

На правах рукописи

Ломакин Яков Анатольевич

Структурно-функциональный анализ моноклональных антител,
кроссреактивных к вирусным антигенам, при рассеянном
склерозе

Специальность 03.01.03 - Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Москва - 2014

Работа выполнена в лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Кандидат химических наук
Белогуров Алексей Анатольевич

Официальные оппоненты:

Лагарькова Мария Андреевна, доктор биологических наук, заведующий лабораторией генетических основ клеточных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Тиллиб Сергей Владимирович, доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярных биотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН).

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Защита диссертации состоится 28.05.2014 г., в 10:00 на заседании Диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.ibch.ru Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Автореферат разослан _____ 2014 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета



д.ф.-м.н.В.А. Олейников

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ.

Рассеянный склероз (РС) – одно из наиболее социально и экономически значимых неврологических заболеваний современности. Особенностью РС является возникновение заболевания в основном у лиц среднего возраста, то есть молодой и трудоспособной части населения, ведущей активную социальную жизнь. Последствия заболевания за 10-15 лет приводят практически к полной потере трудоспособности, а при недостаточно эффективном и своевременном лечении – и к летальному исходу. Патогенез заболевания обусловлен разрушением миелиновой оболочки нервных волокон. При этом наблюдается активация иммунных клеток и увеличение их количества в центральной нервной системе (ЦНС), что в дальнейшем приводит к демиелинизации, аксонально-нейрональному повреждению и гибели олигодендроцитов, клинически проявляющемся в уменьшении нервной проводимости. Несмотря на огромное количество молекулярно-биологических данных и клинических наблюдений, к настоящему времени не удалось составить полную и однозначную картину механизма индукции рассеянного склероза. В качестве факторов, влияющих на его возникновение, называются как наследственная генетическая предрасположенность, гормональный статус организма и даже климатические условия местности, так и бактериальные или вирусные инфекции, к которым относятся вирус Эпштейн-Барра (EBV), вирус герпеса человека 6 типа (HHV6), вирус простого герпеса первого типа (HSV1), Варицелла зостер вирус (VZV), вирус ТТ (Torque Teno virus) и другие.

На начальных этапах изучения РС основную роль в развитии заболевания отводили Т-лимфоцитам. Но в последнее десятилетие В-клеточный ответ приобретает все большее значение в понимании этиологии и патогенеза не только РС, но и аутоиммунных заболеваний в целом. Было установлено, что наряду с продукцией патологических аутореактивных антител, участвующих в процессе демиелинизации нервного волокна, В-клетки могут способствовать как развитию воспалительного ответа, так и его подавлению путем продукции различных цитокинов. Ещё одной из основных функций В-клеток является презентация антигена, а следовательно, и активация Т-клеток. Таким образом, на сегодняшний день можно с уверенностью сказать, что для развития патологии необходима активация и В-клеточного звена. Выявление конкретного вирусного антигена, способного индуцировать выработку аутоантител к компонентам миелиновой

оболочки, возможно играющих роль в деградации нервных волокон в центральной нервной системе при РС, может оказаться весьма перспективным с точки зрения понимания механизмов развития заболевания, разработки новых подходов к терапии и диагностике данного заболевания.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ И ОСНОВНЫЕ ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ.

В качестве основных аутоантигенов выделяют четыре белка миелиновой оболочки: основной белок миелина (ОБМ), миелин-олигодендроцитарный гликопротеин (МОГ), протеолипидный протеин 1 (ПЛП1) и миелин-ассоциированный гликопротеин. На сегодняшний день существует целый ряд работ, демонстрирующих повышение титра антител в сыворотке крови или цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) к данным аутоантигенам при РС. Однако, последовательность этих антител и соответствующие им В-клеточные рецепторы изучены недостаточно полно, для многих из них не установлена даже конкретная специфичность. В связи с вышеизложенным выявление и анализ структур таких антител может прояснить механизм развития заболевания, а взаимно-однозначное соответствие «структура-функция» может способствовать появлению улучшенных методов диагностики и направленной терапии РС.

Для решения этой проблемы были поставлены следующие задачи:

1. Получение моноклональных одноцепочечных антител из фаг-дисплейной библиотеки РС, специфичных к основному белку миелина, и определение их структур.
2. Создание полноразмерных моноклональных иммуноглобулинов человека на основании одноцепочечных антител, связывающих основной белок миелина, и доказательство их функциональности.
3. Характеризация миелин-реактивных аутоантител больных РС.
4. Определение поли- и кроссреактивности моноклональных миелин-реактивных аутоантител больных РС.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.

В настоящей работе получены ряд моноклональных аутоантител к белкам миелиновой оболочки, определена их аминокислотная последовательность. Определены константы связывания антител с основным белком миелина.

Впервые показано кроссреактивное связывание вирусного и эндогенного антигенов моноклональным аутоантителом из больного РС. Полученные данные являются важным шагом в прояснении патологической роли В-клеток при РС, так как ранее кроссреактивность наблюдалась в основном на поликлональных сыворотках крови больных РС. С использованием технологии Luminex показана полиреактивная природа ряда отобранных анти-ОБМ антител. Полученные данные, подтверждаемые структурной гомологией отобранных антител, свидетельствуют в поддержку непосредственного участия различных вирусов в индукции РС путем механизма молекулярной мимикрии. Показано, что полиреактивность аутоантител при РС может реализовываться за счет сочетания двух цепей – тяжелой и легкой, при этом каждая из которых в большей степени отвечает за связывание своего антигена. С помощью широкомасштабного секвенирования библиотек, предобогащенных на различные антигены, определены гены зародышевой линии, характерные для аутореактивных антител, специфичных к ОБМ (IGHV1-69, IGHV6-1, IGHV5-51, IGLV3-19, IGKV1-39), вирусному белку LMP1 (IGHV1-18, IGHV1-3, IGLV10-54, IGLV1-47), а также полиреактивных антител (IGHV4-59 и IGHV1-8).

Полученные результаты вносят существенный вклад в прояснение этиологии и патогенеза рассеянного склероза. Детальное изучение данной проблемы позволит в дальнейшем использовать полученные данные для создания новых методов диагностики рассеянного склероза и создания лекарственных препаратов, направленных на элиминацию именно патогенных клеток иммунной системы.

ПУБЛИКАЦИЯ И АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.

По теме диссертации опубликовано 3 статьи. Результаты диссертации были представлены на 5 международных российских и зарубежных конференциях.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 119 страницах и содержит 33 рисунка и 8 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Скрининг библиотеки на ОБМ и получение моноклональных одноцепочечных антител, связывающих ОБМ.

Для исследования структурно-функциональных характеристик ОБМ-связывающих антител ранее в нашей лаборатории была сконструирована фаг-дисплейная библиотека одноцепочечных рекомбинантных антител. В качестве источника генетического материала использовали лимфоциты, выделенные из периферической крови 8 доноров – больных рассеянным склерозом (ремиттирующий-рецидивирующий тип течения).

В качестве потенциального антигена для поиска патогенных антител нами был выбран ОБМ. В литературе в течение двух последних десятилетий дебатруется вопрос о значении анти-ОБМ антител в развитии РС. По нашему мнению данный аспект требует прояснения на структурно-молекулярном уровне, в этой связи мы решили отобрать ОБМ-специфичные антитела из библиотеки больных РС, и в дальнейшем исследовать их специфичность и структурные особенности. Одной из основных трудностей при работе с ОБМ является его чрезвычайно высокий поверхностный положительный заряд. В настоящей работе для уменьшения неспецифического связывания при скрининге фаг-дисплейной библиотеки на ОБМ мы решили использовать следующие способы (рис.1 А): (i) ограниченный трипсинолиз ОБМ для понижения плотности положительного поверхностного заряда молекулы, (ii) отбор на полноразмерную молекулу ОБМ с нейтрализацией положительного заряда белка добавлением гепарина, (iii) и отбором в присутствии буфера с высокой ионной силой (0.5 М NaCl).

Для осуществления первого подхода был проведен ограниченный трипсинолиз ОБМ. Лимитированное расщепление молекулы ОБМ после остатков лизина и аргинина понижает плотность сетки положительных зарядов молекулы и, соответственно, уменьшает уровень неспецифической сорбции. Экспериментально был подобран необходимый уровень гидролиза, при котором связывание мышинных поликлональных анти-ОБМ антител (положительный контроль) с гидролизатом ОБМ было сопоставимо со связыванием с полноразмерной молекулой ОБМ, а неспецифическое связывание с бактериофагом M13K07 – минимально. Для этого мы варьировали концентрацию трипсина от 10 мкг до 0.001 мкг на мг ОБМ (время гидролиза составляло 1 час при 37°C). На рисунке 1 Б представлены результаты ИФА связывания поликлональных антител и бакте-

риофагов M13K07 с гидролизатами ОБМ и электрофоретическое разделение этих гидролизатов. По соотношению специфического связывания к уровню фона была выбрана точка «5», соответствующая обработке ОБМ трипсином в концентрации 0.12 мкг на мг ОБМ в течение 1 часа.

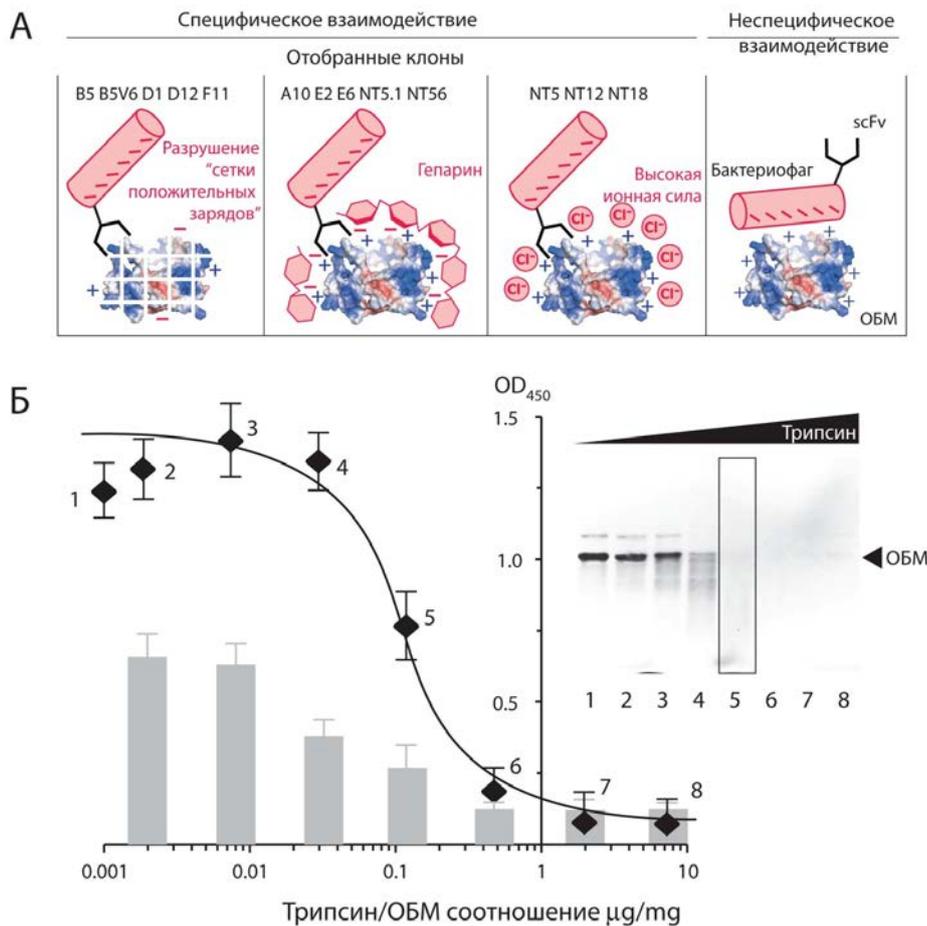


Рисунок 1. А. Различные схемы биопэннинга. Б. Для дальнейшего обогащения библиотеки была подобрана степень гидролиза ОБМ трипсином. Гидролизаты ОБМ (показаны во врезке) гибридизовали с поликлональными анти-ОБМ антителами (черная кривая) и с фагом M13K07 (серая столбчатая диаграмма). Оптимальная концентрация трипсина составила 0,12 мкг энзима на 1 мг белка (точка 5).

Далее каждая схема обогащения была использована для проведения 5 раундов селекции, что позволило в итоге отобрать 13 клонов одноцепочечных антител, связывающих ОБМ.

Анализ одноцепочечных антител в индивидуальном виде.

Силу связывания scFv с ОБМ оценивали методом ИФА. Все одноцепочечные антитела показали достоверное связывание и специфичность по сравнению с отрицательным контролем (одноцепочечным антителом к тиреоглобулину, проэкспрессированным и очищенным в тех же условиях). Так же мы охарактеризовали количественно силу связывания отобранных антител с ОБМ методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Клоны E2 и F11 связывали ОБМ с КД близкими к наномолярным значениям ($3.9 \cdot 10^{-9}$ и $4.0 \cdot 10^{-9}$ М, соответствен-

но), а B5V6 с $KD \sim 1.2 \cdot 10^{-8}$ М (Рис.2 Б). При этом для одноцепочечных антител D1 и E6 KD оценить не удалось вследствие недостаточной силы связывания.

Следующей задачей было определение сайтов связывания ОБМ отобранными антителами. Для этого использовалась ранее созданная в нашей лаборатории эпитопная библиотека ОБМ, в которой молекула ОБМ была разделена на 12 перекрывающихся фрагментов длиной около 25 аминокислотных остатков. Пептиды ОБМ были интегрированы в состав слитного белка, состоящего из тиоредоксина, двух 6-гистидиновых кластеров для аффинной очистки белка и стус-эпитопа для детекции моноклональными антителами (см. рис.2 В). В качестве отрицательного контроля была создана генетическая конструкция, не содержащая в своем составе фрагментов ОБМ, а состоящая только из элементов белка-носителя (Тгх-носитель – тиоредоксин+линкер). Нам не удалось обнаружить какой-либо определенный эпитоп для антител E2 и F11, в то время как D1 и E6 специфично взаимодействовали с фрагментами ОБМ 65–92 и 130–156 (см. рис.2 В). Анализ последовательности ОБМ выявил возможные супермотивы внутри этих эпитопов (рис.2 Г). На основе полученных данных можно предпо-

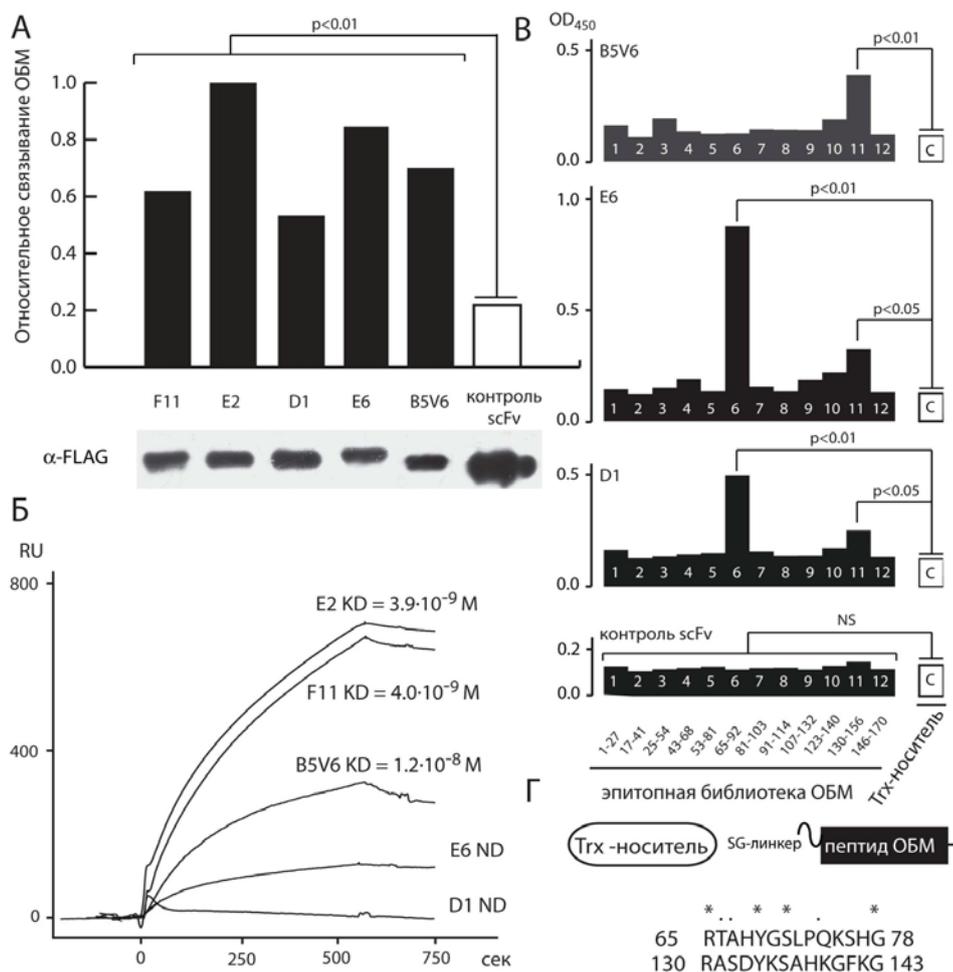


Рисунок 2. А. Связывание отобранных scFv с ОБМ, ИФА. Б. Связывание отобранных scFv с ОБМ, метод поверхностного плазмонного резонанса. В. Связывание отобранных scFv с фрагментами библиотеки ОБМ, ИФА. Г. Схема эпитопной библиотеки ОБМ. Супермотив, присутствующий в пептидах 6 и 11.

ложить, что антитела D1 и E6 узнают линейные эпитопы ОБМ, а E2 и F11 скорее всего конформационные. Антитело B5V6 занимает промежуточное положение, взаимодействуя и с полноразмерной молекулой ОБМ и с фрагментом 130–156.

Анализ пространственной модели ОБМ выявил, что найденные мотивы находятся на двух подвижных петлях 65-85 и 130-148. Таким образом предсказанный эпитоп для B5V6 так же находится в этой внешней петле. Отрицательно заряженный и в большой степени гидрофобный желобок scFv B5V6 может взаимодействовать с петлей ОБМ 136-145, выступающей на поверхности и несущей частично положительный заряд. Интересно заметить, что наши данные совпадают с результатами, описывающими распределение связывания поликлональных антител из сыворотки больных РС с ОБМ, где фрагменты 65-92 и 130-156 были определены как иммуннодоминантные.

Определение гомологии зародышевых линий

Использование фаг-дисплейной библиотеки генов иммуноглобулинов позволило не только идентифицировать индивидуальные клоны, но и охарактеризовать их структуру. Последовательности 11 полных scFv и 2 отдельных тяжелых цепей были проанализированы с помощью программы Ig BLAST для

отобранные scFv	зародышевая линия тяжелой цепи	гомологичные антитела	зародышевая линия тяжелой цепи	родственные зародышевые линии
E2	HV3-11*	MS2	HV3-11*	HV3-48*
NT12	HV4-61*	<i>EBV_H3</i>	HV7-b*-01	HV7 -61*/-39*/-59*/-28*
A10	HV4-59*			
E6	HV5-51			
B5	HV1-8*	<i>EBV_G5</i>	HV1-2*-04	HV1 -46*/-8*/-3*/-18*
NT56	HV1-18*			
B5V6	HV1-8*			
NT5	HV3-23*	<i>EBV_F5</i>	HV3-23*	HV3 -43*/-64*/-53*/-48*
D1	HV3-23*			
D12	HV3-23*			
NT18	HV3-53*			
NT5.1	HV3-48*			
F11	HV1-69*	MS1	HV1-69*	
отобранные scFv	зародышевая линия легкой цепи	гомологичные антитела	зародышевая линия легкой цепи	родственные зародышевые линии
NT12	LV3-19*	<i>EBV_G5</i>	LV3-19*-01	
E6	LV3-19*			
B5V6	LV6-57*			
B5	LV2-14*	<i>EBV_A4</i>	LV2-14*-01	LV2 -23*/-8*/-11*
E2	LV2-14*	MS2	LV2-11*	
NT5	KV-1-6*			
F11	LV1-44*	<i>EBV_F5, B8,E2</i>	LV1-47*-01	LV1-44*
D12	LV1-44*			
D1	KV3-20*			
NT5.1	KV1-12*	<i>EBV_H3</i>	KV1-39*-01	KV1 -12*/-8*/-16*
NT56	LV4-69*	MS1	LV4-69*	
NT18	нет			
A10	нет			

Таблица 1. Гомология тяжелых и лёгких цепей отобранных одноцепочечных антител с антителами (по литературным данным) из ЦСЖ больных РС и антителами отобранными на связывание LMP1 из фаг-дисплейной библиотеки Гриффина 1. Антитела специфичные к LMP1, отобранные ранее из фаг-дисплейной библиотеки Гриффина 1 помечены курсивом. Антитела из ЦСЖ больных РС отмечены жирным шрифтом.

определения ближайших зародышевых семейств для VH и VL регионов (Таблица 1). Для тяжелых цепей преобладали семейства HV1 и HV3 (соответственно 4 и 6 клонов из 13). Так же мы сравнили полученные антитела с охарактеризованными ранее из базы данных с использованием программы Protein BLAST.

В результате нами была обнаружена высокая гомология аминокислотной последовательности (до 95%) между отобранными scFv и переменными регионами анти-LMP1 антител, отобранными ранее из библиотеки Griffin1, и патогенных аутоантител из ЦСЖ больных РС (Рис.3). 10 тяжелых и 7 лёгких цепей из 13 отобранных scFv были схожи с анти-LMP1 антителами (Таблица 1, рис.3). Обе цепи scFv D12 принадлежали тому же зародышевому семейству, что и анти-LMP1 антитело F5. ScFv NT5.1, NT12 и B5 состояли из комбинаций тяжелых и лёгких цепей, гомологичных к различным анти-LMP1 антителам. Любопытно, что scFv NT56 содержало тяжелую цепь, гомологичную таковой для анти-LMP1 антитела, и лёгкую цепь, гомологичную легкой цепи природного антитела при РС. ScFv F11 наоборот содержало цепи, гомологичные лёгкой цепи анти-LMP1 антитела и тяжелой цепью антитела при РС. Наконец, scFv E2 было гомологично антителу при РС по обеим цепям, при этом лёгкая цепь относилась к тому же зародышевому семейству, что и анти-LMP1 антитело A4.

Перекрытие паттернов узнавания между отобранными scFv и существующими природными антителами, а также данные по их структурной схожести свидетельствует в пользу того, что отобранные комбинации тяжелых и лёгких цепей могут существовать у пациентов с РС, и, следовательно, скринируемая нами библиотека отражает реальную ситуацию иммунологического репертуара больных РС.

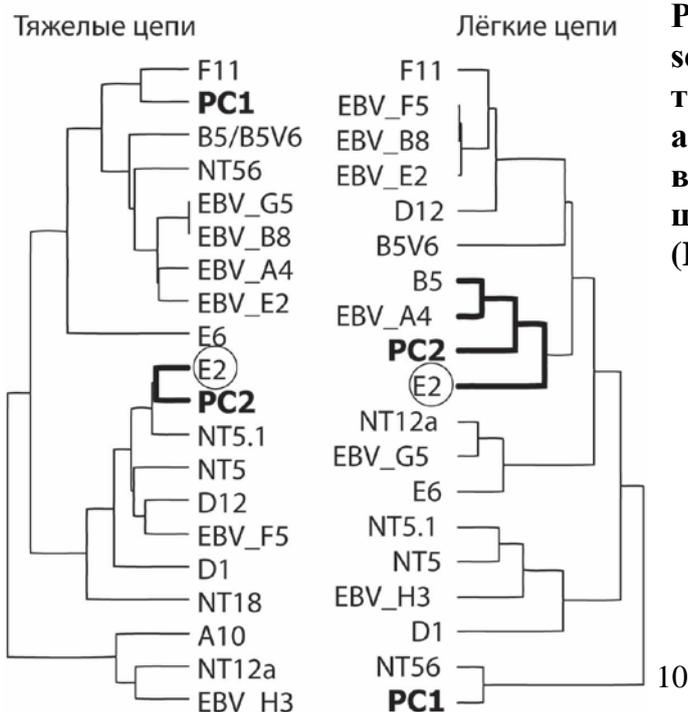


Рисунок 3. Гомология отобранных scFv с ранее опубликованными антителами: жирным шрифтом отмечены антитела из ЦСЖ больных РС; курсивом отмечены антитела, связывающие LMP1 вируса Эпштейн-Барр (EBV).

Доказательство *in vitro* кроссреактивности между аутоантигеном ОБМ и белком вируса Эпштейна-Барра LMP1

Структурная гомология отобранных одноцепочечных антител одновременно с антителами из ЦСЖ больных РС, и с антителами, специфичными к LMP1, привела нас к мысли проверить, возможна ли подобная кроссреактивность *in vitro*. Для этого методом Вестерн-блоттинга мы проанализировали связывание одноцепочечных антител с белками ОБМ и LMP1 (Рис.4 А). В качестве препарата LMP1 мы использовали эукариотические клетки НЕК293, экспрессирующие рекомбинантный LMP1, нетрансфицированную линию клеток использовали в качестве отрицательного контроля. Нам удалось показать, что scFv E2 взаимодействует и с LMP1, и с ОБМ. Для доказательства того, что детектируемое связывание scFv с ОБМ не является результатом неправильного фолдинга, необходимо было воспроизвести эксперимент на полноразмерных IgG.

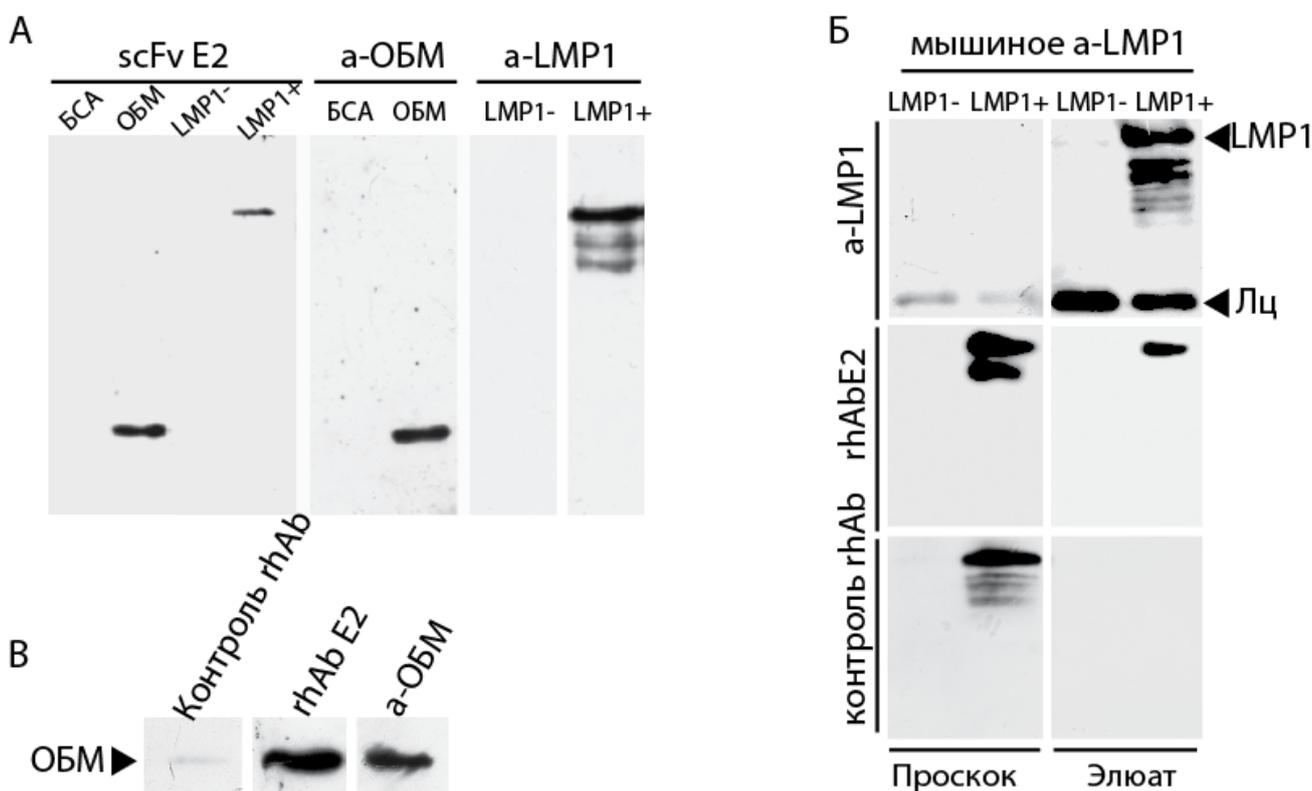


Рисунок 4. (А) Вестерн-блот анализ связывания scFv E2 с ОБМ и LMP1. Рекомбинантное человеческое антитело E2 специфично связывает ОБМ (В) и иммуноприцепитирует LMP1 из раствора(В).

В случае полноразмерного антитела E2 методом вестерн-блоттинга нам так же удалось показать одновременное связывание ОБМ (рис.4 В) и осаждение LMP1 этим антителом из раствора (рис.4 Б). Таким образом, нами впервые было показано кроссреактивное связывание вирусного и эндогенного антигенов монокло-

нальным аутоантителом из больного РС. Полученные данные являются важным шагом в прояснении патологической роли В-клеток при РС, так как ранее кросс-реактивность наблюдалась в основном на поликлональных сыворотках крови больных РС. Наши данные подтверждают гипотезу о молекулярной мимикрии в основе механизма развития РС. Возможно предположить, что антитела, первично образованные на LMP1 во время инфекции EBV, потенциально кроссреактивны к ОБМ и тем самым могут служить триггерами развития заболевания.

Рациональный анализ комбинаций тяжелых и легких цепей анти-ОБМ антител, полученных комбинаторным подходом.

Несмотря на то, что мы проверили и доказали функциональность отобранных scFv в виде полноразмерных антител, существует достаточно большая вероятность того, что в организме больного конкретно таких комбинаций тяжелой и легкой цепи может не встречаться. Это связано со способом получения комбинаторных библиотек, когда VH и VL репертуары пациентов с РС случайным образом объединяется, создавая при этом вероятно новые комбинации антител, не существующие в организме больного. В связи с этим нами была поставлена задача проверить, как изменятся характеристики рациональных комбинаций отобранных VH и VL. Для комбинаторного анализа мы выбрали антитела A10, B5, B5V6, E2, F11, из которых у антител B5 и B5V6 одинаковые тяжелые цепи, а у антитела A10 присутствует только тяжелая цепь, всего 16 вариантов. Дополнительно мы добавили несколько контрольных комбинаций с цепями антител другой специфичности (A17 и ТГ антитела из библиотеки Griffin 1 специфичные к фосфонату и тиреоглобулину, соответственно). Описанные выше комбинированные антитела были получены путем котрансфекции плазмид, кодирующие соответствующие тяжелые и легкие цепи, в эукариотические клетки линии CHO K-1. Далее препараты антител очищали с помощью аффинной хроматографии на смоле protein G.

Изучение изменения уровня кроссреактивности в зависимости от комбинации цепей с использованием технологии Lumindex

Существует значительное количество работ, постулирующих, что различные пептиды, в большинстве своем вирусной или бактериальной природы, могут потенциально мимикрировать под эпитопы ОБМ. В этой связи нам представлялось интересным охарактеризовать профиль кроссреактивности комбинированных антител к ОБМ. Для этого мы использовали технологию Lumindex. На магнитные микросферы был иммобилизован ряд аутоантигенов при РС

(ОБМ, МОГ, PLP1, ДНК), пептидная библиотека ОБМ, потенциальные аутоантигены при глаукоме (ENO-1, GST, α -фодрин, актин, α -кристаллин, GAPDH, тимозин β 4, hEGF), некоторые вирусные белки (EBV Imp1, HBsAg, CMVpP38, HSV-1 gG), а так же лизоцим и гистон H1. Результаты, представленные на Рисунке 5, свидетельствуют, что профиль кроссреактивности большинства исследуемых аутоантител в основном характеризуется связыванием основных белков и пептидов. Более 70% всех комбинаций связывают лизоцим (pI 9.4) и PLP1 (pI 8.7). Сравнение комбинаций с одинаковой тяжелой цепью выявило, что кроссреактивность антитела довольно сильно зависела от спаренной лёгкой цепи, в то время как связывание ОБМ в основном определялось тяжелой цепью. Например, ни одна тяжелая иррелевантная цепь в комбинации с лёгкой цепью анти-ОБМ антитела (ТН-Е2 и А17-Е2) не имела способности связывать ОБМ, с другой стороны, тяжелая цепь, специфичная к ОБМ, в паре с иррелевантной лёгкой цепью показывала высокую аффинность к ОБМ (F11-th и F11-A17).

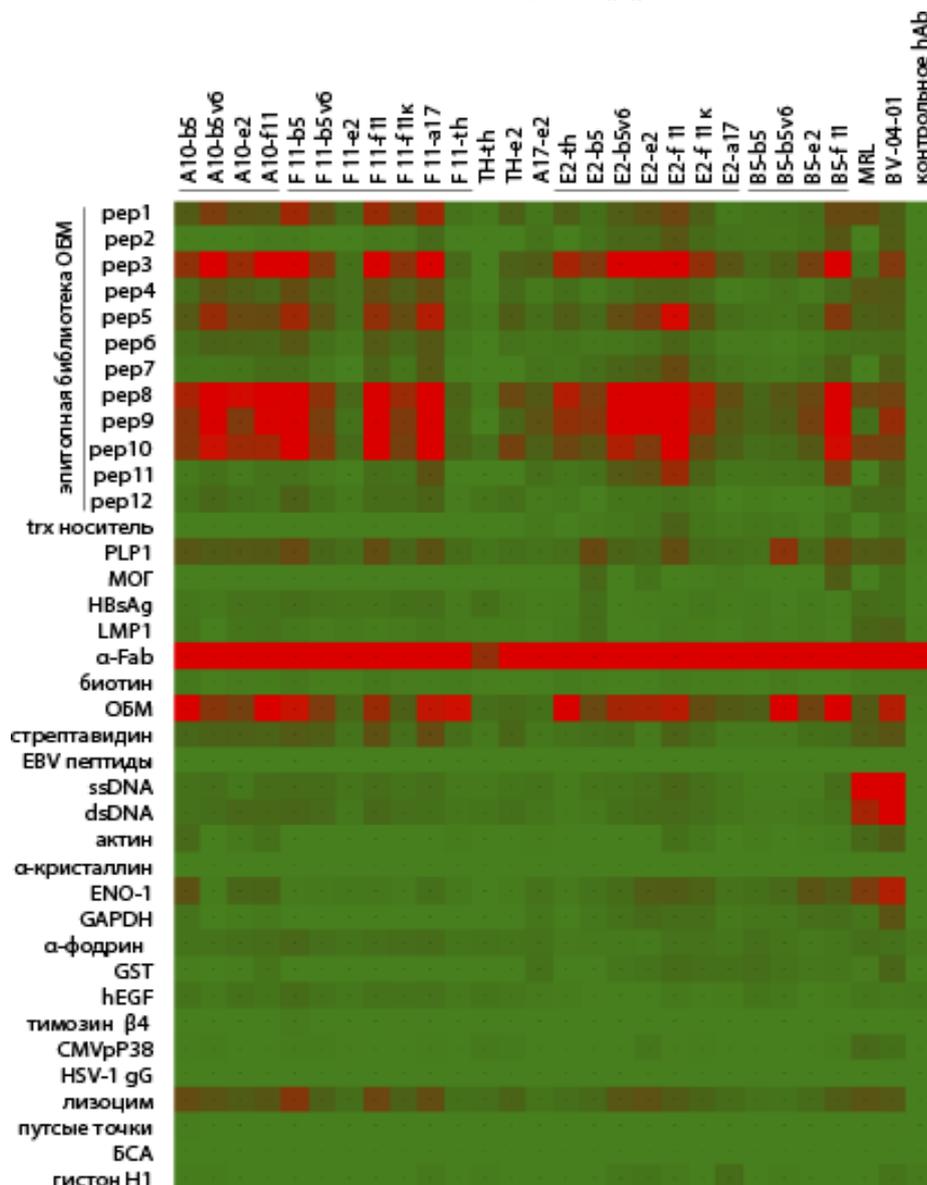
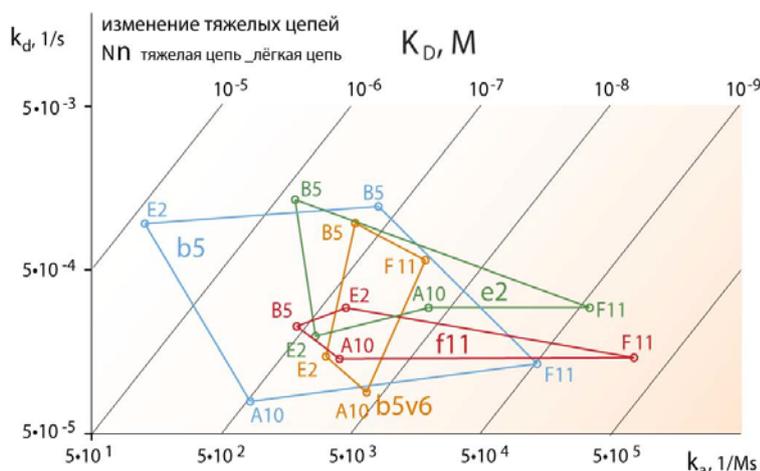
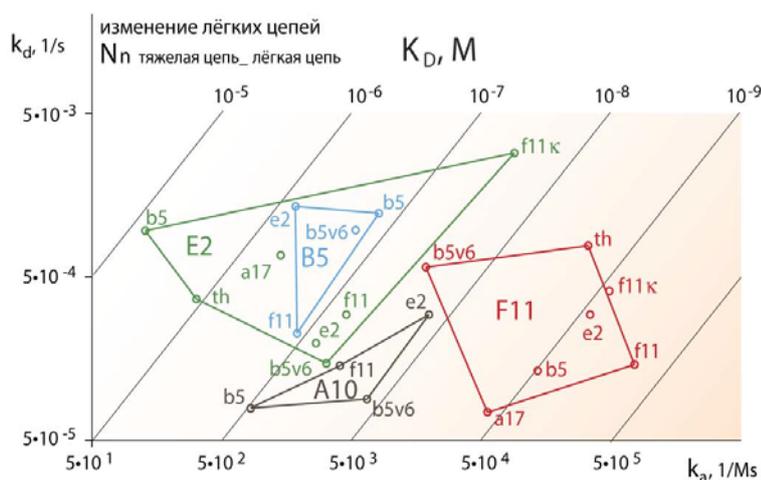


Рисунок 5. Профиль кросс-реактивности аутоантител к ОБМ. Исследовали изменения профиля кросс-реактивности от замены лёгких цепей по связыванию с эпитопной библиотекой ОБМ и с 23 кандидатными аутоантигенами с помощью технологии Luminex. Изменение цвета от зеленого до красного соответствует увеличению силы связывания. Заглавными и строчными буквами обозначены VH и VL соответственно.

Изучения изменения аффинности к антигену (ОБМ) путем измерения констант диссоциации с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса

Для более точной и достоверной характеристики силы связывания исследуемых антител мы использовали технику поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Для этого препарат ОБМ был ковалентно иммобилизован за аминогруппы на поверхности соответствующего чипа. Образцы антител наносили в потоке при различных концентрациях в произвольном порядке для подтверждения независимости последовательных экспериментов друг от друга. На одном чипе проводили не более 10 экспериментов, так как при большем числе последовательных регенераций поверхности чипа результаты становились недостоверными, возможно из-за нарушения фолдинга ОБМ.

А



Б

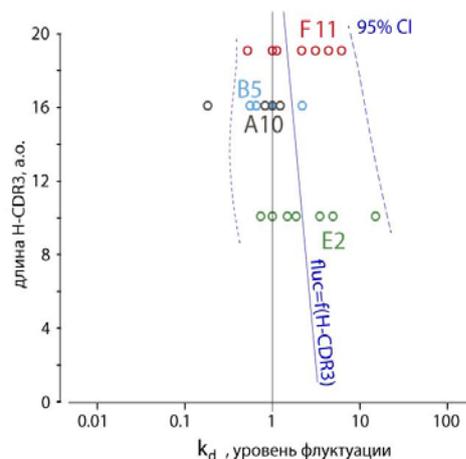
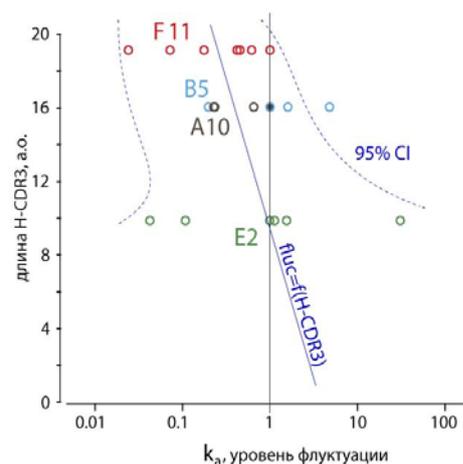


Рисунок 6. Изменение аффинности к ОБМ при варьировании тяжелых и лёгких цепей согласно результатам ППР (BIAcore).

При расчете динамических констант связывания (k_a/k_d) мы учитывали сенсограммы полной раститровки, так как значения, полученные при обработке одной кривой, могут на порядок отличаться от реальных констант связывания и диссоциации. Для более наглядной визуализации результатов мы построили графики (Рис.6 А), в координатах $k_a - k_d$ где дополнительно проведены линии фиксированных значений KD, соответствующие частному k_a и k_d . Из рисунка 6 очевидно, что (1) в целом диапазон изменения k_a больше, чем таковой для k_d ; (2) для кластеров, образованных иммуноглобулинами с одинаковыми VH, но разными VL характерен меньший разброс значений k_a и k_d , чем для вариантов с разными VH и одинаковыми VL. Данный факт приводит к тому, что в случае одинаковых тяжелых цепей кластеры пролегают вдоль линий фиксированных KD, а не перпендикулярно им. Это свидетельствует о существенно меньшем разбросе результирующей KD у комбинаций антител с одинаковой тяжелой цепью, а значит, более стабильной аффинностью по отношению к ОБМ. Важно, что диапазон колебания k_a явно уменьшается при увеличении длины H-CDR3

Биоинформатический анализ аутореактивных IgG

Для более полного понимания природы образования патогенных антител к ОБМ мы хотели прояснить, являются ли отобранные антитела продуктом антиген-обусловленного созревания или всего лишь результатом рандомного мутагенеза. Для этого последовательности тяжёлых цепей антител, отобранных к ОБМ, и контрольных антител (A17, TГ) были проанализированы для определения вероятности именно соматических гипермутаций, а не случайных мутаций до встречи В-клеток с патогеном. На Рисунке 7 показана частота соматических мутаций на каждые 1000 п.о. и собственно сама вероятность антиген-обусловленного созревания. Для ее оценки учитывалось отношение замен в H-CDR1 и H-CDR2 (RCDR) к общему числу мутаций в переменном регионе (MV). Коричневая и серая области соответствуют 90% и 95% доверительными интервалами области случайных мутаций. Таким образом, точки, выходящие за эти области, имеют повышенное содержание направленных замен гипервариабельных участках, что можно считать результатом взаимодействия с антигеном. Результаты анализа свидетельствуют о том, что два (A10 и F11) из четырех исследованных клонов стали специфически связывать ОБМ после встречи с антигеном, которым вероятно мог служить белок вирусной или бактериальной природы, что подтверждает теорию молекулярной мимикрии.

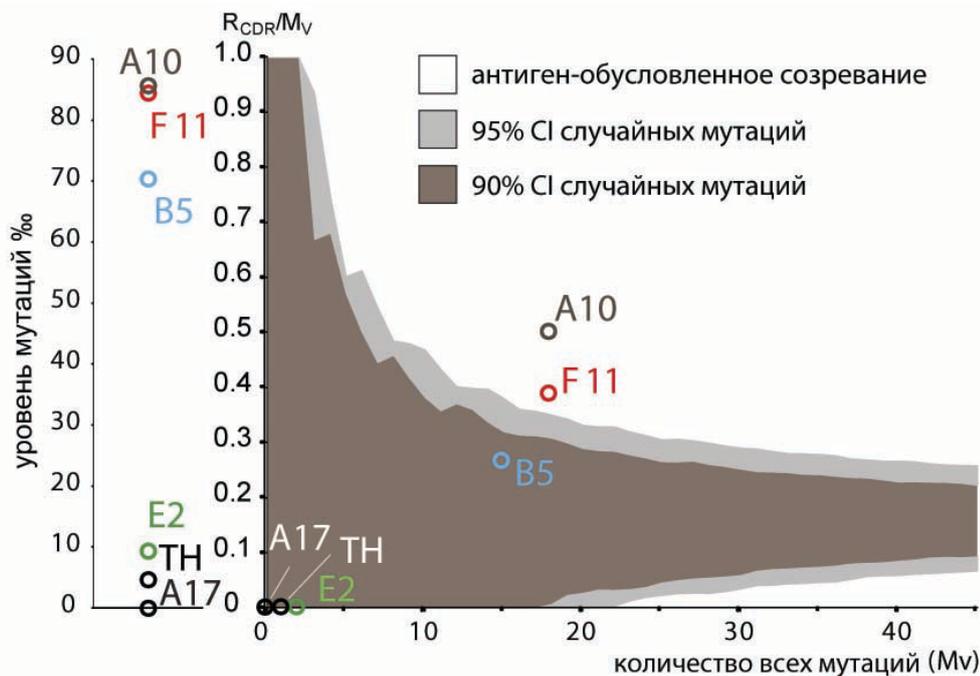


Рисунок 7. Частота соматических мутаций на 1000 п.о. (левый рисунок) и анализ антиген-обусловленного созревания антител (правый рисунок). Отношение мутационных замен в H-CDR1 и H-CDR2 (R_{CDR}) к общему числу мутаций в вариабельном регионе (MV) от-

носителю MV. Серая и коричневая области соответствуют 95% и 90% вероятности случайной мутации. Расположение точки над верхней границей доверительного интервала, является признаком антиген-обусловленного созревания.

В ходе данной работы мы так же проанализировали представленность и структуру антител, отобранных на основные аутоантигены РС – ОБМ и МОГ, а также на вирусный белок LMP-1. С этой целью мы дополнительно провели по два раунда обогащения на МОГ и LMP-1 (на ОБМ обогащение проведено ранее), а для поиска кроссреактивных антител – последовательно два раунда биоэпэннинга на LMP-1, а затем два раунда на ОБМ. Все обогащения проводили под контролем поликлонального ИФА. После процедуры селекции мы проанализировали полученные одноцепочечные антитела в составе фаговых частиц методом моноклонального ИФА. Клон считали положительным, если его сигнал на связывание с одним или двумя антигенами в ИФА превышал минимум в 3 раза сигнал бактерифага M13K07, используемого в качестве отрицательного контроля (в титре 10^{13} фаговых частиц/лунку). Способность конкретных фаговых клонов связывать оба антигена подтверждена путем проведения не менее трех независимых ИФА. В результате было отобрано несколько фаговых клонов, несущих одноцепочечные антитела, которые наиболее эффективно связывали LMP-1 или LMP-1/ОБМ. Их аминокислотные последовательности гипервариабельных участков (CDR3) и принадлежность к генам зародышевой линии представлены в таблице 2.

Таблица2. Одноцепочечные антитела, отобранные после двух раундов фагового дисплея на соответствующие антигены. LL в названии клона обозначает, что клон отобран на LMP-1.

имя клона	Vh	Dh	Jh	H-CDR3	VL	JL	L-CDR3	связывание	
								с LMP-1	с ОБМ
b7	IGHV1-2*04	IGHD1-26*01	IGHJ4*02	VRGSTYSPSGYFEY	IGKV5-2*01	IGKJ2*01	LQHDNFP	+	++
g10	IGHV1-3*01	IGHD6-13*01	IGHJ4*02	ARIFEGLSGIAAPFDY	IGKV4-1*01	IGKJ4*01	QQYFSSPLT	+	±
h1	IGHV1-8*01	IGHD4-17*01	IGHJ6*03	AREVSDYSDYGDVYYMDV	IGKV3-20*01	IGKJ5*01	QQYCCSPIT	±	±
e11	IGHV1-8*01	IGHD4-17*01	IGHJ6*03	AREVSDYSDYGDVYYMDV	IGLV1-44*01	IGLJ3*02	AAWDGSLNGP	±	±
h11	IGHV1-18*04	IGHD3-3*02	IGHJ2*01	ARREGLYTTSPGYFGV	IGLV3-21*03	IGLJ7*02	RVWDKQIVSRSG	±	+
e12	IGHV1-46*01	IGHD4-11*01	IGHJ6*02	ARRGFDY	IGKV1-33*01	IGKJ1*01	LQFYEFPYT	±	±
c11	IGHV1-46*03	IGHD5-12*01	IGHJ6*03	AKDLRPRDIGMDV	IGKV1-39*01	IGKJ5*01	QQSYSSP	±	+
c12	IGHV1-69*06	IGHD1-26*01	IGHJ6*02	ARCGILRSHYFYGMDV	IGLV1-47*01	IGLJ7*01	AAWDDSLSG	±	+
a6	IGHV3-7*01	IGHD4-11*01	IGHJ6*02	VRGGLGAGADY	IGLV4-69*01	IGLJ7*01	QITWGTGI	+	++
c3	IGHV4-b*01	IGHD2-21*01	IGHJ5*01	AGLTQSSHNDAN	IGKV2-30*01	IGKJ1*01	MQATHWP	±	+
fl1 (=e1 LL)	-	-	-	-	IGLV1-47*01	IGLJ3*02	VAWDDNLSG	±	±
c2	-	-	-	-	IGLV3-1*01	IGLJ7*01	AAWDDSLNGPV	±	±
d1	-	-	-	-	IGLV6-57*01	IGLJ7*01	QSYNTSILI	±	±
a1	-	-	-	-	IGLV10-54*01	IGLJ3*02	SVWSSLSA	±	±
отбор на LMP-1									
h4 LL	IGHV3-23*01	IGHD6-13*01	IGHJ2*01	AKDIAAAATPEY	IGKV3-11*01	IGKJ5*01	QQRSNWPPT	+++	н.о.
c12 LL	IGHV5-51*01	IGHD4-17*01	IGHJ4*03	ARFYDSTGSCDY	IGKV1D-33*01	IGKJ2*02	SIQXKFPLXC	+++	н.о.
d4 LL, g3 LL, h3 LL	-	-	-	-	IGLV1-47*01	IGLJ7*01	AAWDDSLSG	+++	н.о.
e1 LL (=fl1)	-	-	-	-	IGLV1-47*01	IGLJ3*02	VAWDDNLSG	+++	н.о.
d2 LL (=a1)	-	-	-	-	IGLV10-54*01	IGLJ3*02	SVWSSLSA	+++	н.о.

Широкомасштабное секвенирование.

Параллельно с анализом функционально отобранных антител, для расширения панели исследуемых моноклонов и лучшей статистической достоверности мы использовали метод широкомасштабного секвенирования. С использованием оборудования Illumina MiSeq определено около 100 000 последовательностей из исходной библиотеки и из каждой пре-селектированной суббиблиотеки (по 50000 для тяжелых и легких цепей). Для них была проведена идентификация генотипа IgV, IgHD и IgJ локусов. IgV и CDR3 тяжелой или легкой цепи были обнаружены практически во всех клонах. Последовательности без CDR3 исключались из дальнейшего анализа. Всего из пяти библиотек получили 44357 последовательностей для тяжелых цепей иммуноглобулинов и 49001 последовательностей для легких цепей, включая 24476 для каппа и 24525 для лямбда цепей. После исключения повторностей осталось 20674 уникальных

VH и 26242 уникальных VL. Количество уникальных последовательностей для каждой отдельной библиотеки варьировалось от 2499 до 10074 для VH и от 857 до 8466 для VL.

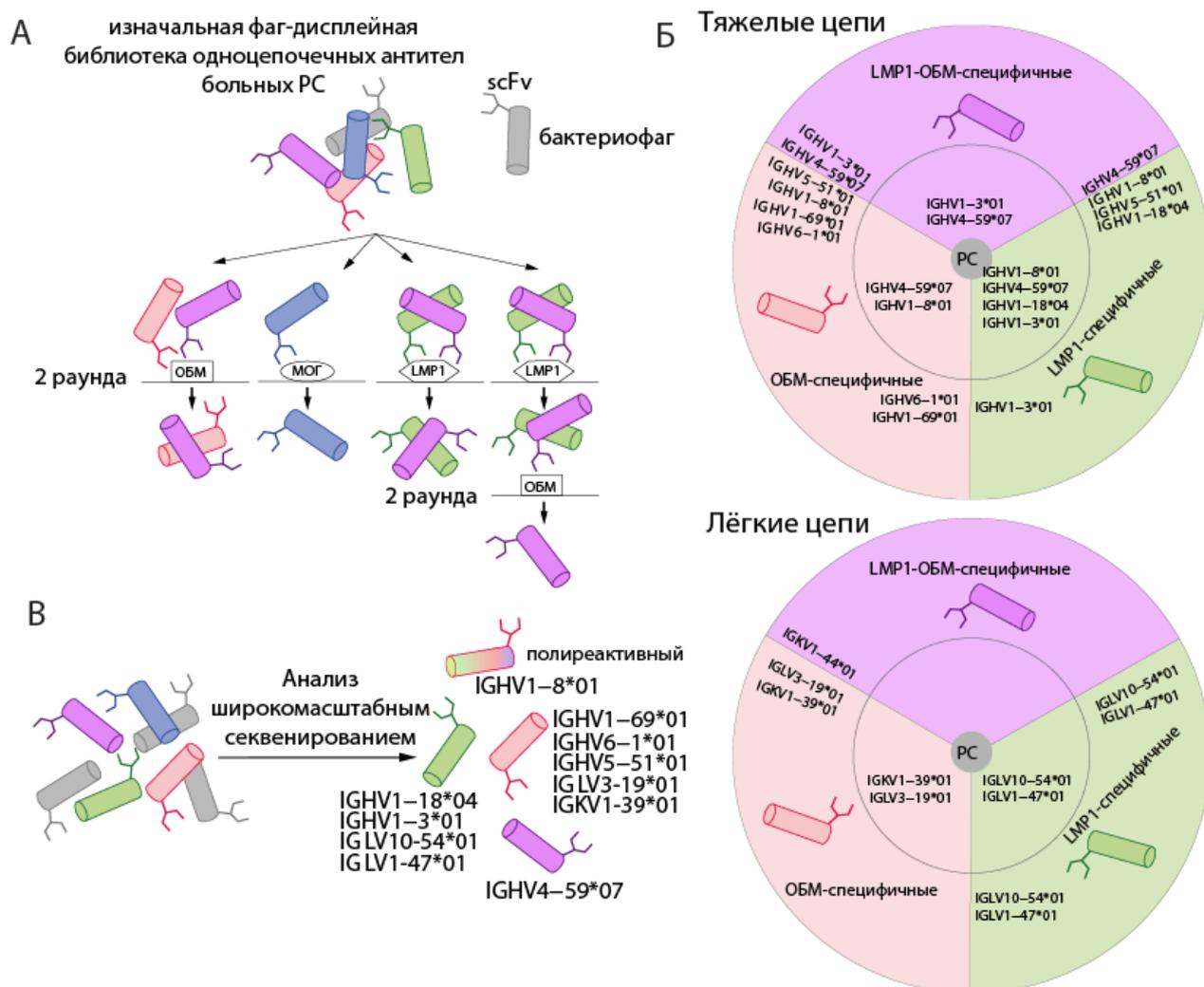


Рисунок 8. Описание фаг-дисплейных библиотек одноцепочечных антител, обогащенных на ОБМ, LMP-1 и МОГ, с помощью метода широкомасштабного секвенирования. (А) Схема обогащения фаг-дисплейной библиотеки РС одноцепочечных антител. (Б) Преобладание специфических зародышевых семейств в отдельных библиотеках по сравнению с остальными для VH (верхняя диаграмма) и VL (нижняя диаграмма). Здесь и на рис (В) подписаны зародышевые семейства, являющиеся аутлайнерами при попарном сравнении библиотек. (В) Выявление из исходной библиотеки РС специфических зародышевых семейств, для которых намечена тенденция к взаимодействию с различными антигенами. Здесь и на рисунке обогащенные библиотеки на ОБМ выделены розовым, на LMP-1 салатным, а одновременно на ОБМ и LMP-1 сиреневым цветом.

Полученные в результате широкомасштабного секвенирования последовательности были выровнены с последовательностями антител из базы данных IMGT с помощью программы IMGT/V-QUEST, а затем результаты выравнива-

ний были отфильтрованы для избавления от артефактов (процент гомологии с предсказанным зародышевым семейством должен был составлять не менее 70%, функциональность последовательности и критерий «одна аллель – для одного гипервариабельного участка»). В дальнейшем анализировали только отфильтрованные результаты секвенирования. Для анализа эффективности отбора были проведены 8 сравнений: каждая обогащенная библиотека против исходной библиотеки РС, LMP1/ОБМ против ОБМ и LMP1 библиотек, МОГ против ОБМ и LMP1 против ОБМ библиотеки. Для каждой пары библиотек применяли линейный анализ для сравнения представленности всех аллелей в этих двух библиотеках. В результате (рис.8 Б, В) зародышевые семейства IGHV1-3*01, IGHV1-18*04, IGLV10-54*01, IGLV1-47*01 были определены как LMP1-реактивные; IGHV1-69*01, IGHV5-51*01, IGHV6-1*01 и IGLV3-19*01, IGKV1-39*01 как ОБМ-реактивные; IGHV4-59*07 показал кроссреактивные характеристики, а для IGHV1-8*01 были обнаружены полиреактивные свойства, так как это семейство было обнаружено во всех обогащенных библиотеках.

Итоговое количество обнаруженных IgHV варьируется от 36 до 54, включая 4 псевдогена и 12 непрофильных генов (noncore genes), т.е. гены, которые встречаются только у некоторых, а не у всех индивидуумов. Значимое увеличение встречаемости по сравнению с предыдущими данными по здоровым донорам было обнаружено для IGHV1-24, IGHV1-69, IGHV1-8, IGHV5-51, и IGHV6-1. Сравнительный анализ показал, что в случае ОБМ и LMP1 спектр зародышевых семейств для VH примерно совпадает с распределением начальной библиотеки РС, особенно для сегментов VH4. В случае антител к МОГ наиболее распространены зародышевые семейства VH IGHV1-69, IGHV1-8 и IGHV3-30. Необходимо заметить, что IGHV4-39 и IGHV4-59 преобладают в библиотеке LMP-1/ОБМ. Сравнительный количественный анализ показал, что клоны, амплифицированные на МОГ, в основном представлены IGHV1-8 и IGHV1-69 сегментами, а клоны, амплифицированные на ОБМ и LMP-1 в основном относятся к IGHV4-59, IGHV5-51, IGHV3-23 и IGHV4-59 сегментам.

Далее был проведен анализ отобранных антител по встречаемости CDR3 для тяжелых и легких цепей, а также определены абсолютные заряды наиболее эффективно отобранных CDR3. Сравнительному анализу подвергали представленность различных CDR3 в обогащенных библиотеках по сравнению с начальной библиотекой РС, считая мерой представленности CDR3 общее число последовательностей, несущих этот CDR3. На рисунке 9 приведена представленность

ной представляется ситуация, когда согласно анализу встречаемости H-CDR3 явный отбор по связыванию ОБМ и LMP-1 прошла последовательность ARGATSTRLLSRRGHAFDV, но методом моноклонального фагового ИФА мы не получили ни одного антитела с таким CDR3. Возможным объяснением может служить ограниченное число клонов, анализируемое при фаговом ИФА вручную. Подобная ситуация может возникнуть и в результате невысокой аффинности конкретного фагового клона к двум антигенам в формате моноклонального ИФА (низкий сигнал при ИФА), в результате чего данный клон не был выбран для дальнейшего анализа. Среди легких цепей потенциальной повышенной кроссреактивностью между ОБМ и МОГ обладал CDR3 клон e12. При этом он был эффективно отобран и в библиотеке LMP-1/ОБМ после обогащения на ОБМ, хотя при одиночном обогащении на LMP-1 не наблюдалось эффективного отбора на данный CDR3.

Дополнительно мы проанализировали, как изменяется длина CDR3 в процессе обогащения по сравнению с исходной библиотекой. При этом мы учитывали частоту встречаемости каждого уникального клона. Для тяжелых цепей при обогащении на МОГ характерно увеличения числа антител с CDR3 длиной 18 а.а., а для кросс-реактивных клонов к ОБМ и LMP1 увеличение CDR3 с длиной 7 или 19 а.о.. Интересно, что по отдельности для LMP1 характерно увеличение CDR3 с длиной 7 а.о., а для ОБМ – с 19 а.о., то есть кроссреактивные клоны объединили эти характеристики.

Взаимодействие двух белков во многом обусловлено наличием заряда в области их соприкосновения. Так как у антитела наибольшую роль в формировании сайта связывания играет CDR3, мы решили оценить вклад электростатических взаимодействий данного региона в специфичность связывания при отборе на разные антигены, а также в отборе кроссреактивных клонов. С этой целью мы определили частоту встречаемости CDR3 с разными зарядами для тяжелых и легких цепей (рис.10), учитывая количество прочтений для каждой последовательности. Можно отметить, что в библиотеке, обогащенной на МОГ, практически на треть уменьшилось количество нейтрально заряженных CDR3 тяжелых цепей и в 7 раз увеличилось количество CDR3 с суммарным высоким отрицательным зарядом (-4 и больше) во многом за счет сокращения положительного заряда (+1). В отборе на остальные антигены наблюдается смещение суммарного заряда в высокозаряженные области как положительные (+4), так и отрицательные (-4). Для легких цепей, в основном, наблюдается уменьшение количе-

ства нейтрально заряженных и увеличение слабоотрицательных CDR3 (-1 – у ОБМ, МОГ, двойного обогащения LMP-1/ОБМ и -1-2 у LMP-1). Из этих данных можно сделать вывод, что хотя изначально в библиотеке антител больных РС (РС на рис.10), в некоторой степени отражающей распределение антител в организме больного, преобладают и иммуноглобулины с нейтральными CDR3, тенденцию к проявлению аутореактивности в основном имеют антитела с заряженными остатками в антигенсвязывающих центрах. Причем у тяжелых цепей по сравнению с легкими наблюдается большее смещение заряда в крайние области по модулю – как в положительную, так и в отрицательную стороны. Это может свидетельствовать о более активном участии тяжелой цепи в формировании сайта связывания.

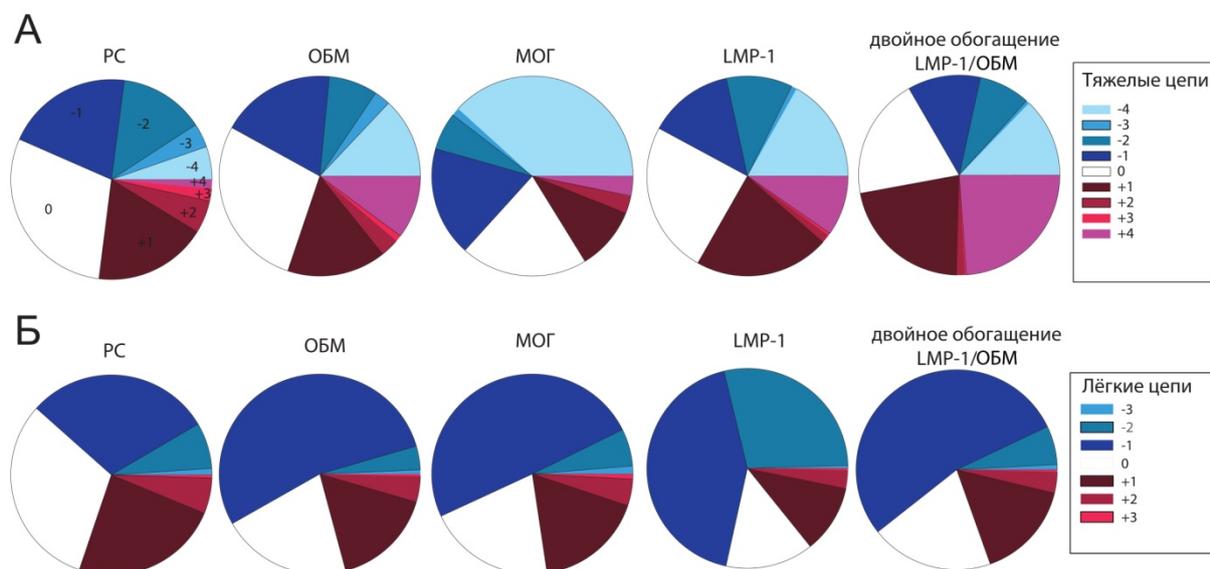


Рисунок 10. Распределение суммарного заряда CDR3 в библиотеках, обогащенных на разные антигены для тяжелых (А) и легких (Б) цепей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

На наш взгляд, высокая гомология антител, способных связывать ОБМ, с противовирусными антителами потенциально указывает на то, что первичной мишенью для подобных антител может служить ряд вирусных белков. Необходимо отметить, что наряду с потенциально патогенными кроссреактивными клетками активируются и нормальные клетки иммунной системы, направленные только на элиминацию вируса. Таким образом, далеко не все клетки, активированные вирусом, при попадании в ЦНС могут инициировать разрушение миелиновой оболочки. В результате работы нами определены гены зародышевой

линии, для которой характерна продукция именно патогенных кроссреактивных антител. На наш взгляд, для возникновения РС и активации патогенных В-клеток, наряду с генетическими и экологическими факторами, необходимо наличие не какого-либо определенного экзогенного патогена, а его способность, проникая в ЦНС, увлекать за собой клетки иммунной системы, что в итоге приводит к их «множественной и беспорядочной» активации.

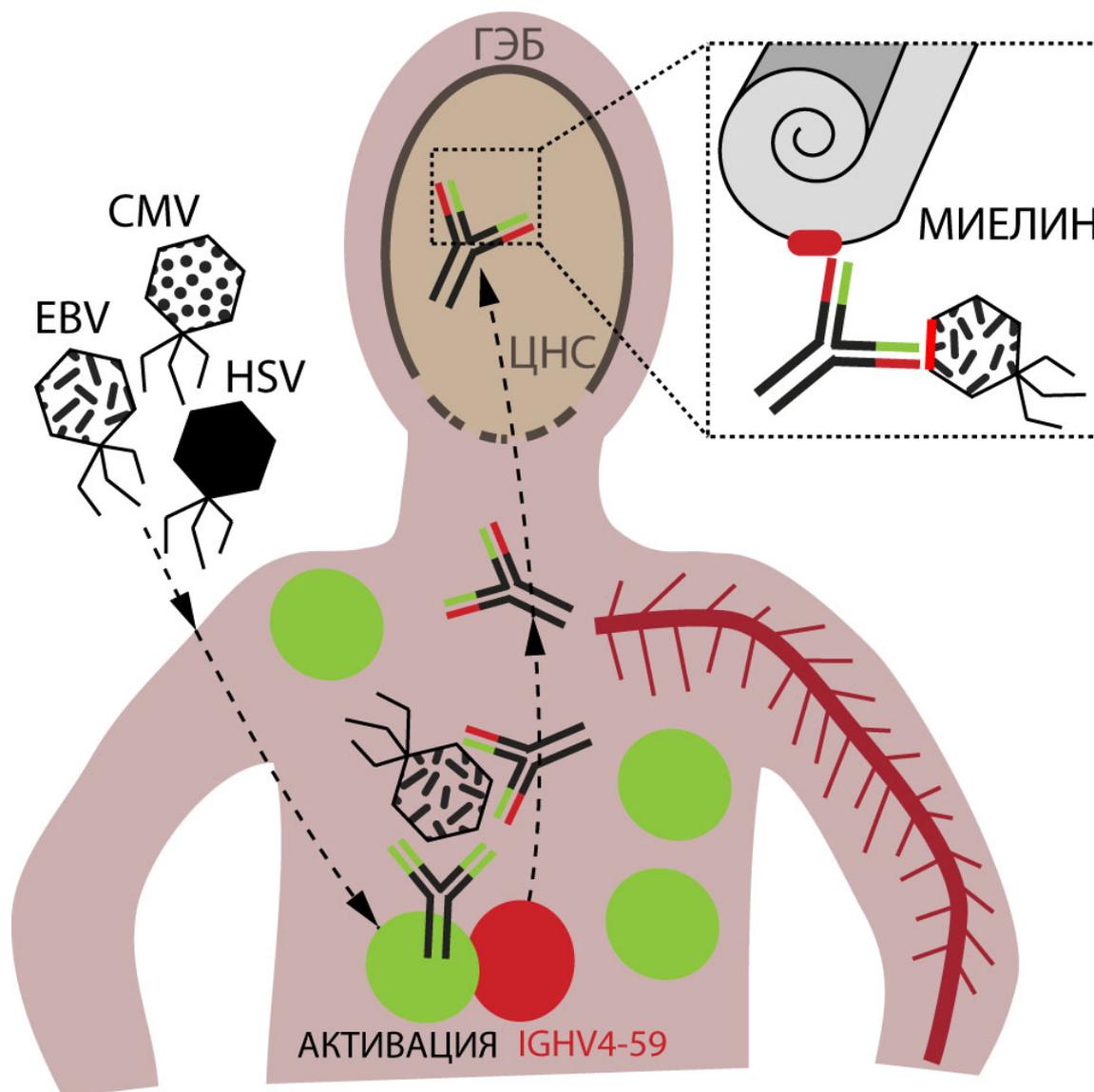


Рисунок 11. Предполагаемый механизм развития РС на основании полученных результатов и литературных данных.

ВЫВОДЫ.

1. В результате проведенной работы был отобран ряд одноцепочечных антител к ОБМ из фаг-дисплейной библиотеки больных РС. Впервые продемонстрирована *in vitro* кросс-реактивность полученного аутореактивного моноклонального IgG E2 по отношению к ОБМ и вирусному белку LMP1.
2. С использованием технологии Luminex показана полиреактивная природа ряда отобранных анти-ОБМ антител. Полученные данные, подтверждаемые структурной гомологией отобранных антител, свидетельствуют в поддержку непосредственного участия различных вирусов в индукции РС путем механизма молекулярной мимикрии.
3. Показано, что полиреактивность аутоантител при РС может реализовываться за счет сочетания двух цепей – тяжелой и легкой, при этом каждая из которых в большей степени отвечает за связывание своего антигена.
4. С помощью широкомасштабного секвенирования библиотек, предобогащенных на различные антигены, определены гены зародышевой линии, характерные для аутореактивных антител, специфичных к ОБМ (IGHV1-69, IGHV6-1, IGHV5-51, IGLV3-19, IGKV1-39), вирусному белку – LMP1 (IGHV1-18, IGHV1-3, IGLV10-54, IGLV1-47), а также полиреактивных антител (IGHV4-59 и IGHV1-8).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статьи:

1. Gabibov A.G., Belogurov A.A. Jr, **Lomakin Y.A.**, Zakharova M.Y., Avakyan M.E., Dubrovskaya V.V., Smirnov I.V., Ivanov A.S., Molnar A.A., Gurtsevitch V.E., Diduk S.V., Smirnova K.V., Avalle B., Sharanova S.N., Tramontano A., Friboulet A., Boyko A.N., Ponomarenko N.A., Tikunova N.V.. Combinatorial antibody library from multiple sclerosis patients reveals antibodies that cross-react with myelin basic protein and EBV antigen. *FASEB J.* 2011 Dec;25(12):4211-21. Epub 2011 Aug 22.

2. **Я.А. Ломакин**, М.Ю. Захарова, А.А. Белогуров, Н.А. Быкова, М.А. Дронина, А.Е. Тупикин, В.Д. Кнорре, А.Н. Бойко, А.В. Фаворов, М.Р. Кабилов, Н.А. Пonomаренко, А.Г. Габибов. Полиреактивные аутоантитела при рассеянном склерозе: функциональный отбор из фаг-дисплейной библиотеки в сочетании с методом широкомасштабного секвенирования. *АСТА NATURAE*, том 5, №4 (19) 2013, 104-115.

3. **Y.A. Lomakin**, M.Y. Zakharova, A.V. Stepanov, M.A. Dronina, I.V. Smirnov, T.V. Bobik, A.Y. Pyrkov, N.V. Tikunova, S.N. Sharanova, V.M. Boitsov, S.Y. Vyazmin, M.R. Kabilov, A.E. Tupikin, A.N. Krasnov, N.A. Bykova, Y.A. Medvedeva, M.V. Fridman, A.V. Favorov, N.A. Ponomarenko, M.V. Dubina, A.N. Boyko, V.V. Vlassov, A.A. Belogurov Jr. and A.G. Gabibov. Heavy–light chain interrelations of MS-associated immunoglobulins probed by deep sequencing and rational variation. *Mol. Immunol.* 2014 Feb 14 (In Press, Corrected Proof pii: S0161-5890(14)00023-6. doi: 10.1016/j.molimm.2014.01.013.).

Опубликованные тезисы конференций и доклады:

1. **Yakov A. Lomakin**, Alexey A. Belogurov Jr., Maria Yu. Zakharova, Natalia A. Ponomarenko, Nina V. Tikunova, A.G. Gabibov. Human anti-MBP monoclonal antibodies crossreact with LMP1 (EBV protein). *Late Abstracts FEBS Journal*, Volume 279, Issue s1, September 2012, Pages: 600–608.

2. **Lomakin Y.A.** , Zaharova M.Y., Belogurov A.A. Jr., Avakyan M.E., Ponomarenko N.A., Gabibov A.G. Anti-myelin basic protein antibodies selected from ScFv phage display library based on lymphocytes derived from Multiple Sclerosis patients have structural homology with MS-associated natural autoantibodies. Poster presentation. Biocatalysis 2009: Fundamentals & Applications, June 19-24, 2009, Arkhangelsk, Russian Federation.

3. **Ломакин Я.А.**, Захарова М.Ю., Белогуров А.А., Быкова Н.А., Фаворов А.В., Кабилов М.Р., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г. Изучение зависимости свойств иммуноглобулинов от длины CDR3 тяжелой цепи на примере больных рассеянным склерозом. Доклад. XXVI зимняя молодежная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 10-14 февраля (2014), Москва, Российская Федерация.

4. **Ломакин Я.А.**, Захарова М.Ю., Белогуров А.А., Тикунова Н.В., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г. Кросс-реактивность антител, отобранных из фаг-дисплейной библиотеки больных рассеянным склерозом на основной белок миелина с Ipr1 вируса эпштейна-барр Постер. Научная конференция «X чтения памяти академика Ю.А.Овчинникова», 14-17 ноября (2011), Москва - Пушкино, Российская Федерация.

5. **Ломакин Я.А.**, Захарова М.Ю., Белогуров А.А., Авакян М.Э., Дубровская В.В., Пономаренко Н.А., Тикунова Н.В., Габибов А.Г. Кроссреактивность антител, отобранных из фаг-дисплейной библиотеки больных рассеянным склерозом на основной белок миелина с LMP1 вируса Эпштейн-Барр Постерная презентация. V Российский симпозиум «Белки и пептиды» Петрозаводск, 8-12 августа 2011 г.