of a covalently stabilized complex of a human  $\alpha\beta$  T-cell receptor, influenza HA peptide and MHC class II molecule, HLA-DR1 // *EMBO J. John Wiley & Sons, Ltd*, 2000. Vol. 19, № 21. P. 5611–5624.
43. Hahn M. et al. Unconventional topology of self peptide–major histocompatibility complex binding by a human autoimmune T cell receptor // *Nat Immunol.* 2005. Vol. 6, № 5. P. 490–496.
44. Zenichiro K. et al. Positioning of autoimmune TCR-Ob.2F3 and TCR-Ob.3D1 on the MBP85–99/HLA-DR2 complex // *Proceedings of the National Academy of Sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. Vol. 105, № 40. P. 15523–15528.
45. Li Y. et al. Structure of a human autoimmune TCR bound to a myelin basic protein self-peptide and a multiple sclerosis-associated MHC class II molecule // *EMBO J. John Wiley & Sons, Ltd*, 2005. Vol. 24, № 17. P. 2968–2979.
46. Sethi D.K. et al. A highly tilted binding mode by a self-reactive T cell receptor results in altered engagement of peptide and MHC // *Journal of Experimental Medicine.* 2011. Vol. 208, № 1. P. 91–102.
47. Adams J.J. et al. T Cell Receptor Signaling Is Limited by Docking Geometry to Peptide-Major Histocompatibility Complex // *Immunity.* 2011. Vol. 35, № 5. P. 681–693.
48. Yin Y. et al. Structure of a TCR with high affinity for self-antigen reveals basis for escape from negative selection // *EMBO J. John Wiley & Sons, Ltd*, 2011. Vol. 30, № 6. P. 1137–1148.
49. Maynard J. et al. Structure of an Autoimmune T Cell Receptor Complexed with Class II Peptide-MHC: Insights into MHC Bias and Antigen Specificity // *Immunity.* 2005. Vol. 22, № 1. P. 81–92.

50. Feng D. et al. Structural evidence for a germline-encoded T cell receptor–major histocompatibility complex interaction “codon” // *Nat Immunol.* 2007. Vol. 8, № 9. P. 975–983.
51. Zamvil S.S. et al. T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis // *Nature.* 1986. Vol. 324, № 6094. P. 258–260.
52. Ito Y. et al. Rapid CLIP dissociation from MHC II promotes an unusual antigen presentation pathway in autoimmunity // *Journal of Experimental Medicine.* 2018. Vol. 215, № 10. P. 2617–2635.
53. Stadinski B.D. et al. Diabetogenic T cells recognize insulin bound to IA<sub>g</sub>7 in an unexpected, weakly binding register // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. Vol. 107, № 24. P. 10978–10983.
54. Frances C. et al. Specificity and detection of insulin-reactive CD4<sup>+</sup> T cells in type 1 diabetes in the nonobese diabetic (NOD) mouse // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011. Vol. 108, № 40. P. 16729–16734.
55. Junbao Y. et al. Autoreactive T cells specific for insulin B:11-23 recognize a low-affinity peptide register in human subjects with autoimmune diabetes // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. Vol. 111, № 41. P. 14840–14845.
56. Raposo B. et al. T cells specific for post-translational modifications escape intrathymic tolerance induction // *Nat Commun.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 353.
57. Carayanniotis G. Recognition of Thyroglobulin by T Cells: The Role of Iodine // *Thyroid.* Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2007. Vol. 17, № 10. P. 963–973.
58. Kwon E.-J., Ju J.H. Impact of Posttranslational Modification in Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: Focusing on Citrullination, Carbamylation, and Acetylation // *Int J Mol Sci.* 2021. Vol. 22, № 19.
59. Hill J.A. et al. Cutting Edge: The Conversion of Arginine to Citrulline Allows for a High-Affinity Peptide Interaction with the Rheumatoid Arthritis-Associated HLA-DRB1\*0401 MHC Class II Molecule // *The Journal of Immunology.* 2003. Vol. 171, № 2. P. 538.
60. Scherer H.U., Häupl T., Burmester G.R. The etiology of rheumatoid arthritis // *J Autoimmun.* 2020. Vol. 110. P. 102400.
61. Jia L.J. et al. The shared susceptibility epitope of HLA-DR4 binds citrullinated self-antigens and the TCR // *Sci Immunol.* American Association for the Advancement of Science, 2021. Vol. 6, № 58. P. eabe0896.
62. Song J. et al. Shared recognition of citrullinated tenascin-C peptides by T and B cells in rheumatoid arthritis // *JCI Insight.* American Society for Clinical Investigation, 2021. Vol. 6, № 5.

63. Ge C. et al. Key interactions in the trimolecular complex consisting of the rheumatoid arthritis-associated DRB1\*04:01 molecule, the major glycosylated collagen II peptide and the T-cell receptor // *Ann Rheum Dis*. 2022. Vol. 81, № 4. P. 480.
64. McGinty J.W. et al. Recognition of Posttranslationally Modified GAD65 Epitopes in Subjects With Type 1 Diabetes // *Diabetes*. 2014. Vol. 63, № 9. P. 3033–3040.
65. Mannering S.I. et al. The insulin A-chain epitope recognized by human T cells is posttranslationally modified // *Journal of Experimental Medicine*. 2005. Vol. 202, № 9. P. 1191–1197.
66. Baker R.L. et al. CD4 T Cells Reactive to Hybrid Insulin Peptides Are Indicators of Disease Activity in the NOD Mouse // *Diabetes*. 2018. Vol. 67, № 9. P. 1836–1846.
67. Baker R.L. et al. Hybrid Insulin Peptides Are Autoantigens in Type 1 Diabetes // *Diabetes*. 2019. Vol. 68, № 9. P. 1830–1840.
68. Thomas D. et al. Pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes recognize epitopes formed by peptide fusion // *Science* (1979). American Association for the Advancement of Science, 2016. Vol. 351, № 6274. P. 711–714.
69. Christen U., von Herrath M.G. Infections and Autoimmunity—Good or Bad? // *The Journal of Immunology*. 2005. Vol. 174, № 12. P. 7481.
70. Markovic-Plese S. et al. High level of cross-reactivity in influenza virus hemagglutinin-specific CD4+ T-cell response: Implications for the initiation of autoimmune response in multiple sclerosis // *J Neuroimmunol*. 2005. Vol. 169, № 1. P. 31–38.
71. Hiemstra H.S. et al. Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. Vol. 98, № 7. P. 3988–3991.
72. Bellucci G. et al. Multiple Sclerosis and SARS-CoV-2: Has the Interplay Started? // *Front Immunol*. 2021. Vol. 12.
73. Satheesh N.J., Salloum-Asfar S., Abdulla S.A. The Potential Role of COVID-19 in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis—A Preliminary Report // *Viruses*. 2021. Vol. 13, № 10.
74. Brennan F.M. et al. Resting CD4+effector memory T cells are precursors of bystander-activated effectors: a surrogate model of rheumatoid arthritis synovial T-cell function // *Arthritis Res Ther*. 2008. Vol. 10, № 2. P. R36.
75. Martino G. et al. Proinflammatory cytokines regulate antigen-independent T-cell Activation by two separate calcium-signaling pathways in multiple sclerosis patients // *Ann Neurol*. John Wiley & Sons, Ltd, 1998. Vol. 43, № 3. P. 340–349.

76. Steimle V. et al. Regulation of MHC Class II Expression by Interferon- $\gamma$  Mediated by the Transactivator Gene CIITA // *Science* (1979). American Association for the Advancement of Science, 1994. Vol. 265, № 5168. P. 106–109.
77. Iglesias B.M. et al. Analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands in cultured mouse microglia: upregulation by interferon- $\gamma$  and lipopolysaccharide and downregulation by interleukin-10, prostaglandin E2 and cyclic AMP-elevating agents // *J Neuroimmunol*. 1997. Vol. 72, № 1. P. 83–93.
78. Nikcevich K.M. et al. IFN- $\gamma$ -activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. // *The Journal of Immunology*. 1997. Vol. 158, № 2. P. 614.
79. Russell M.A. et al. HLA Class II Antigen Processing and Presentation Pathway Components Demonstrated by Transcriptome and Protein Analyses of Islet  $\beta$ -Cells From Donors With Type 1 Diabetes // *Diabetes*. 2019. Vol. 68, № 5. P. 988–1001.
80. Quesada-Masachs E. et al. Upregulation of HLA class II in pancreatic beta cells from organ donors with type 1 diabetes // *Diabetologia*. 2022. Vol. 65, № 2. P. 387–401.
81. Zhao Y. et al. Mouse pancreatic beta cells express MHC class II and stimulate CD4+ T cells to proliferate // *Eur J Immunol*. 2015. Vol. 45, № 9. P. 2494–2503.
82. Scott N.A. et al. IFN $\gamma$ -Induced MHC Class II Expression on Islet Endothelial Cells Is an Early Marker of Insulinitis but Is Not Required for Diabetogenic CD4+ T Cell Migration // *Front Immunol*. 2018. Vol. 9.
83. Gobin S.J.P. et al. Upregulation of transcription factors controlling MHC expression in multiple sclerosis lesions // *Glia*. John Wiley & Sons, Ltd, 2001. Vol. 36, № 1. P. 68–77.
84. Falcão A.M. et al. Disease-specific oligodendrocyte lineage cells arise in multiple sclerosis // *Nat Med*. 2018. Vol. 24, № 12. P. 1837–1844.
85. Kanazawa S. et al. Aberrant MHC class II expression in mouse joints leads to arthritis with extraarticular manifestations similar to rheumatoid arthritis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. Vol. 103, № 39. P. 14465–14470.
86. Fasano R. et al. Impact of Antigen Presentation Mechanisms on Immune Response in Autoimmune Hepatitis // *Front Immunol*. 2022. Vol. 12.
87. Serreze D. V et al. Diabetes Acceleration or Prevention by a Coxsackievirus B4 Infection: Critical Requirements for both Interleukin-4 and Gamma Interferon // *J Virol*. 2005. Vol. 79, № 2. P. 1045–1052.
88. Nekoua M.P., Alidjinou E.K., Hober D. Persistent coxsackievirus B infection and pathogenesis of type 1 diabetes mellitus // *Nat Rev Endocrinol*. 2022. Vol. 18, № 8. P. 503–516.

89. Isaacs S.R. et al. Viruses and Type 1 Diabetes: From Enteroviruses to the Virome // *Microorganisms*. 2021. Vol. 9, № 7.
90. Gabibov A.G. et al. Combinatorial antibody library from multiple sclerosis patients reveals antibodies that cross-react with myelin basic protein and EBV antigen // *The FASEB Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 2011. Vol. 25, № 12. P. 4211–4221.
91. Abdul-Ghaffar A.Y. et al. Relation between Epstein-Barr virus infection and Multiple Sclerosis // *QJM: An International Journal of Medicine*. 2021. Vol. 114, № Supplement\_1. P. hcab091.
92. Tao C. et al. Markers of Epstein-Barr virus and Human Herpesvirus-6 infection and multiple sclerosis clinical progression // *Mult Scler Relat Disord*. 2022. Vol. 59. P. 103561.
93. Lünemann J.D., Münz C. EBV in MS: guilty by association? // *Trends Immunol*. 2009. Vol. 30, № 6. P. 243–248.
94. Zdimerova H. et al. Attenuated immune control of Epstein–Barr virus in humanized mice is associated with the multiple sclerosis risk factor HLA-DR15 // *Eur J Immunol*. John Wiley & Sons, Ltd, 2021. Vol. 51, № 1. P. 64–75.
95. Luo G. et al. Autoimmunity to hypocretin and molecular mimicry to flu in type 1 narcolepsy // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018. Vol. 115, № 52. P. E12323–E12332.
96. Vuorela A. et al. Enhanced influenza A H1N1 T cell epitope recognition and cross-reactivity to protein-O-mannosyltransferase 1 in Pandemrix-associated narcolepsy type 1 // *Nat Commun*. 2021. Vol. 12, № 1. P. 2283.
97. Ooi J.D. et al. A plasmid-encoded peptide from *Staphylococcus aureus* induces anti-myeloperoxidase nephritogenic autoimmunity // *Nat Commun*. 2019. Vol. 10, № 1. P. 3392.
98. Ellis N.M.J. et al. T Cell Mimicry and Epitope Specificity of Cross-Reactive T Cell Clones from Rheumatic Heart Disease // *The Journal of Immunology*. 2005. Vol. 175, № 8. P. 5448.
99. Moten D. et al. Molecular Mimicry of the Rheumatoid Arthritis-Related Immunodominant T-Cell Epitope within Type II Collagen (CII260-270) by the Bacterial L-Asparaginase // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23, № 16.
100. Miyauchi E. et al. Gut microorganisms act together to exacerbate inflammation in spinal cords // *Nature*. 2020. Vol. 585, № 7823. P. 102–106.
101. Ruff W.E. et al. Pathogenic Autoreactive T and B Cells Cross-React with Mimotopes Expressed by a Common Human Gut Commensal to Trigger Autoimmunity // *Cell Host Microbe*. Elsevier, 2019. Vol. 26, № 1. P. 100-113.e8.

102. Girdhar K. et al. A gut microbial peptide and molecular mimicry in the pathogenesis of type 1 diabetes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2022. Vol. 119, № 31. P. e2120028119.
103. Nishimoto H. et al. Prevention of autoimmune insulinitis by expression of I-E molecules in NOD mice // *Nature*. 1987. Vol. 328, № 6129. P. 432–434.
104. Reich E.-P. et al. An explanation for the protective effect of the MHC class II I-E molecule in murine diabetes // *Nature*. 1989. Vol. 341, № 6240. P. 326–328.
105. Schmidt D. et al. A Mechanism for the Major Histocompatibility Complex–linked Resistance to Autoimmunity // *Journal of Experimental Medicine*. 1997. Vol. 186, № 7. P. 1059–1075.
106. Katz J.D. et al. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis // *Cell*. 1993. Vol. 74, № 6. P. 1089–1100.
107. Beringer D.X. et al. T cell receptor reversed polarity recognition of a self-antigen major histocompatibility complex // *Nat Immunol*. 2015. Vol. 16, № 11. P. 1153–1161.
108. Stadinski B.D. et al. A temporal thymic selection switch and ligand binding kinetics constrain neonatal Foxp3<sup>+</sup> Treg cell development // *Nat Immunol*. 2019. Vol. 20, № 8. P. 1046–1058.
109. Scherer H.U., Häupl T., Burmester G.R. The etiology of rheumatoid arthritis // *J Autoimmun*. 2020. Vol. 110. P. 102400.
110. van der Woude D. et al. Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum*. John Wiley & Sons, Ltd, 2009. Vol. 60, № 4. P. 916–923.
111. van der Helm-van Mil A.H.M. et al. The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum*. John Wiley & Sons, Ltd, 2006. Vol. 54, № 4. P. 1117–1121.
112. Ding B. et al. Different patterns of associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in the extended major histocompatibility complex region // *Arthritis Rheum*. John Wiley & Sons, Ltd, 2009. Vol. 60, № 1. P. 30–38.
113. Nielen M.M.J. et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: A study of serial measurements in blood donors // *Arthritis Rheum*. John Wiley & Sons, Ltd, 2004. Vol. 50, № 2. P. 380–386.
114. Tanner S. et al. A prospective study of the development of inflammatory arthritis in the family members of Indigenous North American people with rheumatoid arthritis // *Arthritis & Rheumatology*. Wiley Online Library, 2019. Vol. 71, № 9. P. 1494–1503.



115. Hannemann N., Apparailly F., Courties G. Synovial macrophages: from ordinary eaters to extraordinary multitaskers // *Trends Immunol.* Elsevier, 2021. Vol. 42, № 5. P. 368–371.
116. Itoh Y. Chapter Eight - Metalloproteinases in Rheumatoid Arthritis: Potential Therapeutic Targets to Improve Current Therapies // *Progress in Molecular Biology and Translational Science* / ed. Khalil R.A. Academic Press, 2017. Vol. 148. P. 327–338.
117. Geusens P. The role of RANK ligand/osteoprotegerin in rheumatoid arthritis // *Ther Adv Musculoskelet Dis.* SAGE Publications, 2012. Vol. 4, № 4. P. 225–233.
118. Phull A.-R. et al. Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis // *Chem Biol Interact.* 2018. Vol. 281. P. 121–136.
119. Holers V.M., Banda N.K. Complement in the Initiation and Evolution of Rheumatoid Arthritis // *Front Immunol.* 2018. Vol. 9.
120. Elshabrawy H.A. et al. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis // *Angiogenesis.* 2015. Vol. 18, № 4. P. 433–448.
121. KEHLEN A. et al. Expression, modulation and signalling of IL-17 receptor in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis // *Clin Exp Immunol.* 2002. Vol. 127, № 3. P. 539–546.
122. Shen F., Gaffen S.L. Structure–function relationships in the IL-17 receptor: Implications for signal transduction and therapy // *Cytokine.* 2008. Vol. 41, № 2. P. 92–104.
123. Mellado M. et al. T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis // *Front Immunol.* 2015. Vol. 6.
124. Messemaker T.C., Huizinga T.W., Kurreeman F. Immunogenetics of rheumatoid arthritis: Understanding functional implications // *J Autoimmun.* 2015. Vol. 64. P. 74–81.
125. Holoshitz J. The rheumatoid arthritis HLA–DRB1 shared epitope // *Curr Opin Rheumatol.* 2010. Vol. 22, № 3.
126. Verpoort K.N. et al. Association of HLA–DR3 with anti–cyclic citrullinated peptide antibody–negative rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* John Wiley & Sons, Ltd, 2005. Vol. 52, № 10. P. 3058–3062.
127. Raychaudhuri S. et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis // *Nat Genet.* 2012. Vol. 44, № 3. P. 291–296.
128. Shoda H. et al. Autoantigen BiP-Derived HLA–DR4 Epitopes Differentially Recognized by Effector and Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis // *Arthritis & Rheumatology.* John Wiley & Sons, Ltd, 2015. Vol. 67, № 5. P. 1171–1181.

129. Carlé C. et al. Characteristics of the (Auto)Reactive T Cells in Rheumatoid Arthritis According to the Immune Epitope Database // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, № 5.
130. Shoda H. et al. Immune responses to Mycobacterial heat shock protein 70 accompany self-reactivity to human BiP in rheumatoid arthritis // *Sci Rep*. 2016. Vol. 6, № 1. P. 22486.
131. de Jong H. et al. PAN–DR-Binding Hsp60 self epitopes induce an interleukin-10–mediated immune response in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum*. John Wiley & Sons, Ltd, 2009. Vol. 60, № 7. P. 1966–1976.
132. Ge C. et al. Key interactions in the trimolecular complex consisting of the rheumatoid arthritis-associated DRB1\*04:01 molecule, the major glycosylated collagen II peptide and the T-cell receptor // *Ann Rheum Dis*. 2022. Vol. 81, № 4. P. 480.
133. De Santis M. et al. Effects of type II collagen epitope carbamylation and citrullination in human leucocyte antigen (HLA)-DR4+ monozygotic twins discordant for rheumatoid arthritis // *Clin Exp Immunol*. 2016. Vol. 185, № 3. P. 309–319.
134. Kotzin B.L. et al. Use of soluble peptide–DR4 tetramers to detect synovial T cells specific for cartilage antigens in patients with rheumatoid arthritis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. Vol. 97, № 1. P. 291–296.
135. Trembleau S. et al. Immunodominant T-cell epitopes of hnRNP-A2 associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis // *Eur J Immunol*. John Wiley & Sons, Ltd, 2010. Vol. 40, № 6. P. 1795–1808.
136. Auger I. et al. Peptidylarginine Deiminase Autoimmunity and the Development of Anti–Citrullinated Protein Antibody in Rheumatoid Arthritis: The Hapten–Carrier Model // *Arthritis & Rheumatology*. John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 72, № 6. P. 903–911.
137. Law S.C. et al. T-cell autoreactivity to citrullinated autoantigenic peptides in rheumatoid arthritis patients carrying HLA-DRB1 shared epitope alleles // *Arthritis Res Ther*. 2012. Vol. 14, № 3. P. R118.
138. Chemin K. et al. A Novel HLA–DRB1\*10:01–Restricted T Cell Epitope From Citrullinated Type II Collagen Relevant to Rheumatoid Arthritis // *Arthritis & Rheumatology*. John Wiley & Sons, Ltd, 2016. Vol. 68, № 5. P. 1124–1135.
139. Song J. et al. Shared recognition of citrullinated tenascin-C peptides by T and B cells in rheumatoid arthritis // *JCI Insight*. The American Society for Clinical Investigation, 2021. Vol. 6, № 5.
140. James E.A. et al. HLA–DR1001 presents “altered-self” peptides derived from joint-associated proteins by accepting citrulline in three of its binding pockets // *Arthritis Rheum*. John Wiley & Sons, Ltd, 2010. Vol. 62, № 10. P. 2909–2918.

141. Gerstner C. et al. Functional and Structural Characterization of a Novel HLA-DRB1\*04:01-Restricted  $\alpha$ -Enolase T Cell Epitope in Rheumatoid Arthritis // *Front Immunol.* 2016. Vol. 7.
142. Cianciotti B.C. et al. CD4+ Memory Stem T Cells Recognizing Citrullinated Epitopes Are Expanded in Patients With Rheumatoid Arthritis and Sensitive to Tumor Necrosis Factor Blockade // *Arthritis & Rheumatology.* John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 72, № 4. P. 565–575.
143. Pianta A. et al. Evidence of the Immune Relevance of *Prevotella copri*, a Gut Microbe, in Patients With Rheumatoid Arthritis // *Arthritis & Rheumatology.* John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 69, № 5. P. 964–975.
144. Maggi J. et al. Isolation of HLA-DR-naturally presented peptides identifies T-cell epitopes for rheumatoid arthritis // *Ann Rheum Dis.* 2022. Vol. 81, № 8. P. 1096.
145. Hawiger D. et al. Dendritic Cells Induce Peripheral T Cell Unresponsiveness under Steady State Conditions in Vivo // *Journal of Experimental Medicine.* 2001. Vol. 194, № 6. P. 769–780.
146. Benham H. et al. Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients // *Sci Transl Med.* American Association for the Advancement of Science, 2015. Vol. 7, № 290. P. 290ra87-290ra87.
147. Capini C. et al. Antigen-Specific Suppression of Inflammatory Arthritis Using Liposomes1 // *The Journal of Immunology.* 2009. Vol. 182, № 6. P. 3556–3565.
148. Galea R. et al. PD-L1- and calcitriol-dependent liposomal antigen-specific regulation of systemic inflammatory autoimmune disease // *JCI Insight.* The American Society for Clinical Investigation, 2019. Vol. 4, № 18.
149. Sonigra A. et al. Randomized phase I trial of antigen-specific tolerizing immunotherapy with peptide/calcitriol liposomes in ACPA+ rheumatoid arthritis // *JCI Insight.* The American Society for Clinical Investigation, 2022. Vol. 7, № 20.
150. Britanova O. V et al. Targeted depletion of TRBV9+ T cells as immunotherapy in a patient with ankylosing spondylitis // *Nat Med.* 2023. Vol. 29, № 11. P. 2731–2736.
151. Trudeau J.D. et al. Prediction of spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice by quantification of autoreactive T cells in peripheral blood // *J Clin Invest.* Am Soc Clin Investig, 2003. Vol. 111, № 2. P. 217–223.
152. Trouw L.A., Pickering M.C., Blom A.M. The complement system as a potential therapeutic target in rheumatic disease // *Nat Rev Rheumatol.* 2017. Vol. 13, № 9. P. 538–547.
153. Tsokos G.C. et al. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus // *Nat Rev Rheumatol.* 2016. Vol. 12, № 12. P. 716–730.

154. Pisetsky D.S., Lipsky P.E. New insights into the role of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus // *Nat Rev Rheumatol*. 2020. Vol. 16, № 10. P. 565–579.
155. Wise L.M., Stohl W. Belimumab and rituximab in systemic lupus erythematosus: a tale of two B cell-targeting agents // *Front Med (Lausanne)*. Frontiers Media SA, 2020. Vol. 7. P. 303.
156. Mackensen A. et al. Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus // *Nat Med*. Nature Publishing Group US New York, 2022. Vol. 28, № 10. P. 2124–2132.
157. Juang Y.-T. et al. Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV // *J Clin Invest*. The American Society for Clinical Investigation, 2005. Vol. 115, № 4. P. 996–1005.
158. Fernandez D.R. et al. Activation of mammalian target of rapamycin controls the loss of TCR $\zeta$  in lupus T cells through HRES-1/Rab4-regulated lysosomal degradation // *The Journal of Immunology*. American Association of Immunologists, 2009. Vol. 182, № 4. P. 2063–2073.
159. Crispín J.C. et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys // *The journal of immunology*. American Association of Immunologists, 2008. Vol. 181, № 12. P. 8761–8766.
160. Chavele K.-M., Ehrenstein M.R. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis // *FEBS Lett*. John Wiley & Sons, Ltd, 2011. Vol. 585, № 23. P. 3603–3610.
161. Niu Z., Zhang P., Tong Y. Value of HLA-DR genotype in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis // *Int J Rheum Dis*. Wiley Online Library, 2015. Vol. 18, № 1. P. 17–28.
162. Graham R.R. et al. Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE // *European journal of human genetics*. Nature Publishing Group, 2007. Vol. 15, № 8. P. 823–830.
163. Langefeld C.D. et al. Transancestral mapping and genetic load in systemic lupus erythematosus // *Nat Commun*. Nature Publishing Group UK London, 2017. Vol. 8, № 1. P. 16021.
164. Abdirama D. et al. Nuclear antigen-reactive CD4<sup>+</sup> T cells expand in active systemic lupus erythematosus, produce effector cytokines, and invade the kidneys // *Kidney Int*. Elsevier, 2021. Vol. 99, № 1. P. 238–246.

165. Tesch S. et al. Identification and characterization of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells targeting renally expressed antigens in human lupus nephritis with two independent methods // *Sci Rep*. 2020. Vol. 10, № 1. P. 21312.
166. Eggenhuizen P.J. et al. Smith-specific regulatory T cells halt the progression of lupus nephritis // *Nat Commun*. 2024. Vol. 15, № 1. P. 899.
167. Aletaha D. et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative // *Arthritis Rheum*. John Wiley & Sons, Ltd, 2010. Vol. 62, № 9. P. 2569–2581.
168. Lomakin Ya.A. et al. High-Throughput Platform for B-Cell Screening Based on Fluorescent Phage-Display Technology // *Bull Exp Biol Med*. 2019. Vol. 167, № 4. P. 446–451.
169. Lomakin Y.A. et al. Probing Surface Membrane Receptors Using Engineered Bacteriophage Bioconjugates // *Bioconjug Chem*. American Chemical Society, 2019. Vol. 30, № 5. P. 1500–1506.
170. Nersisyan S. et al. T-CoV: a comprehensive portal of HLA-peptide interactions affected by SARS-CoV-2 mutations // *Nucleic Acids Res*. 2022. Vol. 50, № D1. P. D883–D887.
171. LAEMMLI U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
172. Pandey K., Ramarathinam S.H., Purcell A.W. Isolation of HLA Bound Peptides by Immunoaffinity Capture and Identification by Mass Spectrometry // *Curr Protoc*. John Wiley & Sons, Ltd, 2021. Vol. 1, № 3. P. e92.
173. Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips // *Nat Protoc*. 2007. Vol. 2, № 8. P. 1896–1906.
174. Ma B. et al. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry // *Rapid communications in mass spectrometry*. Wiley Online Library, 2003. Vol. 17, № 20. P. 2337–2342.
175. Ишина И.А. et al. Гибридные белки, содержащие антигенный эпитоп и тиоредоксин для *in vitro* стимуляции CD4 + TCR + Jurkat Т-клеток // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2024. Vol. 516, № 1. P. 64–68.
176. Mellins E.D., Stern L.J. HLA-DM and HLA-DO, key regulators of MHC-II processing and presentation // *Curr Opin Immunol*. 2014. Vol. 26. P. 115–122.
177. Pierzynowska K. et al. Applications of the phage display technology in molecular biology, biotechnology and medicine // *Crit Rev Microbiol*. Taylor & Francis, 2024. Vol. 50, № 4. P. 450–490.

178. Tan Y. et al. Advance in phage display technology for bioanalysis // *Biotechnol J.* John Wiley & Sons, Ltd, 2016. Vol. 11, № 6. P. 732–745.
179. 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.
180. Stern L.J. et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide // *Nature.* 1994. Vol. 368, № 6468. P. 215–221.
181. O’Sullivan D. et al. On the interaction of promiscuous antigenic peptides with different DR alleles. Identification of common structural motifs. // *J Immunol.* 1991. Vol. 147, № 8. P. 2663–2669.
182. Watanabe N. et al. A cell-based high-throughput screening assay system for inhibitor compounds of antigen presentation by HLA class II molecule // *Sci Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 6798.
183. Terekhov S.S. et al. Liquid drop of DNA libraries reveals total genome information // *Proceedings of the National Academy of Sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences,* 2020. Vol. 117, № 44. P. 27300–27306.
184. Reynisson B. et al. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data // *Nucleic Acids Res.* 2020. Vol. 48, № W1. P. W449–W454.
185. Wieczorek M. et al. MHC class II complexes sample intermediate states along the peptide exchange pathway // *Nat Commun.* 2016. Vol. 7, № 1. P. 13224.
186. Abualrous E.T. et al. MHC-II dynamics are maintained in HLA-DR allotypes to ensure catalyzed peptide exchange // *Nat Chem Biol.* 2023.
187. Belogurov A.A. et al. Recognition and Degradation of Myelin Basic Protein Peptides by Serum Autoantibodies: Novel Biomarker for Multiple Sclerosis // *The Journal of Immunology. American Association of Immunologists,* 2008. Vol. 180, № 2. P. 1258–1267.
188. Rappazzo C.G., Huisman B.D., Birnbaum M.E. Repertoire-scale determination of class II MHC peptide binding via yeast display improves antigen prediction // *Nat Commun.* 2020. Vol. 11, № 1. P. 4414.
189. Misaki Y., Van Venrooij W.J., Pruijn G.J. Prevalence and characteristics of anti-56K/annexin XI autoantibodies in systemic autoimmune diseases. // *J Rheumatol.* 1995. Vol. 22, № 1. P. 97–102.
190. Jürgensen C.S. et al. Determination of autoantibodies to annexin XI in systemic autoimmune diseases // *Lupus. SAGE Publications Ltd STM,* 2000. Vol. 9, № 7. P. 515–520.

191. Iaccarino L. et al. Anti-annexins autoantibodies: Their role as biomarkers of autoimmune diseases // *Autoimmun Rev.* 2011. Vol. 10, № 9. P. 553–558.
192. Liu H., Pope R.M. The role of apoptosis in rheumatoid arthritis // *Curr Opin Pharmacol.* 2003. Vol. 3, № 3. P. 317–322.
193. Rao R. V et al. Molecular Components of a Cell Death Pathway Activated by Endoplasmic Reticulum Stress \* // *Journal of Biological Chemistry.* Elsevier, 2004. Vol. 279, № 1. P. 177–187.
194. Joo J.H. et al. S100A6 (calcyclin) enhances the sensitivity to apoptosis via the upregulation of caspase-3 activity in Hep3B cells // *J Cell Biochem.* John Wiley & Sons, Ltd, 2008. Vol. 103, № 4. P. 1183–1197.
195. Yang P. et al. Th17 cell pathogenicity and plasticity in rheumatoid arthritis // *J Leukoc Biol.* 2019. Vol. 106, № 6. P. 1233–1240.
196. Belogurov A. et al. CD206-Targeted Liposomal Myelin Basic Protein Peptides in Patients with Multiple Sclerosis Resistant to First-Line Disease-Modifying Therapies: A First-in-Human, Proof-of-Concept Dose-Escalation Study // *Neurotherapeutics.* 2016. Vol. 13, № 4. P. 895–904.
197. Urbonaviciute V. et al. Therapy targeting antigen-specific T cells by a peptide-based tolerizing vaccine against autoimmune arthritis // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2023. Vol. 120, № 25. P. e2218668120.
198. Roskopf S. et al. A Jurkat 76 based triple parameter reporter system to evaluate TCR functions and adoptive T cell strategies // *Oncotarget.* Impact Journals, LLC, 2018. Vol. 9, № 25. P. 17608.
199. Petersen M.C. et al. Insulin Receptor Autoantibody–mediated Hypoglycemia in a Woman With Mixed Connective Tissue Disease // *J Endocr Soc.* 2022. Vol. 6, № 1. P. bvab182.
200. Alvarez-Payares J.C. et al. Late Systemic Lupus Erythematosus-Associated Insulin Resistance Syndrome: A Rare Cause of De Novo Diabetes Mellitus // *Case Rep Med.* John Wiley & Sons, Ltd, 2022. Vol. 2022, № 1. P. 4655804.
201. Rosenstein E.D. et al. The Prevalence of Insulin Receptor Antibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Related Conditions // *JCR: Journal of Clinical Rheumatology.* 2001. Vol. 7, № 6.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

*Приложение 1. Таблица 10. Клинические характеристики пациентов и здоровых доноров.*

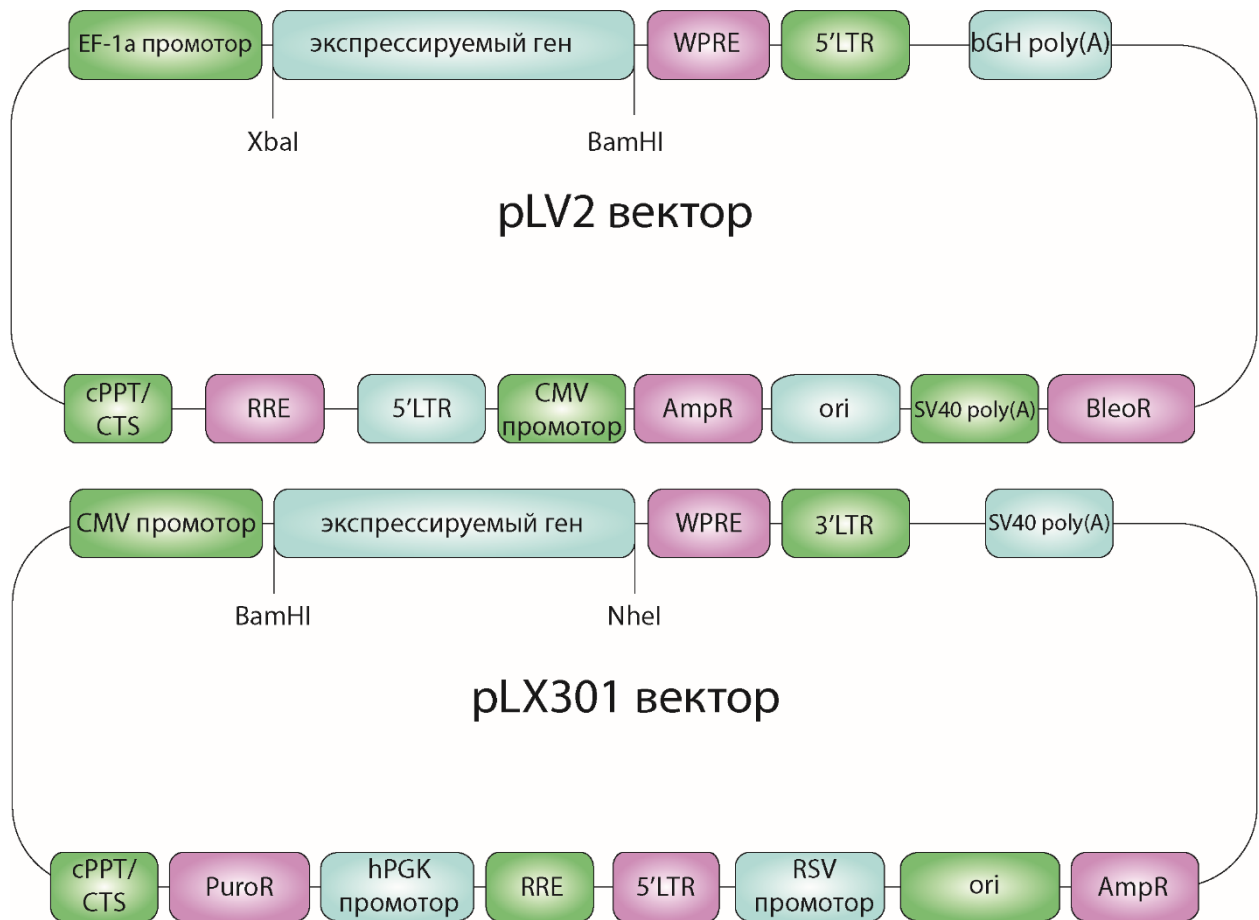
№	РА, СКВ, HD	Иммунопептидом, Т-клеточный ответ	Пол	Возраст	Лечение	DAS-28/SLEDAI-2k	HLA-DRB1
1	РА	Иммунопептидом	жен	54	Methotrexate	4.34	DRB1*04:01:01, DRB1*13:03:01
2	РА	Иммунопептидом	жен	81	Methylprednisolone, Hydroxychloroquine, Rituximab	6.2	DRB1*04:01:01, DRB1*04:02:01
3	РА	Иммунопептидом	жен	43	Methylprednisolone, Methotrexate, Olokizumab	5.26	DRB1*04:01:01, DRB1*11:01:01
4	РА	Иммунопептидом	жен	67	Methotrexate, Hydroxychloroquine	6.03	DRB1*04:01:01, DRB1*04:08:01
5	РА	Иммунопептидом	жен	38	Methylprednisolone, Methotrexate, Olokizumab	5.71	DRB1*01:01:01, DRB1*04:03:01
6	РА	Т-клеточный ответ	жен	42	Methylprednisolone, Methotrexate, Olokizumab	5.96	DRB1*01:01:01, DRB1*09:01:02
7	РА	Т-клеточный ответ	жен	33	Methotrexate	5.3	DRB1*07:01:01, DRB1*01:01:01
8	РА	Т-клеточный ответ	жен	48	Methylprednisolone, Sulfasalazine, Hydroxychloroquine	5.46	DRB1*14:54:01, DRB1*04:01:01
9	РА	Т-клеточный ответ	жен	56	Methotrexate, Hydroxychloroquine	6.02	DRB1*13:01:01, DRB1*04:01:01
10	РА	Т-клеточный ответ	муж	53	Methotrexate, Olokizumab	7.86	DRB1*01:01:01, DRB1*04:01:01
11	РА	Т-клеточный ответ	жен	44	Methotrexate, Hydroxychloroquine	2.34	DRB1*04:01:01, DRB1*10:01:01
12	РА	Т-клеточный ответ	жен	38	Methotrexate, Hydroxychloroquine	6.79	DRB1*07:01:01, DRB1*04:01:01
13	РА	Т-клеточный ответ	жен	56	Methylprednisolone, Leflunomide, Olokizumab	6.54	DRB1*09:01:02, DRB1*01:01:01
14	РА	Т-клеточный ответ	жен	57	Methotrexate	5.46	DRB1*01:01:01, DRB1*15:01:01
15	РА	Т-клеточный ответ	жен	40	Methylprednisolone, Sulfasalazine, Rituximab	4.17	DRB1*04:04:01, DRB1*01:01:01
16	HD	Иммунопептидом	жен	39	-	-	DRB1*04:01:01, DRB1*15:01:01
17	HD	Иммунопептидом/Т-клеточный ответ	муж	43	-	-	DRB1*01:01:01, DRB1*15:01:01
18	HD	Иммунопептидом	муж	33	-	-	DRB1*01:01:01, DRB1*15:01:01
19	HD	Иммунопептидом	жен	39	-	-	DRB1*04:01:01, DRB1*07:01:01
20	HD	Т-клеточный ответ	муж	23	-	-	HLA- DRB1*04:02:01, HLA- DRB1*01:01:01



21	HD	Т-клеточный ответ	жен	43	-	-	HLA-DRB1*04:01:01, HLA-DRB1*07:01:01
22	HD	Т-клеточный ответ	жен	55	-	-	HLA-DRB1*04:01:01, HLA-DRB1*07:01:01
23	HD	Т-клеточный ответ	муж	32	-	-	HLA-DRB1*13:01:01, HLA-DRB1*04:01:01
24	HD	Т-клеточный ответ	жен	35	-	-	HLA-DRB1*13:01:01, HLA-DRB1*01:01:01
25	HD	Т-клеточный ответ	жен	26	-	-	HLA-DRB1*01:01:01
26	HD	Т-клеточный ответ	жен	28	-	-	HLA-DRB1*04:01:01, HLA-DRB1*11:01:01
27	СКВ	Т-клеточный ответ	жен	33	Methylprednisolone, Hydroxychloroquine, Rituximab	14	HLA-DRB1*11:01:01, HLA-DRB1*15:01:01
28	СКВ	Т-клеточный ответ	жен	18	Methylprednisolone, Hydroxychloroquine, Rituximab	10	HLA-DRB1*15:01:01, HLA-DRB1*03:01:01
29	СКВ	Т-клеточный ответ	жен	26	Methylprednisolone, Hydroxychloroquine	14	HLA-DRB1*07:01:01, HLA-DRB1*15:01:01
30	HD	Т-клеточный ответ	муж	43	-	-	DRB1*01:01:01, DRB1*15:01:01
31	HD	Т-клеточный ответ	жен	39	-	-	DRB1*04:01:01, DRB1*15:01:01
32	HD	Т-клеточный ответ	муж	33	-	-	DRB1*01:01:01, DRB1*15:01:01
33	HD	Т-клеточный ответ	жен	37	-	-	DRB1*07:01:01, DRB1*15:01:01

Номера 1-26: пациенты РА и HDs, относящиеся к исследованию по РА; номера 27-29: пациенты СКВ, относящиеся к исследованию по СКВ; номера 30-33: HDs, относящиеся к исследованию по разработке системы антиген-специфической экспансии CD4<sup>+</sup> Т-клеток с помощью EVs.

**Приложение 2**



**Рисунок 37. Векторные карты генетических конструкций pLV2 (CD80, HLA-DR, pMHC, TCR) и pLX301 (CD4).** Интересующий ген экспрессируется под контролем промотора EF-1a или CMV в лентивирусных векторах pLV2 или pLX301, соответственно.

**Приложение 3. Таблица 11. Антитела, использованные в работе**

<b>№</b>	<b>Антитело</b>	<b>Производитель</b>	<b>Клон</b>
1	anti-human CD80-PE	Biolegend	W17149D
2	anti-human HLA-DR-APC	Biolegend	L243
3	anti-human CD4-APC- Alexa Fluor 750	Thermo	S3.5
4	anti-human CD3-APC	Biolegend	ОКТ3
5	anti-human CD3-FITC	Biolegend	ОКТ3
6	anti-human TCR $\alpha/\beta$ -APC	Biolegend	IP26
7	anti-human CD69-APC	Biolegend	FN50
8	anti-human IFN $\gamma$ -PE	Biolegend	4S.B3
9	anti-human CD11c-FITC	Biolegend	3.9
10	anti-human IL-2-APC	Biolegend	MQ1-17H12
11	anti-mouse IgG-FITC	Biolegend	Поликлональные
12	anti-human HLA-DR	Гибридома	L243
13	anti-FLAG-HRP	Sigma	M2
14	anti-M13-HRP	Santa Cruz Biotechnology	RL-ph2
15	anti-M13	Sigma	Поликлональные
16	anti-rabbit-HRP	Sigma	Поликлональные